

Antioxidantes I. Chile ancho (*Capsicum annum L. grossum sendt.*) y romero (*Rosmarinus officinalis L.*) como fuentes naturales de antioxidantes

Agustín Monroy-Vázquez², Alfonso Totosaus², Leandro Rodrigo González González^{1,2},
Katya Angélica de la Fuente Salazar¹ e Ignacio García-Martínez^{1,2}

¹Universidad Simón Bolívar

²Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec

Resumen

Actualmente, productos alimenticios consumidos por la especie humana mayoritariamente contienen antioxidantes sintéticos, por lo cual se buscan alternativas de antioxidantes naturales. El chile ancho (*Capsicum annum L. grossum sendt.*) y el romero (*Rosmarinus officinalis L.*) son utilizados en la alimentación como especias y contienen metabolitos secundarios como polifenoles y flavonoides. Se realizaron extracciones del chile ancho y romero de polifenoles a diferentes proporciones de etanol:agua y se determinó el análisis cualitativo de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteou y su actividad antioxidante comparando con BHA y BHT. Los resultados obtenidos muestran que los extractos de chile ancho y romero poseen una elevada cantidad de polifenoles y actividad antioxidante.

Palabras clave: romero, chile ancho, polifenoles, antioxidante.

Abstract

Currently foodstuffs consumed by the human species, which are principally containing synthetic antioxidants, which are seeking alternatives to natural antioxidants. The broad chili (*Capsicum annum L. grossum sendt.*), Rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) are used in nutrition as spices contain secondary metabolites such as flavonoids and polyphenols. We extractions of broad chili and rosemary polyphenol different proportions of ethanol:water was determined and qualitative analysis of total polyphenols method Folin-Ciocalteou and its antioxidant activity compared with BHA and BHT. The results show that extracts of rosemary and broad chili have large amounts of polyphenols and high antioxidant activity.

Keywords: rosemary, capsicum, polyphenols, antioxidants.

Introducción

En los últimos años se han investigado fuentes alternas de antioxidantes naturales. Esta búsqueda se basa principalmente en la extracción de polifenoles y flavonoides. Los polifenoles son metabolitos secundarios generalmente extraídos de las plantas. Los compuestos llamados colectivamente

flavonoides poseen 13 subclases, con un total de más de 4000 compuestos (Eskin y Robinson, 2001; Haworth, 2003).

Los antioxidantes se clasifican en dos principales categorías: primarios y secundarios. Los antioxidantes primarios son aquéllos que reaccionan con especies reactivas de oxígeno (ERO). Las ERO

son varias formas de activación del oxígeno, que incluyen a los radicales libres como iones de superóxido (O_2^-) y radicales hidroxilo (-OH) (Rajeshwar et al., 2005). Los antioxidantes secundarios actúan debido a numerosos mecanismos, reduciendo la velocidad de oxidación de lípidos por varias acciones, pero sin estabilizar a las ERO. También pueden desactivar metales pesados prooxidantes o ceder hidrógeno a los antioxidantes primarios provocando su regeneración (Harborne, 1994; Akoh y Min, 2002).

Los antioxidantes pueden actuar en los alimentos por diferentes mecanismos: (1) atrapan a radicales libres que inducen reacciones de iniciación de oxidación, (2) inactivan iones metálicos, (3) quitan las especies reactivas de oxígeno como radicales libres, (4) rompen la cadena de reacciones de iniciación y (5) reducen los peróxidos para prevenir la formación de radicales libres (Eskin y Robinson, 2001).

El romero y el chile ancho se han usado como especias. Los extractos de éstos han generado interés en la industria alimenticia a raíz de sus propiedades antioxidantes.

Objetivo

Realizar la extracción etanólica (etanol: agua) de compuestos polifenólicos en muestras de chile ancho (*Capsicum annum L. grossum sendt.*) y romero (*Rosmarinus officinalis*) y evaluar su actividad antioxidante comparándolos con antioxidantes sintéticos (BHA y BHT).

Método

Las muestras de chile ancho y romero se adquirieron en el mes de septiembre en el Mercado de la Merced, del Distrito Federal, lugar especializado en la comercialización de productos agrícolas. Las muestras presentaron un grado de madurez adecuado. Los estándares utilizados fueron grado reactivo. Los reactivos y solventes empleados fueron grado analítico (J. T. Baker).

Extracción

Los extractos se obtuvieron mediante el uso de soluciones etanol:agua, empleando diferentes proporciones volumen/volumen (v/v) de etanol y agua (0:100, 25:75, 50:50, 75:25, 100:0) (Pietta et al., 1998; Almeida-Doria y Regitano-D'arce, 2000; Kaur y Kapoor, 2002; Zaporozhets et al., 2004; Almaraz et al., 2004; Vourela et al., 2005). De experimentaciones previas en el laboratorio, se llegó a la determinación de mezclar 1 g de romero o chile ancho por cada 5 ml de mezcla etanol:agua.

Las muestras de romero y chile ancho se llevaron a un horno de secado Marca FELISA, Modelo FE-230, a 35 °C por 24 horas. Transcurrido este tiempo, se molieron hasta obtener partículas finas de la muestra, pasando por malla no. 20. A continuación se agregó cada una de las proporciones correspondientes de la mezcla de etanol:agua y se mezclaron en un agitador magnético durante 10 minutos.

Presencia de polifenoles

El análisis cualitativo de polifenoles en los extractos se determinó por la metodología modificada de Madhujith y Shahidi (2005), a partir de la reportada por Singleton y Rossi (1965).

El extracto se diluyó hasta un volumen de 100 ml. Posteriormente, se tomó 1 ml de la muestra y se adicionó 1 ml del Reactivo de Folin-Ciocalteu, se agitó y se agregaron 8 ml de Na_2CO_3 (0.7 M). Se dejó reposar en oscuridad a temperatura ambiente por 2 h y finalmente se leyó la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro VARIAN CARY, Modelo 50 BIO (VARIAN, Sprinvale, Australia). Cada muestra se analizó por triplicado y la presencia de polifenoles se determinó a partir de una curva patrón que contenía de 20 a 200 mg de catecol por ml.

Capacidad antioxidante

La evaluación de la actividad antioxidante de los extractos se determinó empleando la metodología de Re et al. (1999).

El catión de ABTS.⁺ (2,2'-azinobis-(3-etilbezotiazoline-6- ácido sulfónico) se obtuvo mediante la oxidación química con persulfato de potasio, disolviéndose en agua hasta una concentración de 7 mm, para posteriormente reaccionar con persulfato de potasio (2.45 mm concentración final). Para

su oxidación completa, se dejó reposar la mezcla ABTS.⁺-persulfato de potasio en oscuridad total y a temperatura ambiente por 18 horas.

Para la evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos y el radical ABTS.⁺, las muestras se diluyeron con etanol hasta un volumen de 10 ml. La concentración empleada fue de 4 mg/ml tanto para los extractos como para los antioxidantes BHA y BHT.

Las muestras y el ABTS.⁺ se mantuvieron a temperatura constante de 30 °C. Posteriormente, se tomó una alícuota de 980 µL de la dilución del ABTS.⁺ y se le midió la absorbancia en un espectrofotómetro VARIAN CARY, Modelo 50 BIO (VARIAN, Sprinvale, Australia), a una longitud de onda de 734 nm hasta obtener una absorbancia de 0.700 ± 0.01. Posteriormente, se agregaron 20 µL de la muestra correspondiente de antioxidante, se agitó y después de un minuto se volvió a medir la absorbancia. Del porcentaje de inhibición de la absorbancia a 734 nm inicial y final, se consideró la capacidad antioxidante.

Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de varianza y a una prueba de Tukey, empleando el programa Statistical Análisis System, Versión 6.0 (SAS Institute, Cary, North Carolina).

Resultados

Extracción de compuestos polifenólicos

La tabla 1 muestra los resultados obtenidos en la extracción de polifenoles dependiendo de la mezcla etanol:agua (v:v). Se observó que la concentración más alta de polifenoles de romero se obtuvo a mayores proporciones de etanol, esto es, 50:50, 75:25 y 100:0. En el caso del chile ancho se encontró una gran variabilidad de los valores de polifenoles presentes, ya que para la proporción 50:50 etanol:agua se obtuvo una gran cantidad de polifenoles, casi 4 veces más que en las otras proporciones de etanol:agua.

Tabla 1. Análisis de medias para los resultados de la extracción de polifenoles romero y chile ancho dependiendo de la mezcla de etanol:agua (V:V)

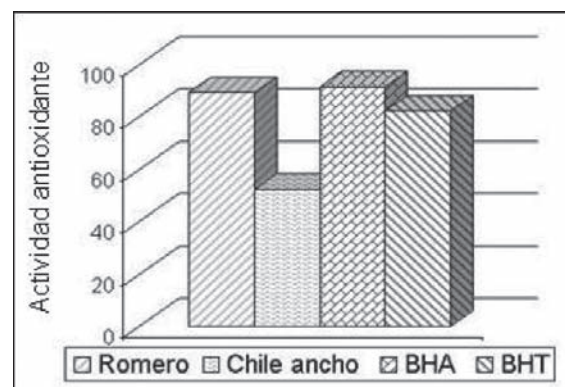
Proporción de Etanol/Agua	Tipo de muestra	
	Romero mg/mL	Chile ancho mg/mL
0:100	247 ^B	645 ^B
25:75	413 ^B	609 ^B
50:50	931 ^A	2578 ^A
75:25	1048 ^A	218 ^B
100:0	847 ^A	168 ^B

^{A, B} Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (P<0.05) para la mezcla etanol:agua.

Actividad antioxidante

En la figura 1 se observa la actividad antioxidante de los extractos de romero y chile ancho y de los antioxidantes BHA y BHT. Esta actividad fue dependiente del número de grupos hidroxilo (OH) que contenían los polifenoles extraídos (Rice-Evans et. al., 1996; Burda y Oleszek, 2001; Genovese et al., 2005).

Figura 1. Capacidad antioxidante de los extractos de romero, chile ancho, BHA y BHT



Discusión

El análisis estadístico mostró que hubo un efecto significativo ($P < 0.01$) correspondiente a la proporción de etanol:agua que varió la cantidad de polifenoles extraídos de romero y chile ancho.


Los resultados obtenidos para la extracción de polifenoles nos sugieren que la composición de los extractos de romero y chile ancho es diferente, ya que para romero, a mayor proporción de etanol en la mezcla, la cantidad de polifenoles extraídos aumentó, siendo mayor a una proporción de 75:25 de etanol:agua. Se ha reportado que los compuestos principales del romero son ácido rosmérico, carnosol y ácido carnosólico (Andersen et al., 2005) y flavonoides (Pérez, 2003 y Kuskoski et al., 2005).

El mejor extracto con actividad antioxidante (figura 1) fue el correspondiente a la muestra de romero con un 89%, debido a que los componentes principales del extracto poseen características de ser excelentes antioxidantes (Andersen et al., 2005). El extracto de chile ancho presentó un 52% de actividad antioxidante aun cuando predominantemente contiene una gran variedad de compuestos como carotenoides, flavonoides (Sun et al., 2007), ácido ascórbico, capsaicinoides, quercetina y luteolina (Lee et al., 1995; Martínez et al., 2006), los cuales presentan una capacidad antioxidante menor a la de los componentes del romero y a las muestras de BHA y BHT.

Los resultados de la actividad antioxidante mostraron que existe una diferencia significativa ($P > 0.05$) entre los extractos de chile y romero. El extracto de romero tuvo una capacidad antioxidante equivalente al BHA y fue el mejor antioxidante con una actividad del 91%, como lo refiere Almeida-Doria y Regitano-D'arce (2000) y Yesil-Celiktas et al. (2007). La capacidad también fue superior al BHT con una actividad antioxidante del 77%. Por esta razón, el extracto de romero pueden ser considerado como un excelente compuesto antioxidante ya que presenta una elevada inhibición ante los radicales libres (Ozkan et al., 2004).

Conclusión

La proporción etanol:agua con un mayor rendimiento, en cuanto a la extracción de polifenoles en muestras de romero, fue de 75:25, mientras que para muestras de chile ancho la mejor fue de 50:50, lo cual es un factor que influye en el momento de elegir la proporción adecuada. La actividad antioxidante que presentan los extractos de romero y chile ancho es alta de manera general; sin embargo, el extracto de romero es equiparable al antioxidante más empleado en la industria de los alimentos que es el BHA. Podemos establecer, de acuerdo a los resultados obtenidos, que se puede emplear el extracto de romero como fuente principal de antioxidante para el uso en alimentos. Estos resultados abren la puerta para la utilización en el futuro de los extractos de romero y chile ancho como sustitutos de antioxidantes sintéticos.

En los extractos de chile ancho, con una mayor proporción de agua, hay más presencia de polifenoles y es mayor la cantidad de éstos a una proporción de 50:50 en la mezcla. Los extractos de romero muestran un comportamiento similar; sin embargo, la mayor presencia de polifenoles fue al emplear una proporción de 75:25. Este efecto se debe predominantemente a la composición química del extracto, pues cada proporción de etanol:agua utilizada presenta una polaridad diferente y por tal motivo se generan contrastes en la extracción (Zaporrozhets et al., 2004). Muestra de ello es lo reportado por Lee et al. (1995) y Martínez et al. (2006), quienes reportaron que los principales compuestos presentes en muestras de chile ancho son: ácido ascórbico, carotenoides, capsaicinoides, quercetina, luteolina y flavonoides. 

Referencias

- Akoh C. C. y Min D.B. (2002). *Food lipids, chemistry, nutrition and biotechnology*. 2ª Ed. New York. Marcel Dekker.
- Almaraz-Abarca, N., da Graca Campos, M., Avila-Reyes, J. A., Naranjo-Jimenez, N., Herrera Corral, J., y Gonzalez-Valdez, L. S. (2007). Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee-collected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, Leguminosae). *Journal of Food Composition and Analysis: an Official Publication of the United Nations University*, International Network of Food Data Systems. 20(2):119.

- Almeida-Doria y M. A. B. Regitano-D'arce. (2000). *Antioxidant activity of rosemary and oregano ethanol extracts in soybean oil under thermal oxidation* (versión electrónica). Recuperado el 15 de febrero de 2007 en: Ciencia E Tecnología De Alimentos. <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci%5Farttextypid=S0101-2061200000200013>.
- Andersen, M.L.; Kragh, L.R. y Skibsted L. (2005). *Power of phenolic compounds*. *Functional Foods and Nutraceuticals*, March: 1-7.
- Burda, S. y Oleszek, W. (2001). Antioxidant and antimicrobial activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 2774-2779.
- Eskin, N.A.M. y Robinson, D. S. (2001). *Food shelf life stability: Chemical, Biochemical, and Microbiological Changes*. CRC series in contemporary food science. Boca Raton: CRC Press.
- Genovese, M.I.; Hassimotto, N.M.A. y Lajolo, F.M. (2005). *Isoflavone profile and antioxidant activity of Brazilian soybean varieties*. *Food Science Technological International*. 11(3): 205-211.
- Harborne J. B. (1994). *The flavonoids, advances in research since 1986*. 2a. Ed. Great Britain: Capman y Hall.
- Haworth, J.E. (2003). *Natural antioxidants Review*. Proceedings of the 56th American Meat Science Association Reciprocal Meat Conference. Columbia Missouri, June 15-18: 95-98.
- Kaur, C. y Kapoor, H. (2002). Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*. 37:153-161.
- Kuskoski, E.M.; Asuero, A.G.; Troncoso, A.M.; Manzini-Filho, J. y Fett, R. (2005). *Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos*. *Ciencia y Tecnología de Alimentos Campinas*. 25(4):726-732.
- Lee, Y.; Howard, L.R. y Villalón, B. (1995). Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper (*Capsicum annum*) cultivars. *Journal of Food Science*, 60(3):473-476.
- Madhujith, T. y Shahidi, F. (2005). Antioxidant potential of pea beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food Science*. 70(1):585-590.
- Martínez, L.; Cilla, I.; Beltrán, J.A. y Roncalás, P. (2006). Effect of *Capsicum annum* and *Piper nigrum*, pepper powders on the shelf life of fresh pork sausages packaged in modified atmosphere. *Journal of Food Science*. 71(1): 548-543.
- Ozkan, G.; Baydar, N.G. y Baydar, H. (2004). *Antioxidant and antimicrobial activities of Rosa damascena flower extracts*. *Food Science Technological International*. 10(4):277-281.
- Pérez, T.G. (2003). Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes, *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 22(1):48-57.
- Pietta, P.; Simonetti, P. y Mauri, P. (1998). Antioxidant activity of selected medicinal plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46:4487-4490.
- Rajeshwar, Y.; Gupta, M. y Mazumder, K. (2005). In vitro lipid peroxidation and antimicrobial activity of mucuna pruriens seeds. *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics*. 4(1):32-35.
- Re, R.; Pellegrine, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. (1999). *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decoloration assay*. *Free Radical Biological Medicine*. 26(9-10):9-10.
- Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J. y Papaganda, G. (1996). *Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids*, *Free Radical Biology Medical*. 20(7):933-956.
- Singleton, V.L. y Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal Viticulture Enology*. 16:144-158.
- Sun, T.; Xu, Z.; Wu, C.-T.; James, M.; Prinyawiwatku, W. y No, H.K. (2007). Antioxidant activities of different colored sweet peppers (*Capsicum annum* L.). *Journal of Food Science*. 72 (2): S98-S102.
- Vourela, S.; Meyer, A. y Heinonen, M. (2005). Impact of isolation method on the antioxidant activity of rapeseed meal phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(26):8202-8207.
- Yesil-Celiktas, O.; Girgin, G.; Orhan, H.; Wichers, H.J.; Bedir, E. y Vardar-Sukan, F. (2007). *Screening of free radical scavenging capacity and antioxidant activities of Rosmarinus officinalis extracts with focus on location and harvesting times*. *Euro Food Res. Technological*. 224: 443-451.
- Zaporozhets, O.A.; Krushynska, O. A.; Lipkovska, N.A. y Barvinchenko, V.N. (2004). A new test method for the evaluation of total antioxidant activity of herbal products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(1):21-25.