

# Desactivación del oxígeno singlete por el extracto de las cáscaras del fruto de *Syzygium Cumini*

## Quenching of singlet oxygen by extract of peels of the fruit of *syzygium cumini*

Jiress Joseph Flórez-Santiago  
Universidad del Atlántico  
Barranquilla, Colombia  
jjosephflorez@uniatlantico.edu.co

Carlos David Grande-Tovar  
Universidad del Atlántico  
Barranquilla, Colombia  
carlosgrande@uniatlantico.edu.co

Carlos Enrique Díaz-Urbe  
Universidad del Atlántico  
Barranquilla, Colombia  
carlosdiaz@uniatlantico.edu.co

**Resumen**– Recientes investigaciones demuestran la importancia de los extractos de origen vegetal como potentes antioxidantes, debido a la presencia de componentes químicamente activos, como los polifenoles, antocianinas, flavonoides, entre otros. Esta sinergia de los componentes se convierte en una posible alternativa frente al uso de antioxidantes de origen sintético. En este trabajo la cáscara de la fruta *Syzygium cumini* fue utilizada para determinar la actividad antioxidante frente al oxígeno singlete. El extracto mostró cantidades apreciables de grupos fenólicos (alrededor de 8,55 AGE mg/g peso fruta). La caracterización por HPLC-DAD muestra por lo menos 3 antocianinas de mayor abundancia relativa (la malvidina 3,5-diglucósido, la delphinidina 3,5-diglucósido y la petunidina 3,5-diglucósido). El porcentaje de desactivación del oxígeno singlete fue determinado a diferentes concentraciones del extracto etanólico, encontrándose un valor del 60% a una concentración 0.39 mg/mL.

**Palabras clave**– Antocianinas, desactivación, oxígeno singlete, *syzygium cumini*.

**Abstract**– Recent research has shown the importance of plant extracts as powerful antioxidants owing to the presence of chemically active components such as polyphenols, anthocyanins, flavonoids, among others. This synergy of the components becomes a possible alternative to the use of antioxidants of synthetic origin. In this study, *Syzygium cumini* fruit peel was used to determine the antioxidant activity against singlet oxygen. The extract showed appreciable amounts of phenolic groups (about 8.55 AGE mg/g fruit weight). HPLC-DAD characterization showed at least 3 anthocyanins of higher relative abundance (malvidin 3,5-diglucoside, delphinidin 3,5-diglucoside and petunidin 3,5-diglucoside). The percentage of quenching of singlet oxygen was determined

at different concentrations of the ethanolic extract, finding a value of 60% at a concentration of 0.39 mg/mL.

**Keywords**– anthocyanins, quenching, singlet oxygen, *syzygium cumini*.

### 1. INTRODUCCIÓN

Los radicales libres y las especies reactivas del oxígeno tienen la capacidad de interactuar químicamente con las macromoléculas del cuerpo humano, generando enfermedades como el cáncer, obesidad, diabetes, enfermedad de Alzheimer, enfermedades oculares, lupus entre otras [1-3]. Estas especies pueden estar presentes en el organismo humano como producto de un metabolismo normal, y pueden ser usadas para la producción de energía, incluso, en algunas células pueden ser utilizadas como defensas para destruir virus y bacterias; pero cuando el cuerpo genera o se expone a cantidades excesivas, ya sea por factores externos o por un factor genotípico, su energía extremadamente alta puede dañar los tejidos normales [4]. El organismo puede contrarrestar estas alteraciones mediante enzimas antioxidantes endógenas, pero cuando no es suficiente, se hace necesario suministrar antioxidantes naturales o sintéticos, tales como el hidroxianisol butilado (BHA) e hidroxitolueno butilado (BHT) [5]. Sin embargo, el uso de compuestos sintéticos ha sido restringido en muchos países debido a los efectos producidos en la salud [6].

Los compuestos naturales parecen ser una alternativa para su uso como antioxidantes. Los metabolitos secundarios de las plantas reúnen una gran cantidad de polifenoles, antocianinas, entre otros compuestos, que están implicados en la defensa contra el ataque de los radicales libres y el oxígeno singulete; por lo que recibe atención al considerarse como factores de protección contra las enfermedades crónicas degenerativas y enfermedades cardiovasculares [7]. Una de las especies vegetales que evidencia que tiene actividad antioxidante es la *Syzygium cumini* (Eugenia Jambolana) [8]. Sin embargo, se desconoce el efecto de estos extractos contra el oxígeno singulete. En este trabajo se evaluó la actividad antioxidante contra el oxígeno singulete a partir del extracto etanólico de la cáscara del fruto de *Syzygium cumini*.

## 2. DESARROLLO DEL ARTÍCULO

### 2.1 Obtención del extracto etanólico por percolación

Para la obtención de la muestra se recolectó 500 g de la fruta *S. cumini* en condiciones óptimas de maduración, en la ciudad de Valledupar (Cesar), Colombia, de coordenadas 10°27'37"N 73°15'35"O, altitud media de 168 msnm, durante la última semana del mes de marzo se marca el inicio de la temporada de lluvias en esta zona del país. Las uvas frescas de la especie *Syzygium cumini* se lavaron con agua destilada, posteriormente se secaron en un horno a 45 °C por un período de 5 días. Se pesó periódicamente hasta que este 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 rotaevaporador por 10 minutos y una temperatura de 60 °C, retirando el solvente.

### 2.2 Caracterización del extracto por UV-Vis y HPLC

Para el análisis de las antocianinas presentes en el extracto etanólico se utilizó un espectrofotómetro UV-vis (*Thermo Fisher Scientific*, modelo

*Genesys 10S UV-Vis*), y se caracterizó por determinación analítica, 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 *Chromleon® 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).

### 2.3 Contenido total de fenoles

El reactivo de Folin-Ciocalteu (FC) se preparó a una concentración 1 N a partir del reactivo comercial (2,0 N) disolviéndolo en agua destilada. Se protegió de la luz para evitar su degradación y se guardó en refrigeración hasta su uso. Adicionalmente, se preparó una solución al 20% de carbonato de sodio.

### 2.4 Estudio del quenching del oxígeno singulete por el extracto

El oxígeno singulete fue generado siguiendo la metodología propuesta por Aubry [9], por medio del sistema  $\text{Na}_2\text{MoO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ , 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 microe-

mulsi3n. Luego se adicion3 a esta microemulsi3n 6 mL de una soluci3n 0,2 M de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $1,2 \times 10^{-3}$  moles), gota a gota con agitaci3n constante hasta obtener una emulsi3n transparente (pH=10) [10]. La microemulsi3n originada corresponde a una micela tipo (W/O) o micela invertida. Para la generaci3n de ox3geno singulete se adicion3 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

El seguimiento de la reacci3n se hizo a 522 nm. El porcentaje de desactivaci3n (%Q) se determin3 por medio de la siguiente ecuaci3n:

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

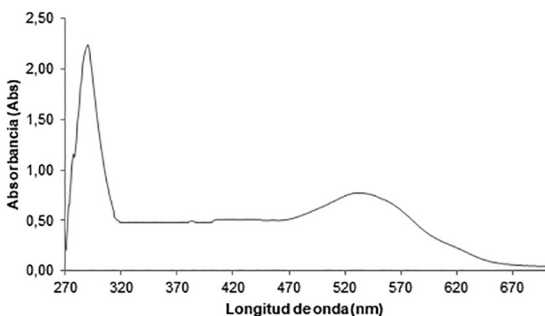
Donde el  $\Delta A_{ao}$  corresponde a un cambio de la absorbancia en presencia del extracto y  $\Delta A_c$ , es el cambio de la reacci3n control, es decir, en ausencia del extracto.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Caracterizaci3n del extracto por UV-Vis y HPLC

La soluci3n del extracto etan3lico de *S. cumini* present3 un color p3rpura intenso, caracter3stico de los extractos que contienen antocianinas [11]. Las antocianinas exhiben un espectro de absorci3n de referencia con bandas aproximadas a 290, 380 y una banda ancha entre 500-545 nm (Fig. 1). las dos primeras se3ales corresponden a las transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$  y la 3ltima a la transici3n  $n \rightarrow \pi^*$ , esto permite la confirmaci3n preliminar de la existencia de un grupo crom3foro fuertemente conjugado, como son las antocianinas [12].

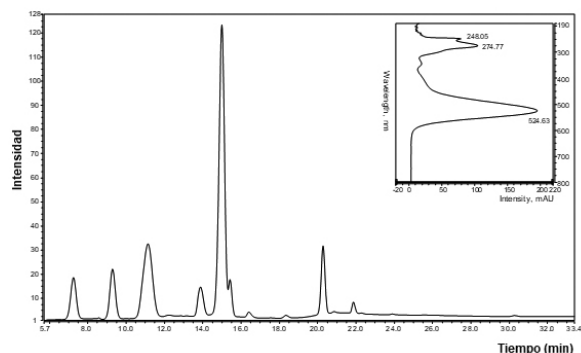
Fig. 1. ESPECTRO DE ABSORCI3N UV-Vis DE LA SOLUCI3N ETAN3LICA DEL EXTRACTO DE *S. CUMINI*



Fuente: Los autores

El contenido total de antocianinas presente en el extracto etan3lico de *S. cumini* fue de  $31 \pm 5$   $\mu\text{g}$  ATECD/mL de extracto. El perfil cromatogr3fico por HPLC-DAD ( $\lambda$  525 nm) para el extracto de frutos de *S. cumini* se presenta en la Fig. 2. De acuerdo con la metodolog3a planteada, se caracteriz3 la presencia de m3s de 15 antocianinas, tres de ellas m3s abundantes, las cuales fueron, la malvidina 3,5-digluc3sido (44%), la delphinidina 3,5-digluc3sido (28%) y la petunidina 3,5-digluc3sido (9%) [13].

Fig. 2. PERFIL CROMATOGR3FICO POR HPLC-DAD ( $\lambda$  525 nm) DEL EXTRACTO ETAN3LICO DEL FRUTO ESPECIE *S. CUMINI*



Fuente: Los autores

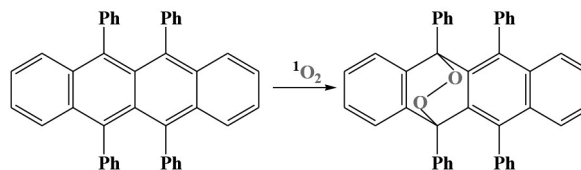
#### 3.2 Determinaci3n del contenido total de fenoles

Por cada 100 gramos de fruta fresca se obtuvo 1,58 g de extracto seco. El contenido total de fenoles reportado para las partes comestibles de la fruta *S. cumini* es de: 0,569 (piel) y 0,235 (pulpa) mg/g AGE PF (peso fruta), y para esta metodolog3a fue de 8,55 mg/g AGE PF.

#### 3.3 Desactivaci3n del ox3geno singulete

El rubreno (color naranja) es oxidado a un endoper3xido (incoloro), a trav3s de una cicloadici3n [ $4\pi + 2\pi$ ] del ox3geno singulete, Fig. 3 [14]. Cuando el extracto est3 presente en el medio, la reacci3n de oxidaci3n es inhibida.

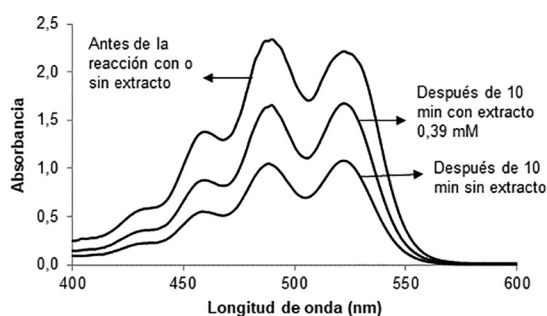
Fig. 3. ATRAPAMIENTO QU3MICO DEL OX3GENO SINGULETE POR EL RUBRENO.



Fuente: Los autores

En la Fig. 4 se puede apreciar el espectro visible de la oxidación del rubreno en ausencia y en presencia del extracto. Después de 10 min de reacción, con una concentración de extracto de 0.39 mg/mL, la oxidación del rubreno por el oxígeno singulete es inhibida aproximadamente en un 60%. En la tabla 1 se muestran los porcentajes de desactivación del oxígeno singulete para diferentes concentraciones de extracto; es posible evidenciar que a menores concentraciones del extracto *S. cumini* se presentan menores valores de dicho porcentaje, esto es debido a que disminuye la cantidad de moléculas capaces de desactivar el oxígeno singulete. En presencia de azida de sodio no se observó oxidación del rubreno.

Fig. 4. ESPECTROS VIS DE LA OXIDACIÓN DEL RUBRENO



Fuente: Los autores

Tabla I

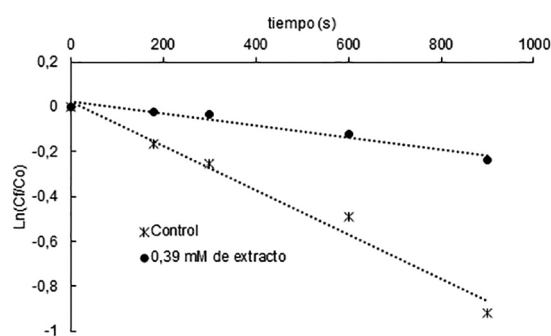
PORCENTAJE DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO *S. CUMINI*

Concentración del extracto (mg/mL)	% Q ( 10 min)
0,390	60%
0,100	54%
0,058	46%
0,026	19%

Fuente: Los autores

La oxidación del rubreno en ausencia o presencia del extracto siguió una cinética de pseudo-primer orden (Fig. 5). 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  $3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ , 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.

Fig. 5. GRÁFICO DE  $\ln(C_t/C_0)$  VS TIEMPO (s)



Fuente: Los autores

#### 4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que el fruto de la especie *Syzygium cumini* es una posible fuente de compuestos con potencial actividad antioxidante contra el oxígeno singulete. El extracto mostró cantidades apreciables de grupos fenólicos (alrededor de 8,55 AGE mg/g peso fruta). La caracterización por HPLC-DAD muestra por lo menos 3 antocianinas de mayor abundancia relativa (la malvidina 3,5-diglicósido, la delphinidina 3,5-diglicósido y la petunidina 3,5-diglicósido). Se evidencia un 60% de desactivación del oxígeno singulete, a una concentración de 0,39 mg/mL a 10 minutos de reacción.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al profesor Amner Muñoz de la Universidad del Norte por la toma del espectro de HPLC.

#### REFERENCIAS

- [1] C.R: Reczek, N.S. Chandel, "ROS Promotes Cancer Cell Survival through Calcium Signaling," *Cancer Cell*, vol. 33, pp. 949-951, 2018.
- [2] J.N. Moloney, T.G. Cotter, "ROS signalling in the biology of cancer," *Semin Cell Dev Biol*, vol. 80, pp. 50-64, 2018.
- [3] C.E. Díaz-Urbe, F. Martínez, W. Vallejo, "Synthesis and characterization of TiO<sub>2</sub> thin films doped with copper to be used in photocatalysis," *Iteckne*, vol. 10, pp. 16-20, 2013.
- [4] F. Galli, M. Piroddi, C. Anneti, C. Aisa, E. Floridi, A. Floridi, "Oxidative stress and reactive oxygen species," *Contrib Nephrol*, vol. 149, pp. 240-260, 2005.
- [5] M.Y. Jung, J.H. Lee, "Direct spectroscopic observation of singlet oxygen quenching and kinetic studies of physical and chemical singlet oxygen quenching rate constants of synthetic antioxidants (BHA, BHT, and

- TBHQ) in methanol," *J Food Sci.* vol.;75(6), pp. C506-513, 2010.
- [6] N.F. Ito, "Carcinogenicity and modification of the carcinogenic response by BHA, BHT, and other antioxidants," *CRC Cr. Rev Toxicol*, vol. 15(2), pp. 109-150, 1985.
- [7] V. Unsal, E. Belge-Kurutas, "Experimental Hepatic Carcinogenesis: Oxidative Stress and Natural Antioxidants," *J Med Sci*, vol 12, pp. 686-691, 2017.
- [8] R.S. Birur, R.S. Iyer, S.R. Subbaramaiah, S.A. Richard, B.I. Dhananjaya, "Antioxidant activity of *Syzygium cumini* leaf gall extracts," *Bioimpacts*. vol 4(2), pp. 101-107, 2014.
- [9] J.M. Aubry, "Search for singlet oxygen in the decomposition of hydrogen peroxide by mineral compounds in aqueous solutions," *J. Am. Chem. Soc.* vol 107, pp. 5844-5849, 1985.
- [10] C.E. Díaz-Urbe, M. Daza, F. Martínez, "Oxidation of anthracene with singlet oxygen generated chemically by the sodium molybdate/hydrogen peroxide system," *Rev. Col. Quim* vol 37(1), pp. 45-53, 2008.
- [11] K. KjellTorskangerpoll, O.M. Andersen, "Colour stability of anthocyanins in aqueous solutions at various pH values," *Food Chem.*, vol 89, 99 427-440, 2005.
- [12] L.M. Zapata, A.M. Heredia, C.F. Quinteros, A.D. Mallet, G. Clemente, J.A, "Cárcel Optimización de la extracción de antocianinas de arándanos," *Cienc. Docen Tecn.* vol. pp. 1851-1716, 2014.
- [13] Da-Silva, R., I. Hermosín Gutiérrez, M. I., De Carvalho Tavares, A., Mota Ramos, S., Gómez Alonso, E. García Romero, "Comprehensive study of the phenolic composition of the edible parts of jambolan fruit (*Syzygium cumini* (L.) Skeels)," *Food Research International*, 82, 1-13. 2016.
- [14] V. Nardello, M.J. Marti, C. Pierlot J.M Aubry, "Photochemistry without light: oxidation of rubrene in a microemulsion with a chemical source of singlet molecular oxygen ( $^1\text{O}_2$ ,  $^1\Delta_g$ )," *J. Chem. Edu.* Vol. 76, 1999, 1285-1288.