

Derribando Mitos

El Calor no Siempre Degrada

AUMENTO DE LA ACTIVIDAD ANTIRRADICALARIA DEL EXTRACTO DE CÁSCARA DE NARANJA POR EFECTO DEL PRETRATAMIENTO TÉRMICO.

Resumen: La cáscara de naranja resulta un residuo industrial cuyo mesocarpio es rico en el flavonoide hesperidina. Si se desea obtener extractos a partir del residuo mencionado es necesario recurrir a su deshidratación para facilitar su almacenamiento, disminuyendo su volumen y prolongando su vida útil. En el presente trabajo se evalúa el efecto de diferentes tratamientos de secado del mesocarpio -en estufa de circulación forzada y de vacío, a 40 y 60 °C- sobre la actividad antirradicalaria de los extractos obtenidos posteriormente. Se encontró que los correspondientes a las muestras sometidas a tratamiento térmico muestran mayor actividad antirradicalaria que el obtenido a partir del material fresco. Este resultado contradice el concepto generalizado de que el calor degrada todo compuesto bioactivo. Se encontró además una correlación positiva entre el contenido de flavonoides totales y melanoidinas y la actividad antirradicalaria, postulando que ambos grupos de compuestos contribuyen al aumento del poder antirradicalario observado.

Palabras Claves: Extracción Asistida por Ultrasonido; Naranja; Actividad Antirradicalaria; Flavonoides; Melanoidinas.

Abstract: The citrus peel is an industrial residue which mesocarp is rich in the flavonoid hesperidin. If extracts from this residue are to be obtained, it is necessary to dehydrate it in order to facilitate its storage reducing its volume and extending its lifespan. In the present work the effect of different mesocarp drying treatments -convection and vacuum oven; at 40, and 60 °C- over the antiradical activity of the extracts obtained afterwards are evaluated. It was found that the ones obtained from the heat-treated samples show higher antiradical activity than the extract obtained from the fresh vegetal material. This result opposes the generalized concept that heat degrades all bioactive compounds. Furthermore, a positive correlation between the content of total flavonoids and melanoidins and the antiradical activity was found, indicating that both groups of compounds contribute to the observed rise in the antiradical power.

Keywords: Ultrasound-assisted Extraction; Orange; Antiradical Activity; Flavonoids; Melanoidins.

Consuelo Pacheco⁽¹⁾, Nicolás De Palma⁽¹⁾, Jonathan Moreno⁽²⁾, Mariana Walter⁽²⁾, Juliana Piña⁽¹⁾, Mónica A. Nazareno⁽³⁾

⁽¹⁾Planta Piloto de Ingeniería Química, PLAPIQUI (UNS-CONICET), Camino La Carrindanga km 7, Bahía Blanca, Argentina.

⁽²⁾Departamento de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Sur, Av. Alem 1253, Bahía Blanca, Argentina.

⁽³⁾Centro de Investigación y Transferencia de Santiago del Estero (UNSE – CONICET), Ruta Nacional 9 km 1125, Santiago del Estero Argentina.

Mail: cpacheco@plapiqui.edu.ar

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Estudios epidemiológicos han demostrado que una dieta rica en frutas y verduras posee un importante efecto en la disminución de la incidencia de serias enfermedades, tales como cáncer, afecciones cardio- y cerebrovasculares y diabetes. Esta acción preventiva ha sido relacionada con la presencia de sustancias bioactivas; entre otras, vitaminas, carotenoides y polifenoles, dentro de los cuales se ubican los flavonoides (Hertog et al., 1995). Estos fitoquímicos poseen como característica común su actividad antioxidante.

La Administración de Alimentos y Drogas de Estados Unidos (FDA) incluyó al flavonoide hesperidina entre los nutrientes cuyo consumo es aconsejado para mantener una buena salud, estableciendo incluso una dosis diaria recomendada (Balch, 2008). Este flavonoide es utilizado ampliamente en el tratamiento y prevención de patologías asociadas al sistema circulatorio debido a sus propiedades antiinflamatorias (Milde et al., 2004).

La hesperidina se encuentra principalmente en el albedo o mesocarpio de la naranja, es decir, en la capa blanca esponjosa presente entre la porción comestible y la que generalmente se denomina piel (Escobar-Blanco, 2010; Garg et al., 2001).

La extracción de compuestos fenólicos de materiales vegetales resulta un desafío ya que la solubilidad de los mismos es gobernada por el tipo de solvente utilizado (su polaridad), el grado de polimerización del polifenol, las interacciones con otros compuestos de la matriz y la formación de complejos insolubles. Por lo tanto, no existe un método uniforme o completamente satisfactorio para la extracción de todos los polifenoles presentes en materiales vegetales. Los tiempos de extracción varían usualmente entre 1 minuto y 24 horas; mayores tiempos aumentan la probabilidad de que ocurran reacciones oxidativas con deterioro del compuesto fenólico (Naczki y Shahidi,

2004). La recuperación de polifenoles de productos alimenticios también se ve influenciada por la relación muestra-solvente. En el caso de los flavonoides, éstos son generalmente extraídos con metanol, etanol, agua o sus mezclas (Naczki y Shahidi, 2004).

El método convencional utilizado es la clásica extracción por solvente, en el cual la matriz conteniendo el flavonoide y el solvente elegido se ponen en contacto, usualmente aplicando calor y alcanzando en algunos casos el punto de ebullición de la mezcla (Yang y Zhang, 2008). Este método es sencillo y el equipamiento necesario es simple. Sin embargo, el rendimiento del proceso puede ser bajo debido a la ionización, hidrólisis y/u oxidación que puede sufrir la muestra (Ohnishi et al., 1994; Paganga et al., 1999). Entre los métodos alternativos se encuentran la extracción con fluidos supercríticos, la extracción con líquidos presurizados, la microextracción de fase sólida y la extracción asistida por ultrasonido (Chua, 2013). Esta última técnica ofrece alta reproducibilidad en menores tiempos de extracción, simplificada manipulación, consumo reducido de solvente y menor consumo de energía (Chemat et al., 2008; Yang y Zhang, 2008; Herrera y Luque de Castro, 2004; Chua, 2013). El mismo produce disrupción celular, reducción del tamaño de partícula y chorros ultrasónicos hacia la superficie del sólido generando una mayor superficie de contacto entre las fases líquida y sólida (Yang y Zhang, 2008).

La cáscara de la naranja, de la cual forma parte el albedo, resulta un sub-producto de la industria juguera. Si se desea aprovechar el alto contenido de compuestos bioactivos presentes en dicho residuo, considerando los importantes volúmenes que se generan del mismo en épocas de cosecha, es necesario incorporar una etapa de secado previo a la obtención de los extractos de manera de prolongar su vida útil.

Estudios preliminares determinaron que el secado del albedo de naranja como etapa previa a la extracción asistida por ultrasonido aumenta la actividad antirradicalaria (AAR) de los extractos obtenidos, en oposición al concepto generalizado de que el calentamiento de un material natural genera inevitablemente degradación de sus compuestos bioactivos (Pacheco et al., 2015). En la literatura es posible encontrar diversos trabajos en los cuales se arriba a conclusiones similares. Son varias las hipótesis presentadas para intentar explicar este comportamiento, siendo pocos los trabajos en los cuales se verifican las mismas. Entre dichas hipótesis se destaca la sugerida por varios autores que postula que las melanoïdinas, compuestos generados durante la Reacción de Maillard, podrían presentar cierta actividad antioxidante (Manzocco et al., 2001; Que et al., 2008; Vega-Gálvez et al., 2009). Otra hipótesis, sugerida por varios autores (Manzocco et al. (1998), Nicoli et al. (1999), Da Porto et al. (2000)), consiste en proponer que los polifenoles parcialmente oxidados podrían poseer mayor poder antioxidante que sus precursores no oxidados.

El presente trabajo tiene como objetivo contribuir a esclarecer las posibles causas de la mejora en la capacidad antirradicalaria de los extractos ricos en hesperidina obtenidos a partir de albedo de naranja como consecuencia de la incorporación de una etapa de secado previa al proceso de extracción. En particular, se cuantifica el contenido de flavonoides y de melanoïdinas presente en dichos extractos.

METODOLOGÍA

Preparación del Material Previo a la Extracción

Se evaluaron dos métodos de deshidratación a distintas temperaturas: secado en estufa de vacío (58

cm Hg), a 40 y 60 °C durante 4 y 2 h, respectivamente; y secado en estufa de circulación forzada, a 40 y 60 °C durante 5,5 h y 2,7 h, respectivamente. En todos los casos, el material fue secado hasta alcanzar peso constante.

Las muestras secas fueron pulverizadas mediante mortero y luego tamizadas para garantizar uniformidad de tamaño de partícula. Se utilizaron tamices de la serie ASTM, seleccionando la fracción de partículas con diámetro menor a 300 µm. En el caso de las muestras frescas se recurrió al agregado de nitrógeno líquido para mantener el material congelado durante todo el proceso de pulverización en mortero.

Proceso de Extracción

Todas las extracciones se llevaron a cabo en un equipo de ultrasonido por 20 min, utilizando etanol absoluto a 40 °C como solvente de extracción. Tanto para las extracciones a partir de material fresco como seco, la masa de materia seca se mantuvo en 1,5 g, mientras que la relación material seco-solvente se fijó en 1:10. Las extracciones se llevaron a cabo por triplicado.

Determinación de la actividad antirradicalaria (AAR)

La técnica empleada para determinar la AAR consistió en medir la desaparición de un radical libre estable 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH•) en metanol, por acción del agregado de una alícuota del extracto etanólico vegetal.

El consumo del radical por el agregado de alícuotas de los extractos fue monitoreado por espectrofotometría visible en su máximo de absorción ($\lambda_{\text{máx}} = 515 \text{ nm}$) cada 30 segundos durante 10 minutos. La concentración del extracto etanólico fue de 60 mg/mL (calculada en base a la masa inicial de albedo seco) y el volumen de la

alícuota fue de 150 µL en 2,85 mL de solución de DPPH•.

La AAR se calculó mediante la Ecuación (1), donde A_0 es la absorbancia a 515 nm y tiempo 0 de la solución de DPPH• (previo al agregado del extracto) y A_{ss} es la absorbancia luego del agregado de muestra, en el estado estacionario. Este valor se obtuvo mediante extrapolación a partir del ajuste de los perfiles cinéticos por regresión no lineal (Microcal Origin versión 8.0). Los resultados se presentan como %AAR/mg residuo.

$$\%AAR = \left(1 - \frac{A_{ss}}{A_0}\right) 100\% \quad (1)$$

Cuantificación de Flavonoides Totales

Esta determinación se llevó a cabo según Chailou y Nazareno (2009). El método consistió en agregar 2 mL del extracto etanólico (60 mg/mL) a 2 mL de una solución de $AlCl_3$ en una mezcla de metanol-ácido acético (0,149 M) y esperar 30 minutos a temperatura ambiente para luego determinar su absorbancia espectrofotométricamente. La cuantificación se llevó a cabo utilizando hesperidina como estándar de referencia ($\lambda_{m\acute{a}x} = 306$ nm). El contenido de flavonoides se reporta como mg hesperidina/g residuo.

Determinación del Contenido de Melanoidinas

Las melanoidinas fueron cuantificadas espectrofotométricamente a 420 nm, la longitud de onda a la cual las melanoidinas absorben (Del Castillo et al., 2002). Como la estructura de las melanoidinas no ha sido aún determinada, no hay disponible ningún estándar de referencia (Pérez-Hernández et al., 2012). En consecuencia, los resultados son presentados como AU específica (unidades de absorción por g de residuo)/ AU específica

para la muestra fresca (Udomkun et al., 2015). De esta manera, el valor correspondiente al extracto obtenido a partir del albedo fresco toma el valor arbitrario de uno, de manera de simplificar la comparación con los valores correspondientes al resto de las muestras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad Antirradicalaria

En la Figura 1 se presentan los resultados obtenidos en cuanto a AAR de las diferentes muestras. Cabe aclarar que los resultados son expresados por masa de residuo y no de material vegetal inicial debido a que lo que se intenta evaluar son los cambios de naturaleza química que puede estar sufriendo el mismo, independientemente del rendimiento del proceso de extracción.

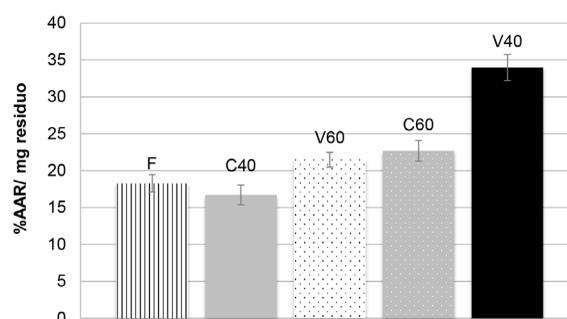


Figura 1. Actividad antirradicalaria presentada por las diferentes muestras (F: fresca; C40: secada en estufa de circulación forzada a 40 °C; C60: secada en estufa de circulación forzada a 60 °C; V40: secada en estufa de vacío a 40 °C; V60: secada en estufa de vacío a 60 °C. Valores promedio de 3 determinaciones ± desvío estándar.

Tal como se esperaba, la AAR de los extractos obtenidos a partir del material vegetal sometido a tratamiento térmico resultó mayor a la correspondiente al extracto obtenido a partir del albedo fresco, a excepción de la muestra secada en estufa de circulación

forzada a 40 °C, que presentó valores similares (valor $p > 0,1$). De acuerdo a estos resultados, y al rendimiento obtenido para cada una de las muestras (datos no mostrados), el pretratamiento óptimo -si lo que se desea es maximizar la AAR del extracto obtenido- resultaría la deshidratación de la muestra en estufa de vacío a 40 °C. Asimismo, la opción de secar a 60 °C en estufa de circulación forzada de aire resulta atractiva ya que constituye un proceso más económico y con menor tiempo operativo.

Contenido de Flavonoides Totales

Al evaluar el contenido de flavonoides totales de las muestras (Figura 2), se observa que el pretratamiento térmico promovió la formación de compuestos flavonoides para tres de las cuatro muestras sometidas a calentamiento (valor $p < 0,05$). Como se mencionó anteriormente, diversos autores (Manzocco et al. (1998), Nicoli et al. (1999), Da Porto et al. (2000)) sugieren que los polifenoles oxidados podrían poseer mayor poder antioxidante que sus precursores no oxidados. Los resultados aquí presentados demuestran que el aumento de la AAR presentada por las muestras sometidas a las condiciones planteadas en el presente trabajo podría atribuirse, al menos parcialmente, a la formación de nuevos compuestos fenólicos. Esta evidencia no invalida la hipótesis alternativa presentada por los autores mencionados. De hecho, la tendencia de los resultados presentados en la Figura 2 se mantiene parcialmente respecto a los correspondientes a AAR. La diferencia altamente significativa entre las muestras C60 y V40 observada en la Figura 1 desaparece, encontrándose valores similares de contenido de flavonoides en ambas muestras (valor $p > 0,05$).

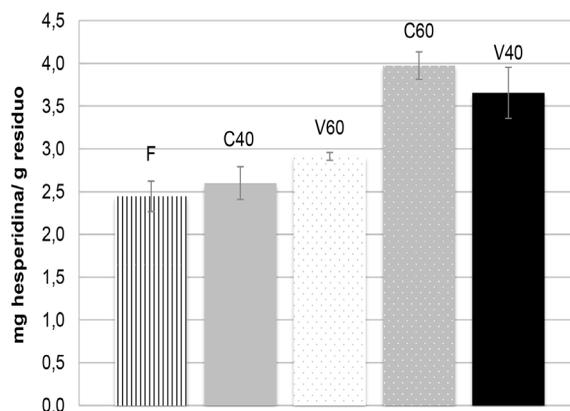


Figura 2. Contenido de flavonoides presentado por las diferentes muestras (F: fresca; C40: secada en estufa de circulación forzada a 40 °C; C60: secada en estufa de circulación forzada a 60 °C; V40: secada en estufa de vacío a 40 °C; V60: secada en estufa de vacío a 60 °C). Valores promedio de 3 determinaciones \pm desvío estándar.

Contenido de Melanoidinas

En la Figura 3 se presentan los resultados obtenidos respecto al contenido de melanoidinas en los diferentes extractos. Como se esperaba, el extracto obtenido a partir de la muestra fresca presentó el contenido mínimo de melanoidinas.

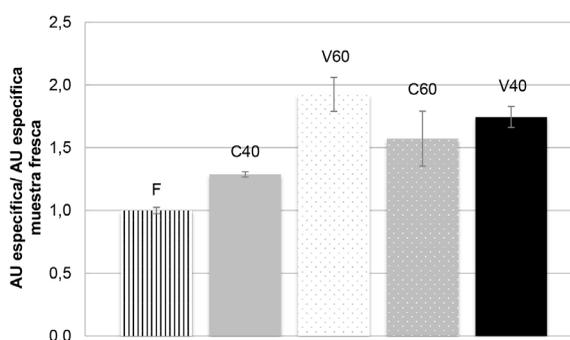


Figura 3. Contenido de melanoidinas presentado por las diferentes muestras, expresado como unidades de absorción relativa (por unidad de masa de residuo) relativas a las unidades de absorción relativa del extracto obtenido a partir del material fresco. (F: fresca; C40: secada en estufa de circulación forzada a 40 °C; C60: secada en estufa de circulación forzada a 60 °C; V40: secada en estufa de vacío a 40 °C; V60: secada en estufa de vacío a 60 °C). Valores promedio de 3 determinaciones \pm desvío estándar.

Al igual que en el caso de la composición en flavonoides, la tendencia respecto a la AAR de los diferentes extractos se muestra similar, aunque no se mantiene de manera estricta. Esto indicaría nuevamente la presencia de diversas reacciones desarrollándose en simultáneo. Manzocco et al. (2001) indican que una correlación positiva entre color y propiedades antioxidantes puede ser encontrada en sistemas modelo y en alimentos donde la reacción de Maillard es la prevalente. Esto ocurre en alimentos con nulo o bajo contenido de antioxidantes, o en alimentos cuyos antioxidantes naturales son bastante termoestables. Claramente el albedo de naranja no forma parte de este grupo de alimentos, por lo cual la contribución de las melanoidinas al aumento de la AAR sufrida por el mismo al ser sometido a tratamiento térmico debe evaluarse conjuntamente con la ocurrencia de reacciones en las que participan compuestos fenólicos.

CONCLUSIONES

Se evaluó el efecto de diferentes pretratamientos térmicos del albedo de naranja sobre la actividad anti-

radicalaria de los extractos obtenidos en una etapa posterior. Se encontró que la AAR de los extractos del material vegetal seco aumenta en tres de los cuatro casos considerados. Asimismo, las tres muestras que exhibieron mayor AAR presentaron mayor contenido de flavonoides totales, aunque la correlación no fue directa. Al evaluar el comportamiento de estas muestras en relación con su concentración en melanoidinas, los resultados fueron similares en cuanto a que las tres muestras que mostraron diferencias en AAR respecto al extracto obtenido a partir del albedo fresco, también exhibieron mayor contenido de melanoidinas. Este resultado indicaría que estos compuestos, producidos durante la reacción de pardeamiento no enzimático, podrían tener efectivamente una acción antirradicalaria.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por la ANPyT, el CONICET y la Universidad Nacional del Sur (UNS). Asimismo, los autores agradecen la colaboración de las Téc. Clarisa Cicchelli y Analía Muñoz y la Lic. Fernanda Cabrera por la asistencia en el uso de los diferentes equipos utilizados.

REFERENCIAS

- Hertog, M.G.L., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., Giampaoli, S., Jansen, A., Menott, A., Nedeljkovic, S., Pekkarinen, M., Simic, B.S., Toshoma, H., Feskens, E.J.M., Hollman, P.C.H., Katan, M. (1995). Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Archives of Internal Medicine*, 155, 381-386.
- Balch, P.A. (2008). *Prescription for Nutritional Healing*. New York: Avery. 4a edición.
- Milde, J., Elstner, E.F., Graßmann, J. (2004). Synergistic inhibition of low-density lipoprotein oxidation by rutin, γ -terpinene, and ascorbic acid. *Phytomedicine*, 11, 105-113.
- Escobar Blanco, M. (2010). *Extracción de compuestos fenólicos de las cáscaras de cítricos producidos en México. Tesis de Magister*. Instituto Politécnico Nacional, México.
- Garg, A., Garg, S., Zaneveld, L.J.D., Singla, A.K. (2001). Chemistry and Pharmacology of The Citrus Bioflavonoid Hesperidin. *Phytotherapy Research*, 15, 655-669.
- Naczki, M., Shahidib, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054, 95-111.
- Yang, Y., Zhang, F. (2008). Ultrasound-assisted extraction of rutin and quercetin from *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15, 308-313.
- Ohnishi, M., Morishita, H., Iwahashi, H., Toda S., Shirataki, Y., Kimura, M., Kido, R. (1994). Inhibitory effects of chlorogenic acids on linoleic acid peroxidation and

- haemolysis. *Phytochemistry*, 36, 579–583.
- Paganga, G., Miller, N., Rice-Evans, C.A. (1999). The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities. What does a serving constitute? *Free Radical Research*, 30, 153–162.
- Chua, L.S. (2013). A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 150, 805–817.
- Chemat, F., Tomao, V., Viot, M. (2008). Ultrasound-assisted extraction in food analysis. *Handbook of food analysis instruments por Semih Ötles*, CRC press, USA, pp. 85–103.
- Herrera, M.C., Luque de Castro, M.D. (2004). Ultrasound-assisted extraction for the analysis of phenolic compounds in strawberries. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 379, 1106–1112.
- Pacheco, C., Bari, A., De Cabo, M., Richards, S., Piña, J., Nazareno, M.A. (2015) Estudio de la extracción asistida por ultrasonido de antioxidantes de cáscara de naranja. *Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas (CLICAP)* (pág. 498-504). Mendoza: Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria.
- Manzocco, L., Calligaris, S., Mastrocola, D., Nicoli, M.C., Lerici, C.R. (2001). Review of non- enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Trends in Food Science & Technology*, 11, 340–346.
- Que, F.; Mao, L.; Fang, X. ; Wu, T. (2008). Comparison of hot air-drying and freeze-drying on the physicochemical properties and antioxidant activities of pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) flour. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 1195–1201.
- Vega-Gálvez, A.; Di Scala K.; Rodríguez, A.; Lemus-Mondaca, R.; Miranda, M.; López, J.; Pérez-Won, M. (2009). Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties, antioxidant capacity, colour and total phenolic content of red pepper (*Capsicum annum*, L. var. Hungarian). *Food Chemistry*, 117, 647–653.
- Manzocco, L., Mastrocola, D. and Nicoli, M.C. (1998). Chainbreaking and Oxygen Scavenging Properties of Wine as Affected by Some Technological Procedures. *Food Research International*, 31, 673–678.
- Nicoli, M.C., Anese, M. and Manzocco, L. (1999). Oil Stability and Antioxidant Properties of an Oil-tomato Food System as Affected by Processing. *Advances in Food Sciences*, 21, 10–14.
- Da Porto, C., Calligaris, S., Celotti, E. and Nicoli, M.C. (2000). Antiradical Properties of Commercial Cognacs Assessed by the DPPH• Test. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 4241–4245.
- Chaillou, L.L., Nazareno, M.A. (2009). Chemical variability in propolis from Santiago del Estero, Argentina, related to the arboreal environment as the sources of resins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 978-983.
- Del Castillo, M.D., Ames, J.M., Gordon, M.H. (2002). Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3698-3703.
- Pérez-Hernández, L.M., Chávez-Quiroz, K., Medina-Juárez, L.A., Gámez Meza, N. (2012). Phenolic Characterization, Melanoidins, and Antioxidant Activity of Some Commercial Coffees from *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 56(4), 430-435.
- Udomkun, P., Nagle, M., Mahayothee, B., Nohr, D., Koza, A., Müller, J. (2015). Influence of air drying properties on non-enzymatic browning, major bio-active compounds and antioxidant capacity of osmotically pretreated papaya. *LWT - Food Science and Technology*, 60, 914-922.