

Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos
Instituto Nacional de Nutrición de Italia

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y POTENCIAL DE SINERGISMO ENTRE LOS PRINCIPALES CONSTITUYENTES ANTIOXIDANTES DE ALGUNOS ALIMENTOS

Daymy Pineda Alonso,¹ Mónica Salucci,² Regina Lázaro,³ Giuseppe Maiani⁴ y Anna Ferro-Luzzi³

RESUMEN

Los objetivos de este estudio fueron: evaluar la capacidad antioxidante de alimentos seleccionados (tomate, cebolla, lechuga y col), su efecto protector sobre la peroxidación de ácido linoleico, e investigar el potencial de interacción entre diferentes antioxidantes como flavonoides (rutina y quercetina), ácidos fenólicos (ácido cafeico) y vitaminas (vitamina E y C). Se examinó la eficiencia antioxidante por 2 sistemas: la capacidad antioxidante total y el efecto protector sobre la peroxidación del ácido linoleico. La mayor capacidad antioxidante total la presentó la col, seguida por la lechuga, cebolla y tomate y el mayor efecto protector sobre la peroxidación del ácido linoleico también lo presentó la col, seguida por el tomate, la lechuga y la cebolla. En el estudio de interacción se obtuvo una variedad de respuestas, desde un antagonismo hasta un sinergismo. En conclusión, los extractos de vegetales frescos muestran un efecto antioxidante diferente y su actividad depende de la naturaleza y concentración de los antioxidantes naturales presentes en el alimento. El uso de 2 sistemas (hidrofílico y lipofílico) es fundamental para estudiar la capacidad antioxidante de un compuesto o de un extracto de alimento.

Descriptor DeCS: TOMATES; CEBOLLAS; LECHUGA; BRASSICA; ANTIOXIDANTES.

El consumo de frutas y vegetales ha sido asociado con una menor incidencia y mortalidad por diferentes enfermedades crónicas.^{1,2} La protección que las frutas y vegetales brindan contra las enfermedades degenerativas como cáncer y enfermeda-

des cardiovasculares y cerebrovasculares, ha sido atribuida a su alto contenido de varios antioxidantes.³

Los radicales libres están implicados en la causa de estas enfermedades por ocasionar daño oxidativo a proteínas, lípidos

¹ Master en Nutrición. Licenciada en Bioquímica.

² Licenciada en Biología.

³ Doctora en Ciencias Biológicas.

⁴ Doctor en Ciencias Bioquímicas.

y ácidos nucleicos. Es por esto que los antioxidantes, los cuales neutralizan la acción de los radicales libres, desempeñan una función fundamental en la prevención de estas enfermedades.

La mayor parte de la capacidad antioxidante de frutas y vegetales se la proporciona su contenido en vitamina E, C y carotenos, así como de diferentes polifenoles.⁴⁻⁶

La medición de los antioxidantes individuales por separado no permite conocer con certeza la capacidad antioxidante total de un fluido biológico por los efectos sinérgicos que puedan establecerse entre los antioxidantes presentes en él.⁷⁻¹⁰

Diferentes métodos se han desarrollado para determinar la capacidad antioxidante de fluidos,⁷⁻¹¹ son todos métodos de inhibición, donde se usa una especie generadora de radicales libres y una sustancia que detecta estas especies. La actividad antioxidante de la muestra añadida inhibe la generación de estos radicales.

La determinación del potencial antioxidante total (TRAP) ha sido la técnica más ampliamente usada para determinar actividad antioxidante de un fluido. Este ensayo usa un generador de radicales hidrofílicos y una sustancia que detecta estos radicales, la ficoeritrina.¹⁰ Otro sistema usado para evaluar actividad antioxidante es la determinación de malondialdehído (MDA), como medida del efecto protector de la sustancia probada, el cual usa un generador de radicales lipofílicos que reaccionan con el ácido linoleico.¹¹

Este trabajo tiene como objetivos evaluar la TRAP de alimentos seleccionados (tomate, cebolla, lechuga y col) y su efecto protector sobre la peroxidación del ácido linoleico, e investigar el potencial de interacción de diferentes antioxidantes como flavonoides (rutina y quercetina),

ácidos fenólicos (ácido cafeico) y vitaminas E y C.

MÉTODOS

Muestras. Los vegetales (tomate, cebolla, lechuga y col) fueron adquiridos en un supermercado local el mismo día de la preparación de las muestras.

Diseño del estudio. Se examinó la eficiencia antioxidante de diferentes compuestos, por 2 sistemas diferentes: 1) la medición de la TRAP y 2) el efecto protector de estos antioxidantes sobre la peroxidación del ácido linoleico (determinación de MDA). Estos métodos se emplearon tanto para las moléculas simples, como para combinaciones de éstas.

Reactivos. Todos los reactivos usados fueron adquiridos de Sigma Chemical Co., excepto el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (TROLOX) adquirido de Aldrich Chemical Co, y el azo-compuesto 2,2'-azobis-(2-amidinopropano) (ABAP) de Polyscience. Todas las soluciones usadas para los ensayos fueron preparadas con agua bidestilada Mili-Q y pasadas por una columna con resina Chelex 100 Na⁺.

Ensayo del TRAP. El método usado fue propuesto por Ghiselli.¹⁰ La mezcla de reacción consistía en $1,5 \times 10^{-8}$ M R-PE (ficoeritrina) disuelta en 75 mM de *buffer* fosfato, pH 7,0; a esta mezcla se le añadió el estándar de antioxidante y se mantuvo por 5 min a 37 °C. La reacción de oxidación comenzó al añadir el ABAP (compuesto que se descompone térmicamente generando radicales libres a una velocidad constante) a una concentración final de 4,0 mM. La disminución de la fluorescencia de la ficoeritrina fue monitoreada cada 5 min en un espectrofotómetro luminiscente Perkin-Elmer LS-5. La longitud de onda

de excitación usada fue 495 nm/5 nm de rendija y la de emisión 575 nm/5 nm de rendija.

Determinación de MDA. La mezcla de reacción consistió en el ácido linoleico (10 mM), llevado a seco y resuspendido en 2 mL de *buffer* fosfato. El control fue peroxidado con 40 µL de AMVN 10 mM (generador de radicales lipofílicos), mientras a las muestras se les añadió 40 µL de AMVN y el estándar de antioxidante. Tanto el control como las muestras se incubaron por 15 min a 37 °C. Después de esta incubación se le añadió a la mezcla de reacción el ácido tricloroacético y el ácido tiobarbitúrico; este último constituyó la sustancia fluorescente. Las condiciones de lectura en el fluorímetro fueron: longitud de onda de excitación 515 nm/5 nm de rendija y de emisión 553 nm/5 nm de rendija. Se realizó una curva de calibración para el posterior cálculo de la concentración de MDA.¹¹

Determinación de polifenoles y carotenoides. Se usaron métodos de HPLC para muestras biológicas, pero ligeramen-

te modificadas para alimentos vegetales.^{12,13}

La TRAP y la concentración de MDA de los diferentes alimentos se compararon mediante un ANOVA de clasificación simple y en los casos donde se observó diferencias significativas se aplicó la prueba de Duncan.

RESULTADOS

La tabla muestra el contenido de carotenoides y polifenoles de los vegetales seleccionados. Los resultados están expresados como miligramo por kilogramo de alimentos para polifenoles y como microgramo por 100 g de alimento para carotenoides y representan la $\bar{X} \pm DE$ de 3 determinaciones de 4 muestras diferentes de alimentos. Por ejemplo, el tomate es rico en carotenoides, principalmente licopeno y beta-caroteno, y contiene concentraciones relativamente grandes de ácido cafeico. La cebolla es muy rica en quercetina y la col en ácido cafeico y derivados del ácido hidroxycinámico en general.

TABLA Contenido de los principales polifenoles (mg/kg de porción comestible) + carotenoides (µg/100 g de porción comestible) de alimentos comerciales (n=3)

	Tomate	Cebolla	Lechuga	Col
Flavonoides				
Quercetina	9,7 ± 3,3	417,0 ± 10,4	24,2 ± 2,1	14,2 ± 27,0
Kaempferol	18,0 ± 0,4	23,9 ± 8,9	< 2,0	35,2 ± 7,3
Ácidos hydroxycinámicos				
Ácido cafeico	46,7 ± 1,1	33,3 ± 1,2	12,6 ± 1,9	59,4 ± 0,2
Ácido cumárico	13,0 ± 1,2	30,0 ± 1,0	nd	40,1 ± 0,9
Ácido ferúlico	4,0 ± 0,3	39,0 ± 1,9	nd	nd
Carotenoides				
Luteína	58,7 ± 11,6	nd	880 ± 321	1 056 ± 142
Licopeno	2 205 ± 997	nd	nd	< 2,0
Beta-caroteno	496 ± 100	nd	556 ± 178	nd

La figura 1 muestra los valores totales de la TRAP y la contribución a ésta, de las fracciones hidrosolubles y liposolubles. El TRAP total de los alimentos ha sido calculado mediante la suma de los valores del TRAP de la fracción hidrosoluble, con los valores de la fracción liposoluble. La col tiene el más grande valor de TRAP, seguida por la lechuga, la cebolla y el tomate ($p < 0,05$).

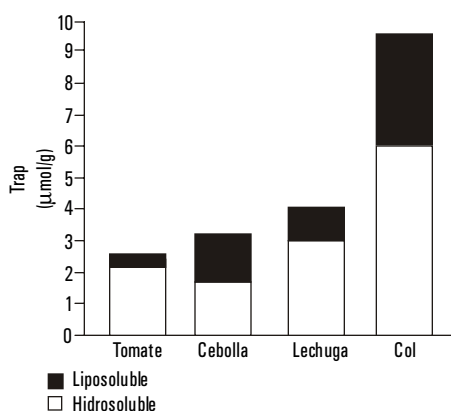


FIG. 1. TRAP de extractos de vegetales.

Otra vía para evaluar el efecto protector de extractos de alimentos, es la medición *in vitro* de la oxidación de un ácido graso. Nuestro modelo químico consiste en el ácido linoleico, ácido graso polinsaturado, que si se peroxida con AMVN (iniciador de radicales lipofílicos) puede dar como producto final MDA. La figura 2 muestra el efecto protector de las fracciones hidrofílicas y lipofílicas de los alimentos seleccionados sobre la peroxidación del ácido linoleico. La concentración de MDA/g de vegetal de la col y el tomate fueron las menores (0,21 y 0,28 µmol, $p < 0,05$), por lo que tienen el más gran-

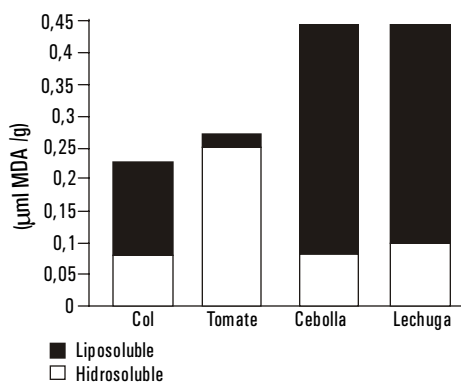


FIG. 2. Efecto protector de extractos de vegetales frescos sobre la peroxidación del ácido linoleico.

de efecto protector, seguidos por cebolla y lechuga (0,43 y 0,44 µmol).

En la técnica de determinación de la TRAP, cuando a la mezcla de reacción se le añade el plasma (o un compuesto antioxidante), se observa un período de completa protección a la ficoeritrina, esta longitud es llamada fase Lag y es directamente proporcional a la capacidad antioxidante del compuesto probado.

En la figura 3 se muestran los valores de fase Lag en minutos de las moléculas individualmente (la concentración en cubeta es de 4 µmol/L ácido ascórbico y 1 µmol/L de los otros compuestos). Para que exista sinergismo entre 2 antioxidantes es necesario que el efecto antioxidante de la combinación de ellos sea mayor que la suma de los efectos causados por estos compuestos por separado. Por tanto para que haya sinergismo, la fase Lag producida por la combinación de 2 antioxidantes, debe ser mayor que la suma de las fases Lag de estos compuestos solos.

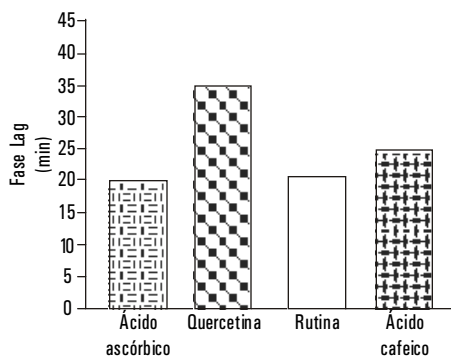


FIG. 3. Valores de fase Lag de moléculas individuales.

En la figura 4 se observa que existe un efecto sinérgico entre rutina y ácido ascórbico y entre ácido cafeico y ácido

ascórbico. Contrario a este sinergismo se observa un antagonismo entre quercetina y ácido ascórbico.

La figura 5 muestra el efecto protector de estos antioxidantes sobre la lipoperoxidación. Estos valores muestran que el alfa-tocoferol y la quercetina presentan un efecto protector con respecto al ácido ascórbico, al cafeico y a la rutina.

Los porcentajes de protección de las diferentes combinaciones entre estos antioxidantes (fig.6) muestran que la combinación del alfa-tocoferol más el ácido ascórbico y el alfa-tocoferol más la quercetina, tienen mayor efecto con respecto a las otras combinaciones.

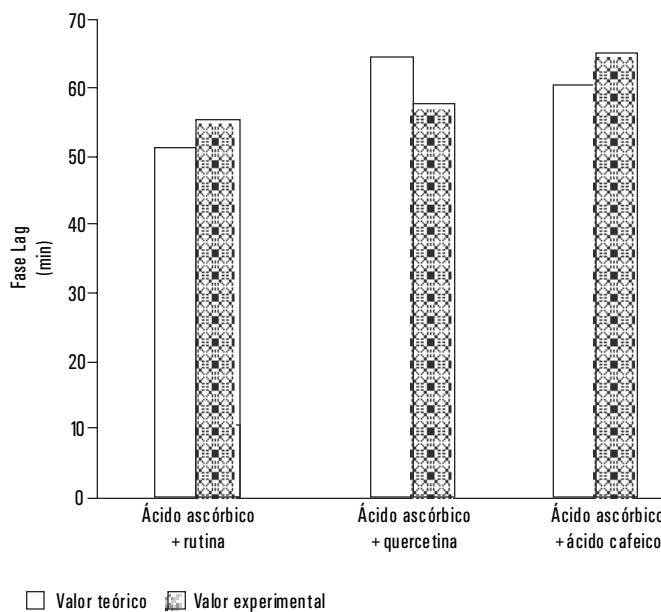


FIG. 4. Efecto de la combinación de moléculas puras sobre la eficiencia antioxidante (fase Lag).

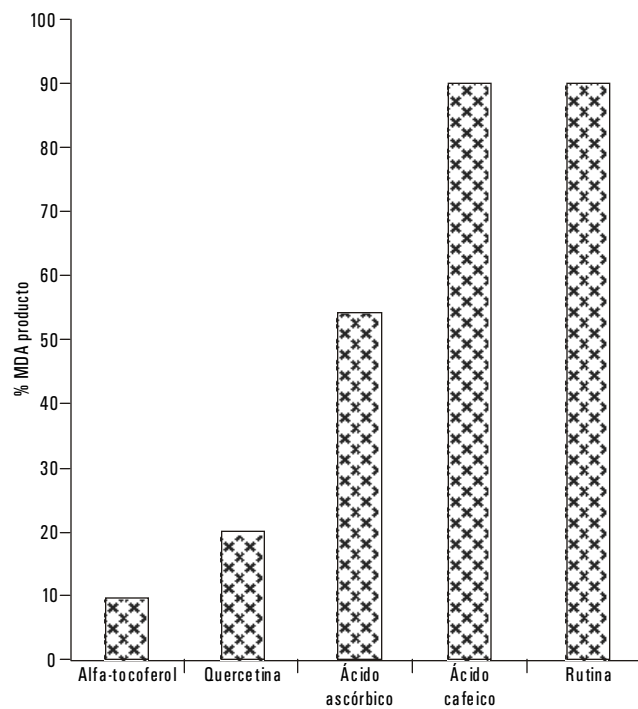
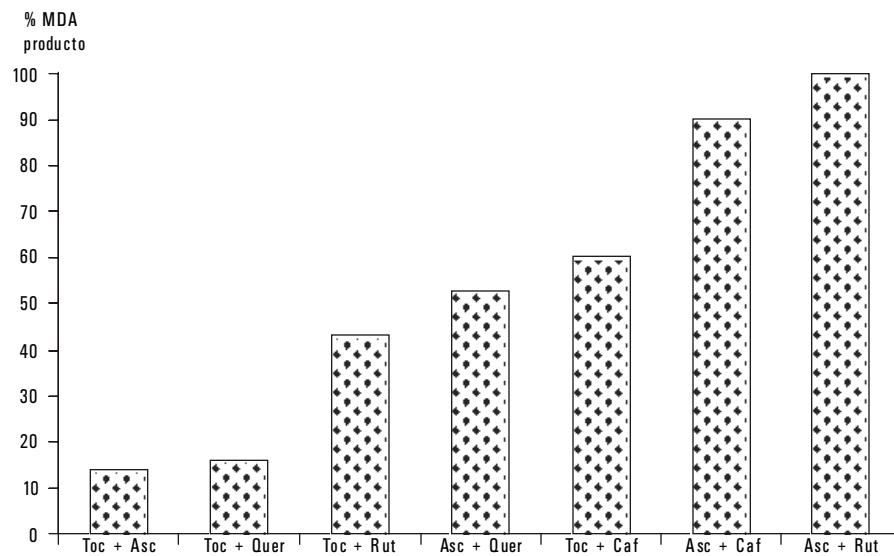


FIG. 5. Porcentaje de MDA producto de las moléculas antioxidantes simples.



Toc: alfa - tocoferol; Asc: ácido ascórbico; Quer: quercetina; Rut: rutina; Caf: ácido cafeico.

FIG. 6. Porcentaje de MDA producto de moléculas simples.

DISCUSIÓN

La capacidad antioxidante de un alimento depende de la naturaleza y concentración de los antioxidantes naturales presentes en él.^{14,15} El contenido de los principales antioxidantes en los alimentos probados (tabla) varía de un alimento a otro, tal es así que por ejemplo, el ácido hidroxicinámico varía del 2 al 20 %, los flavonoides del 2 al 34 % y carotenoides del 13 al 43 %.

La TRAP de algunas frutas y vegetales ha sido determinada recientemente por métodos similares a la TRAP, y se han obtenido resultados comparables con el presente estudio.^{16,17}

Los extractos de vegetales frescos (col, lechuga, tomate y cebolla), tienen diferentes valores de capacidad antioxidante total. Los resultados muestran que la capacidad antioxidante total del extracto hidrosoluble es siempre mayor que la liposoluble en los alimentos probados, lo cual se esperaba ya que el TRAP es un sistema hidrosoluble. El orden de eficiencia antioxidante de los extractos de alimentos contra los radicales generados en fase hidrofílica es el siguiente: col>lechuga>cebolla=tomate. El tomate tiene el menor valor de TRAP, a pesar de tener grandes cantidades de licopeno, pro-

bablemente porque el licopeno y carotenoides en general, son eficientes en la extinción (*quenching*) de singletes de oxígeno, y no tanto en el atrapamiento de radicales peroxílicos.¹⁸

Los extractos de los alimentos seleccionados tienen diferentes efectos sobre la peroxidación del ácido linoleico. El tomate tiene mayor efecto protector sobre los radicales generados en fase lipofílica, que sobre los generados en fase hidrofílica, lo cual era de esperar por su alto contenido de antioxidantes lipofílicos (como licopeno, beta-caroteno y luteína) y estos son los más efectivos en el atrapamiento de radicales lipofílicos. El orden de los alimentos en cuanto a su efecto protector es el siguiente: col>tomate>lechuga=cebolla.

Los resultados en el estudio de interacción entre los diferentes antioxidantes confirman la bien conocida cooperación entre el alfa-tocoferol y el ácido ascórbico,^{19,20} y sugieren una similar cooperación entre tocoferol y quercetina, rutina y ácido ascórbico y ácido cafeico más ácido ascórbico.

El uso de 2 sistemas diferentes, hidrofílico y lipofílico, ofrece una completa información sobre la actividad antioxidante de los antioxidantes naturales presentes en los alimentos.

SUMMARY

This study was aimed at evaluating the antioxidant capacity of selected vegetables (tomato, onion, lettuce and cabbage) and their protective effect on the peroxidation of linoleic acid and at researching the potential interaction among different antioxidants such as flavonoids (rutin and quercetin), phenolic acids (cafeic acid) and vitamins (vitamins E and C). Antioxidant efficiency was examined by two systems: total antioxidant capacity and the protective effect on the peroxidation of linoleic acid. The maximum total antioxidant capacity was found in cabbage followed by tomato, lettuce and onion. The interaction study revealed a variety of answers ranging from antagonism to synergism. In conclusion, the fresh vegetable extracts exhibit a different antioxidant effect and their activity depends on the nature and concentration of the natural antioxidants present in the food. The use of 2 systems (hydrophilic and lipophilic) is fundamental for studying the antioxidant capacity of either a food compound or extract.

Subject headings: TOMATOES; ONIONS; LETTUCE; BRASSICA; ANTIOXIDANTS.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jacob RA, Burri BJ. Oxidative damage and defense. *Am J Clin Nutr* 1996;63(6):985S-990S.
2. Hughes K, Ong CN. Vitamins, selenium, iron, and coronary heart disease risk in Indians, Malays, and Chinese in Singapore. *J Epidemiol Comm Health* 1998;52(3):181-5.
3. Could antioxidants play a role in high rates of coronary heart disease in the Czech Republic-Eur *Clin Nutr* 1998;52(9):632-6.
4. Functional food science and defense against reactive oxidative species. *Br J Nutr* 1998;80(1):S77-112.
5. Rice-Evans C, Miller NJ. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad Biol Med* 1996;20(7):933-56.
6. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 1998;56(11):317-33.
7. Wayner D, Burton GW, Ingold KU, Locke S. Quantitative measurement of the total peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. *FEBS Lett* 1985;187:33-7.
8. DeLange RJ, Glazer AN. Phycoerythrin fluorescence-based assay for peroxy radicals: a screen for biologically relevant protective agents. *Anal Biochem* 1989;177:300-6.
9. Glazer AN. Fluorescence-based assay for reactive oxygen species: A protective role for creatinine. *FASEB J* 1988;2:2487-91.
10. Ghiselli A, Serafini M, Maiani G, Azzini E, Ferro-Luzzi A. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Rad Biol Med* 1995;18(1):29-36.
11. Lazaro R, Salucci M, Maiani G, Ferro-Luzzi A. Total antioxidant capacity of selected vegetables and protective effect on the peroxidation of linoleic acid. *J Agric Food Chem* 1998 (en prensa).
12. Michel G, Peter C, Dini P. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *J Agric Food Chem* 1992;40:1591-8.
13. Sharpless K, Thomas J, Sander L, Wise S. Liquid chromatographic determination of carotenoids in human serum using an engineered C30 and C18 stationary phase. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1996;678(2):187-95.
14. Cao G, Wu A, Wang H, Prior R. Automated oxygen radical absorbance capacity assay using the COBAS FARAI. *Clin Chem* 1995;41:1738-44.
15. Pieri C, Marra M, Moroni F. Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci* 1994;55:271-6.
16. Wang H, Cao G, Prior R. Total antioxidant capacity of fruits. *J Agric Food Chem* 1996;44:701-5.
17. Cao G, Sofic E, Prior R. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *J Agric Food Chem* 1996;44:3426-31.
18. Sies H, Sahi W. Vitamins E and C, beta-carotene and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr* 1995;62(Suppl):1315S-21S.
19. Synergistic effects of some pairs of antioxidants and related agents on mouse leukaemia L5178Y cell growth in vitro. *J Pharm Pharmacol* 1998;50(10):1173-7.
20. Beta-carotene with vitamins E and C offers synergistic cell protection against Nox. *FEBS Lett* 1998;436(3):387-9.

Recibido: 31 de marzo de 1999. Aprobado: 30 de abril de 1999.

Lic. *Daymy Pineda Alonso*. Instituto de Nutrición de los Alimentos. Infanta No. 1158, municipio Centro Habana, Ciudad de La Habana 10300, Cuba.