

Artículo Original

Fluctuación diurna del contenido de vitamina C en hojas de *Myrciaria dubia* "camu camu"

[Diurnal fluctuation of vitamin C in leaves of *Myrciaria dubia* "camu camu"]

Franz M. Correa-Meléndez^{1*}, Marianela Cobos-Ruiz¹, Roberson Ramirez-Saavedra²,
Sixto A. Imán-Correa³ & Juan C. Castro-Gómez²

¹Facultad de Ciencias e Ingeniería, Universidad Científica del Perú, Av. Abelardo Quiñones Km 2.5, Iquitos, Perú.

²Centro de Investigación de Recursos Naturales (CIRNA). Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP).
Pasaje Los Paujiles S/N, AAHH Nuevo San Lorenzo. Iquitos-Perú.

³Instituto Nacional de Innovación Agraria-Estación Experimental San Roque.

*e-mail: franzmich07@hotmail.com

Resumen

Myrciaria dubia "camu camu" es un frutal del trópico amazónico caracterizado por sus frutos con gran contenido de vitamina C, siendo considerado un producto importante del país. Sin embargo, hay pocos reportes sobre el metabolismo y transporte de vitamina C en esta especie. El objetivo de la investigación fue determinar la fluctuación diurna del contenido de vitamina C en hojas de *M. dubia* "camu camu". Las hojas se colectaron de la colección de germoplasma de "camu camu" del INIA a las 2, 6, 10, 14, 18 y 22 horas; de cuatro plantas y en tres fechas diferentes. La vitamina C fue extraída de las hojas con un método estandarizado en el laboratorio y se cuantificó mediante espectrofotometría a 530nm, previa reacción con 2,6-diclorofenolindofenol. Los resultados muestran que el contenido de vitamina C de las hojas de "camu camu" fue en promedio 231±35 mg vitamina C/100g de hoja. Además, el contenido de vitamina C en las hojas del "camu camu" mostró fluctuación diurna, siendo menor a las 6 horas y mayor a las 2 y 14 horas del día. También, se registraron concentraciones intermedias en horas de menor o ausencia de radiación solar (235±17 y 237±35 mg vitamina C/100g de hoja a las 18 y 22 horas respectivamente). Se concluye que existe alto contenido de vitamina C en las hojas del "camu camu" y que este contenido presenta fluctuación diurna.

Palabras clave: *Myrciaria dubia*, camu camu, vitamina C, fluctuación diurna, hojas.

Abstract

Myrciaria dubia "camu camu" is a fruit of Amazonian tropics characterized by high content of vitamin C, being considered a important product of the country. However, there are few reports on the metabolism and transport of vitamin C in this species. The research objective was to determine the diurnal fluctuation of vitamin C in leaves of *M. dubia* "camu camu". Leaves were collected from the germplasm collection of "camu camu" from INIA at 2, 6, 10, 14, 18 and 22 hours, from four plants and three different dates. Vitamin C was extracted from leaves with a standardized method in the laboratory and quantified by spectrophotometry at 530nm, after reaction with 2,6-dichlorophenolindophenol. Results show that vitamin C content of leaves of "camu camu" averaged 231±35 mg vitamin C/100g of leaves. In addition, vitamin C content in the leaves of "camu camu" showed diurnal fluctuation, being lower at 6 h and increased at 2 and 14 hours of day. Also, were recorded intermediate concentrations in hours with lower or absence of solar radiation (235±17 and 237±35 mg vitamin C/100g of leaves at 18 and 22 hours respectively). In conclusion, there is a high vitamin C content in leaves of "camu camu" and this content has diurnal fluctuation.

Keywords: *Myrciaria dubia*, camu camu, vitamin C, diurnal fluctuation, leaves.

Recibido: 20 Julio 2012

Aceptado: 05 Mayo 2013

Este artículo puede ser citado como: FM Correa-Meléndez, M Cobos-Ruiz, R Ramirez-Saavedra, SA Imán-Correa & JC Castro-Gómez. 2013. Fluctuación diurna del contenido de vitamina C en hojas de *Myrciaria dubia* "camu camu". **Cienc amaz (Iquitos) 3(2), 60-66.**

INTRODUCCIÓN

La Amazonía es el mayor bosque tropical que existe en el mundo, abarca aproximadamente 6 059 000 km² y contiene más del 50% de las especies registradas hasta el momento (Uhl y Dransfield, 1997). Con el actual desarrollo de fuentes económicas a través de la explotación de nuestros recursos naturales, es necesario el estudio en todas las formas de aquellos que representen una mayor importancia para el desarrollo social y económico de la población, y uno de ellos es *Myrciaria dubia* también conocido como "camu camu". Este producto, es valorado a nivel mundial debido principalmente a las altas concentraciones de ácido ascórbico (vitamina C), siendo denominado por el Perú como producto bandera a nivel Nacional para que sea impulsor del crecimiento económico del país.

Myrciaria dubia (Kunth) Mc Vaugh, de la familia Myrtaceae es un arbusto que crece comúnmente en la orilla de las quebradas y cochas de la cuenca amazónica. La especie forma una parte importante de la vegetación riparia en Perú, Brasil, Venezuela y Colombia, pero se presenta en mayor abundancia en la Amazonía Peruana, donde se encuentran poblaciones naturales extensas (Peters y Vásquez, 1988).

El ácido ascórbico, también conocido como vitamina C, es producido sintéticamente y extensivamente usado en la industria de alimentos por su acción antioxidante (Chambers *et al.*, 1996). En muchos alimentos es adicionado como suplemento (jugos de fruta, por ejemplo), siendo usado en la medicina como pastillas multivitamínicas. El ácido ascórbico es un agente reductor en solución acuosa. El carácter ácido y la acción reductora son atribuidos al grupo enediol (David *et al.*, 1994).

La principal ruta biosintética de vitamina C en plantas ha sido recientemente estudiada por Wheeler *et al.* (1998) y han sido descritas vías alternativas (Hancock y Viola, 2005). Castro *et al.* (2011), ha demostrado la expresión genética y actividad de enzimas de la vía Smirnoff-Wheeler en las hojas y frutos (pulpa y cáscara) del "camu camu". Este proceso metabólico se inicia con la fotosíntesis, donde la planta toma la luz solar y la transforma en energía química (ATP), para la síntesis de glucosa. Una parte de la glucosa sintetizada es convertida a glucosa-6-fosfato y este

metabolito es canalizado a la ruta de Smirnoff-Wheeler, en la que la GDP-manosa-1-fosfato es convertida a ácido ascórbico. En este proceso enzimático se forman intermediarios metabólicos como GDP-Manosa, GDP-L-Galactosa, L-Galactosa-1-fosfato, L-Galactosa y L-galactona-1,4-lactona. Varios estudios han determinado el contenido de vitamina C en los frutos del "camu camu" (Peters y Vasques, 1988; Vizcarra, 2005). Sin embargo, no existen reportes de la determinación del contenido de esta vitamina en las hojas, uno de los principales órganos de fotosíntesis y por ende de biosíntesis de vitamina C. Además, se desconoce su relación con los factores físicoquímicos (temperatura, horas del día e intensidad de luz, factores nutricionales entre otros). Por tanto, el objetivo de esta investigación fue determinar la fluctuación diurna del contenido de vitamina C en hojas de *M. dubia* "camu camu".

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de material botánico

Las muestras biológicas fueron obtenidas de la colección de germoplasma de "camu camu", de la estación experimental "El Dorado" del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), ubicado a la altura del km 25½ de la carretera Iquitos-Nauta (3°57'22.95"LS, 73°24'46.91"LO).

Se eligieron al azar cuatro plantas de la colección de germoplasma de "camu camu" (códigos de acceso: 7,2, 52,9, 53,3 y 56,2). Las hojas adultas en buen estado, fueron colectadas cada cuatro horas (2, 6, 10, 14, 18 y 22 horas del día) por triplicado y en tres fechas diferentes (31/08/11, 05/10/11 y 05/11/11). Las muestras obtenidas fueron transportadas en condiciones de refrigeración al Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigación de Recursos Naturales (CIRNA) de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, donde se procesaron inmediatamente para extraer y cuantificar la vitamina C.



Figura 1. Ubicación de la Colección de Germoplasma de "camu camu" del INIA. Lugar donde se colectaron las hojas del "camu camu" para extraer y cuantificar la vitamina C. Imagen tomada y modificada de Google Earth.

Extracción de vitamina C

Se realizó de acuerdo a Ledezma-Gairaud (1993) modificado. Para ello, 250mg de hoja se trituró por tres minutos con un mortero, añadiendo gradualmente hasta 950 µl de solución extractora (HPO₃ 3%, ácido acético

8% y EDTA 0,36%). El proceso de extracción se realizó en un ambiente con luz tenue y a temperatura a 18 ° C. El triturado se transfirió a microtubos de 1,5 ml, se homogenizó en vortex por 30 seg, y centrifugó a 15000 rpm por 10 min a 4°C, el sobrenadante obtenido se transfirió a otro microtubo y almacenó a -20°C protegido de la luz (figura 2).

Cuantificación de vitamina C

Se efectuó en base a Loeffler y Pointing (1942) modificado, que consistió en mezclar 100 µl del sobrenadante obtenido con 900 µl de 2,6-Diclorofenolindofenol 0.5mM, se homogenizó por 30 seg en el vortex y procedió a leer la absorbancia a 530 nm en un espectrofotómetro UV/Vis Genesys 6.0. El blanco de lectura empleado fue ácido oxálico al 0,4%. La cuantificación de la vitamina C se realizó en base a las ecuaciones de dos curvas estándares, una preparada en el rango de 100 a 200mg/L y la otra en el rango de 200 a 800mg/L (figura 3).



Figura 2. Proceso de extracción de vitamina C a partir de hojas de *Myrciaria dubia* "camu camu"

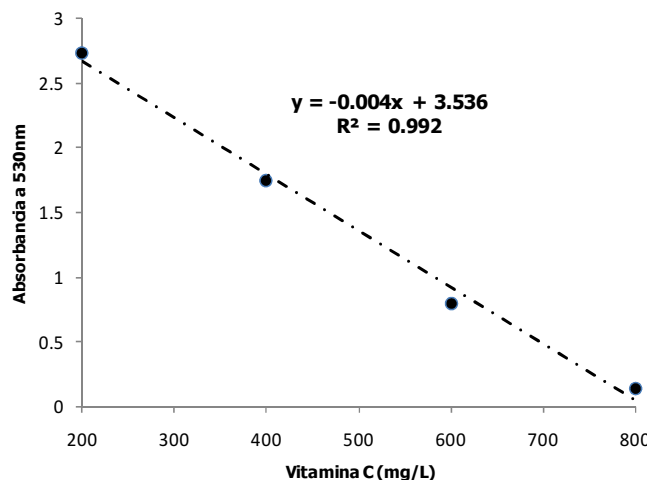


Figura 3. Curva estándar obtenida al hacer reaccionar 100µl de diferentes concentraciones de vitamina C comercial (200 a 800mg/L) con 900µl de 2,6-diclorofenolindofenol 0,5mM. La absorbancia de cada estándar se leyó a 530nm.

Análisis de datos

Los datos de absorbancia y concentración de vitamina C fueron almacenados en una hoja Excel de Microsoft 2007. Se determinó el promedio, desviación estándar la prueba de ANOVA de un factor y la prueba HSD de Tukey para determinar si los promedios de concentración de vitamina C entre hojas colectadas en las diferentes horas del día mostraron diferencias estadísticas significativas. Los análisis estadísticos se hicieron con el programa PASW Statistics v 18.0

RESULTADOS

El contenido de vitamina C en las hojas del "camu camu" es elevado. Los valores fluctuaron de 158 a 298 mg vitamina C/100g de hoja, con un valor promedio de 231 ± 35 mg vitamina C/100g de hoja.

El contenido de vitamina C en las hojas del "camu camu" mostró fluctuación diurna (figura 4). Se observa que el contenido más bajo de vitamina C se registró a las 6 horas (197 ± 31 mg vitamina C/100g de hoja), momento en que la radiación solar es tenue. En contraste, los contenidos más altos de vitamina C se registraron a las 2 (240 ± 56 mg Vitamina C/100g de hoja) y 14 horas (244 ± 24 mg Vitamina C/100g de hoja) del día. Por otra parte, concentraciones intermedias de vitamina C (con respecto a las indicadas) se registraron en horas de menor radiación solar (235 ± 17 mg vitamina C/100g de hoja a las 18 horas) o ausencia de radiación solar (237 ± 35 mg vitamina C/100g de hojas a las 22 horas). El ANOVA muestra que las fluctuaciones en el contenido de vitamina C en función a las horas del día no mostró diferencias estadísticas significativas ($F=0,97$, $P=0,47$).

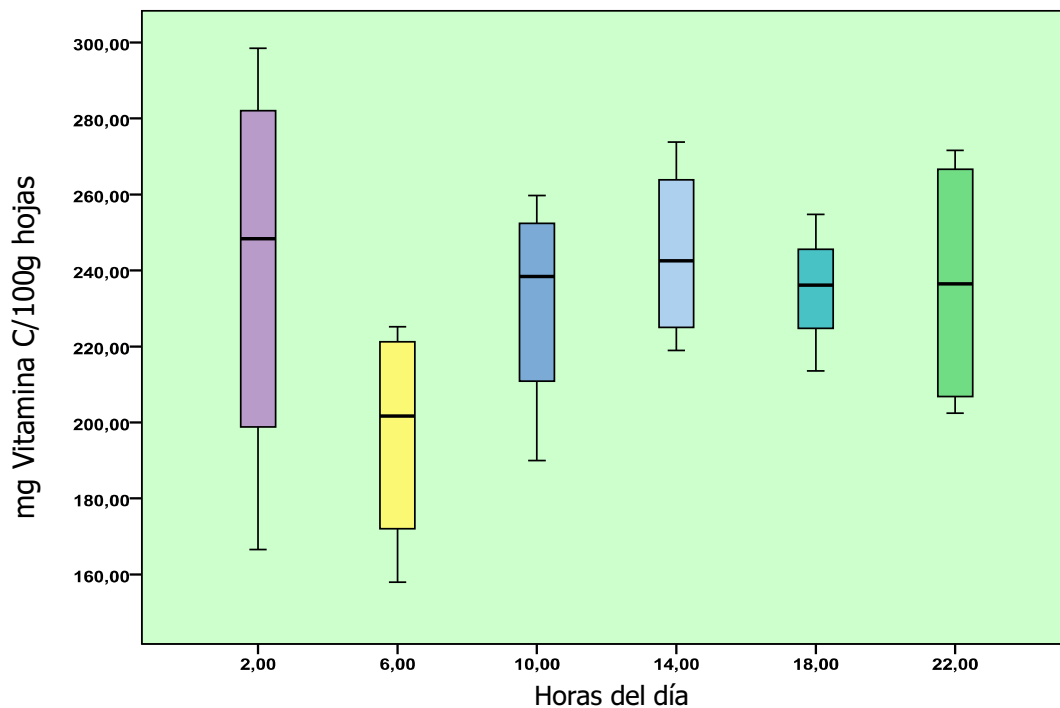


Figura 04. Fluctuación diurna del contenido de Vitamina C en hojas de *Myrciaria dubia* "camu camu".

DISCUSIÓN

El "camu camu" es una planta muy importante en la región Loreto, debido a que produce frutos con alta concentración de vitamina C (más de 2000mg de vitamina C/100g de pulpa) y diversos metabolitos secundarios con potencial uso farmacológico, como antocianinas, flavonoides y compuestos fenólicos (Sotero *et al.*, 2009). Los frutos son empleados para la preparación de refrescos, helados y otros productos para el consumo local, regional y nacional. Además, la pulpa es exportada a diversos países como el Japón para su procesamiento y consumo. También, las hojas son empleadas en la medicina tradicional para prevenir el escorbuto, aliviar problemas inflamatorios, prevenir el resfriado común, entre otros usos.

Los resultados muestran que también las hojas del "camu camu" tienen alto contenido de vitamina C. De tal modo, que presenta de 1,8 a 466 veces más vitamina C que frutos amazónicos como *Anacardium occidentale* (127±60 mg vitamina C/100g de pulpa) y *Solanum sessiliflorum* (0.50±0.08 mg vitamina C/100g de pulpa) respectivamente (Siguas *et al.*, 2010).

También nuestros hallazgos indican una fluctuación diurna en el contenido de vitamina C en las hojas del "camu camu". Está bien establecido que los niveles de vitamina C en las hojas dependen de las condiciones de luz y oscuridad, de tal modo que las hojas expuestas a la luz contienen más vitamina C que las hojas mantenidas en oscuridad (Grace y Logan, 1996; Smirnoff y Palanca, 1996; Tabata *et al.*, 2002; Yabuta *et al.*, 2007). Asimismo, los niveles de vitamina C en las hojas muestran un ritmo diurno (Dutilleul *et al.*, 2003; Tamaoki *et al.*, 2003). Según Yabuta *et al.* (2007), esto es atribuible a que la regulación de la biosíntesis de vitamina C por la luz en hojas de *Arabidopsis thaliana*, es dependiente de la cadena transportadora de electrones fotosintética y paralelamente existe un incremento en la expresión de genes codantes de enzimas implicadas en la biosíntesis de vitamina C, tales como GDP-manosa pirofosforilasa, GDP-L-galactosa guaniltransferasa, L-galactosa-1-fosfato fosfatasa y Galatono-1,4-lactono deshidrogenasa. El incremento en los niveles de expresión de estos genes son afectados principalmente por el estado redox del pool de

la plastoquinona, y que los cambios en los niveles de vitamina C debidos a la luz podría estar controlado predominantemente por la misma fotosíntesis, pero no por el aumento de la expresión de genes responsables de la biosíntesis de vitamina C.

El aumento en los niveles de vitamina C en las horas de mayor intensidad lumínica (14 horas), puede deberse a que tiene un rol protector durante la fotosíntesis, al evitar los efectos deletéreos de los radicales libres de oxígeno (ROS), que son generados como subproductos durante la fotosíntesis y como un componente clave en los mecanismos de disipación de exceso de energía fotónica, tales como los ciclos agua-agua (Asada, 1999) y el ciclo de xantofilas Muller-Moule *et al.*, 2002). Los ROS pueden oxidar diversos componentes celulares (proteínas, ADN, ARN, membranas etc.). Para evitar el daño a estas macromoléculas, la planta debe genera más vitamina C y en menor cantidad otras moléculas antioxidantes (α -tocoferol, carotenoides, flavonoides, etc), para neutralizar la acción bioquímica de los ROS (Davey *et al.*, 2000).

La oxidación del ascorbato y su regeneración a partir de monodehidroascorbato (MDHA) y dehidroascorbato (DHA) son mediadas por varios sistemas enzimáticos y no enzimáticos localizados en diferentes estructuras de las células vegetales. El ascorbato neutraliza el efecto oxidante del peróxido de hidrógeno en una reacción catalizada por la ascorbato peroxidasa. Las isoformas de esta enzima se localizan en el citosol, cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas/glioxisomas y están unidos a las membranas de estos últimos organelos y de los tilacoides. La vitamina E (α -tocoferol) es un antioxidante unido a las membranas celulares que se encarga de neutralizar radicales lipídicos. El producto radical α -cromanoxilo, es reducido a α -tocoferol por el ascorbato. El ascorbato también es oxidado cuando actúa como cofactor de varias enzimas (prolil hidroxilasas, antocianidina sintasa, flavona-3-hidroxilasa, alcaloide oxigenasa, giberelina-20-oxidasa, entre otras). Dos moléculas de MDHA, el producto de oxidación primario del ascorbato, pueden generar una de DHA y otra de ascorbato. El MDHA es reducido a ascorbato por la MDHA reductasa dependiente de NAD(P)H o por ferredoxina reducida en el

fotosistema I. Finalmente, DHA es reducido a ascorbato por DHA reductasa dependiente de glutatión (GSH). El GSH oxidado (GSSG) es reducido a GSH por glutatión reductasa dependiente de NADPH. Las dos reacciones enzimáticas son componentes del ciclo ascorbato-glutatión. Las enzimas están ubicadas en el citosol, cloroplasto, estroma, matriz mitocondrial y en los peroxisomas/glioxisomas (Smirnoff, 2000; Smirnoff y Wheeler, 2000).

CONCLUSIONES

El contenido de vitamina C en las hojas de *Myrciaria dubia* "camu camu" es relativamente alto, superando incluso al contenido de esta vitamina en la pulpa de varios frutos nativos amazónicos.

El contenido de vitamina C en las hojas de *Myrciaria dubia* "camu camu" muestra fluctuación diurna, siendo mayor en horas de mayor intensidad luminosa y menor en las horas de baja intensidad luminosa. Aunque estas tendencias no fueron estadísticamente significativas.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC) por el apoyo financiero para la ejecución de esta investigación. Al Centro de Investigación de Recursos Naturales de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (CIRNA-UNAP) por el soporte con sus instalaciones y equipos. Un agradecimiento especial a cada uno de los integrantes del equipo de trabajo de la Unidad Especializada de Biotecnología del CIRNA, por el apoyo constante en las diversas actividades realizadas.

REFERENCIAS

- Asada K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, 601-639.
- Castro JC, Cobos M, Ramírez R, Imán SA, Egoávil A, Torres J *et al.* 2011. Expresión de genes que codifican enzimas de la vía Smirnoff-Wheeler y su relación con la concentración de vitamina C en frutos de *Myrciaria dubia* (HBK) McVaugh "camu camu". Iquitos, Perú. Poster Científico presentado en la Semana de la Ciencia y Tecnología 18-22 Nov. CONCYTEC.
- Chambers S, Lambert N, Plumb G, Willianson G. 1996. Evaluation of the antioxidant properties of a methanolic extract from juice plus fruit and juice plus vegetable (dietary supplements). *Food Chem* 57, 271-274.
- Davey M, Van Montagu M, Inze D, San Martin M, Kanellis A, Smirnoff N *et al.* 2000. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 825-860.
- Davis M, Austin J, Partridge D. 1994. Vitamin C: its chemistry and biochemistry. Cambridge: Royal Society of Chemistry 47, 154-168.
- Dutilleul C, Garmier M, Noctor G, Mathieu C, Chetrit P, Foyer CH, De Paepe R. 2003. Leaf mitochondria modulate whole cell redox homeostasis, set antioxidant capacity, and determine stress resistance through altered signaling and diurnal regulation. *The Plant Cell* 15, 1212-1226.
- Grace SC, Logan BA. 1996. Acclimation of foliar antioxidant systems to growth irradiance in three broad-leaved evergreen species. *Plant Physiology* 112, 1631-1640.
- Hancock R y Viola R. 2005. Biosynthesis and catabolism of L-ascorbic acid in plants. *Crit Rev Plant Sci* 24, 167-188.
- Ledezma-Gairaud M. 2004. Validación del método: determinación de vitamina C total por cromatografía líquida de alta resolución "HPLC". *Tecnología en Marcha*. 17 (4), 15-23.
- Loeffler HJ y Pointing JD. 1942. Ascorbic acid: rapid determination in fresh, frozen or dehydrated fruits and vegetables. *Ind Eng Chem Anal* 14, 846-856.
- Muller-Moule P, Conklin PL, Niyogi KK. 2002. Ascorbate deficiency can limit violaxanthin de-epoxidase activity in vivo. *Plant Physiology* 128,970-977.
- Peters C y Vásquez A. 1988. Estudios ecológicos de Camu-Camu (*Myrciaria dubia*) producción de frutos en poblaciones naturales. *Folia amazónica* 1(1), 82-88.

- Siguas M, Caro J, Ramírez R, Cobos M, Castro JC. 2010. Determinación del contenido de Vitamina C en Frutos de la Amazonia Peruana. Libro de resúmenes UNAMAZ. Encuentro de Universidades y Centros de Investigación. Iquitos-Perú.
- Smirnoff N, Pallanca JE. 1996. Ascorbate metabolism in relation to oxidative stress. *Biochemical Society Transactions* 24, 472–478.
- Smirnoff N. 2000. Ascorbic acid: Metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Current opinion of Plant Biology* 3, 229-235.
- Smirnoff N y Wheeler G. 2000. Ascorbic Acid in Plants: Biosynthesis and Function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 35(4), 291-314.
- Sotero V, Silva D, García D, Imán S. 2009. Evaluación de la actividad antioxidante de la pulpa, cáscara y semilla del fruto del camucamu (*Myrciaria dubia* H.B.K.) *Rev Soc Quím Perú* 75(3), 293-299.
- Tabata K, Takaoka T, Esaka M. 2002. Gene expression of ascorbic acid-related enzymes in tobacco. *Phytochemistry* 61, 631–635.
- Tamaoki M, Mukai F, Asai N, Nakajima N, Kubo A, Aono M, Saji H. 2003. Light-controlled expression of a gene encoding L-galactono-c-lactone dehydrogenase which affects ascorbate pool size in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* 164, 1111–1117.
- Uhl N, Dransfield J. 1997. *Genera Plantarum*, basados en los trabajos de Harold E. Moore Sr. The. L. H. Bailey Hortorium and International Palm Society. 610 pp.
- Vizcarra R. 2005. Liofilización de Pulpa de *Myrciaria dubia* (H.B.K) McVaugh "camucamu". *Folia Amazónica* 14(2), 51-56.
- Wheeler G, Jones M, Smirnoff N. 1998. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* 393, 365–369.
- Yabuta Y, Mieda T, Rapolu M, Nakamura A, Motoki T, Maruta T et al. 2007. Light regulation of ascorbate biosynthesis is dependent on the photosynthetic electron transport chain but independent of sugars in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 58(10), 2661-2671.