

COMPARACIÓN DE DOS TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE FENÓLICOS TOTALES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE A PARTIR DE CHIPILÍN (*Crotalaria maypurensis* H.B.K.)

A. Valadez-Villarreal^{a*}, E. López-Hernández^b, R. García-Jiménez^a, F.L. Ruíz-Santiago^a

^a Universidad Tecnológica de Tabasco. División de Procesos Industriales. ^b Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Programa de ingeniería de alimentos, DACA. *valadezantonio@hotmail.com

RESUMEN:

Los compuestos polifenólicos son considerados debido a su estructura química como antioxidantes. En este trabajo se estudian los compuestos polifenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de chipilín (*Crotalaria maypurensis* H.B.K.), por obtenidos por los métodos de reflujo y de microondas asistida por ultrasonido. El contenido de polifenoles se determinó por medio del reactivo de Folin-Ciocalteu y la actividad antioxidante se evaluó por las técnicas de DPPH (2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Se evaluó la cantidad de ácido gálico de los extractos usando la técnica de HPLC, con el fin de evaluar la eficiencia de la extracción. La extracción por ultrasonido mostró concentraciones mayores de polifenoles así como de actividad antioxidante. El contenido de ácido gálico fue mayor en los extractos obtenidos por microondas asistida por sonicación.

ABSTRACT:

Polyphenolic compounds are considered due to their chemical structure as antioxidants. In this paper the polyphenolic compounds and antioxidant capacity of extracts chipilín (*Crotalaria maypurensis* H.B.K.), by obtained by the methods of microwave assisted, reflux and ultrasound are studied . The polyphenol content was determined using the Folin -Ciocalteu and antioxidant activity by techniques DPPH (2,2- diphenyl -2 - picrylhydrazyl). It was evaluated the amount of gallic acid extracts was assessed using the technique of HPLC in order to assess the efficiency of extraction. Ultrasound extraction showed higher concentrations of polyphenols and antioxidant activity. Gallic acid content was higher in the extracts obtained by microwaves assisted by sonication.

Palabras clave: chipilín, polifenoles, *Crotalaria*

Keywords: chipilin, poliphenols, *Crotalaria*

Área: Alimentos funcionales

INTRODUCCIÓN

La investigación de nuevas sustancias seguras para la conservación de los alimentos, se está realizando en diversas partes del mundo (Magnuson et al, 2013, Ortega-Ramírez et al, 2014). Muchas plantas presentan compuestos bioactivos que pueden ser considerados como una excelente alternativa para ser usadas como antioxidantes y como antimicrobiales (Silva-Espinosa et al, 2013). Las plantas medicinales (raíces, tallos, hojas, flores y frutas), son ricos en

compuestos diversos como son terpenos (safrol, terpineno, terpinoleno), y fenólicos (flavonoides y ácidos fenólicos) y se ha observado que estos compuestos son efectivos como aditivos alimentarios (Ortega-Ramírez et al, 2014).

Como consecuencia del proceso oxidativo, se generan las llamadas EROS (Especies reactivas del oxígeno), que son causantes de la generación de radicales libres que a su vez provocan una serie de alteraciones funcionales que son enfermedades crónicas tales como cáncer, reumatismo, Alzheimer, aterosclerosis, enfisema, cirrosis y diabetes (Quiroz-Reyes et al, 2013). Los antioxidantes se ingieren con los alimentos y bebidas como el café y el té, que se consumen en la mayoría de los países y que promueven la buena salud (Quiroz-Reyes et al, 2013). No obstante plantas como el momo, la chaya o el chipilín, que son ampliamente consumidos en el sur del país son fuentes naturales de estos compuestos antioxidantes.

El chipilín es una leguminosa; a este grupo también pertenecen leguminosas que se consumen por sus vainas tiernas o por sus granos, como las habas (*Vicia faba*), las lentejas (*Lens culinaris*), los garbanzos (*Cicer arietinum*), los chícharos (*Pisum sativum*), los chícharos muela (*Lathyrus sativus*), los frijoles y los frijoles (*Phaseolus vulgaris*, *P. lunatus*, *P. coccineus* y *P. acutifolius*), la soya (*Glycine max*), el frijol japonés (*Dolichos lablab*), el lupino o altramuz (*Lupinus albus*), y el cacahuate (*Arachis hypogaea*). No se tiene información suficiente de la composición de compuestos polifenólicos de esta planta, por lo que para el presente trabajo se partió de los reportes de plantas de la misma familia, como el frijol de diferentes tipos (*Phaseolus* sp.). En estos se indica la presencia de polifenoles y fenoles (Xu y Chang, 2006; Madhujidith y Shahidi, 2005; <http://es.wikipedia.org/wiki/Chipilin>).

Existen diversas técnicas de extracción para compuestos fenólicos que son la maceración y reflujo con solventes, extracción con agua caliente, extracción asistida por enzimas, la utilización de rayos gama y flujo de electrones, además de los fluidos supercríticos y el uso de radiación ultrasónica asistida por sonicación (Quiroz-Reyes et al, 2013).

El uso de radiación ultrasónica (20-100 kHz) para extraer compuestos naturales tiene alta reproducibilidad y facilidad de manejo, bajo consumo de energía y equipamiento más barato comparado con otras técnicas novedosas. El ultrasonido facilita la humectación de los tejidos vegetales lo que permite una alta velocidad de difusión a través de la pared celular e incrementar la transferencia de masa (Vinatoru et al, 2001). Debido a que no hay reportes del uso de técnicas de ultrasonido para la extracción de polifenoles en chipilín, el objetivo de este estudio es hacer un comparativo de la efectividad de extracción de los compuestos polifenólicos, la actividad antioxidante y del rendimiento, entre el método de reflujo y el de microondas asistido por ultrasonido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las hojas de chipilín, fueron obtenidas en el mercado de la Sierra en la ciudad de Villahermosa, Tabasco, en la estación de primavera y con un estado de madurez comercial para su consumo. Los reactivos de Folin-Ciocalteu fue marca HYCEL, el DPPH, ABTS, ácido gálico, son de la marca SIGMA y los demás reactivos y disolventes son de las marcas nacionales.

Contenido de humedad

El contenido de humedad fue medido de acuerdo al método 934.06 de la AOAC (2000).

Obtención de los extractos

1. Se seleccionaron hojas frescas de chipilín, y le fueron eliminados los tallos
2. Las hojas de chipilín fueron cortadas en pequeños trozos y se realizó el secado de las mismas en un horno deshidratador de charolas a 50°C, de la marca Jersa modelo a vapor con 20 charolas, durante 3 horas. El material seco se molió en un molino marca Pulvex modelo 200, utilizando la fracción entre 40 y 60 mallas y el polvo resultante se guardó en frascos sellados, en un desecador, hasta su utilización.
3. Para la obtención de los extractos por reflujo se plantearon los siguientes experimentos; Se utilizaron mezclas de metanol al 100%, metanol-agua 75%. 50%. 25% y 0% de agua. Se extrajo 1 gr de muestra y se adicionaron 250 mL, de la mezcla de disolventes, en un extractor tipo Soxhlet marca RIOSA, durante tres horas. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se filtró a vacío en un embudo Buchner, por un papel filtro Whatman No.1 El cartucho de extracción se llevó a peso constante y por diferencia de peso se calculó el rendimiento de extracción. Las extracciones se hicieron por triplicado,
4. Los extractos obtenidos por microondas asistido por ultrasonido se obtuvieron utilizando un gramo de la muestra pulverizada y colocando 250 mL de cada una de las mezclas de disolventes antes mencionadas en el matraz de dilución. Se empleó un aparato de la marca Xin Tuo modelo CW-2000^a, y las condiciones de trabajo fueron; Potencia 800W, Temperatura 60°C y los tiempos de extracción fueron de 30, 60 y 120 min. Posteriormente, los extractos se filtraron a vacío, usando papel Whatman No. 1, se concentraron a vacío.
5. Las muestras se almacenaron en frasco color ámbar en refrigeración a 4 °C hasta su posterior utilización.

Análisis estadístico.

Los datos se analizaron usando el software Statistica. Se realizaron pruebas de ANOVA y de comparación de medias de Tukey para determinar las diferencias significativas. Los resultados se analizaron para una probabilidad del 95% ($P < 0,05$). La desviación estándar fue calculada usando el software Excel.

Determinación de compuestos fenólicos totales por el método de Folin-Ciocalteu.

Se usó la técnica utilizada reportada por Chia-Ching y col (2002). Se elaboró una curva estándar (por triplicado) de ácido gálico. se midió la absorbancia a 765 nm

en un espectrofotómetro marca Genesys 2. Se tomaron 2 mL de los extractos preparados previamente y se diluyeron a 25 mL con metanol. De esta dilución se tomó 1 mL, se colocó en un tubo de ensayo y se agregaron 5 mL de agua, 1.5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu y 1.5 mL de carbonato de sodio al 20%. Se incubaron 30 min a 40°C, se dejó enfriar y se midió la absorbancia a 765 nm. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

Actividad antioxidante por el método de DPPH.

Se llevó a cabo de acuerdo con método reportado por Moura-Rufino y col (2007). Se preparó una curva estándar de DPPH 0.06 mM con las diluciones respectivas con metanol, para obtener concentraciones de 0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 mM. La absorbancia se obtuvo a una longitud de onda de 515 nm. Se prepararon tres diluciones de las muestras de chipilín. Para la primera se diluyeron 0.5 mL del extracto original, diluyendo en 10 mL de metanol. Posteriormente de cada dilución se realizó sucesivamente dos diluciones más, tomando 5 mL de cada extracto y llevando a 10 mL. En un tubo de ensayo se colocaron 3.9 mL de DPPH y 0.1 mL de cada dilución y se midió la absorbancia después de 60 min de reacción. Las determinaciones se hicieron por triplicado. Los resultados se expresaron como I que es $I\% = (A_i - A_f) / A_i * 100$. Se calculó el valor de la EC_{50} , graficando el porcentaje de inhibición del radical DPPH contra el logaritmo de la concentración del extracto.

Determinación de compuestos polifenólicos

Los compuestos polifenólicos se determinaron por HPLC usando un equipo Waters modelo 2475 equipado con una bomba binaria, detector UV-Vis y columna Symmetry (4.6 x 75 mm) de fase reversa C18 y un detector dual ultravioleta visible a las siguientes longitudes de onda. $\lambda = 250$ y 330 nm. Las condiciones en las que se realizó el análisis fueron las siguientes; Como solvente A, 10% acetonitrilo-agua (70:30) y como solvente B, 90% ácido acético-agua (1:19). Flujo isocrático de 1 mL/min; 30 min tiempo de elusión y 20 μ L de muestra.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

El contenido de humedad de la muestra fue de $9 \pm 0,034\%$ P/P y en estado fresco de $85,0 \pm 0,5965\%$ P/P. En la Tabla I se muestra el rendimiento de extracción por el método de reflujo y de microondas a tres tiempos de extracción. y se observa que, para el caso del reflujo, a todas las condiciones de extracción, los valores son estadísticamente diferentes y los valores de rendimiento son menores en comparación a los de extracción por microondas y que los valores más altos e extracción lo están con las mezclas metanol-agua 75-25 metanol-agua y a 50-50, a un tiempo de 120 min. Esto indica que al usar un tiempo de 30 minutos para estas mezclas de extracción, este es equivalente estadísticamente a los otros dos tiempos, lo que da la ventaja de hacer las determinaciones más cortas y de exponer por menos tiempo a las muestras a temperatura lo que podría llevar a una posible pérdida de compuestos polifenólicos. Esto está de acuerdo con lo que indica Sulaiman et al, 2011, para la extracción de polifenoles y antioxidantes en diversas plantas, evaluando el efecto de varios disolventes.

Tabla I. Rendimiento de la extracción de hojas de chipilín por los métodos de reflujo y de microondas asistido por ultrasonido con diferentes mezclas de disolventes.

Tiempo	METANOL 100%	75/25	50/50	25/75	100% AGUA
Reflujo	18,17±0,081 b	22,12±0,0640 c	25,39±0,149 b	17,89±0,170 b	13,24±0,513 c
30	23,51±0,687 a	30,19±0,7729 a	31,12±0,745 a	29,59±0,309 a	30,16±0,183a b
60	23,88±0,378 a	31,09±0,0278 ab	30,16±0,191 a	29,80±0,265 a	29,97±0,275 b
120	24,71±0,908 a	32,09±0,1002 b	31,02±0,096 a	37,48±0,358 c	30,96±0,146 a

Las medias con diferentes letras en cada columna fueron significativamente diferentes P<0,05).

Compuestos polifenólicos totales

La Tabla II se muestra el contenido de polifenólicos totales reportados como miligramos de ácido gálico/g de planta seca, donde los valores mayores son para las mezclas metanol-agua 75-25 y metanol agua 50-50. Como en el caso de los polifenoles totales los valores de reflujo fueron menores comparados con los de microondas lográndose los mayores valores a los 120 minutos, aunque estando bastante cercanos los valores de 30 y 60 min. Conde–Hernández et al (2014), obtiene resultados parecidos aunque utilizando el método de agitación y comparándolo con microondas. Quiroz-Reyes et al, (2013) trabajó con maceración y ultrasonido en cacao y encuentra que es más eficiente el método de microondas con ultrasonido en relación a la maceración.

Tabla II. Contenido de compuestos polifenólicos por el método de reflujo y de microondas asistido por ultrasonido, en cinco concentraciones de metanol-agua (mg de ácido gálico/g de muestra seca).

Tiempo	METANOL 100%	75/25	50/50	25/75	100% AGUA
Reflujo	5,81±0,0392 a	8,60±0,0792 a	7,05±0,0608 a	5,08±0,0908 a	0,04±0,5882 c 2,13±0,1904
30	6,88±0,2941 b	10,77±0,3962 b	7,82±0,6886 a	5,26±0,1480 a	a 5,99±0,2273
60	7,30±0,1961 b	11,17±0,1335 b	7,57±0,1563 a	7,04±0,2961 c	b 9,13±0,2060
120	8,57±0,1080 c	13,05±0,1335 c	11,89±0,1480 b	9,71±0,5990 d	b

Las medias con diferentes letras en cada columna fueron significativamente diferentes P<0,05).

En la Tabla III se muestran los valores de EC₅₀ para el extracto de chipilín en las cinco mezclas de disolventes y para los dos métodos de extracción. La EC₅₀ se define como la cantidad de antioxidante necesario para reducir la concentración inicial de DPPH en un 50%. A valores de EC₅₀, mas grande es la actividad de los extractos como inhibidores del radical DPPH (Wooton-Beard y Ryan, 2011). Los valores menores que son los que representan la mayor capacidad de inhibición se encuentran a 120 minutos y en las mezclas metanol-agua 75-25 y 50-50

Tabla III. Valores de EC₅₀ de extracto de chipilín en cinco sistemas de disolventes y con los dos métodos de extracción.

	Metanol al 100%	75/25	50/50	25/75	100% agua
Reflujo	0,4756±0,0086b	0,0687±0,0009a	1,0453±0,0075b	0,775±0,0065c	0,9324±0,0080b

30 min	0,5874±0,0051c	0,7783±0,0038b	1,0159±0,0065a	0,8125±0,0076d	0,9236±0,0075b
60 min	0,0578±0,0043a	1,2043±0,0047c	1,0715±0,0032c	0,4238±0,0023b	0,7976±0,0067a
120	-0,3765±0,0023d	1,4365±0,0067d	-1,145±0,0021d	0,3536±0,0020a	0,6065±0,0010c

Las medias con diferentes letras en cada columna fueron significativamente diferentes P<0,05).

Ensayo cromatográfico del extracto de chipilín por HPLC.

Con el fin de conocer los componentes que están presentes en el extracto de chipilín, se obtuvo el cromatograma del mismo y de uno de sus componentes que es el ácido gálico que por su facilidad de manejo y adquisición se tenía disponible, como se muestra en las Figuras 1.

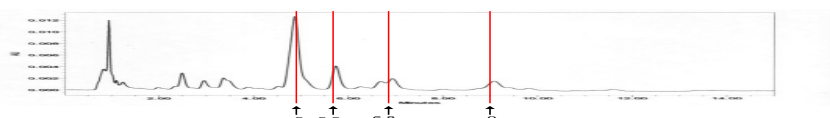


Figura 1. Cromatograma por HPLC del chipilín (*Crotalaria maypurensis* H.B.K)

Aunque Fuertes Ruiton y col (1998) estudiaron otra fabácea, *Lupinus ballianus* C.P., en la que se reporta la presencia de flavonoides, principalmente la genisteína, y Avendaño, (2011) hizo estudios sobre la soya (*Glycine maxima*) determinando la presencia de isoflavonas, siendo la malonildadzina el compuesto mayoritario, y acetildaidzina y daizeína los compuestos secundarios, no fue posible identificar estos compuestos por lo que se procedió a realizar la búsqueda de un compuesto presente de manera general como el ácido gálico e inyectarlo junto con nuestro extracto y obtener por repetición que estamos extrayendo adecuadamente los compuestos. Los resultados de la absorbancia observada se muestran en la Tabla IV.

Tabla IV. Valores de absorbancia observada en cada inyección al inyectar 20 µL de muestra en el HPLC

	MET 100%	75/25	50/50	25/75	100% AGUA
SOHXLET	1,2±0,0092 a	1,75±0,0062 a	1,66±0,0008 a	1,65±0,0008 a	1,07±0,0012 a
30 min	1,6±0,0041 b	2,27±0,0032 b	1,74±0,0046 a	1,56±0,0080 a	1,2±0,0024 c
60 min	1,4±0,0007 b	2,16±0,0015 b	1,79±0,0063 a	1,74±0,0061 c	1,75±0,0073 b
120 min	1,8±0,0080 c	2,4±0,0035 c	2,28±0,0180 b	1,90±0,0090 d	1,87±0,0060 b

Las medias con diferentes letras en cada columna fueron significativamente diferentes P<0,05).

El comportamiento que se observa es similar al que se presenta en los demás ensayos, por lo que se observa congruencia entre los resultados.

CONCLUSIÓN

El emplear ultrasonido facilita la extracción de los compuestos polifenólicos presentes en la hoja de chipilín incrementando los valores de extracción de manera significativa. La actividad antioxidante medida por los métodos de DPPH y

ABTS muestran que los valores obtenidos con microondas y asistido por sonicación, son más efectivos para extraer los compuestos polifenólicos presentes.

Así mismo podemos concluir que el método de microondas con ultrasonido es mucho más efectivo que el de reflujo, ya que es menos drástico al emplear tiempos y temperaturas más bajas.

BIBLIOGRAFÍA

- Chia-Chi Chang, Ming-Hua Yang, Hwei-Mei Wen And Jiing-Chuan Chern 2002 Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol. 10, No. 3, Pages 178-182
- Magnuson B, Munro I, Abbot P, Baldwin N, López-García R, Ly K, McGirr L, Robeerts A, Socolovsky S. 2013. Review of the regulation and safety assesment of good substances in various countries and jurisdictions. *Food Addit. Contam:Part A* 30(7):1147-1220.
- Moura Rufino M.S, Elesbao,A.R.,Sousa B.E.,Maia M.S. Goes S.C.,Pérez-Jiménez J y Saura-Calixto,F.D. 2010 Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH . Metodología científica. Empresa Embrasa. Brasil
- Ortega-Ramírez LA, Rodríguez-García I, Leyva JM, Cruz-Valenzuela MR, Silva-Espinoza BA, González-Aguilar GA, Siddiqui MW, Ayala-zavala JF. 2014. Potential of medicinal plants as antimicrobial and antioxidant agents in food industry: A hypothesis. 79(2) R129-R137.
- Quiroz-Reyes, CN, Aguilar-Méndez, MA, Ramírez-Ortíz, ME, Ronquillo-de Jesús, E. 2013. Comparative study of ultrasound and maceration thecniques for the extraction of plyphenols from cocoa. *Rev. Mexicana de Ingeniería Química* 12(1), 11-18
- Sánchez Y, Pino O, Correa T.M., Naranjo E, Iglesia A. 2009. Estudio químico y microbiológico del aceite de *Piper auritum* Kunth (Caisimón de anís). *Revista de Protección Vegetal*, 24, 110-115.
- Silva-Espinoza BA, Ortega-Ramírez LA, González-Aguilar GA, Olivas I, Ayala-Zavala JF.2013. Protección antifúngica y enriquecimiento antioxidante de fresa con aceite de hoja de canela. *REv. Fitotecnia Mexicana* 36(3):217-224
- Sulaiman, S.F., Bakar Sajak, A.A., Ooi, K.L.Seow, M.E. 2011. Effect of solvents in extracting polyphenols and antioxidants of selected raw vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis* 24, 506-515
- Vinatoru M. 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry* 8, 303-313
- Wooton-beard P.C. Ryan, L 2011. Improving public health? The role of antioxidant-rich fruit and vegetables beverages. *Food Research International* 44, 3135-3148
- (<http://www.food-info.net/es/products/spices/mexpep.htm>)