



Evaluación del contenido de antioxidantes en extractos convencionales y supercríticos de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.)

Gisela L. Fabiani¹; Elvecia E. Pérez¹; Lucrecia Corral²; Alfredo R. Salguero¹; Mariela González²; María L. Tereschuk² y Héctor J. Boggetti¹

(1) *Departamento de Ciencias Químicas, Facultad de Agronomía y Agroindustrias, Universidad Nacional de Santiago del Estero.*
gini@unse.edu.ar

(2) *Cátedra de Química Orgánica. Departamento de Ingeniería de Procesos y Gestión Industrial, Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología, Universidad Nacional de Tucumán.*
mtereschuk@herrera.unt.edu.ar

RESUMEN: Vegetales y frutas brindan protección contra múltiples enfermedades, merced a sus componentes antioxidantes. Estos incluyen compuestos fenólicos, particularmente antocianinas. El fruto del arándano (*Vaccinium corymbosum*), de importancia comercial en Argentina, es una de las fuentes más ricas de antioxidantes. La extracción con fluidos supercríticos ofrece importantes ventajas respecto del método convencional, con solventes polares. El objetivo de este trabajo es comparar la eficiencia de la extracción supercrítica (ESC) con la convencional (EC) de antocianinas y polifenoles presentes en el fruto del arándano y establecer la relación entre la actividad antirradicalaria del extracto y el método usado. Se trabajó con fruta proveniente de Tucumán. Los compuestos antioxidantes de la muestra fueron extraídos por EC y ESC. Se cuantificaron polifenoles totales (PFT) y antocianinas y se evaluó la actividad antirradicalaria (AA) por ensayo del DPPH. La eficiencia de la ESC resultó mayor que la de la EC. El ESC presentó mayor PFT y menor cantidad de antocianinas que el EC. Se interpreta que el solvente utilizado en la EC es más selectivo para antocianinas, mientras que el de ESC extrae distintas clases de compuestos fenólicos. Los dos extractos presentan similar AA, resultado contradictorio teniendo en cuenta el contenido de PFT.

1 INTRODUCCION

Existen numerosos estudios que demuestran que vegetales y frutas son beneficiosos para la salud y brindan protección contra numerosas enfermedades crónicas, las que incluyen cáncer, enfermedades cardio y cerebro vasculares, oculares, y enfermedades neurodegenerativas. Este efecto protector de frutas y vegetales en general, se ha atribuido a sus componentes antioxidantes, entre los que se incluyen los carotenoides, las vitaminas C y E, y los compuestos fenólicos, particularmente flavonoides y antocianinas (pigmentos naturales presentes en los vegetales). Los antioxidantes intervienen en la protección de los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos contra el proceso oxidativo iniciado por radicales libres (Howart y col., 2003).

Debido a que los radicales libres desempeñan un importante papel en el desarrollo de enfermedades, las dietas ricas en frutas y vegetales con altos contenidos de antioxidantes pueden ser de importancia fundamental en retrasar los daños originados por los radicales libres y ayudar en la prevención de estas enfermedades (Prior y col., 1998).

El arándano, baya comestible con pulpa dulce y jugosa, es una de las fuentes más ricas de fitonutrientes antioxidantes (Prior y col., 2013). Perteneció a la familia Ericaceae, género *Vaccinium*, constituido por cinco especies dentro de las cuales el *Vaccinium corymbosum* L. es una de las de mayor importancia comercial (Gil, 2000).

El arándano se cultiva en todos los continentes siendo su centro de producción los Estados

Unidos y Canadá. En nuestro país, este fruto se conoce desde 1994 y su cultivo se extiende por todo el territorio: desde El Bolsón en Río Negro, pasando por Azul, Tandil o Mercedes, en Buenos Aires; Gualleguaychú, Concordia y Chajarí en Entre Ríos; y Curuzú Cuatía, en Corrientes; hasta llegar a Famaillá en Tucumán (INDEC).

El fruto del arándano contiene principalmente antocianinas, responsables de su característico color azul, y también menores cantidades de quercetina; ácidos p-hidroxibenzoico, protocateico y clorogénico; y taninos condensados (Mazza y Miniati, 1993). El fruto constituye una excelente fuente de vitamina C; de fibra dietética; de minerales como manganeso, potasio, hierro y calcio; y presenta además un bajo nivel de calorías lo que lo convierte en un producto con variados e importantes beneficios para la nutrición y salud, transformándose en un componente importante de una dieta sana (Pritts y Hancock, 1992; Gough, 1994).

La extracción convencional de los antioxidantes de diferentes fuentes vegetales se realiza con solventes polares como agua, metanol o etanol. Esta operación, en general, requiere tiempo y grandes cantidades de solvente. La extracción con fluidos supercríticos surge como una alternativa para sustituir los métodos convencionales, ya que ofrece algunas ventajas: origina un producto libre de solventes, es adecuado para extraer o fraccionar productos termolábiles, reduce el contacto con el oxígeno ambiental disminuyendo así la oxidación del producto, y ofrece la posibilidad de analizar directamente mezclas complejas reduciendo así los riesgos de contaminación de muestras (Sargenti, 1994). Estos beneficios son particularmente importantes cuando el dióxido de carbono es empleado como fluido supercrítico, ya que el mismo ofrece importantes ventajas prácticas: temperatura crítica baja (31°C), no tóxico, no inflamable, relativamente barato y posibilidades de ser purificado y reciclado en un proceso de extracción continua.

El objetivo de este trabajo es comparar la eficiencia de la extracción supercrítica con la convencional de antocianinas y polifenoles presentes en el fruto del arándano y establecer la relación entre la actividad antirradicalaria del extracto y el método usado.

2 MATERIALES Y METODOS

2.1 Material vegetal

Frutos maduros de arándanos (*Vaccinium corymbosum* L.) provistos la Estación

Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC), Famaillá, Tucumán. Cosecha 2012.

Los frutos enteros fueron congelados a -18 °C y liofilizados durante tres días hasta obtención de peso constante.

2.2 Métodos de extracción

2.2.1 Extracción convencional

Se colocó una porción de la muestra liofilizada (1,5 g) en un matraz protegido de la luz y se maceró con 30 ml de etanol ácido (con HCl al 0,3 % v/v) durante 24 hs a 5 °C. Se filtró y se realizó una segunda y tercera extracción del residuo sólido. Finalmente se reunieron los filtrados obtenidos y se evaporó a sequedad a temperatura inferior a 45 °C, usando evaporador rotatorio y secado con nitrógeno gaseoso hasta peso constante. Se determinó el rendimiento de la extracción, expresándose como gramos de extracto seco por cada 100 g de arándano. A este extracto se le denominó convencional (EC).

2.2.2 Extracción supercrítica

Se tomaron tres porciones (1 g) de la muestra liofilizada y se colocaron, una por vez, en la columna de extracción. Las condiciones utilizadas fueron: CO₂ a temperatura y presión críticas de 60 °C y 90 atmósferas usando como modificador orgánico 10% de etanol. El tiempo de extracción fue de 30 minutos y el material extraído se recibió en 50 ml de etanol ácido (HCl al 0,3 % v/v). Se reunieron los extractos de las 3 corridas y se secó al vacío y luego con nitrógeno hasta peso constante. El rendimiento de la extracción se expresó como gramos de extracto seco por cada 100 g de arándano. A este extracto se le denominó supercrítico (ESC).

2.3. Ensayos químicos:

2.3.1 Contenido de fenoles totales

Se determinó usando el método de Folin-Ciocalteu. Para ello, se preparó una solución etanólica madre de EC o ESC de concentración 0,3 µg/ml (10 ml) y se procedió según Lima y col. (2009). Se tomaron 0,5 ml de la solución etanólica madre y se oxidaron usando el mismo volumen del reactivo de Folin-Ciocalteu y luego fue neutralizado con carbonato sódico. Después de 30 minutos la absorbancia de la solución azul resultante fue medida 765 nm usando un espectrofotómetro UV Visible Hitachi 1900 con celda de 1 cm de paso óptico. Los resultados fueron calculados utilizando la curva de calibración de ácido gálico y se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por cada 100

gramos de muestra. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

2.3.2 Contenido de antocianinas

Se tomaron 3 mg de extracto (EC o ESC) y se disolvió en 10 ml de una solución de metanol-0,1 M de HCl (85:15). Esta solución se diluyó en el mismo solvente hasta alcanzar una absorbancia entre 0,2-1 medida en espectrofotómetro UV Visible Metrolab a 545 nm usando celda de vidrio de 1 cm de paso óptico. La cantidad de antocianinas se calcula como gramos equivalentes de Malvidin 3,5-diglucósido con absorptividad molar de 37700 L/cm.mol y peso molecular de 691 g/mol (González y col 2011). Esta determinación se realizó por triplicado. El resultado se expresa como g equivalentes de Mv-3,5 diglucósido por cada 100 g de fruta en base seca.

2.4 Actividad antirradicalaria

La actividad antirradicalaria se determinó por la caída de la absorbancia de una solución metanólica de radical difenil 1-picril hidrazilo (DPPH) en presencia de extracto de arándano (EC o ESC) a 517 nm, usando la solución del radical DPPH como blanco (Tapia y col, 2004). Soluciones de quercetina de la misma concentración que los extractos de arándanos fueron utilizadas como antioxidante de referencia. El porcentaje de pérdida del color del radical por acción del extracto fue calculado según ecuación (1):

$$\% \text{ Decoloración }_E = [1 - (A_{\text{muestra}} / A_{\text{blanco}})] \times 100 \quad (1)$$

La pérdida del color, proporcional al grado de captura del radical DPPH, es una medida de la eficiencia antirradicalaria de los extractos. Los valores son expresados como un promedio de tres determinaciones independientes.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Métodos de extracción

La extracción se realizó por extracción supercrítica y por el método convencional, obteniéndose dos extractos: ESC y EC. La eficiencia de la extracción de los métodos utilizados se evaluó como cantidad de extracto seco obtenido por cada 100 gramos de muestra en base seca. Los resultados obtenidos se grafican en la figura 1. En ella puede verse que la extracción supercrítica resultó más eficiente que la convencional.

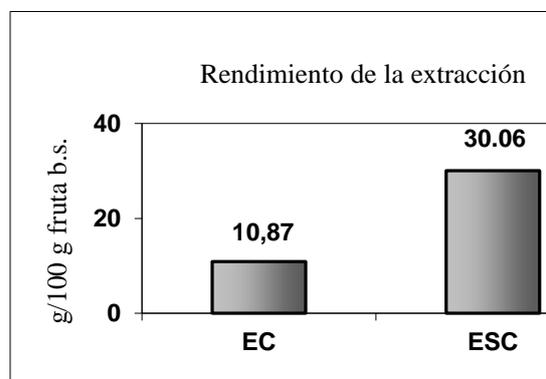


Figura 1. Rendimiento de la extracción de frutos de arándanos liofilizados: método supercrítico y convencional.

Como se puede ver en la figura 1, se extrae mayor cantidad de compuestos en la extracción supercrítica que en la convencional.

3.2 Ensayos químicos y actividad antirradicalaria

En la tabla 1 pueden verse los contenidos de antocianinas y de polifenoles totales extraídos utilizando las dos técnicas de extracción. Estos compuestos fueron determinados por su posible acción como contribuyentes relativos a la actividad antioxidante de los extractos. Los pigmentos antociánicos fueron determinados en particular debido a que esta clase de compuestos fueron reportados como los principales polifenoles presentes en el fruto de arándanos.

Al comparar el contenido de polifenoles totales extraído por las dos técnicas utilizadas se observa, que éste es bastante mayor con el método supercrítico (167,5 mg %) que con el convencional (104,6 mg %). Esto está de acuerdo con los resultados de Pérez y col. (2003).

El contenido de polifenoles totales de otros frutos obtenidos utilizando la misma técnica se muestra en la tabla 2. Comparando los resultados obtenidos para el EC y el ESC con los resultados de esta tabla, se observa que presentan valores intermedios de contenidos fenólicos, siendo menores que los de mango, manzana y ananá pero mucho mayores que los de durazno, banana, pera, sandía, y cercanos a los de lima y uva. Con respecto al arándano reportado por Guindán

Tabla 1. Contenido de antocianinas y polifenoles totales y actividad antirradicalaria de ESC y EC. Referencia: EM: equivalentes de malvidin 3,5-diglucósido; EAG: equivalentes de ácido gálico; b.s.: base seca; b.h.: base húmeda. Compuesto patrón: quercetina. *concentración de quercetina: 10 µg/ml

Método de extracción	Antocianinas totales (AT) (mg EM/100 g fruto b.h.)	Polifenoles totales (PFT) (mg EAG/100 g fruto b.s.)	Relación PFT/AT	Porcentaje de decoloración del DPPH*
Supercrítico (ESC)	86,1 ± 2,5	167,5 ± 11,1	1,95	64,52 ± 8,99
Convencional (EC)	146,4 ± 3,1	104,6 ± 15,9	0,71	62,86 ± 6,03

Tabla 2. Compuestos fenólicos totales de frutas. PFT: polifenoles totales; ¹ Vijaya Kumar Reddy y col,2010; ² Guindán y col,2012; ³Lim y col, 2007.

Nombre común	Nombre científico	PFT (mgEAC/100 g fruta)
Mango ¹	<i>Magnifira indica</i>	307 ± 17
Manzana ¹	<i>Malus pumila</i>	232 ± 16
Ananá ¹	<i>Ananas cosnosus</i>	219 ± 16
Arándano ²	<i>Vaccinium corymbosum</i>	154 ± 2
Lima ¹	<i>Citrus aurantifolial</i>	133 ± 6
Uva ¹	<i>Vitis vinífera</i>	126 ± 6
Durazno ²	<i>Prunus persica</i>	68 ± 3
Banana ³	<i>Musa paradisiacal</i>	51 ± 7
Pera ³	<i>Pyrus communis</i>	35 ± 4
Sandía ¹	<i>Citrullus lanatus</i>	25 ± 2

Si comparamos el contenido de antocianinas totales obtenido por los dos métodos, se observa que en contraposición con la determinación de polifenoles, la cantidad de antocianinas obtenidas por el método supercrítico (86,1 mg %) es bastante menor que la obtenida por el método convencional (146,4 mg %). El contenido antocianínico en arándanos frescos varía de 25 a 495 mg/100g (Mazza y Miniati, 1993). Según Coria Muñoz y col (2009), el contenido de antocianinas en arándanos de la provincia de Tucumán es de 159,4mg/100 g de fruta fresca. Por lo tanto, el contenido antocianínico obtenido por el método convencional es similar al reportado por Muñoz, mientras que en el extracto supercrítico es bajo comparado con el mismo. Los contenidos de antocianinas obtenidos en este trabajo son concordantes con los informados por

Lohachoompol y col. (2004) para arándanos australianos.

Los contenidos de antocianinas y de polifenoles determinados para un mismo método de extracción no son comparables entre si, ya que la cantidad de antocianinas resulta superior a la de polifenoles cuando se expresan ambos en base seca. Con el fin de confrontar los resultados de ambos métodos de extracción, se calcula el cociente PFT /AT para cada tipo de extracto. Este expresa el contenido de PFT por unidad de AT. Se observa que este cociente es mucho mayor para el ESC que para el EC (Tabla1), lo que significa que por unidad de AT el contenido de polifenoles totales en el extracto supercrítico es tres veces mayor que en el convencional. Este resultado es coherente con el rendimiento de la extracción supercrítica que supera por tres veces al rendimiento de la extracción convencional. Esto podría interpretarse como que el solvente utilizado en la extracción convencional es más selectivo para antocianinas, mientras que el utilizado como fluido supercrítico extrae distintas clases de compuestos fenólicos.

Los ensayos de la capacidad antioxidante se clasifican en dos tipos en base a su reacción con los radicales libres: los ensayos basados en reacciones de transferencia de átomos de hidrógeno (TAH) y los ensayos basados en reacciones de transferencia electrónica (TE). La mayoría de los ensayos TAH aplican un esquema de reacción competitivo en el cual el sustrato y el antioxidante compiten por radicales peroxilo generados térmicamente. Los ensayos ET miden la capacidad de un antioxidante de prevenir la reducción de un oxidante, el cual cambia de color cuando se reduce. El grado de cambio de color se correlaciona con la concentración de antioxidante de la muestra. En este último grupo se encuentra el ensayo del DPPH (Prior, 2013).

La actividad antirradicalaria de los extractos de arándanos, medida como porcentaje de decoloración de DPPH y corregidos usando quercetina como referencia, se vio en la Tabla 1. Los dos extractos de arándanos presentan similar capacidad atrapadora de radicales. Relacionando estos resultados con el contenido de PFT, se esperaría que la extracción supercrítica en el que esta cantidad es mayor, produjera un extracto con mayor actividad antioxidante. Por otro lado, los resultados encontrados por Cerón y col (2010) para extractos de frutas cultivadas en la región andina, indican que la actividad antioxidante del extracto supercrítico es mayor que la del convencional. Por lo expuesto, se estima necesario profundizar en el estudio de este aspecto cualitativo respecto del tipo de antocianos encontrados en ambos extractos. En este sentido, se encuentra en proceso la cuantificación e identificación de cada compuesto presente en los extractos EC y ESC en colaboración con la Facultad de Química, Universidad de la República (Montevideo, Uruguay), a fin de dilucidar el tipo de estructuras químicas con capacidad antioxidante presentes en cada extracto.

4 CONCLUSIONES

En este trabajo se ha visto la posibilidad del empleo de EFS como técnica eficiente para la obtención de extractos con buena actividad antioxidante a partir de los frutos de arándanos.

El cociente PFT/AT es mayor en EFS que en EC, lo que implica la mayor selectividad de uno para la extracción de antocianos y la mayor eficiencia en la extracción de polifenoles del otro.

La actividad antirradicalaria de los extractos resultó ser ligeramente mayor en EFS que en EC, lo cual se corresponde con su mayor contenido en PFT e implica que de su actividad antioxidante no es sólo responsable el contenido de antocianos.

Se requiere la cuantificación e identificación que determinará cuáles de los principales compuestos antocianícos antioxidantes se encuentran en los extractos.

5 REFERENCIAS

Cerón, I., V. Higueta. & A.C.Cardona, Capacidad antioxidante y contenido fenólico total de tres frutas cultivadas en la región andina, *Vector* 5, 7-16, 2010.

Coria Muñoz, L; Maihua, R.E.; Peralta, F.L.; Tereschuk, M.L. & Albarracín, P.M. Análisis preliminar de antocianinas en arándanos (*Vaccinium*

corymbosum L.) de la región NOA. Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas - CLICAP 2009. 18, 19 y 20 de marzo de 2009. San Rafael – Mendoza. N° 4.

Gil, G. Fruticultura. El potencial productivo. Crecimiento vegetativo y diseño de huertos y viñedos. Colección en agricultura. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Ediciones Universidad Católica de Chile, 2000.

González García, K., Valdés Iglesias, O., Laguna, A., Díaz Martínez, M. & González Lavaut, J. Efecto antioxidante y contenido polifenólico de *Syringodium filiforme* (Cymodoceaceae), *Revista de Biología Tropical*, 59 (1), 465-472, 2011.

Gough, R. The Highbush blueberry and its Management. First edition. Haworth Press, Inc. Nueva York, Estados Unidos, 271,1994

Guindán, C.; Maldonado, P.; Tereschuk, M. L.; González, M.; Cerutti, G. & Albarracín, P. Arándanos y duraznos: análisis nutricional y actividad antioxidante. IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. ISBN-13: 978-987-28845-0-5 Córdoba. Noviembre 2012. pag 708

Howard, L., Clark, J. & Brownmiller, C. Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 1238-1247, 2003.

INDEC, <http://www.monografias.com/trabajos16/produccion-arandanos/produccion-arandanos.shtml>, 2002.

Lim Y.Y., Lim T.T. & Tee J.J. Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. *Food Chemistry* 103 (3), 1003–1008, 2007

Lima, B., Tapia, A., Luna, L., Fabani, M., Schmeda-Hirschmann, G., Podio, N., Wunderlin, D. & Feresin, G. Main flavonoids, DPPH activity, and metal content allow determination of the geographical origin of propolis from the province of San Juan (Argentina), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (7), 2691-2698, 2009.

Lohachoompol, V., Szrednicki, G. & Craske, J. The change of total anthocyanins in blueberries and their antioxidant effect after drying and freezing, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2004 (5), 248-252, 2004

Mazza, G. & Miniati, E. Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains, CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, 1993.

Prior, R. & Wu, X. Diet antioxidant capacity: relationships to oxidative stress and health, *American Journal of Biomedical Sciences*, 5 (2), 126-139, 2013.

Prior, R. ; Cao, G.; Martin, A.; Sofic, E.; Mcewen, J.; O'Brien, C.; Lischner, N.; Ehlenfeldt, M.; Kalt, W.; Krewer, J. & Mainland, M. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content,

maturity, and variety of *Vaccinium Species*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2686-2693, 1998.

Pritts, M. & Hancock, J. Highbush blueberry production guide. Cooperative Extension Publication NRAES-55. Ithaca. New York., 199, 1992.

Sargenti, S. Extracción con fluido supercrítico: Proyecto y construcción de un Nuevo sistema y su aplicación a productos naturales. San Carlos. Tesis Doctoral, USP, 1994.

Tapia, A.; Rodriguez, J.; Theoduloz, C.; López, S.; Feresin, G. & Schmeda-Hirschmann, G. Free radical scavengers and antioxidants from *Baccharis grisebachii*. *Journal of Ethnopharmacology*, 95, 155-161, 2004.

Vijaya Kumar Reddy C., Sreeramulu D. & Raghunath M. Antioxidant activity of fresh and dry fruits commonly consumed in India, [*Food Research International*](#), 43 (1), 285–288, 2010.