

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO PROTEICO DE PIÑUELA (*BROMELIA SPP.*)

*William Rubio, Jesús Ramón, Denis Magaña, Luis Cuevas y Elizabeth Ortiz**

*Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Mérida. Ave. Tecnológico s/n km 5 carr.
Mérida-Progreso. C.P. 97118, Mérida, México.*

E-mail: eortiz@itmerida.mx

RESUMEN

Se evaluó la capacidad antioxidante de la fracción proteica del fruto de la piñuela *Bromelia spp.* mediante diferentes métodos: capacidad de captación de radicales libres por DPPH y ABTS⁺, el poder reductor Fe³⁺ y quelación de Cu²⁺. Se obtuvieron tres extractos del fruto: extracto crudo, extracto soluble y extracto membranal. Los resultados demuestran que los tres extractos tuvieron actividad antioxidante. La mayor actividad antioxidante en tres de las pruebas la presentó el extracto soluble, cuyos IC₅₀ fueron en concentración de proteína: 0,27 µg/µL; 0,45 µg/µL y 0,01197 µg/µL para DPPH, ABTS⁺ y poder reductor Fe³⁺, respectivamente. La actividad quelante de cobre fue mayor en el extracto membranal con un IC₅₀ en concentración de proteína de 0,01305 µg/µL.

Palabras clave: actividad antioxidante, *Bromelia spp.*, poder reductor de hierro (III).

ABSTRACT

Antioxidant activity of protein extract obtained from *bromelia spp.* fruit

The antioxidant activity of protein fractions from *Bromelia spp.* fruit was evaluated using representative methods: ability to capture free radicals by DPPH and ABTS⁺, the reducing power Fe³⁺ and chelation of Cu²⁺. Three fractions from *Bromelia* fruit were obtained: crude, soluble and membrane extract and the antioxidant activity was established for each fraction. The results showed that the three extracts had antioxidant activity. However, in soluble extract this activity was higher, with IC₅₀ protein concentrations of 0.27 µg/µL, 0.45 µg/µL and 0.01197 µg/µL for DPPH, ABTS⁺ and Fe (III) reducing power, respectively. The chelating activity of copper was higher in the membrane extract with an IC₅₀ at protein concentration of 0.01305 µg/µL.

Keywords: antioxidant activity, *Bromelia spp.*, Fe (III) reducing power.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades crónicas y neurodegenerativas son un problema a nivel mundial debido a que se han convertido en la principal causa de muerte en el mundo y un importante problema de salud pública por los altos costos de su tratamiento (1). Enfermedades como el cáncer, Alzheimer, mal de Parkinson, diabetes, arteriosclerosis y el envejecimiento prematuro, se encuentran relacionadas con el estrés oxidativo (2). El estrés oxidativo es un desequilibrio bioquímico propiciado por la producción excesiva de especies reactivas, que por consecuencia provocan daño oxidativo a las macromoléculas y por ende a la célula (3). En la actualidad se ha observado que ciertas proteínas y péptidos son capaces de inhibir la oxidación lipídica

**Elizabeth de la Luz Ortiz Vázquez: Ingeniera Bioquímica (1987). Maestra en Ciencias en Biotecnología (1994). Doctora en Ciencias en Agrobiotecnología (2004). Profesor Investigador. Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Mérida. Con 35 años de experiencia en investigación en las áreas de Fermentaciones, Enzimología, Microbiología y Biología Molecular. Actualmente trabaja en proyectos relacionados con propiedades bioactivas de los alimentos.*

por mecanismos específicos, tales como la inactivación de especies reactivas de oxígeno, estabilización de radicales libres, quelación de metales y reducción de hidroxiperóxidos (4). Estas moléculas de origen proteico pueden contribuir a la capacidad antioxidante endógena de la célula, las cuales pueden ser obtenidas de diferentes alimentos.

Un candidato a poseer proteínas con actividad antioxidante, es la piñuela (*Bromelia spp.*) esta planta pertenece a la familia de las *Bromeliaceas*, la piñuela es una planta ampliamente distribuida en Centroamérica y se puede encontrar en varias partes de México. De la pulpa de este fruto se obtiene una rica fuente de vitaminas, minerales y proteínas. En la época prehispánica los mayas utilizaban el fruto como agente terapéutico por sus propiedades: antihelmínticas, antitusivas y contra enfermedades respiratorias (5). Por lo cual el objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad antioxidante del extracto proteico del fruto de *Bromelia spp.*

MATERIALES Y MÉTODOS

Los frutos de piñuela fueron colectados en el mercado municipal de Mérida, Yucatán. Estos se limpiaron, se les eliminó la pelusa de la cáscara, se desinfectaron y almacenaron a -80 °C.

A los frutos se les retiraron la cáscara y las semillas, la pulpa fue triturada y homogenizada en solución tampón de extracción (100 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM NaCl; 10 mM de cisteína y 1,5 µg/mL de leupeptina). El extracto fue filtrado con el fin de eliminar las partículas de mayor tamaño, posteriormente el extracto fue centrifugado 16 000 g a 4 °C durante 30 min, se recuperó el sobrenadante denominado extracto crudo (EC) y se volvió a centrifugar a 100 000 g durante 45 min para separar la fracción soluble de la membrana; se recuperó el sobrenadante al cual se denominó extracto soluble (ES) y la pastilla se resuspendió en la solución tampón de extracción y se denominó extracto membranal (EM) (6).

El contenido de proteína del extracto proteico se determinó por el método de Bradford (7). El perfil proteico fue realizado según lo reportado anteriormente (8). El cual consistió en usar un sistema SDS-PAGE al 15 %.

La electroforesis se llevó a cabo a 80 V durante 2 h. Transcurrido el tiempo de corrida, el gel se tiñó con nitrato de plata.

A través de la captación del radical DPPH se cuantificó la capacidad de los extractos para estabilizar el radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), siguiendo la metodología propuesta (9). A 100 µL de cada uno de los extractos se le adicionó 1 mL de DPPH (0,1 mM) diluido en alcohol etílico a 96 %, se incubó a temperatura ambiente durante 30 min y se midió la absorbancia a 517 nm. El porcentaje de captación de radicales DPPH se calculó como sigue:

$$\% \text{ Captación de radicales DPPH} = \left\{ \frac{AB - AM}{AB} \right\} \times 100$$

AB = absorbancia del blanco **AM** = absorbancia de la muestra

Se cuantificó la capacidad de captación de radicales libres de los extractos para estabilizar el radical ABTS [2,2'-azinobis (3-etil-benzotiazolin-6 ácido sulfónico)] siguiendo la metodología propuesta anteriormente (10) y utilizando vitamina E como antioxidante estándar. Los extractos fueron diluidos conforme a las concentraciones de la curva de calibración con buffer de fosfatos (pH 7,4). Se mezclaron 10 µL de las muestras diluidas, con 990 µL del radical ABTS⁺, se determinó la absorbancia a 734 nm después de 7 min de reacción. Los valores de TEAC se calcularon a partir de la curva de calibración y se expresaron como equivalentes de Trolox. El porcentaje de inhibición se calculó según las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ IE} = [(AB - AT)/AB] \times 100\%$$

$$\text{IM} = [(AB - AM)/AB] \times 100$$

$$\text{CAET} = (\% \text{ IM} / m) - b$$

AB = absorbancia del blanco a tiempo cero

AT = absorbancia del Trolox después de 1 y 6 min

AM = absorbancia de la muestra después de 1 y 6 min

% IE = porcentaje de inhibición de los estándares

% IM = porcentaje de inhibición de la muestra

m = pendiente de la curva estándar de Trolox

b = intercepto de la curva estándar de Trolox.

El poder reductor de Fe³⁺ de los extractos proteicos se determinó mediante una metodología descrita (11). Los extractos se diluyeron en solución tampón de fosfatos (0,2 M; pH 6,6), se mezclaron 250 µL de las diluciones tampón de fosfatos (250 µL) y ferricianuro de potasio (250 µL, 1 %), se incubaron a temperatura constante (50 °C, 20 min), se les adicionó ácido tricloroacético (250 µL, 10 %), la mezcla resultante se centrifugó (548 g, 10 min); se tomó una alícuota del sobrenadante (500 µL) a la cual se agregaron 400 µL de agua destilada, inmediatamente se agregó cloruro férrico (100 µL; 0,1 %); se incubó a 50 °C por 10 min y se dejó enfriar durante 10 min. Finalmente se determinó la absorbancia a 700 nm. Para determinar el porcentaje de reducción de Fe (III) se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ PR} = \left\{ \frac{AM - AB}{AM} \right\} \times 100$$

% PR = porcentaje del poder reductor AB = absorbancia del blanco AM = absorbancia de la muestra.

Para la determinación de la capacidad quelante de Cu²⁺ de los extractos proteicos se utilizó el método reportado antes (12). Se preparó el blanco mezclando 1200 µL de solución tampón de acetato de sodio 50 mM (pH 6) y 25 µL de violeta de pirocatecol 4 mM. El control se preparó mezclando con 1 100 µL de solución tampón de acetato de sodio 50 mM (pH 6), 100 µL de agua destilada, 100 µL de solución patrón de Cu (II) (40,0 mg/mL) y 25 µL de violeta de pirocatecol 4 mM. La muestra se preparó con 1 000 µL de solución tampón de acetato de sodio 50 mM (pH 6), 100 µL de solución patrón de Cu (II) (40 mg/mL) y 25 µL de violeta de pirocatecol 4 mM, se dejó reaccionar durante 5 min a temperatura ambiente y luego se añadieron 100 mL de muestra. Si la muestra tiene capacidad quelante se produce una disminución de la absorbancia a 632 nm. Se calcula el porcentaje de capacidad quelante como sigue:

$$\% \text{ CQ} = \left\{ \frac{1 - \text{AbsVPCuM}}{\text{AbsVPCu}} \right\} \times 100$$

% CQ = porcentaje de capacidad quelante. AbsVPCuM = absorbancia del complejo de violeta de pirocatecol-Cu (II) en presencia de muestra.

AbsVPCu = absorbancia del complejo de violeta de pirocatecol-Cu (II).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del fruto de la piñuela se obtuvieron tres tipos de extractos: el extracto crudo, el extracto soluble y el extracto membranal, cuyas concentraciones de proteína fueron 2,224; 1,983 y 1,023 mg/mL, respectivamente. Los extractos fueron analizados mediante un sistema electroforético SDS-PAGE (Fig. 1). El extracto crudo y el soluble presentaron un perfil proteico similar, esto es debido a que la mayor parte de las proteínas son solubles; se pueden visualizar bandas de 12, 15 y 24 KDa y un grupo de proteínas menores a 10 KDa. El perfil proteico del extracto membranal no presenta bandas bien definidas y se observa un ensanchamiento que puede ser debido a la presencia de compuestos no proteicos. La banda de 24 kDa ha sido detectada en otras Bromelias de la familia como es el caso de *B. pinguin*, en la que se reportaron cuatro proteínas de tipo endopeptidasa cisteínicas que van de 23,23 a 23,68 kDa (13). También se han reportado proteasas con pesos moleculares 25 kDa y 24 kDa en extractos acuosos de *B. balancea* y *B. hierony* Mez (14), esto indica que proteasas de bajo peso molecular son características del género *Bromelia*.

La capacidad antioxidante de los extractos fue determinada por cuatro métodos diferentes: DPPH y ABTS (basados en su capacidad de captación de radicales libres), poder reductor de Fe³⁺ y quelación de Cu²⁺.

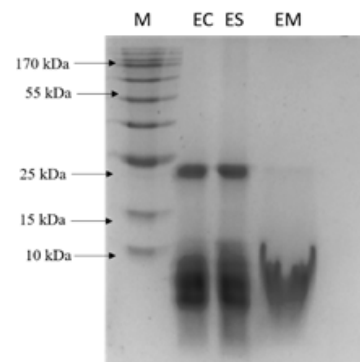


Fig. 1. Perfil proteico de los extractos del fruto de *Bromelia* spp. SDS-PAGE al 15 % de poliacrilamida. Carril (M) Marcador de peso molecular page, (EC) extracto crudo, (ES) extracto soluble y (EM) extracto membranal.

La Fig. 2 muestra los resultados de la captación de radicales libres DPPH, con estos datos se calculó el IC_{50} (concentración mínima para inhibir el 50 % de los radicales) de DPPH para cada uno de los extractos, donde se puede observar que el extracto soluble muestra una mayor actividad que los otros dos extractos dando un valor de IC_{50} de 0,27 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína, en el caso del extracto crudo y del membranal fue de 0,63 y 0,452 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína, respectivamente. Con el método de captación de radicales $ABTS^+$ se calculó la capacidad antioxidante equivalente de trolox (TEAC) en $\text{mM}/\mu\text{g}$ de proteína, los valores están reportados en la Tabla 1. Además se reportan las concentraciones IC_{50} para los extractos. El comportamiento es similar al del DPPH ya que el extracto soluble presenta una mayor actividad antioxidante que los extractos crudo y membranal. En las proteínas la capacidad de captación de radicales libres parece estar relacionada con la presencia de aminoácidos como tirosina, metionina, histidina, lisina y triptófano los cuales han presentado actividad antioxidante en diversos estudios (15).

Por otro lado, el poder reductor es definido como la habilidad de un compuesto para reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} lo cual indica la capacidad de actuar como antioxidante al donar electrones. Asimismo, un incremento en la

biodisponibilidad de aminoácidos libres e iones de hidrógeno durante la digestión provee una fuente adicional de protones y electrones para mantener un alto potencial de óxido-reducción. En la Fig. 3 puede observarse el comportamiento del poder reductor de los tres diferentes extractos proteicos en concentraciones que van de 0,010 a 0,050 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Los IC_{50} tuvieron valores de 0,01197 a 0,024 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, el ES presentó la menor concentración de IC_{50} por lo que tiene un mayor poder reductor. Esto podría explicarse por la composición aminoacídica del extracto.

La capacidad quelante de Cu^{2+} es otro método para determinar la actividad antioxidante. La Fig. 4 presenta los resultados de la capacidad de quelación de cobre de los tres extractos, en donde se puede observar que el EM presentó una mayor actividad quelante, ya que el IC_{50} fue de 0,1305 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, la actividad quelante del ES fue ligeramente menor con un IC_{50} de 0,01715 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. El cobre es un ion metálico fisiológicamente importante que puede jugar un rol significativo en la degradación endógena del ADN y en el daño a lípidos involucrados en el proceso del envejecimiento, en desórdenes neurodegenerativos y cáncer (16). La quelación de cobre podría deberse al incremento de la exposición a ciertos aminoácidos como la histidina (17).

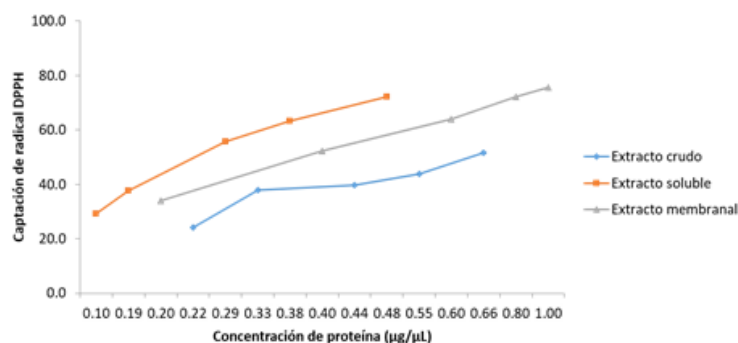


Fig. 2. Valores de IC_{50} en la actividad de captación de radicales DPPH del extracto crudo (EC), extracto soluble (ES) y extracto membranal (EM) de *Bromelia spp.*

Tabla 1. Valores de la capacidad antioxidantes equivalentes a trolox del extracto crudo (EC), extracto soluble (ES) y extracto membranal (EM) de *Bromelia spp.*

Extracto	TEAC ($\text{mM}/\mu\text{g}$ de proteína)	IC_{50} ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína)
EC	1,235	0,60
ES	1,212	0,45
EM	2,909	0,47

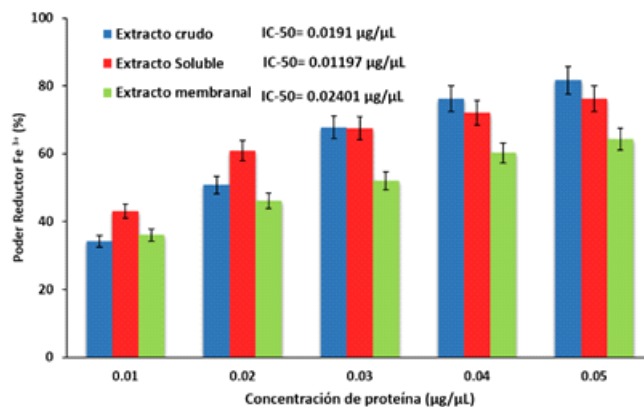


Fig. 3. Valores de IC₅₀ en la actividad de poder reductor de Fe³⁺ del extracto crudo (EC), extracto soluble (ES) y extracto membranal (EM) de *Bromelia spp.*

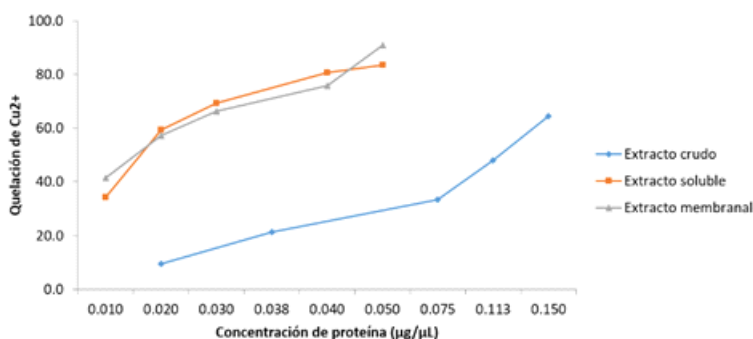


Fig. 4. Valores de IC₅₀ en la actividad de quelación de Cu²⁺ del extracto crudo (EC), extracto soluble (ES) y extracto membranal (EM) de *Bromelia spp.*

CONCLUSIONES

Los tres extractos proteicos que se obtuvieron de la pulpa del fruto de *Bromelia spp.* mostraron actividad antioxidante por los cuatro métodos empleados, siendo el extracto soluble el que presentó mayor actividad antioxidante en tres de los cuatro métodos. Estos son los primeros resultados de la capacidad antioxidante de los compuestos proteicos del fruto de la piñuela que podrían darle un uso potencial como alimento funcional.

REFERENCIAS

1. Arellanes M, Cortes N, García I. Antioxidant and antimicrobial activities of hexane extracts and pure compounds from *Aristolochia taliscana* rhizome. *Rev Mex Cienc Farm* 2011; 42(3):35-41.
2. Alwan A, Armstrong T, Bettcher D, Branca F, Chisholm D, Ezzati M, Wild C. Informe sobre la situación mundial de las enfermedades no transmisibles 2010: Resumen de orientación. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2011.
3. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Nakajima Y, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation* 2017; 114(12):1752-61.
4. Sarmadi BH, Ismail A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides* 2010, 31(10), 1949-56.

5. Pío-León JF, López-Angulo G, Paredes-López O, Uribe-Beltrán M, Díaz-Camacho SP, Delgado-Vargas F. Physicochemical, nutritional and antibacterial characteristics of the fruit of *Bromelia pinguin* L. *Plant Foods for Human Nutrition* 2009; 64:181-7.
6. Argáez B, Ligia G. Análisis del extracto proteico de *Bromelia pinguin* con posible aplicación terapéutica y/o biotecnológica (tesis de maestría). Mérida: Instituto Tecnológico de Mérida; 2011.
7. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1979; 72:248-54.
8. Argáez BC. Actividad antibacteriana de extractos proteicos del fruto de *Bromelia pinguin* L. (tesis de grado). Mérida: Instituto Tecnológico de Mérida, 2014.
9. Sharma OP, Bhat, TK. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem* 2009; 113:1202-05.
10. Kraujalytė V, Venskutonis PR, Pukalskas A, Èesonienė L, Daubaras R. Antioxidant properties, phenolic composition and potentiometric sensor array evaluation of commercial and new blueberry (*Vaccinium corymbosum*) and bog blueberry (*Vaccinium uliginosum*) genotypes. *Food Chem* 2015; 188:583-90.
11. Oyaizu M. Studies on products on browning reaction-anti-oxidative activities of products of browning reaction prepared from Glucosamine. *Jap J Nutr* 1986; 44:307-15.
12. Carter P. Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). *Anal Biochem* 1971; 40:450-8.
13. Abreu-Payrol A, Obregón WD, Trejo SA, Caffini NO. Purification and characterization of four new cysteine endopeptidases from fruits of *Bromelia pinguin* L. grown in Cuba. *Protein J* 2008; 27(2):88-96.
14. Erasti ME. Estudio de posibles aplicaciones farmacológicas de extractos de especies de Bromeliceae y su comparación con bromelina (tesis doctoral). La Plata: Universidad Nacional de la Plata; 2013.
15. Peña-Ramos EA, Xiong YL. Antioxidant activity of soy protein hydrolysates in a liposomal system. *J Food Sci* 2002; 67:2952-6.
16. Megias C, Pedroche J, Yust MM, Girón-Calle J, Alaiz M, Millan F, Vioque J. Affinity purification of copper-chelating peptides from sunflower protein hydrolysates. *J. Agric Food Chem* 2007; 55:6509-14.
17. Peng X, Kong B, Xia Xm, Liu Q. Reducing and radicals-scavenging activities of whey proteins hydrolysates prepared with alcalase. *Int Dairy J* 2010; 20(5):360-5.