

Métodos para la determinación de la actividad antioxidante de vegetales

Methods for determination of plants antioxidant activity

ALICIA M RINCÓN^{1*}, MARÍA N PÉREZ DE R², LIZET BOU RACHED¹,
ALBIN ROMERO², LUISA C BUCARITO², FANNY PADILLA¹

Resumen

En muestras de semillas de *Theobroma cacao* (Cacao), *Capsicum bacatum* (Ajíes dulces, verdes y rojos) y semillas de *Artocarpus altilis* (fruto de pan), se determinó la capacidad antioxidante aplicando diversas metodologías y se analizó la información que proporciona cada método. Luego de proceder a la extracción y cuantificación de los polifenoles, se evaluó la actividad antioxidante utilizando las técnicas de sistema modelo β -caroteno/linoleato, el método del barrido de radicales libres (DPPH)•, el método del tiocianato (peroxidación ácido linoleico) y el poder reductor. En todos los ensayos de determinación de actividad antioxidante, los resultados obtenidos fueron comparables.

Palabras Clave: *Theobroma cacao*, *Capsicum bacatum*, *Artocarpus altilis*, capacidad antioxidante, polifenoles.

Abstract

In samples of *Theobroma cacao* seeds (Cocoa), *Capsicum bacatum* sweet (Sweet pepper, red and green) and of *Artocarpus altilis* seeds (bread fruit), the antioxidant capacity was determined by applying various methods and analyzed the information provided by each one. After proceeding to the extraction and quantification of polyphenols, the antioxidant activity was assessed by the β -caroteno/linoleato model system technique, the scanning free radicals method (DPPH)•, the thiocyanate method (linoleic acid peroxidation) and reducing power. In all the determinations for antioxidant activity, results were comparable.

Key words: *Theobroma cacao*, *Capsicum bacatum*, *Artocarpus altilis*, antioxidant capacity, polyphenol

Introducción

Desde hace décadas, se ha evidenciado la relación directa que existe entre la sobreproducción de radicales libres en el organismo y diversos desórdenes fisiológicos (tales como daño a la membrana celular, oxidación de lipoproteínas, inactivación de enzimas); ciertos estados patológicos y con el envejecimiento (Rieger, 1989; Stockdale, 1987).

A fin de impedir la acumulación de radicales libres, el organismo cuenta con diferentes mecanismos de defensa antioxidantes producidos de manera endógena, pero a medida que se avanza en edad y/o por condiciones de fuertes agresiones prooxidativas, co-

mo la exposición intensa y reiterada a la exposición solar, estos medios resultan insuficientes para proteger al organismo (Rieger, 1993). Con base a esto se ha postulado que los organismos envejecen porque las células acumulan el daño de los radicales libres en el tiempo, por lo que los antioxidantes son comúnmente usados en el cuidado de la piel para prevenir este envejecimiento (Lupo, 2001; Rabe y col., 2006; Von Oppen-Bezalet, 2009; Knaggs, 2009).

Diversos compuestos presentes en productos vegetales tienen la propiedad de actuar como antirradiicales o antioxidantes (Pietta, 1998; Udo y col., 2001). En estos productos se ha evidenciado la presencia de

¹ Unidad de Investigación Análisis de Alimentos. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela.

² Cátedra Tecnología Cosmética. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela.

* Correspondencia a: rinconam@gmail.com

los compuestos fenólicos que tienen propiedades antioxidantes, esta característica ha favorecido su inclusión en formulaciones cosméticas especialmente aquellas con propiedades antienvjecimiento.

En la actualidad no existen Métodos Oficiales para la determinación de la capacidad antioxidante de las materias primas que se emplean en cosmética, por lo cual, se han venido utilizando con este fin diversas metodologías.

De allí la importancia de la aplicación de estos métodos para la determinación de la Actividad Antioxidante en algunos productos vegetales.

Materiales y métodos

OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las semillas secas y fermentadas de cacao (*Theobroma cacao*) y las semillas de fruto de pan (*A. altitilis*) fueron obtenidas en el sector de Ocumare de la Costa, Estado Aragua, Venezuela. Los Ajíes dulces (*Capsicum baccatum*), variedades verde y roja, fueron adquiridos en el Mercado de Quinta Crespo, Caracas, Venezuela. Todas las muestras se lavaron, se secaron y se molieron (en el caso de Artocarpus, previo a este proceso le fue eliminada la capa externa). Posteriormente se liofilizaron, moliéndose nuevamente y pasándose por un tamiz N° 40. Todas las muestras se guardaron en envases plásticos con tapas de cierre hermético, a temperatura ambiente y al abrigo de la luz.

CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES

Los compuestos fenólicos en los extractos metanólicos fueron estimados por ensayo colorimétrico, basado en los procedimientos descritos por Montreau (1972), el cual se basa en la extracción de los polifenoles totales de la muestra con solución metanol: agua (50:50) y solución de acetona:agua (70:30). En una alícuota del extracto se desarrolla coloración con el reactivo de Folin Ciocalteau, leyendo la absorbancia a 750 nm. La concentración de polifenoles en la muestra se determinó usando una curva patrón de ácido gálico en un rango de 20-500 g/ml. Los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico (EAG) g/100g de muestra seca.

DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Esta propiedad fue evaluada por diferentes métodos espectrofotométricos:

I. DETERMINACIÓN DEL PODER REDUCTOR (YEN Y DUH, 1993):

El poder reductor de los compuestos fenólicos se

determina mediante la capacidad de reducir el Fe^{+3} (férrico) a Fe^{+2} (ferroso) con formación del azul de Prusia, a 700 nm. Los resultados se cuantifican contra una curva estándar de ácido ascórbico. Los resultados son expresados como equivalentes de ácido ascórbico (EAAs) g/100 g de muestra.

II. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE EL MÉTODO DE LA PEROXIDACIÓN DEL ÁCIDO LINOLEICO (MÉTODO DEL TIOCIANATO)

La actividad antioxidante se determinó de acuerdo al método descrito por Yen y Hsieh (1998), el cual se basa en la peroxidación del ácido linoleico, usando tiocianato de amonio y cloruro ferroso. La absorbancia se determina a 271 nm. La actividad antioxidante se determina por el grado de peroxidación del ácido linoleico, a las 72 horas, aplicando la fórmula:

$$AA = 72 - \left(\frac{\text{aumento de la Abs. de la mx}}{\text{aumento de la Abs. del control}} \right) \times 100$$

II. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE USANDO EL SISTEMA MODELO β -CAROTENO/ LINOLEATO

Las muestras metanólicas fueron evaluadas siguiendo el método descrito por Hidalgo-Fernández y col. (1994), el cual se basa en la capacidad que tienen los antioxidantes de impedir la pérdida del color del β -caroteno. La relación dosis/respuesta de la actividad antioxidante para los extractos se determina a diferentes concentraciones. La actividad antioxidante (AA) de los extractos es evaluada en términos de decoloración del β -caroteno usando BHA en metanol (100 ppm) para propósitos comparativos. Los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como el valor promedio \pm desviación estándar.

III. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS POLIFENOLES EXTRAÍDOS, UTILIZANDO EL MÉTODO DEL BARRIDO DE RADICALES LIBRES (DPPH•)

Se determinó la capacidad antioxidante mediante secuestro de los radicales libres de acuerdo al método descrito por Sánchez-Moreno y col. (1998). El mismo se basa en la generación de radicales libres a partir de una solución metanólica de 1,1-difenil-2-picril-hidracil. En forma de radical, el DPPH• absorbe a 515 nm, absorbancia que va disminuyendo por la reducción por un agente oxidante, o por especies radicales. La determinación se efectúa a intervalos de tiempos diferentes hasta que la reacción alcanza un equilibrio (time at the steady state). El porcentaje de DPPH• remanente fue calculado como sigue:

$$\%DPPH\cdot\text{rem} = \left(\frac{\text{Abs a 515 nm} \text{ muestra}}{\text{Abs a 515 nm} \text{ control}} \right) \times 100$$

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y se expresaron los valores como los promedio \pm la desviación estándar (DE). La significancia estadística se determinó mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA) y un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Resultados y discusión

CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES POR ENSAYO COLORIMÉTRICO

Como puede observarse en la Tabla I, el contenido porcentual de polifenoles totales presentes en las muestra, expresados como g equivalentes de ácido gálico/ 100 g de muestra seca, siguió el orden siguiente: cacao > ají verde > ají rojo > semilla de Artocarpus.

DETERMINACIÓN DEL PODER REDUCTOR (MÉTODO DE YEN Y DUH MODIFICADO)

En la Tabla II se presentan los valores del poder reductor, expresado como mg equivalentes de ácido ascórbico por 100 gramos de muestra. En este ensayo, el color amarillo de la solución de ensayo cambia a diferentes matices entre el azul y el verde, dependiendo del poder reductor de cada compuesto. La presencia de reductores como los antioxidantes, causa la conversión del Fe^{+3} del complejo ferricianuro usado en este método, a la forma ferrosa. Así, por la medición del azul de Prusia a 700 nm, se puede monitorear la concentración de Fe^{+2} . Altos valores de absorbancia a 700 nm indican un poder reductor alto (Barros y col., 2006).

Los resultados muestran que existen diferencias estadísticamente significativas en el poder reductor de los extractos de las muestras evaluadas ($p < 0,05$); siendo el orden del poder reductor semillas de cacao > ají verde > ají rojo > semillas de Artocarpus. Este orden se correlaciona con el contenido de polifenoles totales en las muestras analizadas, siendo mayor el poder reductor a mayor contenido de polifenoles.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DETERMINADA POR EL MÉTODO DEL BLANQUEAMIENTO DEL β -CAROTENO

En la Tabla III se muestra la Actividad Antioxidante (%) determinada por el método del blanqueamiento del β -caroteno en muestras de semillas de cacao, ajíes, variedades verde y roja, y semillas de Artocarpus.

El ensayo se basa en el blanqueamiento de la solución de β -caroteno y de la habilidad de los antioxidantes para inhibir la decoloración de la solución propiciada por la oxidación del ácido linoleico. El radical libre del ácido linoleico ataca al β -caroteno alta-

Tabla I

Contenido de polifenoles totales, expresados como g equivalentes a ácido gálico/100 g de muestra seca (muestras de semillas de cacao, ajíes, variedades verde y roja, y semillas de Artocarpus)

Muestra	Polifenoles totales (g/100 g)	DE
Cacao <i>Theobroma cacao</i>	6,66 ^d	0,06
Ají verde <i>Capsicum bacatum</i>	0,79 ^c	0,08
Ají rojo <i>Capsicum bacatum</i>	0,74 ^b	0,09
Semillas Fruto de pan <i>Artocarpus altilis</i>	0,26 ^a	0,01

Los resultados son el promedio de tres mediciones por separado \pm DE. Las letras diferentes en una misma columna indica diferencias estadísticamente significativas $p < 0,05$.

Tabla II

Actividad Antioxidante (%) determinada por el método del poder reductor (g equivalentes de ácido ascórbico/100 g muestra), en muestras de semillas de cacao, ajíes, variedades verde y roja, y semillas de Artocarpus

Muestra	Poder reductor (g/100 g) ¹	DE
Cacao <i>Theobroma cacao</i>	5,8 ^d	0,08
Ají verde <i>Capsicum bacatum</i>	3,4 ^c	0,02
Ají rojo <i>Capsicum bacatum</i>	2,9 ^b	0,02
Semillas Fruto de pan <i>Artocarpus altilis</i>	0,5 ^a	0,01

¹ Base seca. Los resultados son el promedio de tres mediciones por separado \pm DE. Las letras diferentes en una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas $p < 0,05$.

mente insaturado. La presencia de los antioxidantes puede obstaculizar la extensión del blanqueamiento del β -caroteno neutralizando el radical libre linoleato y otros radicales libres formados en el sistema (Jayaprakasha y col., 2001). De acuerdo a esto, la absorbancia decrece rápidamente en muestras sin antioxidantes, mientras que en presencia de antioxidantes la solución retiene el color y así la absorbancia por un largo periodo de tiempo.

Los resultados muestran que el porcentaje de actividad antioxidante en las muestras en estudio esta

en el siguiente orden: cacao > ají verde > ají rojo > semillas de artocarpus, lo cual se correlaciona con la cantidad de polifenoles presentes en la muestras analizadas.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DE LA PEROXIDACIÓN DEL ÁCIDO LINOLEICO (MÉTODO DEL TIOCIANATO)

En la Tabla IV se muestran los resultados del porcentaje de actividad antioxidante determinada por el método de la peroxidación del ácido linoleico. La muestra de cacao presentó el porcentaje más elevado de actividad antioxidante, lo cual se correlaciona con los resultados de los otros métodos aplicados, así como con el contenido de polifenoles totales. Las muestras de ají verde y rojo presentaron valores similares de actividad antioxidante. El orden de la capacidad antioxidante en las muestras fue similar a los otros métodos utilizados en este trabajo: cacao > ají verde > ají rojo > semillas de Artocarpus.

DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS POLIFENOLES EXTRAÍDOS, UTILIZANDO EL MÉTODO DEL BARRIDO DE RADICALES LIBRES (DPPH•)

El radical libre DPPH• posee una absorción característica a 515 nm (color púrpura), la cual decrece significativamente cuando está expuesto a la acción de «barrido» por parte de un extracto rico en compuestos fenólicos antioxidantes- por suministro de átomos de hidrógeno o por donación de electrones. Una disminución en la absorbancia, a 515 nm, indica un alto barrido del radical por parte del extracto. El barrido de los radicales libres es uno de los mecanismos conocidos mediante el cual los antioxidantes inhiben la oxidación de los lípidos. El ensayo permite evaluar en forma rápida la actividad antioxidante *in vitro* de compuestos específicos o extractos.

En la figura 1 se muestran los valores de actividad de barrido del radical DPPH• por el extracto metanólico de la harina de semillas de *A. attilis*. A mayor concentración del extracto de harina de artocarpus, mayor es la actividad de barrido, reflejado por el aumento de la absorbancia. Como puede observarse, los extractos de la semilla de cacao presentan los valores más bajos de CE₅₀, por lo que se requiere menos concentración de ese extracto para secuestrar los radicales libres, teniendo entonces más eficiencia como antirradical.

Aún cuando es frecuente el relacionar la capacidad antioxidante de los productos naturales con el contenido de polifenoles totales presentes (Kukoski y col., 2005; Imeh y Khokhar, 2002; Pinelo y col., 2004), en algunos trabajos se ha reportado una corre-

Tabla III

Actividad Antioxidante (%) determinada por el método del blanqueamiento del β-caroteno en muestras de semillas de cacao, ajíes, variedades verde y roja, y semillas de Artocarpus

Muestra	Actividad antioxidante (%)	DE
Cacao <i>Theobroma cacao</i>	89,64	2,94
Ají verde <i>Capsicum baccatum</i>	67,5	0,57
Ají rojo <i>Capsicum baccatum</i>	67,0	2,21
Semillas Fruto de pan <i>Artocarpus attilis</i>	54,29	2,93

Los resultados son el promedio de tres mediciones por separado ± DE. Las letras diferentes en una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas p<0,05.

Tabla IV

Actividad Antioxidante (%) determinada por el Método de peroxidación del ácido linoléico en muestras de semillas de cacao, ajíes, variedades verde y roja, y semillas de Artocarpus

Muestra	(%) Actividad antioxidante	DE
Cacao <i>Theobroma cacao</i>	71,02 ^c	0,022
Ají verde <i>Capsicum baccatum</i>	32,54 ^b	0,027
Ají rojo <i>Capsicum baccatum</i>	32,77 ^b	0,050
Semillas Fruto de Pan <i>Artocarpus attilis</i>	17,67 ^a	0,041

Los resultados son el promedio de tres mediciones por separado ± ES. Las letras diferentes en una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas p<0,05.

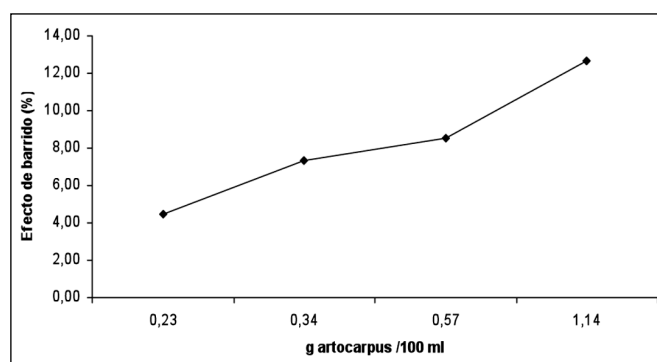


Figura 1. Actividad de barrido (%) de radicales DPPH• por el extracto metanólico de semillas de Artocarpus.

Tabla V

CE₅₀, TEC₅₀ y eficiencia antirradical (EA) de los extractos de semillas de cacao, ajíes, variedades verde y roja, y semillas de Artocarpus

Muestra	CE ₅₀ (g/g DPPH)	TEC ₅₀	EA
Cacao <i>Theobroma cacao</i>	4,72 ± 0.001 ^a	45,57 ± 0.96	0,0047
Ají verde <i>Capsicum baccatum</i>	25,13 ± 0.012 ^c	24,16 ± 3.25	0,0016
Ají rojo <i>Capsicum baccatum</i>	20,80 ± 0.006 ^a	64,43 ± 0.59	0,0007
Semillas de fruto de pan <i>Artocarpus altilis</i>	54,27 ± 0.004 ^d	31,90 ± 1.93	0,0006

Las letras indican diferencias estadísticamente significativas $p < 0,05$. CE₅₀: concentración del extracto metanólico requerido para "barrer" o "secuestrar" el 50% del radical DPPH•; TEC₅₀: tiempo requerido para que el extracto metanólico "barra" "atrape" o "secuestre" el 50% del radical DPPH•; EA: eficiencia antirradical.

lación baja entre estos parámetros (Heinonen y col., 1998) y hasta se ha indicado no existir relación alguna entre el contenido total de polifenoles, concentración de ácido ascórbico y la capacidad antioxidante (Hassimoto y col., 2005).

Aun cuando se emplearon métodos diferentes, los resultados obtenidos fueron comparables para la determinación de la actividad antioxidante en muestras de uso en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética. En efecto, las muestras evaluadas presentaron una alta actividad antioxidante que se correlacionó significativamente con el contenido de polifenoles totales (Correlación = 0,97; $p < 0,05$). Como se observa, la muestra de cacao presentó las mejores propiedades antioxidantes, lo cual está de acuerdo con lo descrito para la especie *Theobroma cacao* de la familia *Sterculiaceae*, la cual es reconocida ampliamente por sus propiedades antioxidantes y utilizada en formulaciones cosméticas por esta acción anti-radical y pudiendo resultar como una excelente materia prima para la obtención de antioxidantes naturales.

Agradecimiento

Los autores agradecen al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico el financiamiento de este trabajo, Proyecto N° PG 06.30.5331.2003.

Referencias bibliográficas

Barros L, Ferreira M, Queiros B, Ferreira I, Baptista, P. 2007. Total phenols, ascorbic acid, B-carotene and lycopene

- in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chem* 103 (2):413-419.
- Hassimoto NMA, Genovese MI, Lajolo FM. 2005. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables and commercial frozen fruit pulps. *J Agric Food Chem* 53: 2928-2935.
- Heinonen A, Meyer AS, Frankel EN. 1998. Antioxidant activity of berry phenols on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *J Agric Food Chem* 46: 4107-4112.
- Hidalgo ME, Fernández E, Quilthot W, Lissi E. 1994. Antioxidant activity of depsides and depsidones. *Phytochemistry* 37:1585-1587.
- Imeh U, Khokhar S. 2002. Distribution of conjugated and free phenols in fruits: antioxidant activity and cultivar variations. *J Agric. Food Chem* 50: 6301-6306.
- Jayaprakasha GK, Singh RP, Sacariah KK. 2001. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chem* 73: 285-290.
- Knaggs H. 2009. The arNOX enzyme: implications for intrinsic aging. *Cosm & Toil* 124(10):48-54
- Kuskoski M, Asuero A, Troncoso AM, Mancini-Filho J, Fett R. 2005. Aplicación de diversos métodos para determinar actividad antioxidante en pulpas de frutos. *Cienc Tecnol Aliment* 25 (4). Campinas Oct/Dec.
- Lupo M. 2001. Antioxidants and vitamins in cosmetics. *Clinics in Dermat* 19:467-473.
- Montreau FR. 1972. Sur le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins par la méthode Folin-Ciocalteu. (the content of total phenolic compounds in wines by the Folin-Ciocalteu method). *Connaissance vigne vin* 24: 397-404.
- Pietta P. 1998. Flavonoids in medicinal plants. In Packer, L, Rice-Evans C. eds. *Flavonoids in health and disease*. Marcel Dekker, New York: 61-110.
- Pinelo M, Monzocco L, Nuñez MJ, Nicoli MC. 2004. Interaction among phenolics in food fortification: negative synergism on antioxidant capacity. *J Agric Food Chem* 52: 1177-1180.
- Rabe J, Mamelak A, McElgunn P, Warwick M, Sauder D. 2006. Photoaging: mechanisms and repair. *J Am Acad Dermatol* 55(1):1-19.
- Rieger M. 1993. Oxidative reactions in and on skin: mechanism and prevention. *Cosm & Toil* 108 (12): 43-51.
- Rieger M. 1989. Reactions of oxygen affecting skin products. *Cosm & Toil*. 104 (10): 83-90.
- Sánchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F. 1998. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric* 7: 270-276.
- Stockdale M. 1987. UV-A Screens methods for assessing their efficacy. *Cosm & Toil* 102(3): 112.
- Udo WS, Saliou C, Packer L. Antioxidants. Cap 26, in *Handbook of Cosmetic Science and Technology*. Marcel Dekker: 299-310. New York. 2001.
- Von Oppen-Bezalet L. 2009. Slowing intrinsic and extrinsic aging: a dual approach. *Cosm & Toil* 124(5):80-84.
- Yen GC, Duh PD. 1993. Antioxidant properties of methanolic extracts from peanut hulls. *J Am Oil Chem. Soc* 70: 383-386.
- Yen GC, Hsieh CL. 1990. Antioxidant activity of extracts from *Du-zhong* (*Eucommia ulmoides*) toward various peroxidation models in vitro. *J Agr Food Chem* 46: 3952-3957.

Recibido: 15 de enero de 2010

Aceptado: 1 de agosto de 2011