

APROVECHAMIENTO DE LA CÁSCARA DE AGRAZ (*Vaccinium meridionale*) COMO ANTIOXIDANTE CONTRA OXÍGENO SINGULETE Y RADICALES LIBRES

VALORIZATION OF AGRAZ (*Vaccinium meridionale*) WASTE AS ANTIOXIDANT AGAINST SINGLET OXYGEN AND FREE RADICALS

Carlos E. Diaz-Uribe¹, Carlos D. Grande-Tovar², Víctor A. Escobar-Cepeda³, William Vallejo-Lozada⁴, Amner Muñoz-Acevedo⁵

¹Doctor en Química, Grupo de Investigación en Fotoquímica y Fotobiología Universidad del Atlántico. Barranquilla, Colombia. ORCID: 0000-0003-3208-1696

²Doctor en Ciencias Químicas, Grupo de Investigación en Fotoquímica y Fotobiología Universidad del Atlántico. Barranquilla, Colombia. ORCID:0000-0002-6243-4571

³Químico, Grupo de Investigación en Fotoquímica y Fotobiología Universidad del Atlántico. Barranquilla, Colombia. ORCID: 0000-0002-3377-1712

⁴Doctor en Ciencias Químicas, Grupo de Investigación en Fotoquímica y Fotobiología Universidad del Atlántico. Barranquilla, Colombia. ORCID:0000-0002-6661-545X

⁵Doctor en Química, Grupo de Investigación en Química y Biología, Universidad del Norte. Barranquilla, Colombia. ORCID:0000-0003-2145-1495

E-mail: carlosdiaz@uniatlantico.edu.co

Recibido: 11/04/2020
Aceptado: 26/06/2020

Cite this article as: C. E. Diaz-Uribe, C. D. Grande-Tovar, V. A. Escobar-Cepeda, W. Vallejo-Lozada, A. Muñoz-Acevedo, "Aprovechamiento de la cáscara de agraz (*vaccinium meridionale*) como antioxidante contra oxígeno singulete y radicales libres", *Prospectiva*, Vol 18, N° 2,, 2020.

<http://doi.org/10.15665/rp.v18i2.2335>

RESUMEN

Actualmente muchas investigaciones se han enfocado en el análisis de la capacidad antioxidante de extractos provenientes de residuos agroindustriales, gracias a su contenido en metabolitos secundarios tales como los fenoles, flavonoides, antocianinas y carotenos, y a su capacidad de reaccionar con radicales libres y varias especies reactivas del oxígeno. En este trabajo el extracto de los residuos de la cáscara de la fruta *Vaccinium meridionale* fue utilizada para determinar la actividad antioxidante frente al oxígeno singulete y a los radicales libres 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) y 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolona)-6-sulfónico (ABTS). El análisis del contenido total de fenoles (TPC) del extracto demostró una cantidad de grupos fenólicos importante (alrededor de 99,30±3,15 mg de ácido gálico/100 g de fruta fresca). Por otra parte, la caracterización por cromatografía líquida (HPLC-DAD) mostró la presencia en el extracto de seis antocianinas de mayor abundancia relativa (la delfinifina-3-glucósido, la delfinifina-3-arabinósida, la cianidina-3-glucósido, la cianidina-3-arabinósido, la cianidina-3-galactósido y una antocianina no identificada). El porcentaje de desactivación del oxígeno singulete fue determinado a diferentes concentraciones del extracto etanólico, encontrándose un valor del 51 % a una concentración 0.4 mg/mL, mientras que el IC50 por el método ABTS fue de 311,5 µg/mL y por el método DPPH de 65,96 µg/mL.

Palabras clave: Antocianinas, oxígeno singlete, capacidad antioxidante, agraz, radicales libres.

ABSTRACT

Currently, many investigations have focused on the analysis of the antioxidant capacity of extracts from agro-industry wastes, thanks to their content in secondary metabolites such as phenols, flavonoids, anthocyanins, and carotenes, and their ability to react with free radicals and various oxygen reactive species. In this work, extracts of the *Vaccinium meridionale* fruit-shell was used to determine the antioxidant activity against singlet oxygen and free radicals 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH) and 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS). The analysis of the total phenolic content (TPC) of the extract showed a significant content of phenolic groups (around 99.30 ± 3.15 mg of gallic acid/100 g of fresh fruit). On the other hand, the characterization by liquid chromatography (HPLC-DAD) showed the presence in the extract of six anthocyanins with the larger relative abundance (delphinidine-3-glucoside, delphinidine-3-arabioside, cyanidine-3-glucoside, cyanidine-3-arabioside, cyanidine-3-galactoside, and an unidentified anthocyanin). The percentage of deactivation of singlet oxygen was determined at different concentrations of the ethanolic extract, with a value of 51% at a concentration of 0.4 mg/mL, while the IC_{50} by the ABTS method was 311.5 μ g/mL and by the DPPH method of 65.96 μ g/mL.

Keywords: Anthocyanins, singlet oxygen, antioxidant capacity, agraz, free radicals.

1. INTRODUCCIÓN

La población mundial está creciendo cada año a un ritmo desenfrenado y con ello la producción de residuos, especialmente provenientes de actividades agropecuarias y urbanas los cuales representan una fuente muy económica de compuestos de alto valor agregado susceptibles de aprovechamiento [1-3]. En este sentido, el uso de residuos agroindustriales representa una opción para transformarlos en nuevas materias primas que se perfilan como una alternativa para conseguir compuestos con propiedades benéficas para la salud humana. La valorización de residuos agroindustriales para la producción de sustancias antioxidantes es de suma importancia debido a la creciente demanda de productos naturales antioxidantes, al tiempo que se da una alternativa sostenible y ambientalmente amigable para el tratamiento de residuos [1-4].

Las características o composición química y biológica de los residuos agroindustriales dependen del proceso de transformación y de la materia prima utilizada. En el caso de las frutas, así como de sus residuos, se conoce que son alimentos ricos en compuestos fenólicos y antocianinas con demostrada actividad antioxidante contra especies reactivas del oxígeno [8-10]. Estas especies como el radical anión superóxido, el radical hidroxilo, el oxígeno singlete y otros radicales, son moléculas derivadas de procesos fisiológicos normales, esenciales para varios procesos fisiológicos, como la fosforilación de proteínas, la activación del factor de transcripción, la diferenciación celular, la apoptosis, la inmunidad celular y como mensajeros secundarios en la regulación del funcionamiento de las células cardíacas y vasculares [11]. La exposición excesiva de estas moléculas en las células causa el estrés oxidativo, situación que puede tener efectos perjudiciales sobre el ADN, las proteínas y los lípidos [12, 13]. Además, el estrés oxidativo es una de las principales causas de enfermedades como el cáncer, la diabetes mellitus, los trastornos metabólicos, la aterosclerosis, las enfermedades cardiovasculares (hipertensión, cardiopatía isquémica, insuficiencia cardíaca crónica) y enfermedades neurodegenerativas [14].

Por ello, la célula se protege contrarrestando estas alteraciones, mediante la acción de sistemas enzimáticos antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), la lactoferrina, la catalasa, la glutatión peroxidasa, la tiorredoxina reductasa y la glutatión reductasa [15]. La célula también usa sistemas no enzimáticos donde se incluyen moléculas antioxidantes como las vitaminas E y C, flavonoides y carotenoides provenientes de la dieta, en su lucha antioxidante [16]. También se ha hecho uso de compuestos antioxidantes sintéticos como el butilhidroxitolueno (BHT) y el butilhidroxianisol (BHA), mejorando la calidad de vida al evitar enfermedades causadas por el estrés oxidativo y efectos adversos por compuestos sintéticos ya que ayudan a reducir el daño causado por los radicales libres [11]. Sin

embargo, la toxicidad que tienen de manera inherente su aplicación ha generado el rechazo de los consumidores disminuyendo su interés e impulsando el consumo de antioxidantes naturales [18, 19]. Esto ha ocasionado mayor interés en la búsqueda de antioxidantes de origen natural. Dentro de los compuestos con propiedades antioxidantes se encuentran los compuestos fenólicos como flavonoides, taninos, ácidos fenólicos y muchas otras moléculas con sistemas electrónicos π -conjugados, presentes en vegetales y frutas, representando una gran alternativa para la terapia preventiva de enfermedades como las anteriormente descritas [20-22].

Por otro lado, el género *Vaccinium* contiene cerca de 400 especies y los frutos han atraído el interés de muchos investigadores alrededor del mundo, debido al alto contenido de compuestos polifenólicos presentes, tales como ácido cinámico, flavonoles, antocianinas y antocianidinas [17]. Dentro de este grupo de plantas ricas en sistemas conjugados se puede encontrar el mortiño o agraz (*Vaccinium meridionale*) que posee potencial actividad antioxidante, gracias a su composición química rica en fenoles y antocianinas [24, 25]. El extracto del fruto de agraz ha sido aplicado en productos cárnicos con el fin de aportar actividad antioxidante con ingredientes naturales [26], para el tratamiento de desórdenes metabólicos en mujeres [27] e incluso se han hecho estudios in vivo de la capacidad terapéutica del extracto de agraz en isquemia-reperfusión en ratas albinas [28], demostrando su versatilidad y potencial.

En el caso del fruto del agraz nativo de Colombia (*Vaccinium meridionale Swartz*), la presencia de compuestos fenólicos y antocianinas han mostrado buena actividad antioxidante contra radicales libres [17]. Por otra parte, diferentes tipos de actividades biológicas interesantes han sido ampliamente estudiadas en Colombia. Por ejemplo, la actividad anticancerígena y antioxidante del extracto acuoso de agraz (*V. meridionale Sw.*) fue determinada por Maldonado-Celís *et al.* (2014), quienes encontraron una alta capacidad antioxidante y anti radicalaria a través de métodos de fluorescencia (capacidad de atrapar especies reactivas del oxígeno y especies reactivas de nitrógeno), gracias a su alto contenido de antocianinas y ácidos fenólicos [23]. En el estudio se evidenció una alta capacidad anti proliferativa en células de adenocarcinoma de colon (SW480) y sus derivadas metastásicas (SW620).

Zapata-Vahos *et al.* (2016) prepararon tres bebidas alcohólicas distintas a partir de diversos métodos de maceración del extracto etanólico de *Vaccinium meridionale Sw.*, gracias a su alto contenido de polifenoles y determinaron mediante los métodos FRAP, DPPH y ORAC su capacidad antioxidante (sin ser afectada negativamente por el proceso de fermentación del extracto), así como su capacidad de disminuir el crecimiento de células cancerígenas del colón (línea celular SW480), demostrando buena capacidad antioxidante y reduciendo la viabilidad celular de esta línea cancerígena hasta en un 37% [24].

Debido a que el fruto de agraz se cosecha únicamente dos veces al año (mayo y diciembre), el uso de técnicas de almacenamiento y preservación que permitan mantener o reducir la pérdida de la actividad antioxidante de los extractos del fruto de agraz es importante para su futura aplicación [25]. Gaviria-Montoya *et al.* (2012) determinaron que el fruto de agraz (*V. meridionale*) presenta cambios en su actividad antioxidante, debido al estrés oxidativo que presentan sus frutos, determinando que el día óptimo de cosecha es el día 143, ya que posterior a este día, la actividad antioxidante no cambia, pero el contenido de antocianinas si puede continuar incrementándose aún en etapa postcosecha [26]. Por ello, Franco-Tobón *et al.* (2016) estudiaron el efecto de conservar la pulpa de agraz por congelación (PAC) y por liofilización (PAL) en la composición química, actividad antioxidante y parámetros microbiológicos, encontrando que el método de liofilización es más conveniente para conservar el contenido de antocianinas y polifenoles en comparación con la congelación, lo cual permitió mantener la capacidad antioxidante más alta durante 60 días de estudio, proyectando esta técnica de conservación para los productores como una alternativa de abastecimiento para el mercado [27].

En este trabajo se utilizó la cáscara del fruto de agraz con el fin de extraer los compuestos fenólicos y antocianinas presentes en el residuo. Así mismo, se evaluó la actividad antioxidante contra el oxígeno singulete y frente a radicales libres por los métodos ABTS y DPPH.

2. METODOLOGÍA

2.1. Selección, obtención y pretratamiento de los residuos

Para la obtención de la muestra se recolectó 500 g de residuos de la cáscara de la fruta *V. meridionale* en condiciones óptimas de maduración en la ciudad de Santa Rosa de Osos (Norte de Antioquia), Colombia, de coordenadas; 6°38'50"N 75°27'38"O de altitud media 1.5 msnm, durante la última semana del mes de mayo, época de recolección recomendada para esta fruta. Las cáscaras de los residuos de agraz se almacenaron a -15°C con la finalidad de minimizar los cambios bioquímicos que se pudiesen presentar hasta el momento de realizar los análisis respectivos.

Los residuos de cáscara de la especie *V. meridionale*, se lavaron con agua destilada, posteriormente se secaron en un horno a 45°C por un periodo de 5 días. Se pesó periódicamente, hasta que éste permaneció constante. Una vez obtenida la muestra deshidratada se procedió a homogeneizar la piel con el fin de aumentar el área de contacto con el solvente. Se pesó 100 g del material macerado y se depositó en un percolador. Se adicionó etanol:agua en proporción volumétrica 1:2. Luego de (72) horas, se procedió a recoger las fracciones obtenidas. Se concentró el extracto en un rota-evaporador por 10 minutos y una temperatura de 60°C, retirando el solvente.

2.2. Determinación del contenido total de fenoles

La cantidad del contenido total de fenoles fue determinada espectrofotométricamente usando el método de Folin-Ciocalteu [29]. Brevemente, se mezcló 1 ml de solución de extracto con 2,5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu al 10% (p/v). Después de 5 minutos, se añadieron 2,0 mL de Na₂CO₃ (75%) a la mezcla y se incubaron a 50°C durante 10 minutos con agitación. Posteriormente, la muestra se enfrió y se midió la absorbancia utilizando un espectrofotómetro UV a 765 nm contra un blanco sin extracto. Los datos de resultado se expresaron como mg/g de equivalentes de ácido gálico en miligramos por gramo (mg GAE/g) de fruta fresca.

2.3. Determinación del contenido antocianinas

Para el análisis de las antocianinas totales presentes en el extracto etanólico se utilizó un espectrofotómetro UV-vis (*Thermo Fisher Scientific*, modelo *Genesys 10S UV-Vis*) para determinar el espectro de absorción UV-Vis del total del extracto. Posteriormente, se realizó determinación analítica de antocianinas utilizando un cromatógrafo líquido UHPLC *Ultimate 3000 (Dionex-Thermo Fisher Scientific, Inc.)* equipado con una bomba cuaternaria de alta presión y un detector de diodos (DAD, UV/Vis). El resultado fue la separación de antocianinas mediante una columna *Capcell-Pak® C18 UG120 S-5 (120 Å, 5 µm) (250 mm x 4,6 mm I.D, Shiseido Co, Tokio)*. Los datos fueron adquiridos y procesados por el software *Chromeleon® 7 Chromatography Data System (Versión 7.2.1.5833, Thermo Fisher Scientific, Inc.)*.

El resultado se expresó en µg/mL de antocianinas totales equivalentes al estándar de referencia cloruro de delfinidina (TAEDC). Esta metodología se basó en la estandarización externa utilizando una curva de calibración, que se obtuvo de las diferentes soluciones del estándar Cloruro de Delfinidina (1,0 µg/mL y 100,0 µg/mL). Condiciones cromatográficas: Caudal: 0,6 mL/min, volumen de inyección: 15 µL, temperatura del horno: 25°C, longitud de onda de detección: 255 nm, 285 nm, 325 nm, 525 nm, fase móvil (agua / ácido fórmico / acetonitrilo): A (83:10:7) y B (40:10:50), Gradiente elución – 0 min - 2 min (95% - 93% A), 4.5 min (93% A), 5.5 min (92% A), 6.5 min - 7.5 min (88% A), 7.8 min - 8 min (86% A), 8.5 min - 13 min (84% A), 13.5 min (80% A), 15 min (75% A), 20 min (70% A), 30 min (65% A), 40 min (95% A).

2.4. Evaluación de la actividad antioxidante

2.4.1 Determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS (azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico).

Se prepararon 10 mL de una solución de ABTS 7 mM a partir de 38,4 ± 0,1 mg de ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico. Luego se preparó una solución de persulfato de potasio 2,45 mM con

66,2mg de $K_2S_2O_8$ en 100 mL de agua desionizada. Una vez se prepararon las dos soluciones, se tomaron 10 mL de cada una y se depositaron en un recipiente ámbar durante 16 horas en la oscuridad, para obtener el radical ABTS. Posteriormente, se realizó una dilución de la solución del radical ABTS con agua desionizada o etanol absoluto hasta una absorbancia $0,70 \pm 0,02$ a una longitud de onda de 734nm. Seguidamente, se tomaron $100 \pm 0,2$ μ L de extracto y se mezclaron con $3,0 \pm 0,1$ mL de la solución del radical ABTS. El blanco consistió de $3,0 \pm 0,1$ mL de solución del radical ABTS y $100 \pm 0,2$ μ L de solvente utilizado para la extracción (etanol). Cada muestra se dejó reaccionar por seis minutos y se determinó su absorbancia a una longitud de onda de 734 nm. El resultado se obtuvo al interpolar el porcentaje de inhibición de la muestra en la curva de calibración (determinada con la ecuación 1), obteniendo la concentración de Trolox equivalente y se expresó como capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC, μ mol/g).

La actividad antioxidante se expresó como porcentaje de inhibición, lo cual corresponde a la cantidad de radical ABTS neutralizado por el extracto a una determinada concentración, de acuerdo con la ecuación 1:

$$\% \text{ inhibición} = \%I = \frac{A - A_1}{A} * 100 \quad (1)$$

Donde A es la absorbancia del blanco y A1 es la absorbancia de la muestra. El resultado se expresó como capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC, μ mol/g).

2.4.2 Determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH (2,2- difenil-1-picrilhidrazilo)

Se preparó una solución stock de DPPH a una concentración de (10 mg/L). Con $1,0 \pm 0,1$ mg de 2,2- difenil-1-picrilhidracilo disuelto en $100 \pm 0,02$ mL de metanol anhidro y luego con metanol grado HPLC se ajustó la solución a una absorbancia de $0,70 \pm 0,02$ a una longitud de onda de 517 nm. La actividad antioxidante se expresó como porcentaje de inhibición, lo cual corresponde a la cantidad de radical DPPH neutralizado por el extracto a una determinada concentración, de acuerdo con la ecuación 1.

2.4.2 Determinación de la actividad antioxidante contra oxígeno singulete

El oxígeno singulete fue generado siguiendo la metodología propuesta por Aubry [30], por medio del sistema Na_2MoO_4/H_2O_2 , en la oscuridad y en presencia de rubreno (0.02 M). Se preparó una mezcla de 4,7 g (0,016 moles) de dodecil sulfato de sodio (SDS) con 9,4 g (0,13 moles) de 1-butanol y se agregó a 60 mL (0,93 moles) de diclorometano formando la fase continua de la microemulsión. Luego se adicionó a esta microemulsión 6 mL de una solución 0,2 M de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ($1,2 \times 10^{-3}$ moles), gota a gota con agitación constante hasta obtener una emulsión transparente (pH=10). La microemulsión originada corresponde a una micela tipo (W/O) o micela invertida. Para la generación de oxígeno singulete se adicionó 100 μ L de H_2O_2 .

El seguimiento de la reacción se realizó a 522 nm. El porcentaje de desactivación (%Q) se determinó por medio de la siguiente ecuación 2:

$$\%Q = \left[1 - \frac{\Delta A_{ao}}{\Delta A_c} \right] \times 100 \quad (2)$$

Donde el ΔA_{ao} corresponde a un cambio de la absorbancia en presencia del extracto y ΔA_c , es el cambio de la reacción control, es decir, en ausencia del extracto.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

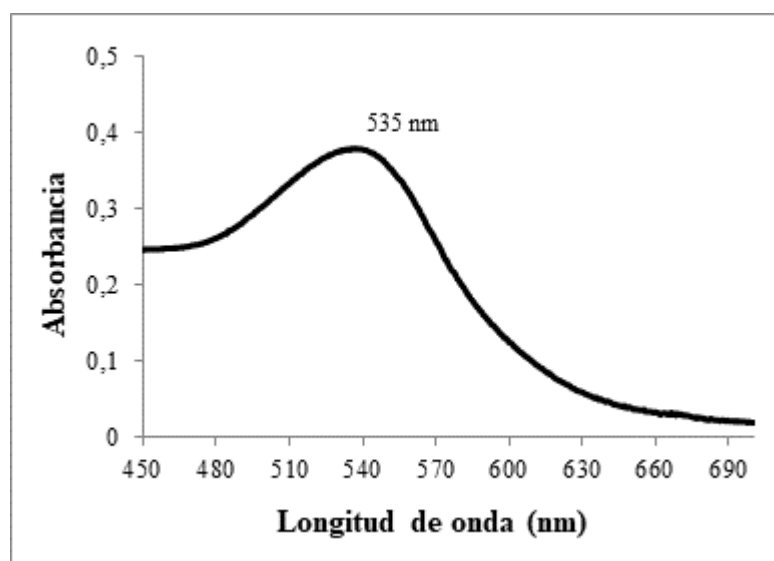
3.1. Determinación del contenido total de fenoles

Por cada 100 gramos de fruta fresca se obtuvo 3,15 g de extracto seco. El contenido total de fenoles reportado para las *V. meridionale* es de $758,6 \pm 62,3$ mg ácido gálico equivalente/100 g de fruta fresca, [23] y para esta metodología fue de $89,30 \pm 3,15$ mg de ácido gálico/100 g de fruta fresca.

3.2. Determinación de antocianinas

En la figura 1 se muestra el espectro UV-Vis del extracto total etanólico de los residuos de cáscara de agraz. Se puede observar una banda de absorción en el rango de 450 a 690 nm, con una longitud de onda máxima a 535 nm. De acuerdo con la estructura de las antocianinas, estas presentan máximos de absorción tanto en la región ultravioleta como en la región visible del espectro electromagnético. La absorción máxima entre 520-600 nm en la región visible del espectro electromagnético es la región comúnmente utilizada en los ensayos espectrofotométricos para la caracterización de antocianinas [31-33].

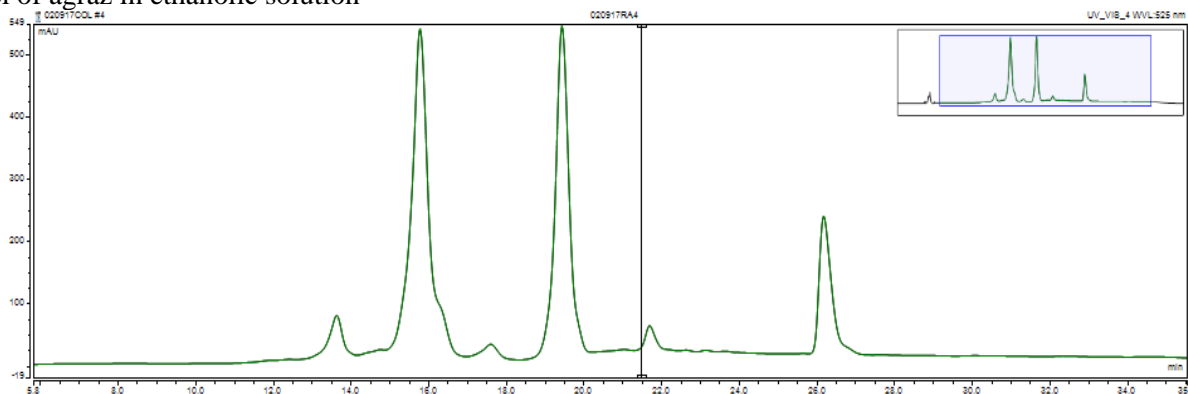
Figura 1. Espectro UV-Vis del extracto total etanólico
Figure 1. UV-Vis spectrum of the total ethanolic extract



El contenido total de antocianinas presente en el extracto etanólico de agraz fue de $48 \pm 5 \mu\text{g}$ ATECD/mL de extracto. Para tal fin se utilizó un método de estandarización externo (curva de calibración) utilizando cloruro de delfinidina. El cromatograma obtenido por HPLC-DAD (λ 285 y nm λ 525 nm) se presenta en la Figura 2.

Figura 2. Perfil cromatográfico por HPLC-DAD (λ 525 nm) de antocianinas encontradas en el extracto de la cáscara de agraz en solución etanólica

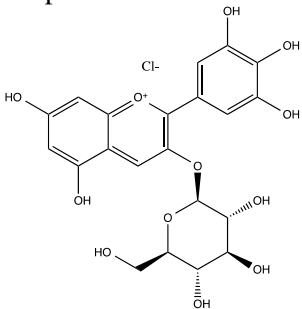
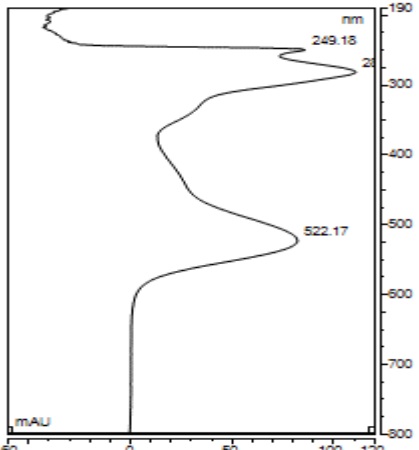
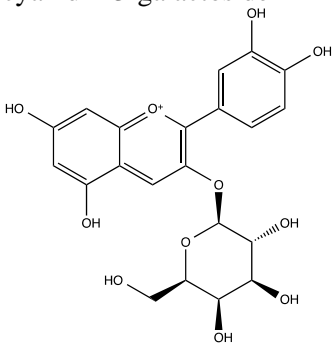
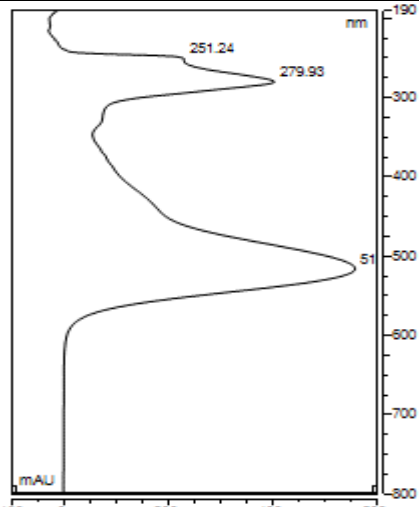
Figure 2. HPLC-DAD chromatographic profile (λ 525 nm) of anthocyanins found in the extract of the peel of agraz in ethanolic solution

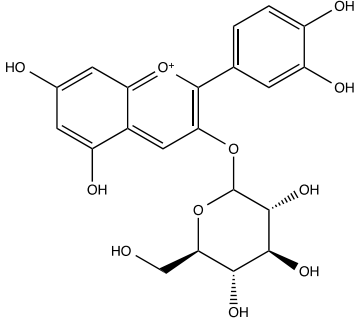
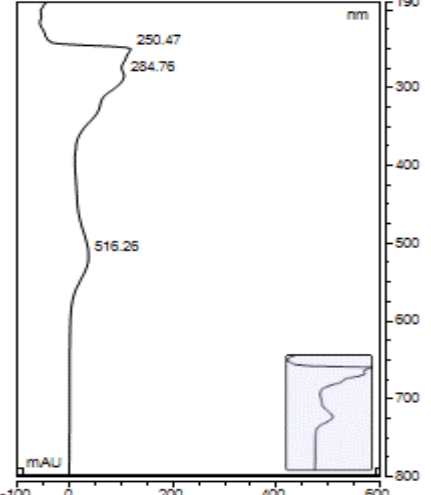
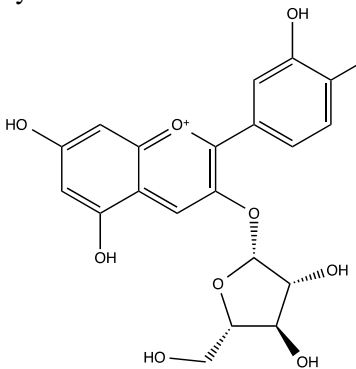
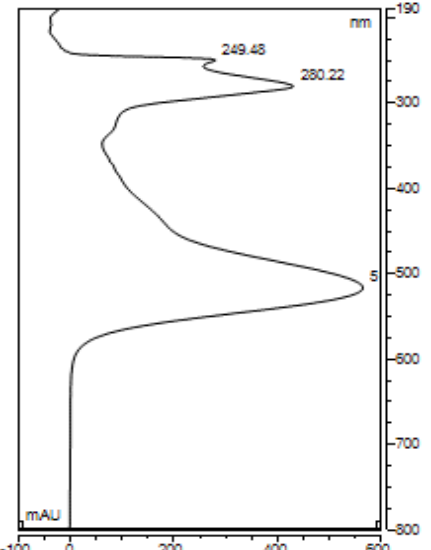
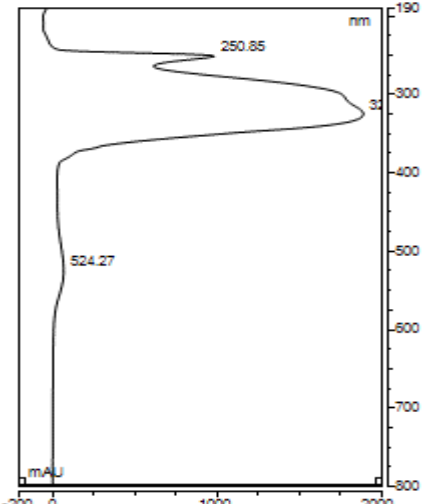


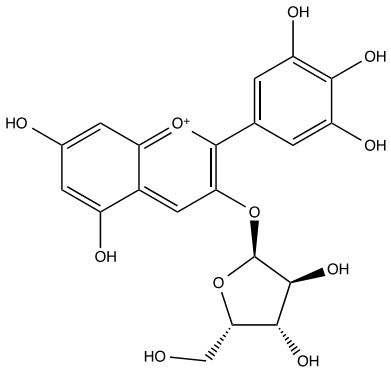
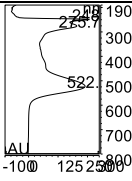
De acuerdo con el perfil cromatográfico, la cáscara del agraz contuvo 6 antocianinas principales, la delphinifina-3-glucósido, la delphinifina-3-arabinósida, la cianidina-3-glucósido, la cianidina-3-arabinósido, la cianidina-3-galactósido y una antocianina no identificada. En la tabla 1 se muestra el espectro UV-Vis y la estructura química de estos compuestos. El reconocimiento de las antocianinas se logró utilizando estándares comerciales y comparando el espectro de absorción de cada antocianina en la muestra con los espectros reportados en la literatura científica para cada antocianina [34-36]. Estos resultados concuerdan con los componentes encontrados en el fruto de Agraz colombiano y el silvestre de regiones del Ecuador. En Colombia aunque se conocen reportes sobre identificación y cuantificación de antocianinas sobre el fruto de Agraz, no se encontraron reportes sobre identificación de antocianinas específicamente en la cáscara del *Vaccinium meridionale* Swartz de la región colombiana [23].

Tabla 1. Caracterización con HPLC-DAD de las antocianinas presentes en el extracto de la fruta *Vaccinium meridionale*.

Table 1. HPLC-DAD characterization of the anthocyanins present in the extract of the fruit *Vaccinium meridionale*.

Tiempo de retención (min)	Porcentaje de abundancia %	Nombre y estructura	Espectro de absorción UV-VIS
13,63	3%	Delphinidin 3-hexoside 	
15.78	40 %	cyanidin-3-galactoside 	

<p>17.63</p>	<p>1%</p>	<p>cyanidin 3-glucoside</p>  <p>The structure shows a cyanidin cation core (a chromone ring with a quinonoid oxygen and a 3,4-dihydroxyphenyl group) linked at the 3-position to a glucose molecule in its pyranose form. The glucose has hydroxyl groups at C2, C3, C4, and C6, and a hydroxymethyl group at C5.</p>	 <p>UV-Vis spectrum showing absorbance (mAU) versus wavelength (nm). The x-axis ranges from -100 to 600 nm, and the y-axis ranges from 190 to 800 mAU. The spectrum shows a broad absorption band with peaks at 250.47 nm and 284.76 nm, and a shoulder at 516.26 nm. An inset shows a zoomed-in view of the 400-600 nm region.</p>
<p>19.44</p>	<p>38 %</p>	<p>cyanidin-3-arabinoside</p>  <p>The structure shows a cyanidin cation core linked at the 3-position to an arabinose molecule in its furanose form. The arabinose has hydroxyl groups at C2, C3, and C4, and a hydroxymethyl group at C5.</p>	 <p>UV-Vis spectrum showing absorbance (mAU) versus wavelength (nm). The x-axis ranges from -100 to 600 nm, and the y-axis ranges from 190 to 800 mAU. The spectrum shows a broad absorption band with peaks at 249.48 nm and 280.22 nm, and a shoulder at 516.26 nm. An inset shows a zoomed-in view of the 400-600 nm region.</p>
<p>21.70</p>	<p>2%</p>	<p>No identificada</p>	 <p>UV-Vis spectrum showing absorbance (mAU) versus wavelength (nm). The x-axis ranges from -200 to 2000 nm, and the y-axis ranges from 190 to 800 mAU. The spectrum shows a broad absorption band with peaks at 250.85 nm and 524.27 nm. An inset shows a zoomed-in view of the 400-600 nm region.</p>

26.19	16 %	<p>delphinidin-3-pentoside</p> 	
-------	------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------

3.3. Evaluación de la actividad antioxidante

3.3.1 Determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS (azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico).

El IC₅₀ se calculó en términos de concentración del extracto *V. meridionale* (µg/mL) y la cantidad equivalente en unidades del estándar de referencia (trolox por cada 100 gramos de fruta) (Tabla 2). Para el método ABTS, se calculó un IC₅₀ de 311,5 µg/mL.

Figura 3. Interpolación de los datos de actividad antioxidante obtenidos de las diferentes concentraciones del extracto por el método ABTS

Figure 3. Interpolation of data obtained the antioxidant activity from the different concentrations of the extract by the ABTS method.

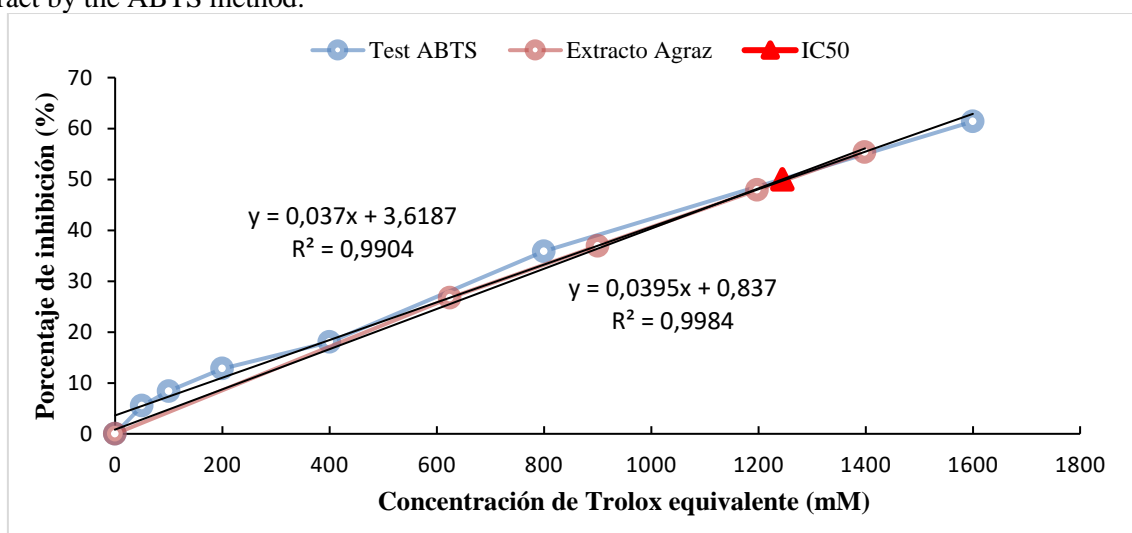


Tabla 2. Capacidad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS del extracto de *V. meridionale* a diferentes concentraciones.

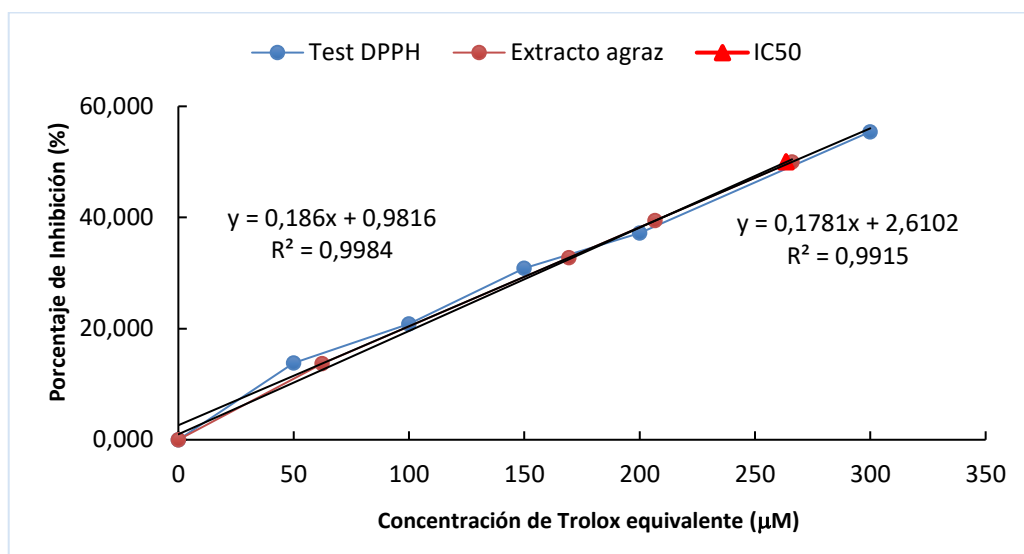
Table 2. Antioxidant capacity by the DPPH and ABTS methods of the *V. meridionale* extract at different concentrations.

μL extracto/mL	DPPH		ABTS	
	Concentración eq. Trolox (μM)	Porcentaje de inhibición (%)	Concentración eq. Trolox (μM)	Porcentaje de inhibición (%)
2	62,350	13,71	585,590	25,28
10	169,43	32,78	861,660	35,50
20	206,73	39,42	1197,56	47,92
50	266,09	50,00	1398,34	55,35

3.3.2 Determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH (2,2- difenil-1-picrilhidrazilo)
 El IC₅₀ se calculó en términos de concentración del extracto *V. meridionale* (μg/mL) y la cantidad equivalente en unidades del estándar de referencia (trolox por cada 100 gramos de fruta) (Tabla 1). De este análisis, se encontraron valores de IC₅₀ para el método DPPH de 65,96 μg/mL .

Figure 4. Interpolación de los datos de actividad antioxidante obtenidos de las diferentes concentraciones del extracto por el método DPPH

Figure 4. Interpolation of data obtained the antioxidant activity from the different concentrations of the extract by the DPPH method.



Para realizar el análisis, se tiene en cuenta que entre más bajo sea el IC₅₀, mayor será su capacidad antioxidante, ya que se requiere menor cantidad del extracto para lograr la inhibición. Los parámetros que indican el potencial antioxidante (PAO) son los siguientes:

- Valores menores a 30 μg/mL serán considerados de alto PAO.
- Valores entre 30 μg/mL y 100 μg/mL tendrán un PAO moderado.
- Valores superiores a 100 μg/mL estarán en el nivel bajo de PAO.

Lo anterior indicaría que el extracto de *V. meridionale* para el método DPPH sería considerado con un potencial antioxidante moderado y para el método de ABTS como uno de bajo PAO. Estos dos análisis

evalúan la capacidad de la muestra para neutralizar radicales libres, pero difieren en su modo de actuar ya que el DPPH es un radical libre estable soluble en metanol que es neutralizado mediante un mecanismo de transferencia de hidrógeno. Por otra parte, el ABTS es generado tras una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato potasio, ABAP), enzimática (peroxidasa, mioglobina) o electroquímica y su mecanismo de neutralización es principalmente por transferencia de electrones. Sin embargo, incluir el extracto de agraz sería una muy buena opción a la hora de elegir un componente rico en antioxidantes para diferentes aplicaciones, tanto alimentarias como no alimentarias. La capacidad antioxidante de los extractos del fruto de agraz tanto etanólicos como acuosos han sido ampliamente estudiados [24] a través de métodos de fluorescencia (capacidad de atrapar especies reactivas del oxígeno y especies reactivas de nitrógeno), gracias a su alto contenido de antocianinas y ácidos fenólicos [23]. Esta capacidad incluso se mantiene luego de procesos de fermentación para la producción de bebidas por distintos métodos de maceración y no se afecta negativamente. Además, estos extractos han mostrado también una capacidad muy interesante para disminuir la proliferación de células del colon cancerígenas (línea celular SW480) y sus derivadas metastásicas (SW620), reduciendo la viabilidad celular de esta línea cancerígena hasta en un 37% [24].

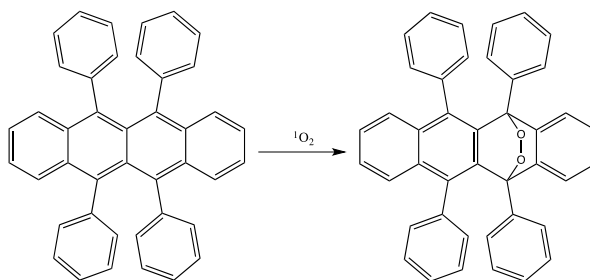
Otro aspecto a tener en cuenta muy importante es el uso de técnicas de almacenamiento y preservación que permitan mantener o reducir la pérdida de la actividad antioxidante de los extractos del fruto de agraz, ya que en Colombia se cosecha dos veces al año [25], pues se ha determinado que el fruto de agraz (*V. meridionale*) presenta cambios en su actividad antioxidante, debido al estrés oxidativo que presentan sus frutos, determinando que el día óptimo de cosecha es el día 143 [26]. Además, el uso del método de liofilización para conservar el contenido de antocianinas y polifenoles en comparación con otras técnicas de conservación resulta ser más efectivo para mantener la capacidad antioxidante, proyectando esta técnica de conservación para los productores como una alternativa de abastecimiento para el mercado [27].

3.3.3 Determinación de la actividad antioxidante contra oxígeno singulete

El oxígeno singulete fue generado químicamente el sistema $\text{MoO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{O}_2$. La descomposición del peróxido de hidrógeno por los iones molibdato se da por formación complejos intermediarios (oxoperoxomolibdatos) que se descomponen térmicamente liberando $^1\text{O}_2$ [37]. La micela preparada se comportó como una fase coloidal termodinámicamente estable, esto es debido al equilibrio del sistema ternario de dodecil sulfato de sodio como surfactante, el 1-butanol como co-surfactante y el diclorometano como el disolvente orgánico, que proporciona la fase apolar del sistema [38]. Al adicionarle el rubreno, la solución tomó un color naranja intenso característico del policíclico aromático hidrocarbonado. De acuerdo con lo reportado en la literatura, el sistema ternario provee una alta eficiencia en la producción de oxígeno singulete, el cual oxida al rubreno (color naranja) para formar un endoperóxido (ver figura 5), el producto oxidado es incoloro. Esta reacción se da mediante una cicloadición [4+2], el cual comprende un sistema de cuatro electrones π (los dienos en posición 5,6 u 11,12 del tetraceno) y uno de los dos electrones π del $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$)_(ac), y por lo tanto se genera un puente entre los carbonos [39].

Figura 5. Reacción del oxígeno singulete con el rubreno

Figure 5. Reaction of singlet oxygen with rubrene



El ion azida es un rápido desactivador físico del oxígeno singulete y es utilizado con regularidad para demostrar la implicación del $^1\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ en los procesos de oxidación [40]. Por tal motivo, se evidenció cualitativamente que, en presencia de NaN_3 , no se hay diferencia en la absorbancia de la microemulsión después de añadir el peróxido de hidrógeno. Esto indica que la azida de sodio desactivó el $^1\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ generado en el sistema, por lo tanto, no se presentó la oxidación del rubreno. De esta manera se comprueba la presencia del oxígeno singulete como la única especie reactiva del oxígeno en el medio de reacción.

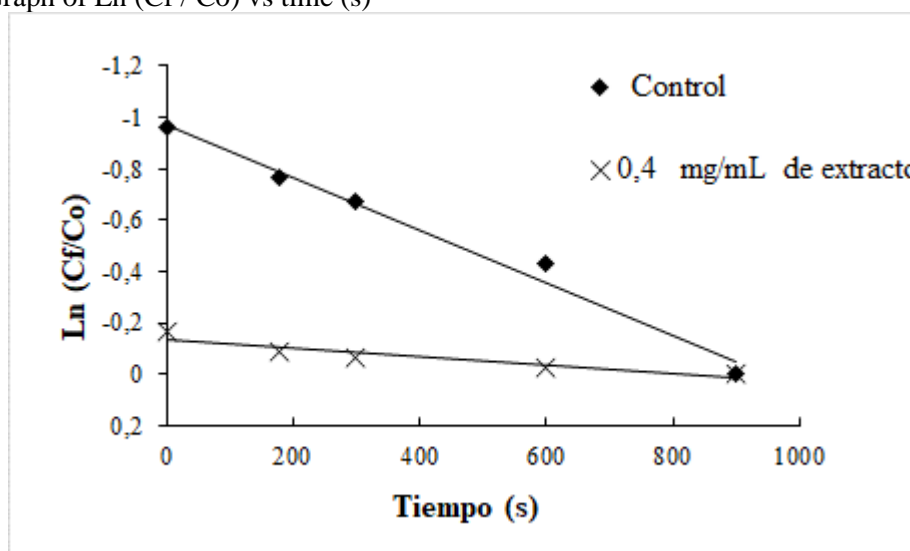
En la tabla 3 se muestran los porcentajes de desactivación del oxígeno singulete para diferentes concentraciones de extracto. Es posible evidenciar que a menores concentraciones del extracto se presentan menores valores del porcentaje de desactivación, esto es debido a que disminuye la cantidad de moléculas capaces de desactivar el oxígeno singulete.

Tabla 3. Porcentaje de la actividad antioxidante del extracto de residuos de cáscara de agraz
Table 3. Percentage of the antioxidant activity of the extract of peel residues of agraz.

<i>Concentración del extracto (mg/mL)</i>	<i>% Q (10 min)</i>
0,40	51%
0,16	40%
0,08	29%
0,03	22%

La oxidación del rubreno en ausencia o presencia del extracto siguió una cinética de pseudo-primer orden (Figura 6). La constante de velocidad para la reacción control (ausencia de extracto) presenta una constante de velocidad de $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, mientras que la constante de velocidad en presencia del extracto es de $2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, esto indica que el proceso de oxidación de la molécula modelo (rubreno) es más lento en presencia del extracto, lo que le confiere propiedades antioxidantes contra el oxígeno singulete.

Figura 6. Gráfico de $\text{Ln}(C_f/C_o)$ vs tiempo (s)
Figure 6. Graph of $\text{Ln}(C_f / C_o)$ vs time (s)



CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que el fruto de la especie *V. meridionale* es una fuente de compuestos con potencial actividad antioxidante contra el oxígeno singulete y los radicales libres

ABTS y DPPH. El extracto mostró cantidades apreciables de grupos fenólicos (alrededor de $99,30 \pm 3,15$ mg de ácido Gálico/100 g de fruta fresca). La caracterización por HPLC-DAD mostró la presencia de 6 antocianinas de mayor abundancia relativa. Finalmente, se pudo comprobar la capacidad antioxidante del extracto frente al oxígeno singulete ya que logró un 53% de desactivación del oxígeno singulete, a una concentración 0.4 mg/mL μ M a 10 minutos de reacción, un IC_{50} de 65,96 μ g/mL por el método DPPH y un IC_{50} de 311,5 μ g/mL por el método ABTS. Todos estos resultados demuestran el potencial del extracto de los residuos de la cáscara de *V. meridionale* como agente antioxidante con potencial aplicación en la industria cosmética y de alimentos.

REFERENCIAS

1. Castro-Vargas, H.I.; Baumann, W.; Ferreira, S.R.S.; Parada-Alfonso, F. Valorization of papaya (Carica papaya L.) agroindustrial waste through the recovery of phenolic antioxidants by supercritical fluid extraction. *J. Food Sci. Technol.* **2019**, *56*, 3055–3066.
2. Larios-Cruz, R.; Buenrostro-Figueroa, J.; Prado-Barragán, A.; Rodríguez-Jasso, R.M.; Rodríguez-Herrera, R.; Montañez, J.C.; Aguilar, C.N. Valorization of Grapefruit By-Products as Solid Support for Solid-State Fermentation to Produce Antioxidant Bioactive Extracts. *Waste and Biomass Valorization* **2019**, *10*, 763–769.
3. Shikha, S.; Satbir, S.; Sahil, G.; Kumar, B.B. Keratin-wastes valorization for production of hydrolysates with high antioxidant potential. *Res. J. Biotechnol. Vol* **2019**, *14*, 11.
4. Squillaci, G.; Veraldi, F.; La Cara, F.; Morana, A. Different extraction methods to produce antioxidants from agro-industrial wastes. In Proceedings of the Wastes: Solutions, Treatments and Opportunities III: Selected Papers from the 5th International Conference Wastes 2019, September 4-6, 2019, Lisbon, Portugal; CRC Press, 2019; p. 27.
5. Patlevič, P.; Vašková, J.; Švorc, P.; Vaško, L.; Švorc, P. Reactive oxygen species and antioxidant defense in human gastrointestinal diseases. *Integr. Med. Res.* **2016**, *5*, 250–258.
6. Sailaja Rao, P.; Kalva, S.; Yerramilli, A.; Mamidi, S. Free Radicals and Tissue Damage: Role of Antioxidants. *Free Radicals Antioxidants* **2011**, *1*, 2–7.
7. Valko, M.; Rhodes, Cj.; Moncol, J.; Izakovic, M.M.; Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* **2006**, *160*, 1–40.
8. Sies, H. On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. *Curr. Opin. Toxicol.* **2018**, *7*, 122–126.
9. Michiels, C.; Raes, M.; Toussaint, O.; Remacle, J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **1994**, *17*, 235–248.
10. Fang, Y.-Z.; Yang, S.; Wu, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* **2002**, *18*, 872–879.
11. Soares, D.G.; Andrezza, A.C.; Salvador, M. Sequestering ability of butylated hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol, and vitamins C and E against ABTS, DPPH, and hydroxyl free radicals in chemical and biological systems. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 1077–1080.
12. Carocho, M.; Ferreira, I.C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *51*, 15–25.
13. Pokorný, J. Natural antioxidants for food use. *Trends Food Sci. Technol.* **1991**, *2*, 223–227.
14. Lorenzo, J.M.; Pateiro, M.; Domínguez, R.; Barba, F.J.; Putnik, P.; Kovačević, D.B.;

- Shpigelman, A.; Granato, D.; Franco, D. Berries extracts as natural antioxidants in meat products: A review. *Food Res. Int.* **2018**, *106*, 1095–1104.
15. Xu, D.-P.; Li, Y.; Meng, X.; Zhou, T.; Zhou, Y.; Zheng, J.; Zhang, J.-J.; Li, H.-B. Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 96.
 16. Nimse, S.B.; Pal, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *Rsc Adv.* **2015**, *5*, 27986–28006.
 17. Quintero-Quiroz, J.; GALVIS-PÉREZ, Y.; Galeano-Vasquez, S.; Marin-Echeverri, C.; Franco-Escobar, C.; Ciro-Gomez, G.; Nunez-Rangel, V.; Aristizabal-Rivera, J.C.; Barona-Acevedo, J. Physico-chemical characterization and antioxidant capacity of the colombian berry (*Vaccinium meridionale Swartz*) with a high-polyphenol content: potential effects in people with metabolic syndrome. *Food Sci. Technol.* **2019**, *39*, 573–582.
 18. MONTOYA, C.G.; OSPINA, C.O.; MESA, N.S.; CANO, C.M.; ARIAS, M.L.; GARCÍA, P.G.; MARTÍNEZ, A.M.; TENORIO, A.T.; PÉREZ, Y.L.; ROJANO, B. Actividad antioxidante e inhibición de la peroxidación lipídica de extractos de frutos de mortiño (*Vaccinium meridionale SW*). *Boletín Latinoam. y del Caribe Plantas Med. y Aromáticas* **2009**, *8*, 519–528.
 19. Lopera, Y.E.; Fantinelli, J.; González Arbeláez, L.F.; Rojano, B.; Ríos, J.L.; Schinella, G.; Mosca, S. Antioxidant activity and cardioprotective effect of a nonalcoholic extract of *Vaccinium meridionale Swartz* during ischemia-reperfusion in rats. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* **2013**, *2013*.
 20. López-Padilla, A.; Martín, D.; Villanueva Bermejo, D.; Jaime, L.; Ruiz-Rodriguez, A.; Restrepo Flórez, C.E.; Rivero Barrios, D.M.; Fornari, T. *Vaccinium meridionale Swartz* extracts and their addition in beef burgers as antioxidant ingredient. *J. Sci. Food Agric.* **2018**, *98*, 377–383.
 21. Marín-Echeverri, C.; Blesso, C.; Fernández, M.; Galvis-Pérez, Y.; Ciro-Gómez, G.; Núñez-Rangel, V.; Aristizabal, J.; Barona-Acevedo, J. Effect of Agraz (*Vaccinium meridionale Swartz*) on High-Density Lipoprotein Function and Inflammation in Women with Metabolic Syndrome. *Antioxidants* **2018**, *7*, 185.
 22. Shen, M.; Li, K.; Jing, H.; Zheng, L. In vivo therapeutic effect of *vaccinium meridionale swartz* in ischemia-reperfusion induced male albino rats. *J. Food Sci.* **2018**, *83*, 221–228.
 23. Maldonado-Celis, M.E.; Arango-Varela, S.S.; Rojano, B.A. Free radical scavenging capacity and cytotoxic and antiproliferative effects of *Vaccinium meridionale Sw.* against colon cancer cell lines. *Rev. Cuba. Plantas Med.* **2014**, *19*, 172–184.
 24. Zapata Vahos, I.C.; Ochoa, S.; Maldonado Celis, M.E.; Zapata Zapata, A.D.; Rojano, B.A. Cytotoxic effect and antioxidant activity of Andean berry (*Vaccinium meridionale Sw*) wine. **2016**.
 25. Abreu Guirado, O.A.; Cuéllar Cuéllar, A.; Prieto, S. Fitoquímica del género *Vaccinium* (Ericaceae). *Rev. Cuba. Plantas Med.* **2008**, *13*, 0.
 26. Montoya, C.G.; Arredondo, J.D.H.; Arias, M.L.; Cano, C.I.M.; Rojano, B.A. Cambios en la actividad antioxidante en frutos de mortiño (*Vaccinium meridionale Sw.*) durante su desarrollo y maduración. *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín* **2012**, *65*, 6487–6495.
 27. Franco-Tobón, Y.N.; Rojano, B.; Alzate-Arbeláez, A.F.; Restrepo-Florez, C.E.; Rivero-Barrios, D.M.; Maldonado-Celis, M.E. Effect of storage time on the physicochemical properties and antioxidants of products derived of andean berry (*Vaccinium meridionale swartz*). *Vitae* **2016**, *23*, 184–193.
 28. Aryal, S.; Baniya, M.K.; Danekhu, K.; Kunwar, P.; Gurung, R.; Koirala, N. Total Phenolic Content, Flavonoid Content and Antioxidant Potential of Wild Vegetables from Western Nepal.

- Plants* **2019**, *8*, 96.
29. Garzón, G.A.; Narváez, C.E.; Riedl, K.M.; Schwartz, S.J. Chemical composition, anthocyanins, non-anthocyanin phenolics and antioxidant activity of wild bilberry (*Vaccinium meridionale* Swartz) from Colombia. *Food Chem.* **2010**, *122*, 980–986.