



EFFECTO DEL EXTRACTO DE LA CEREZA EN LA REDUCCIÓN DE COLESTEROL.

Castañeda-Ovando, A.^{a*}, Contreras-López, E.^a, Piña Aguilar, F.^a, Barajas Gómez, J.J.^a,
Ramírez Godínez, J.^a

^a Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Área Académica de Química. Laboratorio de Físicoquímica de Alimentos 2. Carr. Pachuca-Tulancingo, Km. 4.5, C.P. 42184. Tel: +52 (771) 7172000 Ext. 2512. Mineral de la Reforma, Hidalgo, México.
*ovandoa@uaeh.edu.mx

RESUMEN

En los últimos años, el problema del alto contenido de colesterol en la sangre ha estado en aumento, debido a la falta de control en la dieta. La principal forma de atacar este problema es sobre todo acudiendo a alimentos de origen natural. Es bien sabido, que los frutos rojos tienen un efecto benéfico en la salud, sobre todo frente a enfermedades cardiovasculares; por lo que en el presente trabajo se utilizarán los extractos de antocianinas provenientes de la cereza (*Prunus avium* L.) en la reducción del colesterol. Se realizaron cinéticas para monitorear el contenido de colesterol durante una hora, mostrando una reducción del colesterol en solución no polar hasta de un 70%. Estos resultados demuestran que este tipo de compuestos podrían ser utilizados en el control del colesterol, parámetro que a su vez está relacionado con otros problemas de salud, tales como enfermedades cardiovasculares.

ABSTRACT

In recent years, the high cholesterol content in the blood has been increasing, due to the deficiency in the diet control. The main manner to attack this problem is attending to natural food. It is well known, red fruits have a beneficial effect on health, particularly against cardiovascular diseases; in the present paper used extracts from anthocyanins cherry (*Prunus avium* L.) in reducing cholesterol. Kinetics were carried out to monitor cholesterol content for an hour, showing a cholesterol reduction in non-polar solution up to 70%. These results show that this kind of compounds could be used in the cholesterol control, which is related with other health problems, like cardiovascular diseases.

Palabras clave:

Antocianinas, colesterol, cerezas.

INTRODUCCIÓN

Los pigmentos más comunes en las plantas son los carotenoides, las antocianinas y las betalainas. Mientras que los primeros están localizados en plastidios especializados, las otras dos son depositadas en la vacuola (Stintzing and Carle, 2004).

La importancia de las antocianinas no radica sólo en el color que imparten a las frutas y flores, sino también en sus propiedades benéficas en la salud, tales como: antioxidante, anticarcinogénica, antiinflamatoria y antiangiogénica (Clifford, 2000; Kong et al., 2003; Rossi et al., 2003). En lo que respecta a la cereza, en muchas



investigaciones se han reportado el efecto positivo de la ingesta de éstas en la salud (Rein, 2005).

Las antocianinas aumentan también el valor nutricional de alimentos procesados, ya que previenen la oxidación de lípidos y proteínas en productos alimenticios (Kähkönen et al., 2001; Kähkönen et al., 2003; Viljanen et al., 2004).

Entre los estudios *in vivo* reportados acerca del efecto de las antocianinas en el metabolismo de grasas, se encuentra el realizado por Carvajal-Zarrabal y colaboradores (2009), en el cual se investigó el efecto de los extractos de flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa L.*) en la absorción-excreción de grasas y en la implicación del peso corporal en ratas, encontrando que al aumentar el porcentaje de ingesta de extracto en el animal, disminuía significativamente el peso corporal, concluyendo que este tipo de extracto se puede utilizar como agente antiobesidad.

Por la importancia que tienen los extractos antocianicos, en el presente trabajo se muestran los resultados obtenidos de llevar a cabo diversos experimentos entre fase polar (extracto de antocianinas) y fase no polar (colesterol en solución clorofórmica), realizando la determinación del colesterol mediante el método de Liebermann-Burchard, el cual se fundamenta en una oxidación de dicho compuesto.

METODOLOGÍA

Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. El HCl, el cloroformo, el anhídrido acético y el ácido sulfúrico fueron obtenidos de J.T. Baker (NJ, USA); el etanol de Mallinckrodt (NJ, USA) y el colesterol de Sigma-Aldrich (MO, USA). Las cerezas (*Prunus avium L.*) fueron adquiridas en establecimientos comerciales. El agua desionizada (18.2 MΩ cm) utilizada para preparar las soluciones se tomó de un equipo Milli-Q de Millipore (MA, USA).

Soluciones

Las soluciones utilizadas en la determinación del contenido de antocianinas monoméricas fueron KCl 0.25 mol L⁻¹ (para pH 1) y solución amortiguadora de acetatos (0.4 mol L⁻¹, pH 4.5). Se preparó una solución patrón de colesterol 1000 mgL⁻¹, pesando la cantidad adecuada de reactivo y disolviendo en cloroformo, a partir de la cual se tomaron alícuotas para las diferentes soluciones utilizadas en los experimentos.

Obtención del extracto

Se pesaron 480 g de cereza y se maceraron con 250 mL de solución etanólica de HCl al 0.2 % (v/v). La mezcla se mantuvo en agitación durante 1 h y posteriormente fue filtrada. El filtrado (extracto antocianico) fue almacenado en un envase plástico a 4 °C, para ser utilizado en los experimentos siguientes.

Determinación del contenido de antocianinas

El contenido total de antocianinas en el extracto se realizó utilizando el método de pH diferencial (Wrolstad et al., 2005), para lo cual se prepararon dos soluciones del extracto, una a pH 1 y la otra a pH 4.5, y se obtuvieron los espectros UV-vis correspondientes en una ventana espectral de 250 a 750 nm. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Distribución del colesterol entre fase clorofórmica y extracto de antocianinas

Se realizó una serie de experimentos, utilizando las concentraciones de antocianinas que se presentan en la Tabla 1; en todos los casos se agregaron 10 mL de solución de extracto de antocianinas, 20 mL de fase clorofórmica y una concentración de $2.59 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (100 mg L^{-1}) de colesterol, excepto en los blancos, los cuales únicamente contenían cloroformo como fase no polar.

Tabla 1. Condiciones para la distribución del colesterol.

Experimento	[Antocianinas], $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$
Blanco 1	2.5
Experimento 1	2.5
Blanco 2	5.0
Experimento 2	5.0
Blanco 3	7.5
Experimento 3	7.5

Las fases se mantuvieron en agitación durante 1 hora, tomándose alícuotas de 1 mL de la fase clorofórmica cada 10 minutos, a las cuales posteriormente, se les agregó 1 mL de HCl 1 mol L^{-1} y se centrifugó a 4000 rpm durante 1 minuto, después se separaron las fases, manteniendo la fase clorofórmica para a determinación de colesterol.

Determinación de colesterol mediante el método de Liebermann-Burchard

Se tomaron alícuotas de 500 μL de cada una de las 6 fases clorofórmicas y se llevaron a un baño de vapor para eliminar el disolvente, se agregaron 1.8 mL de anhídrido acético y 200 μL de ácido sulfúrico, manteniendo en reposo durante 10 minutos, hasta que desarrollará el color característico del producto de oxidación del colesterol (azul) y finalmente se midieron las absorbancias de cada una de las muestras, a una longitud de onda de 640 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para calcular el contenido total de antocianinas monoméricas se tomó como base la Ecuación 1, la cual Wrolstad y colaboradores (2005) obtuvieron al hacer el estudio con variedades de muestras en las que incluyeron extractos de diferentes fuentes, expresando el contenido como Cy-3-rut, debido a que es la antocianina más abundante en la cereza (Mozetic, et al., 2006). La absorbancia a 700 nm se toma como corrección cuando en la muestra hay sólidos suspendidos o materia coloidal.

$$\text{Antocianinas totales (mg L}^{-1}\text{)} = \frac{A \times PM \times FD \times 10^3}{\epsilon \times l} \quad \text{Ec. 1}$$



donde:

$$A = (A_{\lambda \text{ vis-max}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH}_1} - (A_{\lambda \text{ vis-max}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH}_{4.5}} \quad \text{Ec. 2}$$

PM= peso molecular de la antocianina más abundante en la cereza (Cy-3-rut, PM= 595 g mol⁻¹).

FD= Factor de dilución= 20.

ε= coeficiente de absorbtividad molar de la antocianina más abundante en la cereza (Cy-3-rut, ε_{523 nm}=28 840 cm⁻¹mol⁻¹ L a pH 1.0).

ℓ= longitud de paso óptico.

Se obtuvo un contenido de antocianinas en el extracto de la cereza de 604 mg L⁻¹ (5.0x10⁻⁶ mol L⁻¹). Esta solución se utilizó para los experimentos de reparto del colesterol.

En los experimentos de reparto del colesterol, tal como se mencionó anteriormente se realizaron 3 experimentos diferentes. Una vez llevada a cabo la reacción de Liebermann-Burchard para la oxidación del colesterol remanente en la fase clorofórmica, se midieron las absorbancias de cada una de las muestras a una longitud de onda de 640 nm.

En la Figura 1 se muestran las gráficas en función a la absorbancia a 640 nm, debida a la formación del producto de oxidación del colesterol. Es importante observar que en el caso del blanco, se lleva a cabo la reacción de Liebermann-Burchard, pero no es debida al contenido de colesterol en la cereza, sino a la presencia del β-sitosterol en este fruto, cuyo contenido en él es de 12 mg/100 g de fruto (Bernardo-Gil, et al., 2001), el cual fue transportado a la fase clorofórmica y que también presenta la reacción de oxidación (Kenny, 1952). Como se observa en la Figura 1, la absorbancia en el blanco se mantiene constante, por lo que es un indicio de que es debida al esteroles presente en la cereza. Este comportamiento fue el mismo en todos los blancos que se trabajaron.

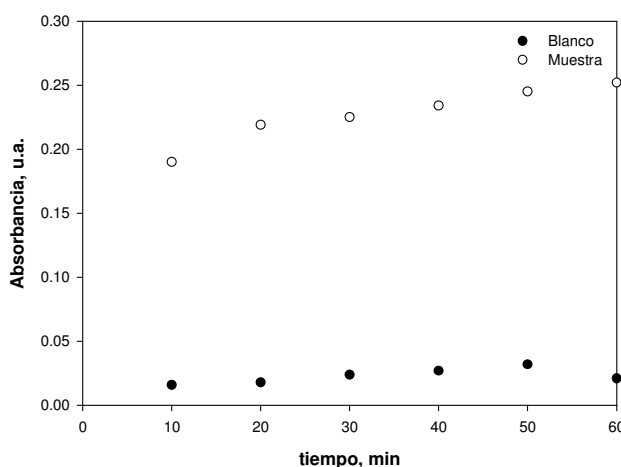


Figura 1. Gráficas de Absorbancia vs tiempo, para el monitoreo de la distribución del colesterol.

Para corroborar la presencia del β -sitosterol en la fase clorofórmica del blanco, se obtuvo el espectro FT-IR de la fase clorofórmica (Figura 2) presentando las bandas características de esa molécula.

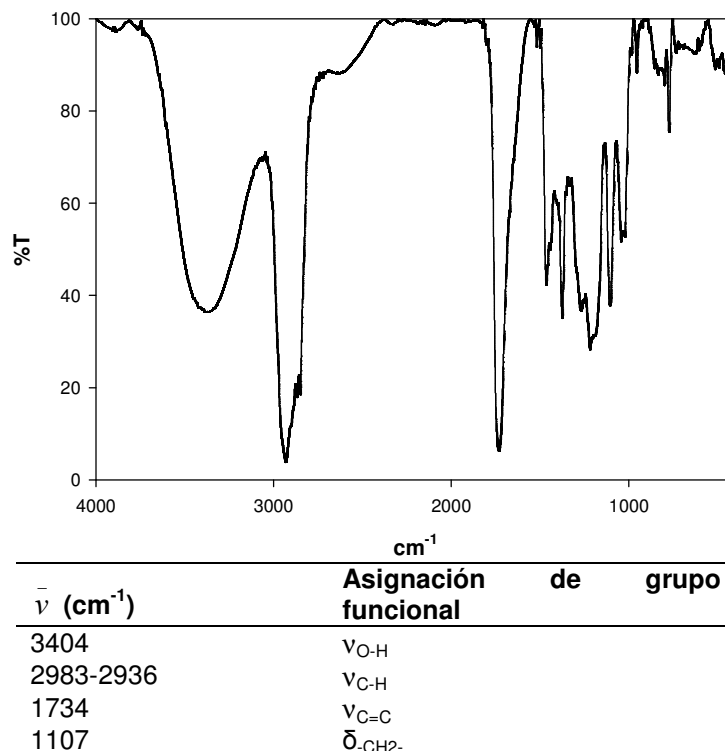


Figura 2. Espectro FT-IR de la fase clorofórmica del blanco, asignado como β -sitosterol.

Para determinar el contenido de colesterol que fue retenido en la fase de las antocianinas, se calculó la concentración del colesterol en las fases clorofórmicas correspondientes haciendo una corrección con el blanco. El cálculo de las concentraciones de colesterol se hizo con la interpolación a una curva de calibrado que previamente se realizó en el intervalo de concentraciones de 0 a 100 mg L⁻¹. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Porcentaje de colesterol retenido en la fase de antocianinas de cereza. Condiciones: [Antocianinas]= 2.5×10^{-6} mol L⁻¹, [colesterol]= 2.59×10^{-4} mol L⁻¹ (100 mg L⁻¹).

Tiempo, min	% colesterol retenido
10	68.82
20	63.98
30	63.98
40	62.90
50	61.83
60	58.60

En el experimento 2, en el cual [Antocianinas]= 5.0×10^{-6} mol L⁻¹, [colesterol]= 2.59×10^{-4} mol L⁻¹ (100 mg L⁻¹), el comportamiento del blanco fue el mismo que en el

caso anterior (Figura3), pero en % de colesterol retenido si hay diferencias, tal como se muestra en la Tabla 3.

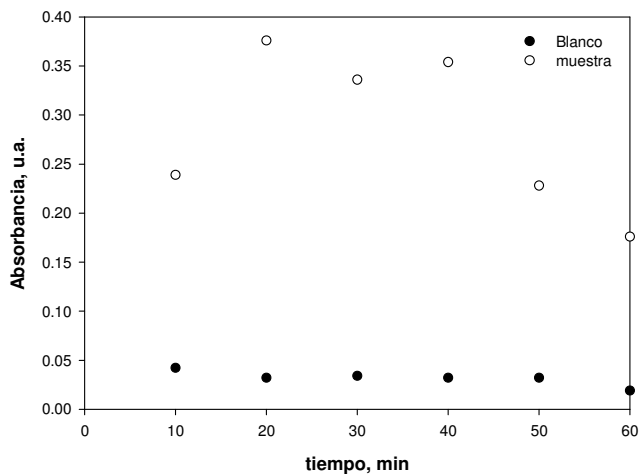


Figura 3. Gráficas de Absorbancia vs tiempo, para el monitoreo de la distribución del colesterol. Condiciones: [Antocianinas]= $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, [colesterol]= $2.59 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (100 mg L^{-1}).

Para el experimento 2 se obtuvieron porcentajes menores de retención del colesterol, sin embargo en 10 minutos, el % de colesterol retenido es muy parecido al del experimento 1.

Tabla 3. Porcentaje de colesterol retenido en la fase de antocianinas de cereza. Condiciones: [Antocianinas]= $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, [colesterol]= $2.59 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (100 mg L^{-1}).

Tiempo, min	% colesterol retenido
10	64.70
20	38.35
30	45.88
40	42.30
50	64.88
60	71.86

En el experimento 3 ([Antocianinas]= $7.5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, [colesterol]= $2.59 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (100 mg L^{-1})), el producto de oxidación no desarrolló el color esperado (azul), esto puede ser debido a que aumenta la cantidad de extracto y es muy probable que se coextraigan otros compuestos del extracto, los cuales son interferentes para la reacción de Liebermann-Burchard.

En la Figura 4 se muestran las gráficas correspondientes al % de colesterol retenido en la fase de antocianinas con respecto al tiempo, para los experimentos 1 y 2; en la cual se puede observar que para el experimento 2 se obtuvieron porcentajes menores de retención del colesterol, sin embargo en 10 minutos, el % es muy parecido al del experimento 1.

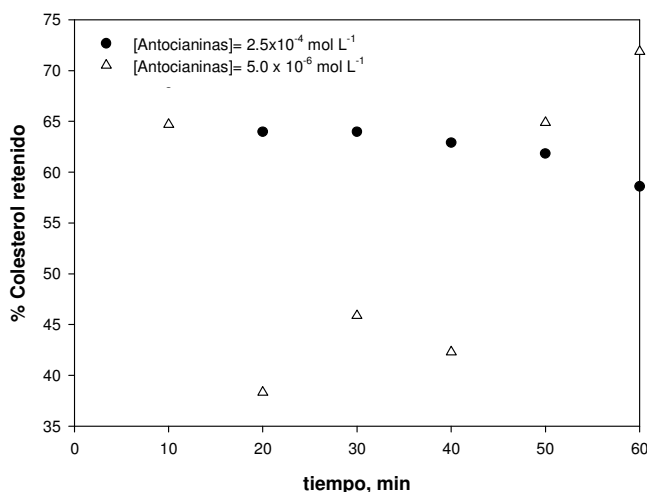


Figura 4. Gráficas de % colesterol retenido vs tiempo, para el experimento 1 ([Antocianinas]= 2.5×10^{-6} mol L⁻¹, [colesterol]= 2.59×10^{-4} mol L⁻¹ (100 mg L⁻¹)) y el experimento 2 ([Antocianinas]= 5.0×10^{-6} mol L⁻¹, [colesterol]= 2.59×10^{-4} mol L⁻¹ (100 mg L⁻¹)).

CONCLUSIONES

Las antocianinas son compuestos con una amplia gama de aplicaciones en el ámbito industrial. En el área de alimentos no sólo se debe ver desde la perspectiva del color. De acuerdo a los resultados obtenidos se encuentra que el extracto de antocianinas es una buena opción para la formulación de un producto orgánico que combata problemas de niveles de colesterol alto.

REFERENCIAS

- Bernardo-Gil G, Oneto C, Antunes P, Rodrigues F, Empis JM. 2001. Extraction of lipids from cherry seed oil using supercritical carbon dioxide. *European Food Research and Technology* 212:170–174.
- Carvajal-Zarrabal O, Hayward-Jones PM, Orta-Flores, Nolasco-Hipólito C, Barradas-Dermitz DM, Aguilar-Uscanga MG, Pedroza-Hernández MF. 2009. Effect of *Hibiscus sabdariffa* L. dried calyx ethanol extract on fat absorption-excretion, and body weight implication in rats. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2009: 1-5.
- Clifford MN. 2000. Anthocyanins-nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80:1063-1072.
- Kähkönen MP, Heinämäki J, Ollilainen V, Heinonen M. 2003. Berry anthocyanins: Isolation, identification and antioxidant activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83:1403-1411.
- Kähkönen MP, Hopia AI, Heinonen M. 2001. Berry phenolics and their antioxidant activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 49:4076-4082.
- Kenny AP. The determination of cholesterol by the Liebermann-Burchard reaction. 1952. *Biochemical Journal* 52:611–619.
- Kong J, Chia L, Goh N, Chia T, Brouillard R. 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 64:923-933.
- Rein M. 2005. Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. University of Helsinki: Helsinki, pp. 9.



- Rossi A, Serraino I, Dugo P, Di Paola R, Mondello L, Genovese T, Morabito D, Dugo G, Sautebin L, Caputi AP, Cuzzocrea S. 2003. Protective effects of anthocyanins from blackberry in a rat model of acute lung inflammation. *Free Radical Research* 37:891-900.
- Stintzing FC, Carle R. 2004. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology* 15:19–38.
- Viljanen K, Kivikari R, Heinonen M. 2004. Protein-lipid interactions during liposome oxidation with added anthocyanin and other phenolic compounds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 52:1104-1111.
- Wrolstad RE, Durst RW, Lee J. 2005. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science & Technology* 16:423-428.