

EFECTO *IN VITRO* DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE LOS FRUTOS LIOFILIZADOS DE *Passiflora mollisima* (H.B.K) Bailey (Tumbo) y *Physalis peruviana* (Aguaymanto) EN EL ESTRÉS OXIDATIVO PRODUCIDO POR 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH)

IN VITRO EFFECT OF ETHANOLIC EXTRACTS OF FREEZE-DRIED FRUITS OF Passiflora mollisima (H.B.K) Bailey (Tumbo) and *Physalis peruviana* (Aguaymanto) ON OXIDATIVE STRESS PRODUCED BY 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

Cinthia Cárol Córdova Barrios¹

(1) Universidad Católica de Santa María, Arequipa - Perú.

RESUMEN: El presente trabajo de investigación tuvo como finalidad, determinar el efecto *in vitro* de los extractos etanólicos de los frutos liofilizados de *Passiflora mollisima* (H.B.K) Bailey (Tumbo) y *Physalis peruviana* (Aguaymanto) en un modelo experimental de estrés oxidativo basado en la reducción del radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) por los antioxidantes de cada fruto. Se utilizaron frutos pintones y frescos, cuyo mesocarpio fue liofilizado en la empresa OMNIAGRO. Los extractos se prepararon por extracción asistida por ultrasonido (EAU) a partir del liofilizado libre de semillas, utilizando etanol (96%) como disolvente. La determinación de la capacidad antioxidante del extracto etanólico de cada fruto liofilizado se realizó a través del método del DPPH, evaluando el porcentaje de decoloración del radical DPPH por los antioxidantes presentes en cada fruto y determinando la concentración inhibitoria media (CI_{50}) de cada extracto. Se evidenció que el extracto etanólico de cada fruto liofilizado tienen el efecto de reducir el radical libre DPPH, sin embargo, cada extracto presenta una determinada concentración inhibitoria media (CI_{50}) que es inversamente proporcional a la capacidad antioxidante. La concentración inhibitoria media (CI_{50}) expresada en $mg.mL^{-1}$ para el extracto etanólico del fruto liofilizado de *Passiflora mollisima* (H.B.K) Bailey (Tumbo) fue de 0.2421; mientras que para el extracto etanólico del fruto liofilizado de *Physalis peruviana* (Aguaymanto) fue de 0.5268. Por tanto, el extracto etanólico (96%) del fruto liofilizado de *Passiflora mollisima* (H.B.K) Bailey (Tumbo) es el que presenta mayor capacidad antioxidante. Finalmente, se demostró que los frutos de *Passiflora mollisima* (H.B.K) Bailey (Tumbo) y *Physalis peruviana* (Aguaymanto) presentan compuestos antioxidantes con potencial benéfico para la salud, por tanto, es necesario la revaloración de estos frutos para la prevención de enfermedades.

Palabras Clave: Capacidad antioxidante, DPPH, liofilizado, *Passiflora mollisima* (H.B.K) Bailey (Tumbo), *Physalis peruviana* (Aguaymanto).

ABSTRACT: The objective of this research is to determine the *in vitro* effect of ethanol extracts of freeze-dried fruits of *Passiflora mollisima* (H.B.K) Bailey (Tumbo) and *Physalis peruviana* (Aguaymanto) in an experimental model of oxidative stress based on reduction of free radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) by antioxidants in each fruit. Fresh and half-ripe fruits were used, which mesocarp was lyophilized in OMNIAGRO enterprise. Extracts were prepared by ultrasound-assisted extraction (EAU) from the free lyophilized of seeds using ethanol (96%) as dissolvent. The determination of antioxidant capacity of ethanol extract of each freeze-dried fruit was made by DPPH method evaluating the percentage of decoloration of radical DPPH by antioxidants present in each fruit and measuring half inhibitory concentration (CI_{50}) for each extract. It is evidenced, that ethanol extract of each freeze-dried fruit have the effect of reducing the free radical DPPH. However, each extract has a determined half inhibitory concentration (CI_{50}), inversely proportional to the capacity activity. Half inhibitory concentration (CI_{50}) expressed in $mg.mL^{-1}$ for ethanol (96%) extract of lyophilized fruits of *Passiflora mollisima* (H.B.K) Bailey (Tumbo) was 0.2421, while for ethanol (96%) extract of lyophilized fruits of *Physalis peruviana* (Aguaymanto) was 0.5268. Therefore, the ethanol (96%) extract of lyophilized fruit of *Passiflora mollisima* (H.B.K) Bailey (Tumbo) shows the highest antioxidant capacity. Finally, it was shown that fruits of *Passiflora mollisima* (H.B.K) Bailey (Tumbo) and *Physalis peruviana* (Aguaymanto) contain antioxidants compounds that are beneficial for health. Then, it is necessary to reevaluate this fruit for prevention of disease.

Keywords: Antioxidant capacity, DPPH, freeze-dried, *Passiflora mollisima* (H.B.K) Bailey (Tumbo), *Physalis peruviana* (Aguaymanto).

INTRODUCCIÓN

Las defensas antioxidantes de nuestro organismo son indispensables para preservar nuestra salud, porque son consideradas como agentes de protección que reducen el daño oxidativo del cuerpo humano¹.

Correspondencia:

Cinthia Cárol Córdova Barrios

Dirección: Urb. El Palacio II D-8 Dpto. 101. Sachaca, Arequipa - Perú

E-mail: ccordova@ucsm.edu.pe

En el organismo se produce un equilibrio entre oxidantes y antioxidantes, cuando este equilibrio se rompe a favor de los oxidantes se produce un estrés oxidativo, el cual está implicado en muchos procesos fisiopatológicos².

Numerosas investigaciones epidemiológicas y experimentales han demostrado que enfermedades cardiovasculares, enfermedades degenerativas (cáncer), así como el proceso biológico del envejecimiento, están asociadas a mecanismos de oxidación de las macromoléculas biológicas³.

Por tanto, es de vital importancia el consumo de alimentos que contengan antioxidantes naturales y se pueda mantener el equilibrio entre oxidantes y antioxidantes o incluso esté a favor de los antioxidantes⁴.

Los antioxidantes dietarios son compuestos que ingerimos a través de la dieta, que disminuyen los efectos adversos de los radicales libres en el cuerpo humano, por lo tanto, la terapia con antioxidantes naturales es una estrategia terapéutica muy atractiva⁵.

El efecto beneficioso de los alimentos vegetales se atribuye principalmente a sustancias con actividad antioxidante, como los carotenoides, el ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), compuestos polifenólicos y flavonoides⁴.

Se ha sugerido que estas sustancias aumentan la defensa antioxidante del organismo contra el "estrés oxidativo", responsable de diferentes tipos de daño celular⁶.

Una dieta rica en antioxidantes, acrecienta las defensas antioxidantes del cuerpo humano y sustenta la hipótesis del rol protector de frutas y verduras⁷.

Es conveniente, señalar que la información que relaciona a los antioxidantes con una buena salud aún no es conocida y manejada por un amplio sector de la población, por lo que es importante dar a conocer los alimentos con alto contenido de antioxidantes.

En general, las frutas son los vegetales más ricos en compuestos antioxidantes, por lo tanto, es importante la revalorización de frutos andinos como *Passiflora mollisima* (H.B.K) Bailey (Tumbo) y *Physalis peruviana* (Aguaymanto) para conocer su potencial benéfico con fines terapéuticos.

Con la intención de conocer el potencial beneficioso para la salud de los frutos de *Passiflora mollisima* (H.B.K) Bailey (Tumbo) y *Physalis peruviana* (Aguaymanto), en este trabajo se determinó el efecto *in vitro* de los extractos del cada fruto liofilizado en un modelo experimental de estrés oxidativo basado en la reducción del radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) por los antioxidantes de cada fruto.

El compuesto 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) es un radical estable que presenta una intensa coloración violeta y que absorbe radiación a 518 nm. La coloración púrpura se pierde progresivamente cuando se añade la muestra conteniendo sustancias antioxidantes⁻⁸.

Es importante destacar que, en el presente trabajo de investigación se utilizó la liofilización como operación unitaria de secado para conservar los frutos y obtener un producto deshidratado de mayor calidad, que puede ser almacenado por largos periodos de tiempo, ya que retiene en gran medida las propiedades físicas, químicas, biológicas y organolépticas de su estado fresco⁹.

Además, se utilizó la extracción asistida por ultrasonido (EAU) como método de extracción eficiente, económico y sencillo, capaz de generar ondas ultrasónicas con la finalidad de provocar una microagitación muy energética y útil para la disolución rápida de los principios activos¹⁰.

El presente trabajo de investigación busca el aprovechamiento de los recursos naturales con fines productivos para obtener productos biotecnológicos, importantes en la industria alimenticia y farmacéutica.

MATERIAL Y METODOS

A. Material vegetal: Se utilizaron frutos de *Passiflora mollisima* (H.B.K) Bailey (Tumbo) y *Physalis peruviana* (Aguaymanto), recolectados del mercado San Camilo de Arequipa, procedentes del distrito de Omate, provincia de General Sánchez Cerro, ubicada en el departamento de Moquegua.

Se seleccionaron frutos frescos en buenas condiciones, los cuales fueron lavados con agua corriente para arrastrar el polvo e impurezas y posteriormente secados con papel absorbente. El mesocarpio de cada fruto fue liofilizado.

B. Preparación de los extractos: Los extractos se prepararon por extracción asistida por ultrasonido (EAU) durante 30 minutos, a partir del liofilizado libre de semillas de cada fruto, utilizando etanol (96%) como disolvente, hasta obtener una concentración de 10 mg.mL⁻¹. Una vez obtenidos los extractos, se procedió a filtrar por gravedad, utilizando papel filtro rápido, ésta operación se repitió 3 veces hasta obtener filtrados translucidos ligeramente amarillos.

C. Preparación del Sistema del DPPH: Se preparó una solución de DPPH 0.6 mM en etanol al 96%, ésta mezcla fue protegida de la luz hasta el inicio del experimento. Se preparó un sistema de diez tubos de ensayo para cada extracto, en los cuales, se adicionó volúmenes determinados de etanol al 96% y de los extractos de cada fruto hasta obtener un rango de concentraciones de 0.1 a 1.0 mg.mL⁻¹. Finalmente, a dicha mezcla se adicionó 1.0 mL de la solución de DPPH, obteniéndose un volumen final de reacción de 4 mL. Este sistema, se incubó en un baño termostático a 37°C por 30 minutos, protegido de la luz. Se realizaron tres repeticiones por cada sistema.

Para las diferentes concentraciones de cada sistema, se preparó un blanco, el cual, contenía la mezcla de etanol (96%) con el extracto de cada fruto. Como control, se utilizó la mezcla de la solución de DPPH (1 mL) con etanol (96%) (3 mL).

La absorbancia de las diferentes concentraciones de cada sistema fue medida a 518 nm. El porcentaje de decoloración del DPPH de cada muestra fue calculado conforme a la Ec.1.

Porcentaje de decoloración del DPPH, Ec.1.

$$\% \text{ Decoloración} = \left\{ 1 - \left(\frac{A_{\text{MUESTRA}}}{A_{\text{CONTROL}}} \right) \right\} \times 100$$

Curva dosis-respuesta, la cual, está definida por la ecuación logística de cuatro parámetros, *four-parameter logistic equation*; Ec. 2

$$y = \min + \frac{\max - \min}{1 + \left(\frac{x}{CI_{50}} \right)^{\text{Hillslope}}}$$

Utilizando el programa SigmaPlot 15, se determinó la concentración inhibitoria media (CI_{50}) de cada sistema, relacionando la concentración de cada muestra con el valor promedio de su respectivo porcentaje de decoloración. Los datos obtenidos se ajustaron a una curva dosis-respuesta, la cual está definida por la Ec.2.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se determinó la capacidad antioxidante de cada sistema midiendo la absorbancia de cada muestra a 518 nm, evaluando el porcentaje de decoloración del radical DPPH y determinando la concentración inhibitoria media (CI_{50}) de cada sistema.

A. Sistema del DPPH para el extracto etanólico (96%) de *Passiflora mollisima* (H.B.K) Bailey (Tumbo): En la Tabla N° 1 se muestra el promedio de la absorbancia de cada muestra y el Porcentaje de Decoloración.

Tabla 1. Sistema del DPPH para el extracto etanólico (96%) de *Passiflora mollisima* (H.B.K) Bailey (Tumbo).

Concentración del extracto $mg.mL^{-1}$	Absorbancia promedial	% Decoloración
0.1	1.007	31.494
0.2	0.667	54.595
0.3	0.431	70.683
0.4	0.267	81.859
0.5	0.115	92.180
0.6	0.087	94.105
0.7	0.060	95.891
0.8	0.058	96.073
0.9	0.055	96.233
1.0	0.054	96.323

La absorbancia promedial del control (C) del sistema fue de 1.469.

Utilizando el programa SigmaPlot 15 y relacionando, la concentración del extracto etanólico (96%) del fruto liofilizado de *Passiflora mollisima* (H.B.K) Bailey (Tumbo) con el valor promedio de su respectivo porcentaje de decoloración del radical DPPH, se determinó la concentración inhibitoria media (CI_{50}) del sistema.

Los datos obtenidos se ajustaron a una curva dosis-respuesta, en cuyo análisis de regresión no lineal, se obtuvo un coeficiente de correlación, r igual a 0.9979, como muestra en la Figura N° 1.

Por tanto, la Concentración inhibitoria media (CI_{50}) del sistema para el extracto etanólico (96%) de *Passiflora mollisima* (H.B.K) Bailey (Tumbo), que reduce la absorbancia de la solución de DPPH en un 50%, es igual a 0.2421 $mg.mL^{-1}$.

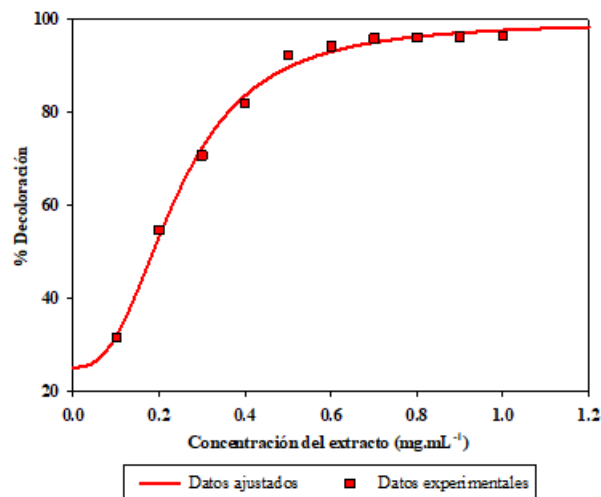


Fig. 1 Relación entre el Porcentaje de decoloración (%) del radical DPPH y la concentración del extracto en etanol (96%) del fruto liofilizado de *Passiflora mollisima* (H.B.K) Bailey (Tumbo).

B. Sistema del DPPH para el extracto etanólico (96%) de *Physalis peruviana* (Aguaymanto): En la Tabla N° 2 se muestra el promedio de la absorbancia de cada muestra y el Porcentaje de Decoloración.

Tabla 2. Sistema del DPPH para el extracto etanólico (96%) de *Physalis peruviana* (Aguaymanto).

Concentración del extracto $mg.mL^{-1}$	Absorbancia promedial	% Decoloración
0.1	1.581	10.523
0.2	1.424	19.451
0.3	1.303	26.298
0.4	1.132	35.935
0.5	0.985	44.253
0.6	0.885	49.928
0.7	0.786	55.551
0.8	0.703	60.246
0.9	0.667	62.264
1.0	0.599	66.131

La absorbancia promedial del control (C) del sistema fue de 1.767.

Utilizando el programa SigmaPlot 15 y relacionando, la concentración del extracto etanólico (96%) del fruto liofilizado de *Physalis peruviana* (Aguaymanto) con el valor promedio de su respectivo porcentaje de decoloración del radical DPPH, se determinó la concentración inhibitoria media (CI_{50}) del sistema.

Los datos obtenidos se ajustaron a una curva dosis-respuesta, en cuyo análisis de regresión no lineal, se obtuvo un coeficiente de correlación, r igual a 0.9994 como muestra en la Figura N° 2.

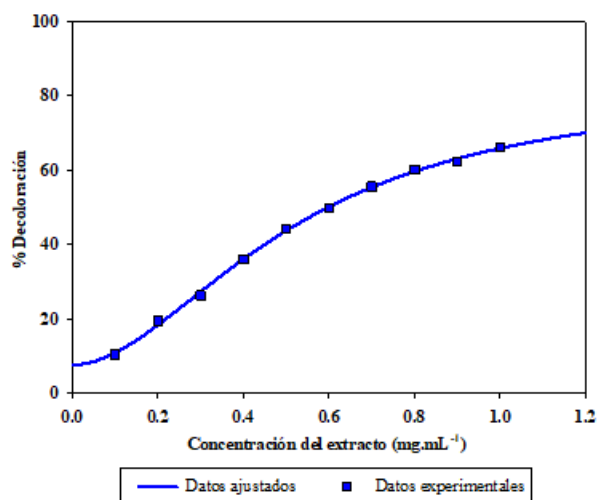


Fig.2 Relación entre el Porcentaje de decoloración (%) del radical DPPH y la concentración del extracto en etanol (96%) del fruto liofilizado de *Physalis peruviana* (Aguaymanto).

Por lo tanto, la Concentración inhibitoria media (CI_{50}) del sistema para el extracto etanólico (96%) de *Physalis peruviana* (Aguaymanto), que reduce la absorbancia de la solución de DPPH en un 50%, es igual a 0.5268 mg.mL⁻¹.

Cabe mencionar que Silva et al.11, utilizaron el método del DPPH con similares condiciones que el presente trabajo de investigación, con la finalidad de determinar la capacidad antioxidante de 14 especies de plantas, las cuales son utilizadas con distintos propósitos, ya sea en la alimentación o en la medicina de Brasil. Sus resultados los compararon con la capacidad antioxidante del extracto etanólico de *Ginkgo biloba*, el cual tuvo una CI_{50} igual a 0.083 mg.mL⁻¹.

Tomando como referencia dicho valor, se observó que, el extracto etanólico (96%) del fruto liofilizado de *Passiflora mollissima* (H.B.K) Bailey presenta una capacidad antioxidante 3 veces menor que el extracto etanólico de *Ginkgo biloba*.

CONCLUSIONES

Se evidenció que los extractos etanólicos de los frutos liofilizados de *Passiflora mollissima* (H.B.K) Bailey (Tumbo) y *Physalis peruviana* (Aguaymanto) tienen el efecto de reducir el radical libre DPPH. Sin embargo, se establece que el extracto que presenta mayor capacidad antioxidante es el extracto etanólico de *Passiflora mollissima* (H.B.K) Bailey (Tumbo).

Basado en el mecanismo de reducción del DPPH, es posible inferir que la capacidad antioxidante depende del efecto de los solventes en el proceso de reacción, siendo éste favorecido, por los solventes polares o la presencia de compuestos con grupos hidroxilo-8.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Causse C. Los secretos de salud de los antioxidantes: Editorial Hispano Europea; 2010.
- [2] Llacuna L, Mach N. Papel de los antioxidantes en la prevención del cáncer. Revista Española de Nutrición Humana y Dietética. 2012;16(1):16-24.
- [3] Mendivil CO, Sierra ID, Pérez CE, Hernández Abad B. Antioxidantes y enfermedad vascular. Clínica e Investigación en Arteriosclerosis. 2002;14(1):26-40.
- [4] Chen Y, Lin Q, Wang J, Mu J, Liang Y. Proteins, polysaccharides and their derivatives as macromolecular antioxidant supplements: A review of in vitro screening methods and strategies. International Journal of Biological Macromolecules. 2023;224:958-71.
- [5] Imchen T, Singh KS. Marine algae colorants: Antioxidant, anti-diabetic properties and applications in food industry. Algal Research. 2023;69:102898.
- [6] Toydemir G, Gultekin Subasi B, Hall RD, Beekwilder J, Boyacioglu D, Capanoglu E. Effect of food processing on antioxidants, their bioavailability and potential relevance to human health. Food Chemistry: X. 2022;14:100334.
- [7] Berlic M, Jug U, Battelino T, Levart A, Dimitrovska I, Albrecht A, et al. Antioxidant-rich foods and nutritional value in daily kindergarten menu: A randomized controlled evaluation executed in Slovenia. Food Chemistry. 2023;404:134566.
- [8] Fadda A, Serra M, Molinu MG, Azara E, Barberis A, Sanna D. Reaction time and DPPH concentration influence antioxidant activity and kinetic parameters of bioactive molecules and plant extracts in the reaction with the DPPH radical. Journal of Food Composition and Analysis. 2014;35(2):112-9.
- [9] Berk Z. Chapter 23 - Freeze drying (lyophilization) and freeze concentration. In: Berk Z, editor. Food Process Engineering and Technology (Third Edition): Academic Press; 2018. p. 567-81.
- [10] Panwar D, Panesar PS, Chopra HK. Ultrasound-assisted extraction of pectin from Citrus limetta peels: Optimization, characterization, and its comparison with commercial pectin. Food Bioscience. 2023;51:102231.
- [11] Silva Cd, Herdeiro R, Mathias C, Panek A, Silveira C, Rodrigues V, et al. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. Pharmacological research. 2005;52(3):229-33.

Recibido el 27 de octubre del 2022 y aceptado para su publicación el 21 de diciembre del 2022.