



TA_60_GRD_RO	
Área:	Tecnología de alimentos
Categoría:	Graduado
Regional:	Rosario

Evaluación de la capacidad antioxidante de los pigmentos de remolacha extraídos a partir de mezclas de distintos solventes

Ma. Victoria PAZO CEPEDA, Estefanía C. STERPI

Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de los Alimentos, Facultad Regional Rosario, UTN

E-mail de contacto: mpazocepeda@frro.utn.edu.ar; esterpi@frro.utn.edu.ar

Este trabajo ha sido realizado bajo la dirección del Mag. en Tecnología de Alimentos Roque Masciarelli, en el marco del proyecto "Desarrollo de procesos de obtención de antioxidantes naturales a partir de materias primas vegetales".

Resumen

El objetivo de este trabajo es estudiar la influencia de la temperatura de secado y diferentes mezclas de solventes utilizadas para la extracción, sobre las propiedades antioxidantes de la remolacha. El secado se realiza en una estufa de tiro forzado con aire a velocidad constante, a temperaturas de: 40, 70 y 100°C. Para todas las muestras, se realiza la molienda y, a partir de la harina obtenida, se preparan distintos extractos de mezclas etanol:agua de concentración (100:0), (80:20) y (50:50) para cada uno de los tratamientos de secado. Los extractos se utilizan para evaluar el contenido de flavonoides totales (CFT), el DPPH* residual y la cantidad de sólidos solubles. Además, se realizaron los barridos a cada una de las muestras para determinar cualitativamente la presencia de pigmentos.

Palabras Claves: Remolacha; Secado; Extracción; Mezclas hidroalcohólicas

1. Introducción y Objetivos

1.1. Consideraciones Generales

La actividad anticancerígena de los compuestos fenólicos se ha relacionado con la inhibición de cáncer de colon, esófago, pulmón, hígado, mama y piel (Decker, 1995). Se ha demostrado que los flavonoides y polifenoles afectan a la etapa de iniciación de la carcinogénesis protegiendo a las células contra los agentes cancerígenos.

Estos beneficios han dado lugar a estudios de investigación con el fin de encontrar los antioxidantes en vegetales utilizados como alimentos (Aparicio-Fernández et al., 2005).

La remolacha (*Beta vulgaris*) de color rojo es el cultivo betalaínico comercialmente explotado más importante. Su interés se ha incrementado en los últimos años, ya que los resultados la clasifican entre las diez verduras antioxidantes más potentes (Halvorsen et al., 2002). La capacidad antioxidante de la remolacha se ha asociado con la presencia constitutiva de compuestos fenólicos (debido a sus pigmentos), que permiten beneficios nutracéuticos en la promoción de la salud humana y en la prevención de enfermedades degenerativas y cáncer (Arroz-Evans et al., 1996). Contiene dos pigmentos principales, constituyentes de las betalaínas: betanina (betacianina roja) y vulgaxantina I (betaxantina amarilla) (Nemzer et al., 2011).

Desde el punto de vista químico, las estructuras de los flavonoides y las betalainas (betacianinas y betaxantinas) están constituidas por grupos carbonilo y oxidrilo que les confieren carácter polar (Fennema et al., 2010).

Masciarelli et al. (2013) verificaron la capacidad antioxidante de extractos de remolacha para fines analíticos utilizando metanol como solvente. Debido a que este solvente no es apto para usos alimenticios se buscó una alternativa para la extracción de los antioxidantes.

Rockenbach et al. (2008) en sus estudios sobre extractos de orujos de uva obtuvieron buenos resultados utilizando distintas concentraciones de solvente etanol:agua. Por lo tanto, se consideró utilizar dichas mezclas de solventes para estudiar la posibilidad de reproducir los resultados de Rockenbach et al. (2008) en la remolacha.

1.2. Objetivos

El objetivo de este trabajo es obtener los valores del contenido de flavonoides totales (CFT), de sólidos solubles y el DPPH* residual en extractos de remolacha utilizando diferentes mezclas hidroalcohólicas y temperaturas de secado, con la finalidad de obtener la mejor combinación de temperatura y mezcla de solventes que permita extraer el mayor contenido de antioxidantes. Además, se contempla la realización en un espectrofotómetro de los barridos de cada uno de los extractos, a los efectos de verificar la mayor concentración de pigmentos en las mezclas hidroalcohólicas propuestas.

2. Metodología

2.1. Materias primas. Procesamiento

Las remolachas se adquirieron en un supermercado de la ciudad de Rosario. Se lavaron con una solución acuosa de detergente neutro y enjuagaron con agua corriente tres veces. En la proporción sólido /líquido: 1/10, se hirvieron durante 30 minutos a partir de alcanzar el punto de ebullición. Esta operación se realizó a los efectos de reducir la carga microbiana y facilitar los procesos extractivos posteriores. Se enfriaron a temperatura ambiente, se pelaron y se cortaron en cubos de $1 \text{ cm} \pm 0,2$. Se colocaron en baño de solución de cloruro de sodio al 4% por 30 min (Raupp et al., 2011). Se enfriaron, se escurrió el líquido, se embolsaron en film de polietileno y se guardaron en el freezer a -18°C hasta su uso. Luego, se sometieron a tratamientos de secado mediante estufa de tiro forzado con aire a velocidad constante a las temperaturas: 40, 70 y 100°C . Los tiempos de secado resultaron: 1595; 735 y 370 min, obtenidos cuando el peso se mantuvo constante. Las humedades finales fueron: 16,8; 15,3 y 14,3% (en base húmeda), respectivamente.

2.2 Reactivos químicos

Los siguientes reactivos químicos fueron provistos por Sigma comercial Co. (St. Louis, USA): metanol; etanol; agua bidestilada; 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH*); nitrito de sodio; tricloruro de aluminio; hidróxido de sodio. Todos los reactivos químicos y solventes utilizados fueron de grado reactivo analítico.

2.3. Preparación de los extractos

El material seco obtenido en cada tratamiento fue molido con molino de cuchillas hasta que el material pasó por tamiz malla 40, obteniéndose una harina de remolacha. 0.6 g de la misma se extrajeron con 10 ml de solvente, de concentración etanol:agua (100:0), (80:20) y (50:50), por agitación, durante 2 h a temperatura ambiente y al abrigo de la luz. Luego, los sólidos se separaron mediante filtración (Whatman N°40). Los filtrados, para cada temperatura y cada solvente, se denominaron extractos. Estos se conservaron a 4°C en frascos herméticos de vidrio hasta su utilización en la obtención del barrido y las determinaciones analíticas. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

2.4. Contenido de flavonoides totales (CFT)

Se evaluó mediante el método de Kim et al. (2003) con algunas modificaciones. Se basa en la capacidad de los flavonoides de formar un compuesto coloreado en presencia de aluminio en medio alcalino, con máxima absorbancia a 510 nm. A 1 ml del extracto se le adicionan 4 ml de agua bidestilada y 0,3 ml de nitrito de sodio, éste es considerado el tiempo cero, a los 5 min se le agregan 0,3 ml de cloruro de aluminio al 3%, a los 6 min 2 ml de hidróxido de sodio (1M) e inmediatamente 2,4 ml de agua bidestilada, midiéndose la absorbancia de la mezcla a 510 nm contra un blanco de reactivo con un espectrofotómetro Jasco Modelo 7800 UV-Vis (JapanSpectroscopic Co., Tokio, Japón).

Los valores obtenidos se expresaron en mg de ácido gálico equivalente (AGE)/ml.

$$\frac{mg\ AGE}{ml} = \frac{Abs - 0.06345}{3.08986} * \frac{170.12}{290.26} \quad (1)$$

2.5. Contenido de sólidos solubles

Este ensayo se realizó para evaluar el rendimiento de la extracción para la harina de remolacha secada a distinta temperatura y las condiciones mismas de la extracción. Se determinó el contenido de sólidos solubles en cada uno de los extractos. Se tomó una alícuota de 3 ml y se pesó en balanza analítica, previa tara del recipiente. Luego, se secó en estufa a temperatura constante de 60°C hasta que no se apreció variación de peso.

Los resultados se expresaron en mg de sólidos solubles/g de muestra seca.

2.6. DPPH* residual

Se utilizó el método espectrofotométrico de Shimada et al., (1992). Se mezcló 1 ml de los extractos con 5 ml de una solución metanólica 0,1 mM de DPPH. Luego, se midió la absorbancia a 517 nm mediante un espectrofotómetro Jasco Modelo 7800 UV-Vis (JapanSpectroscopic Co., Tokio, Japón).

El %DPPH* residual, se calculó según:

$$\% DPPH * residual = \frac{Absorbancia\ muestra}{Absorbancia\ blanco\ de\ reactivo} \times 100 \quad (2)$$

2.7. Barridos

Se realizaron los barridos de cada uno de los extractos en el rango de longitudes de onda comprendido entre 190 y 1100 nm, utilizando un espectrofotómetro Shimadzu Modelo UV-1800 (Shimadzu Corporation, Tokio, Japón). Para la mezcla etanol:agua (50:50), se debió realizar una dilución debido a que los valores de absorbancia sobrepasaron los límites admisibles del equipo.

2.8 Análisis estadístico

Los datos fueron procesados mediante el software Origin Pro 8 y, para establecer las diferencias significativas de los parámetros en estudio, se empleó análisis ANOVA. El nivel de significación se estableció para un valor $p < 0,05$.

3. Resultados y discusión

3.1. Determinación del contenido de flavonoides totales (CFT)

En la figura 1, se muestran los resultados obtenidos del contenido de flavonoides totales en función del solvente utilizado, para las diferentes temperaturas de secado.

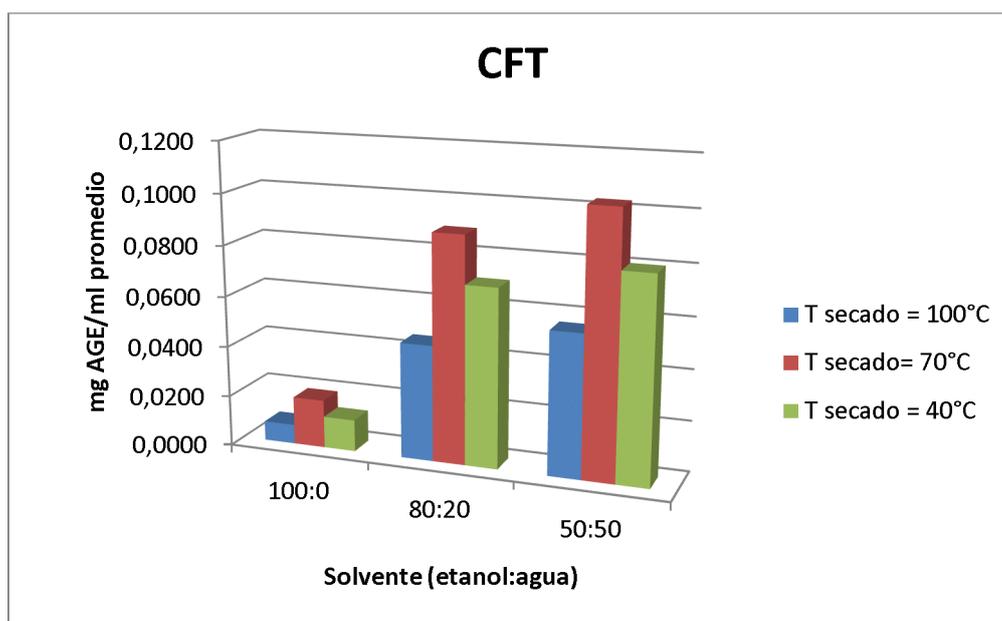


Figura 1. Contenido de flavonoides totales en remolacha.

A partir del gráfico se deduce que la mayor extracción de flavonoides se produjo para el solvente de concentración etanol:agua (50:50) y a la temperatura de secado de 70 °C. Asimismo, se puede observar que, al utilizar un solvente con mayor cantidad de agua, el contenido de flavonoides extraídos se incrementa. Con respecto a la temperatura, tanto en la remolacha secada a 40°C como a 100°C se obtuvo una menor cantidad de flavonoides respecto a la muestra de 70°C, siendo mínima con la de 100°C. Para la mezcla solvente (100:0) prácticamente no se observan diferencias significativas para las tres temperaturas de secado.

A los efectos comparativos Vulic et al. (2012) para pulpa de remolacha, variedades

Egyptium y Bicolor, obtuvieron valores de CFT de 1,87 y 11,98 mg de AGE/g de ms. La extracción se realizó mediante equipo de ultrasonido, empleando una mezcla de una solución acuosa de etanol al 50% y otra de ácido acético al 0,5%, durante 30 min. Se utilizó una relación sólido seco/volumen de solvente, equivalente a 100 mg de ms/ml. En nuestro trabajo se obtuvo para una relación de 60 mg de ms/ml 0,0803; 0,1031 y 0,0562 mg AGE/ml promedio, para 40, 70 y 100°C respectivamente, empleando una solución acuosa de etanol al 50%. Con el objetivo de poder comparar ambas experiencias, se reportan los resultados en las mismas unidades que las utilizadas por Vulic et al. (2012), obteniendo 1,33; 1,72 y 0,94 mg de AGE/g de ms, respectivamente.

3.2. Determinación del contenido de sólidos solubles

En el gráfico siguiente (figura 2) se muestra el contenido de sólidos solubles en función de los diferentes solventes y temperaturas.

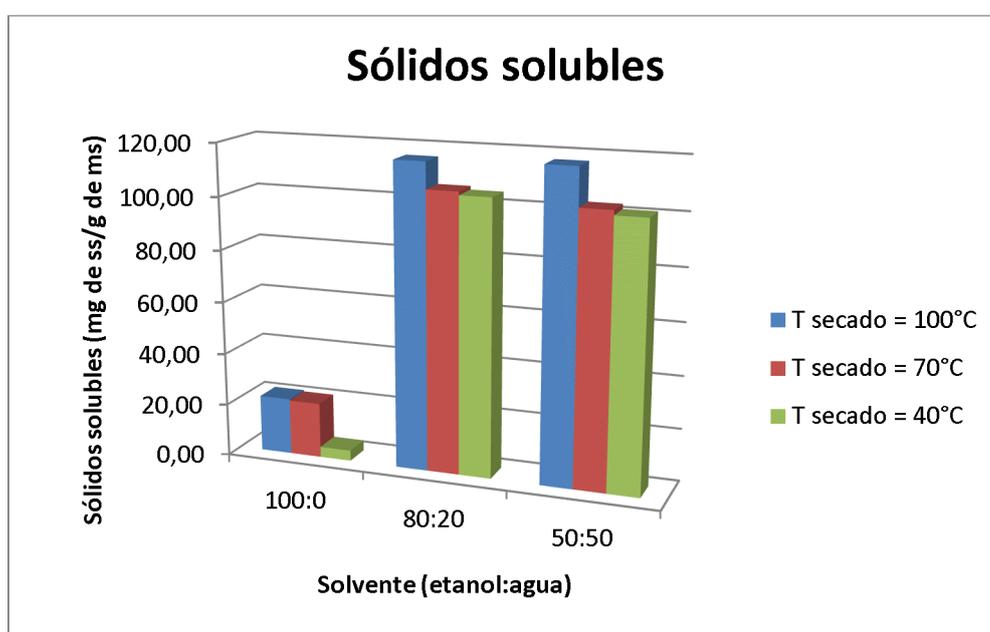


Figura 2. Contenido de sólidos solubles en remolacha.

Se puede observar que cuanto mayor es la temperatura de secado, mayor es la cantidad de sólidos solubles presentes. Con las mezclas (80:20) y (50:50) no se aprecian diferencias significativas para las tres temperaturas ensayadas, respectivamente. Para la mezcla (100:0) se obtiene una proporción de sólidos solubles 6 veces menor, respecto a los otros dos extractos. Por lo tanto, los mayores valores se verificaron a 100°C para las mezclas (80:20) y (50:50), obteniendo 115,83 y 117,17 mg de sólidos solubles/g de ms.

3.3. Determinación del DPPH* residual

El DPPH* es un reactivo analítico, en rigor un radical libre capaz de reaccionar con los flavonoides, las betalainas y con los radicales libres presentes o formados durante el tratamiento de secado.

A continuación, en la figura 3, se presentan los valores de DPPH* residual obtenidos para los diferentes extractos.

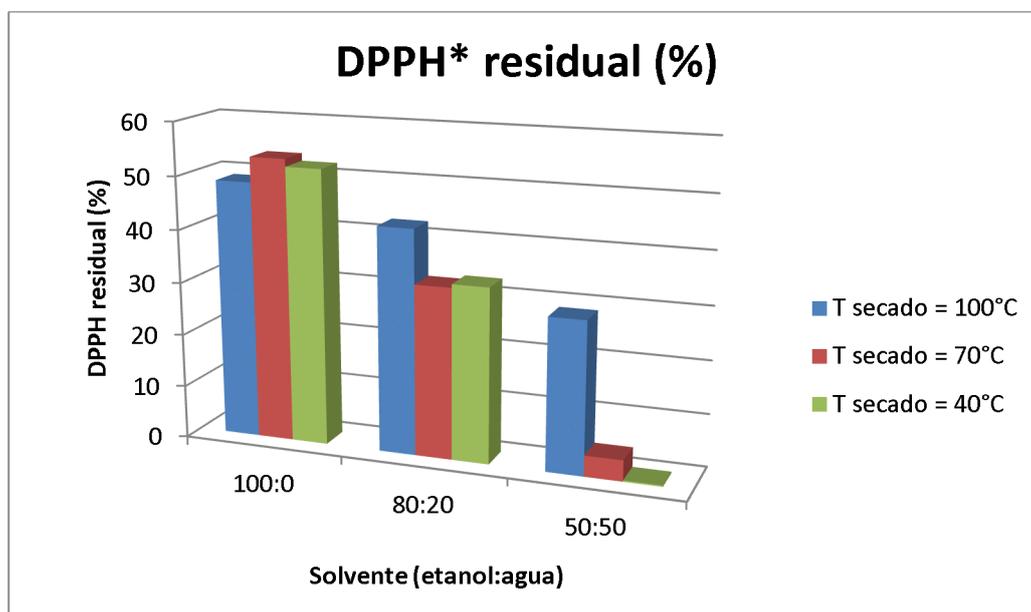


Figura 3. Determinación de DPPH* residual en remolacha.

A partir del gráfico se observa que no existen diferencias significativas entre las tres temperaturas para la mezcla (100:0), de la misma manera para el solvente (80:20) para 40 y 70°C. Los extractos a 100°C presentan mayores valores de DPPH* residual para las mezclas de (80:20) y (50:50), respecto a las otras temperaturas. Para la mezcla (50:50) a 40°C es prácticamente imperceptible el porcentaje de DPPH* residual.

A los efectos comparativos Sakac et al. (2004) en sus estudios sobre pulpa de remolacha, realizando extracciones a 40°C bajo vacío de soluciones acuosas de etanol: 50%, 80% y 100%, encontraron valores del %DPPH* residual de 75,92; 81,05 y 84,94 %, para 160 mg de ms/ml, en tanto los valores obtenidos a dicha temperatura para 60 mg de ms/ml en este trabajo resultaron 0,26; 33 y 52 %.

3.4. Barridos

En las figuras 4, 5 y 6 se presentan los barridos obtenidos con las diferentes muestras de remolacha.

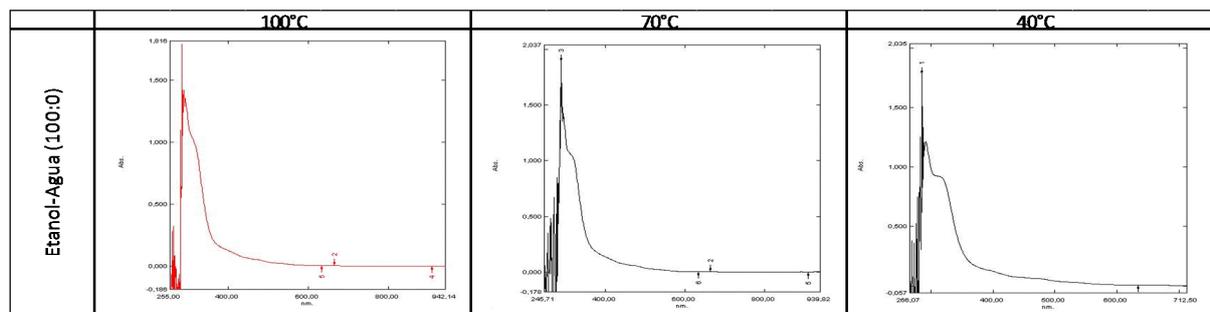


Figura 4. Barridos extracto de remolacha etanol:agua (100:0).

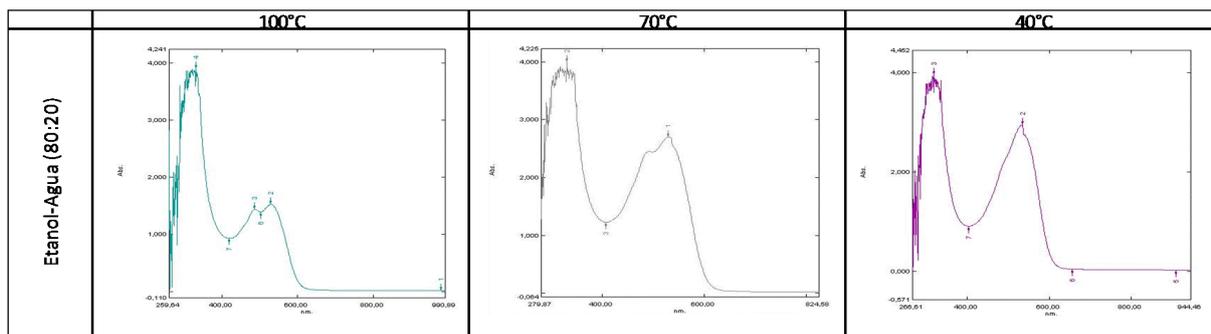


Figura 5. Barridos extracto de remolacha etanol:agua (80:20).

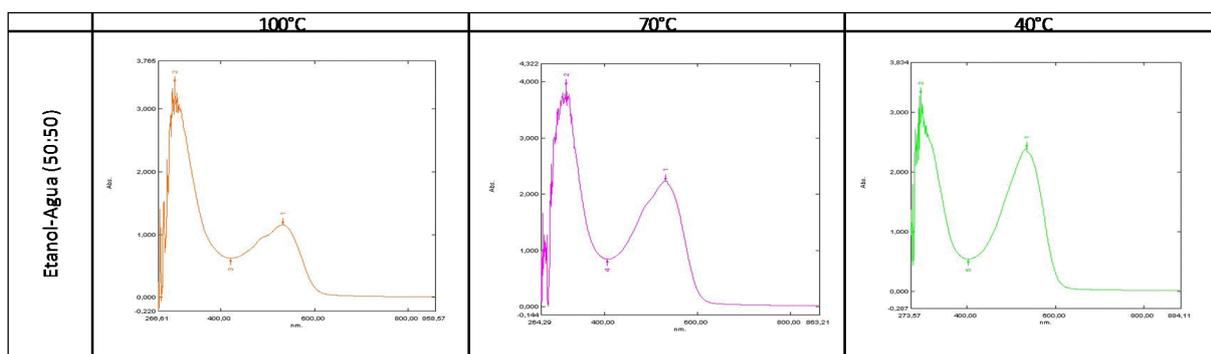


Figura 6. Barridos extracto de remolacha etanol:agua (50:50), previa dilución 1 ml de muestra en 2 ml de solvente.

Todas las muestras presentan un pico predominante alrededor de $\lambda=280$ nm, el cual se puede asociar a la presencia de proteínas, según Franco Zavaleta (2004).

Se puede observar que al utilizar el solvente que contiene etanol puro no evidencia ningún otro pico. En cambio, con los otros solventes se obtuvieron picos que se asocian a la presencia de betalaínas. Las betaxantinas se identifican a $\lambda=480$ nm y las betacianinas a $\lambda=538$ nm, correspondiéndose aproximadamente a los picos observados.

A menor temperatura de secado la presencia de betalaínas es mayor según puede observarse en las figuras 5 y 6. Además, contemplando la dilución realizada en la muestra con solvente (50:50), se deduce que con esta relación se obtiene el mayor contenido de pigmentos.

4. Conclusiones

Del estudio realizado se deduce que la mayor extracción de flavonoides se produjo para el solvente de concentración etanol:agua (50:50) para las tres temperaturas de secado, que coincide con los mayores valores de absorbancia obtenidos de las betalaínas. Al igual que lo concluido por Rockenbach et al. (2008) en orujos, se considera que esto se debe a su alta capacidad polar tanto de los pigmentos como de los solventes. Se estima que el mayor porcentaje de sólidos solubles obtenidos a 100°C para la mezcla utilizada puede atribuirse a la mayor formación de compuestos polares que, de esta manera, incrementan su solubilidad. Con la mezcla (100:0) se extrae una pequeña cantidad de flavonoides, betalaínas y radicales libres presentes. El menor porcentaje de DPPH* residual para la mezcla (50:50) a 40°C está en un todo de acuerdo con una alta presencia de antioxidantes naturales como son los flavonoides y las betalaínas (en particular sobre estas últimas, ya

que durante el barrido para realizar la lectura de absorbancia dentro del rango permitido por el equipo se tuvo que diluir la muestra a un tercio).

Debido a que se realizaron extracciones etanólicas, en el futuro, se propone obtener extractos concentrados de remolacha en estado viscoso mediante evaporación bajo vacío, destacando que, en todo punto del procesamiento, no se emplearán solventes tóxicos. Estos concentrados de remolacha pueden emplearse como prebióticos para reforzar la capacidad antioxidante de distintos alimentos.

Agradecimientos

Las autoras agradecen el apoyo financiero provisto por la Universidad Tecnológica Nacional - Facultad Regional Rosario. La dedicación del Mag. en Tecnología de Alimentos Roque Masciarelli y la colaboración del Ing. Héctor Lucero.

Bibliografía

- Aparicio-Fernández, X. et al. (2005). Characterization of polyphenolics in the seed coat of black jamapa bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*, 11, 4615-4622.
- Arroz-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. (1996). Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biological Medicine*, 20, 933-956.
- Decker, E. A. (1995). The role of phenolics, conjugate linoleic acid, carnosine, and pyrrologlunolinc quinine as nonessential antioxidant. *Nutrition Reviews*, 53, 49-58.
- Fennema, O., Parkin K. L., Samodaran S. (2010). *Química de los Alimentos*. Madison: Acribia.
- Franco Zavaleta, M. E. (2004). Caracterización parcial del pigmento rojo del fruto de la jiotilla (*Escontria chiotilla*), una cactácea subexplotada. México: Universidad Autónoma Metropolitana.
- Halvorsen, B. L., Holte, K., Myhrstad, M.C. (2002). A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *Journal of Nutrition*, 132, 461-471.
- Kim, D., Jeoung, S., Lee, C. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*, 81, 321-326.
- Nemzer B., Pietrkowski Z., Spórna A. (2011). Betalainic and nutritional profiles of pigment-enriched red beet root (*Beta vulgaris* L.) dried extracts. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 127, 42-53.
- Masciarelli, R., Tosi, E., Lucero, H., Silvester, S. (2013). Influencia del tratamiento térmico sobre la capacidad antioxidante de la remolacha (*Beta Vulgaris*). Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (págs. 2-3). Rosario: UTN.
- Raupp M., Carbonar A., Faber de Campos P., Borsato A., Fett, R. (2011). Effect of processing on antioxidant potential and total phenolics content in beet (*Beta vulgaris* L.). *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 31, 688-693.
- Rockenbach, I. I., Da Silva, G. L., Rodrigues, E., Kuskoski, E. M. y Fett, R. (2008). Solvent influence on total polyphenol content, anthocyanins, and antioxidant activity of grape (*Vitis vinifera*) bagasse extracts from Tanta and Ancelota - different varieties of *Vitis vinifera* varieties. *Ciencia e Tecnología de Alimentos* (págs. 238-244). Campinas: Universidad Federal de Santa Catarina.
- Sakac B. M., Pericin, D., Mandic, A., Kormanjos, S. (2004). Antioxidative properties of ethanolic extract of sugar beet pulp. *Acta Periodica Technologica*, 35, 255-264.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., Nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 40, 945-948.
- Vulic J., Canadanovic-Brunet J., Cetkovic G., Tumbas V., Djilas S., Cetojevic-Simin D., Canadanovic V. (2012). Antioxidant and cell growth activities of beet root pomace Extracts. *Journal of Functional Foods*, 4, 670-678.