

Capacidad antioxidante de subproductos de semillas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*).

Ofelia Araceli López-Mejía, Aurelio López-Malo, Enrique Palou

Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental, Universidad de las Américas Puebla, México.

RESUMEN. Se evaluó la capacidad antioxidante (CA) en subproductos de semillas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) de dos parcelas de cultivo, en función de tres métodos de extracción y dos disolventes, a tres concentraciones diferentes. En una primera etapa, se evaluó el efecto del método de extracción (homogeneización, ultrasonido de baja frecuencia y la combinación homogeneización-ultrasonido) y del disolvente de extracción (metanol o etanol, al 100%); en una segunda etapa, se evaluó el efecto de la concentración del disolvente de extracción (100%, 70% o 50%). La CA se determinó por inhibición del radical DPPH•, expresándola en mg Equivalentes de Trolox (ET)/g materia seca; los compuestos fenólicos totales (FT) se determinaron mediante el ensayo de Folin–Ciocalteu, expresándolos como Equivalentes de Ácido Gálico (EAG)/g materia seca. Los compuestos antioxidantes se identificaron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Para la CA, no existe diferencia significativa ($p>0,05$) entre los métodos de extracción estudiados, mientras que sí la hay ($p<0,05$) entre disolventes (3,39 y 1,28 mg ET/g materia seca, con metanol y etanol, respectivamente). Para FT, no hay diferencia significativa ($p>0,05$) entre disolventes al usarlos diluidos, sólo al emplearlos al 100%; mientras que para CA sí hay efecto de la concentración del disolvente, obteniendo mayores valores de CA al utilizar los disolventes al 50% (21,34 y 21,82 mg ET/g materia seca, con metanol y etanol, respectivamente). El análisis cualitativo de los extractos mostró la presencia de escualeno y 2,5-bis (1,1-dimetiletil) fenol como los principales compuestos con capacidad antioxidante.

Palabras clave: Capacidad antioxidante, *Amaranthus hypochondriacus*, subproductos de semillas de amaranto.

SUMMARY. Antioxidant capacity of byproducts from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seeds. The antioxidant capacity (CA) of byproducts from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seeds from two harvest parcels as a function of three extraction methods and two solvents was evaluated. On a first stage the effect of extraction method (homogenization, low frequency ultrasound, or the combination homogenization-ultrasound) and extraction solvent (methanol or ethanol, 100%) were evaluated; on a second stage, the effect of extraction solvent concentration (100%, 70%, or 50%) was evaluated. CA was determined by DPPH• inhibition, which was expressed as mg Equivalents of Trolox (ET)/g dry matter (DM). Total Phenolic compounds (FT) were determined by means of the Folin–Ciocalteu assay and expressed as Equivalents of Gallic Acid (EGA)/g DM. Antioxidant compounds were identified by gas chromatography coupled to mass spectrometry. For CA, there was not significant difference ($p>0,05$) among extraction methods, but there was significant difference ($p<0,05$) between solvents (3,39 and 1,28 mg ET/g DM, with methanol and ethanol, respectively). For FT, there was not significant difference ($p>0,05$) between solvents when they were diluted, but a significant difference ($p<0,05$) was observed when they were used at 100%. For CA, there was a significant ($p<0,05$) effect of solvent concentration, both studied solvents at 50% provided the best results (21,34 and 21,82 mg ET/g DM with methanol and ethanol, respectively). The qualitative analysis of the extracts exhibited the presence of squalene and 2,5-bis (1,1-dimethylethyl) phenol as the major compounds with antioxidant capacity.

Key words: Antioxidant capacity, *Amaranthus hypochondriacus*, amaranth byproducts.

INTRODUCCIÓN

Los materiales vegetales contienen gran diversidad de compuestos bioactivos, dentro de los cuales se encuentran los antioxidantes. Éstos han sido estudiados ampliamente en las últimas décadas debido a sus propiedades funcionales, por las cuales tienen aplicaciones en la salud, la industria cosmética y la industria alimen-

taria (1). La Norma Oficial Mexicana (NOM) 043-SSA2-2005 define a los antioxidantes como sustancias que previenen la oxidación y ayudan al mantenimiento de la integridad celular, inactivando los radicales libres que causan daño celular (2). Por otro lado, el *Codex Alimentarius* los define como aditivos alimentarios que prolongan la vida útil de los alimentos protegiéndolos del deterioro ocasionado por la oxidación (3). Dentro

de los principales antioxidantes presentes en los alimentos se encuentran las vitaminas C y E, los carotenoides, los compuestos fenólicos y los flavonoides.

El estudio de la capacidad antioxidante en materiales alimenticios, generalmente, involucra su extracción mediante el uso de disolventes tales como agua, etanol, metanol, acetato de etilo o hexano, entre otros (4). El metanol es reconocido como un eficiente agente de extracción, pero no es considerado seguro. En cambio, el etanol representa una alternativa de disolvente seguro en procesos de extracción para productos con fines alimenticios (5). Para la obtención de extractos antioxidantes, a partir de diferentes materiales vegetales, se aplican diversas técnicas dependiendo de las características del tejido vegetal que se somete a extracción y de los componentes que desean extraerse. Tales métodos comprenden extracción Soxhlet, agitación, homogeneización y ultrasonido de baja frecuencia, entre otros (6, 7). La naturaleza del disolvente, las condiciones del método, así como el tiempo de análisis requerido son factores que pueden afectar el resultado analítico debido a una degradación que pueden sufrir estos compuestos de interés (7).

El amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) es un cultivo de gran importancia en México, donde los principales estados productores son Puebla, Oaxaca, Querétaro, Morelos, Tlaxcala, Distrito Federal y Estado de México. Sus principales formas de consumo en México son, semillas reventadas o esponjadas, dulces denominados "alegrías", harina y botanas elaboradas con la semilla. El procesamiento del amaranto involucra inicialmente una limpieza, de la cual se genera un subproducto que contiene restos de flores, semillas vanas y cascarilla. Este material es considerado un subproducto que, por el momento, no tiene usos o aplicaciones específicos. Algunos estudios han reportado capacidad antioxidante in vitro en flores de *A. lividus* (8). Álvarez-Jubete *et al.* (9) reportan la presencia de polifenoles en semillas de *A. caudatus*. Otros estudios reportan compuestos fenólicos y antocianinas en semillas de *A. cruentus* (10). Sin embargo, las posibles propiedades funcionales de este material residual, proveniente del procesamiento de semilla, no han sido estudiadas con el fin de identificar sus usos potenciales. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad antioxidante y la concentración de compuestos fenólicos totales en el subproducto obtenido de la limpieza de semillas de amaranto, pertenecientes a

dos parcelas diferentes de cultivo, así como el efecto de tres métodos de extracción con dos disolventes, metanol y etanol, a tres diferentes concentraciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología consistió en evaluar tres **métodos de extracción**, homogeneización, ultrasonido de baja frecuencia o un método combinándolos homogeneización-ultrasonido, sobre la concentración de compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante de los extractos. Se llevaron a cabo extracciones con metanol o etanol como disolventes, en forma absoluta (100%) y diluida (70 o 50%) para determinar también el efecto de los factores disolvente y concentración de disolvente sobre la capacidad antioxidante y concentración de compuestos fenólicos totales en los extractos.

Obtención de la muestra: El material, subproducto de la separación neumática de semillas a partir de las panojas de amaranto corresponde a la cosecha del primer semestre de 2012 de dos parcelas denominadas Correbarranca I y Correbarranca II, cuya única diferencia es la locación, pero ambas están ubicadas en el municipio de Tehuacán y fue proporcionado por Alternativas de Participación Social A. C. de Tehuacán, Puebla, México. El material (2 kg) se empacó en bolsas de polietileno, cerradas herméticamente y se conservó a -18°C hasta su análisis.

Caracterización de las muestras: Las muestras (aproximadamente 250 g) se sometieron a una disminución de tamaño en un molino para especias (Krupps®, México D.F., México) y se pasaron por un tamiz (Mont-Inox, Cd. de México, D.F., México) con tamaño de orificio 0,85 mm. La caracterización de las muestras consistió en realizar los análisis de la composición proximal que incluyen la determinación del contenido de humedad (934.01), cenizas (923.03), grasa (extracto etéreo) (920.39), proteína (960.52) y fibra cruda (920.86), siguiendo los métodos propuestos por la AOAC (11). Los carbohidratos totales se calcularon por diferencia.

Extracción: Previo a la extracción, las muestras (250 g) previamente molidas se secaron en estufa de vacío (Cole Parmer®, Chicago, Illinois, EE.UU.) a 50°C y 15 in Hg de vacío, durante 4 h. La extracción se llevó a cabo por tres diferentes métodos: homogeneización (5 min), ultrasonido de baja frecuencia (10 min), o combinándolos, aplicando primeramente 5

min de homogeneización e inmediatamente después 10 min de ultrasonido. Como disolventes de extracción se utilizaron etanol (Química Meyer, Cd. de México, D. F., México) o metanol (Omnichem, Puebla, Puebla, México), al 100, 70 o 50%. Las extracciones con cada método se realizaron por triplicado como se indica a continuación.

Homogeneización: Se mezclaron 2 g de muestra con 30 mL de disolvente (proporción 1:15) y se sometieron a un proceso de homogeneización durante 5 min con un equipo Ika Ultraturrax®T18 basic (Washington, DCEE.UU.). El extracto se centrifugó (centrífuga, Marathon® 21K/12, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EE.UU.) a 4°C, durante 5 min a 12000 rpm. El sobrenadante se conservó en frasco ámbar de vidrio a -18°C hasta su análisis.

Ultrasonido de baja frecuencia: Se mezclaron 2 g de muestra con 30 mL de disolvente (proporción 1:15) y se sometieron a un tratamiento de ultrasonido con una sonda ultrasónica de 13 mm (Ultrasonic processor, Cole Parmer, EE. UU.), a 20 kHz de frecuencia, 500 Watts potencia, amplitud de 60%, por un lapso de 10 min en un baño de agua a 20°C. Los extractos, se centrifugaron y conservaron de la misma forma que los extractos obtenidos con el método de homogeneización.

Homogeneización-Ultrasonido: Se mezclaron 2 g de muestra con 30 mL de disolvente (proporción 1:15) y se sometieron a un proceso de homogeneización durante 5 min de la misma manera descrita anteriormente. Después de la homogeneización, se sometieron a un tratamiento de ultrasonido bajo las mismas condiciones descritas con anterioridad durante un lapso de 10 min a una temperatura de 20°C. Los extractos se centrifugaron y conservaron de la misma forma que los extractos obtenidos con los métodos anteriores.

Caracterización de extractos: La caracterización de los extractos incluyó la determinación de la concentración de compuesto fenólicos totales y la capacidad antioxidante así como la identificación cualitativa de los compuestos antioxidantes presentes.

Capacidad antioxidante (CA): La determinación de la CA se basa en la formación del radical DPPH• y su inhibición por compuestos antioxidantes (12). Se elaboró una curva estándar, haciendo reaccionar alícuotas de 3,9 mL de solución de 2, 2-difenil-1-picrilhidracilo (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU.), DPPH• (3,94 mg/100 mL de metanol al 80%) y alícuotas de 0,1 mL de soluciones del antioxidante Tro-

lox (Aldrich, Darmstadt, Alemania), en un intervalo de 0,02 a 0,32 mg de Trolox en metanol al 80%, alcanzando un volumen total de 4 mL. El blanco para las mediciones fue metanol al 80%. Los tubos conteniendo estas mezclas se agitaron y se dejaron reaccionar durante 30 min a temperatura ambiente en la obscuridad. Transcurrido este lapso, se midió la absorbancia (ABS) a 515 nm en espectrofotómetro (UNICO 2800H, UV/VIS, EE.UU.). La curva estándar se obtuvo graficando el porcentaje de inhibición del radical DPPH• ($\% \text{ inhibición} = [\text{ABS}_{\text{inicial}} - \text{ABS}_{\text{final}}] / [\text{ABS}_{\text{inicial}}]$) en función de la concentración de Trolox, en mg equivalentes de Trolox (mg ET). Se considera ABSinicial a la absorbancia medida del reactivo de DPPH• preparado para la reacción, y ABSfinal, a la absorbancia del DPPH•, después de la reacción con el antioxidante. La CA en los extractos se obtuvo haciendo reaccionar alícuotas de 0,1 mL de extracto con 3,9 mL solución de DPPH• de la misma manera que para los estándares. Se calculó el porcentaje inhibición y la CA se calculó aplicando la ecuación de regresión obtenida de la curva estándar. La capacidad antioxidante en los extractos se expresó como mg EAG/g de muestra seca.

Compuestos Fenólicos Totales (FT): La determinación de FT se fundamenta en la reducción que generan los compuestos fenólicos en el molibdeno contenido en el reactivo de Folin-Ciocalteu (13). La determinación consistió en la reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu (Merck, Darmstadt, Alemania), haciendo reaccionar 0,1 mL del extracto, con 0,2 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu, adicionando 2 mL de agua destilada, la mezcla se dejó reaccionar por 3 min y se le adicionó 1 mL de solución de Na₂CO₃ (RBM, Puebla, Puebla México) al 20%; después de 60 min en la obscuridad se midió la absorbancia a una longitud de onda de 765 nm, en un espectrofotómetro (UNICO, 2800H, UV/VIS, EE.UU.). La curva estándar se realizó haciendo reaccionar alícuotas de 2,1 mL de soluciones de ácido gálico en un intervalo de 0,00157 a 0,01570 mg equivalentes de ácido gálico (mg EAG) y 0,2 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu. La mezcla se dejó reaccionar por 3 min, posteriormente se adicionó 1 mL de solución de Na₂CO₃ al 20%, con lo que se alcanzó un volumen final de 3,3 mL. Después de 60 min de incubación se midió la absorbancia a 765 nm. El blanco se preparó mezclando una alícuota de 2,1 mL de agua con 0,2 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu y 1 mL de

Na₂CO₃. La concentración de compuestos fenólicos totales en el extracto se calculó a partir de la curva estándar y se expresó como mg EAG/g muestra seca.

Determinación cualitativa de compuestos antioxidantes: El análisis de componentes se realizó mediante la inyección de 1 µL de cada uno de los extractos en un equipo de cromatografía de gases (Agilent Technologies 6850, Santa Clara, California, EE.UU.) con detector de masas (5975 C VL MSD triple axis, con temperatura de trabajo de 270°C). Las condiciones para el análisis fueron: inyección en modo split, usando helio como gas transportador (flujo de 1,1 mL/min), en una columna (Agilent HP-5MS -5% metil fenil siloxano-) de 30 m X 250 µm X 0,25 µm. La determinación se realizó manteniendo inicialmente la temperatura a 60°C por 10 min, para después elevar la temperatura a razón de 5°C/min hasta alcanzar 240°C; esta temperatura se mantuvo durante 10 min. El tiempo total de análisis fue de 56 min. La identificación de los componentes antioxidantes se realizó mediante el espectro de masas, el índice de retención y la biblioteca del software del equipo (*National Institute of Standards and Technology, NIST, Mass Spectral Library*).

Evaluación del efecto del método de extracción, del tipo y concentración del disolvente: Todas las de-

terminaciones son el resultado de la media desviación estándar de tres réplicas. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey ($p < 0,05$), con el software Minitab® (versión 15, EE.UU.), para determinar diferencias significativas en la capacidad antioxidante y concentración de compuestos fenólicos totales entre los métodos de extracción aplicados, entre los disolventes de extracción y sus diluciones, así como entre la procedencia de las muestras.

RESULTADOS

La Tabla 1 presenta los resultados del análisis proximal que se realizó a las muestras de los subproductos de limpieza de la semilla de amaranto provenientes de las dos parcelas, se determinaron mayores contenidos de cenizas, proteína y fibra cruda en la muestra perteneciente a la parcela Correbarranca II, lo que consecuentemente se reflejó en una disminución en su contenido de carbohidratos totales.

La Tabla 2 muestra los resultados de la capacidad antioxidante de los extractos, evaluados en la primera etapa (solventes al 100%). Al comparar la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos de las muestras de cada parcela por los distintos métodos de extracción

TABLA 1 Análisis proximal (g/ 100 g de muestra húmeda) de los subproductos de limpieza de semilla de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) provenientes de dos parcelas.

Parcela	Humedad	Cenizas	Grasa (extracto etéreo)	Proteína	Fibra cruda	Carbohidratos Totales*
Correbarranca I	8,09 ± 0,05 ^a	10,63 ± 0,36 ^a	3,60 ± 0,21 ^a	6,33 ± 0,27 ^a	16,83 ± 0,27 ^a	53,71
Correbarranca II	8,28 ± 1,83 ^a	11,44 ± 0,19 ^b	2,45 ± 0,42 ^b	9,28 ± 0,20 ^b	20,03 ± 0,43 ^b	47,95

* Calculados por diferencia

Los valores reportados representan el promedio ± la desviación estándar de tres repeticiones.

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre parcelas.

TABLA 2 Efecto del método de extracción, disolvente de extracción y parcela de cultivo (Correbarranca I o II) sobre la capacidad antioxidante de los extractos de subproductos de limpieza de semilla de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) utilizando disolventes absolutos.

Método	Disolvente	Capacidad Antioxidante (mg ET/g muestra seca)	
		Correbarranca I	Correbarranca II
Homogeneización	Metanol	3,39 ± 0,69 ^{a,A}	2,19 ± 0,46 ^{a,B}
	Etanol	0,95 ± 0,07 ^{b,A}	0,28 ± 0,06 ^{b,B}
Ultrasonido	Metanol	2,96 ± 0,74 ^{a,A}	2,10 ± 0,15 ^{a,B}
	Etanol	1,28 ± 0,15 ^{c,A}	0,85 ± 0,06 ^{c,B}
Homogeneización-ultrasonido	Metanol	3,29 ± 0,00 ^{a,A}	2,57 ± 0,07 ^{a,B}
	Etanol	1,16 ± 0,25 ^{bc,A}	0,77 ± 0,16 ^{bc,B}

Los valores reportados representan el promedio ± la desviación estándar de tres repeticiones.

Letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en valores correspondientes a la misma columna.

Letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en valores correspondientes al mismo renglón.

aplicados se observó que no existe diferencia significativa ($p > 0,05$), por lo que es indistinto utilizar como método de extracción homogeneización, ultrasonido de baja frecuencia o su combinación, cuando se utiliza metanol como disolvente. Sin embargo, si se observó una diferencia significativa ($p < 0,05$) en la capacidad antioxidante entre los extractos obtenidos de los subproductos de limpieza de la semilla de amaranto provenientes de las distintas parcelas; el extracto del material proveniente de la parcela Correbarranca I posee mayor capacidad antioxidante (para los tres métodos de extracción estudiados). También se encontró diferencia significativa ($p < 0,05$) entre la capacidad

antioxidante de los extractos obtenidos con los dos disolventes grado absoluto, siendo el metanol el disolvente que logró extraer en mayor cantidad componentes con capacidad antioxidante.

Con respecto al efecto de la concentración del disolvente (absolutos y diluidos), se optó como método de extracción la homogeneización dada su facilidad, se observó (Tabla 3) diferencia significativa ($p < 0,05$) en la capacidad antioxidante entre disolventes cuando se usaron en su forma absoluta. No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la capacidad antioxidante del extracto, entre disolventes, cuando se utilizaron en forma diluida; pero sí se observaron di-

TABLA 3 Efecto de la concentración de disolvente sobre la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos totales de los extractos de subproductos de limpieza de semilla de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) provenientes de dos parcelas.

Disolvente		Parcela			
		Correbarranca I		Correbarranca II	
		Capacidad antioxidante (mg ET/g materia seca)	Fenólicos Totales (mg EAG/g materia seca)	Capacidad antioxidante (mg ET/g materia seca)	Fenólicos Totales (mg EAG/g materia seca)
Etanol	100%	0,95 ± 0,07 ^a	0,18 ± 0,03 ^a	0,28 ± 0,06 ^a	0,12 ± 0,02 ^a
	70%	17,61 ± 2,50 ^b	1,48 ± 0,07 ^b	10,55 ± 1,02 ^b	1,01 ± 0,04 ^b
	50%	21,82 ± 0,69 ^c	1,75 ± 0,05 ^c	12,70 ± 2,15 ^c	1,28 ± 0,05 ^c
Metanol	100%	3,39 ± 0,69 ^d	0,56 ± 0,00 ^d	2,19 ± 0,46 ^d	0,37 ± 0,01 ^d
	70%	17,66 ± 0,96 ^b	1,46 ± 0,06 ^b	10,41 ± 0,93 ^b	1,02 ± 0,02 ^b
	50%	21,34 ± 1,11 ^c	1,71 ± 0,14 ^c	13,58 ± 1,27 ^c	1,21 ± 0,06 ^c

Los valores reportados representan el promedio ± la desviación estándar de tres repeticiones.

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en valores correspondientes a la misma columna.

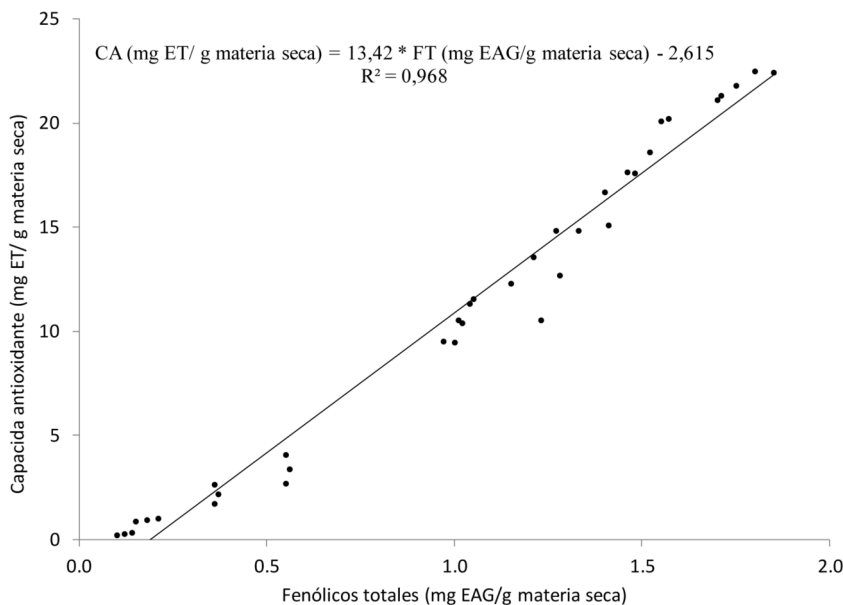


FIGURA 1
Correlación entre la capacidad antioxidante (CA) y el contenido de fenólicos totales (FT) en extractos de subproductos de limpieza de semilla de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*).

ferencias significativas ($p < 0,05$) entre estas dos diluciones (70 o 50%) pertenecientes a un mismo disolvente, siendo los extractos de mayor capacidad antioxidante, los correspondientes a la concentración del 50%. Los extractos de los subproductos de limpieza de la semilla de amaranto provenientes de la parcela Correbarranca I al utilizar los disolvente al 50% mostraron los valores más altos de capacidad antioxidante ($21,82 \pm 0,69$ mg ET/g materia seca, con etanol y $21,34 \pm 1,11$ mg ET/g materia seca, con metanol). Los resultados de la concentración de compuestos fenólicos totales (Tabla 3) se comportan de la misma forma que la capacidad antioxidante, siendo mayores los valores obtenidos con disolventes al 50%, correspondientes a la parcela Correbarranca I ($1,75 \pm 0,05$ mg EAG/g materia seca, con etanol y $1,71 \pm 0,14$ mg EAG/g materia seca, con metanol).

Se observaron resultados más altos de capacidad antioxidante y fenólicos totales, para ambas parcelas en el caso de los extractos obtenidos con metanol y etanol, al 50%, seguido por las diluciones al 70% y, finalmente los resultados más bajos se obtuvieron en extractos obtenidos con los disolventes en grado absoluto (al 100%). Al comparar los extractos analizados, se observa una relación lineal entre la capacidad antioxidante y la concentración de compuestos fenólicos totales de los extractos (Figura 1).

Los principales componentes antioxidantes, encontrados en todos los extractos fueron 2-metoxi-4-vinil fenol, escualeno y 2,5-bis (1,1-dimetiletil) fenol.

DISCUSIÓN

La similitud en contenido de fibra cruda que tienen las muestras provenientes de ambas parcelas (16,83 g/100g, para Correbarranca I y 20,03 g/100g, para Correbarranca II) con respecto al salvado de avena (15,4 g/100 g) y al salvado de arroz (21 g/100 g) (14), importantes comercialmente en la actualidad, puede representar una oportunidad potencial de aplicación de este material de desecho (subproductos de limpieza de la semilla de amaranto) en productos para la alimentación animal, permitiendo incrementar su contenido de fibra (aun cuando el contenido de fibra cruda subestima el contenido de fibra dietética); pues a este material de desecho, en general, no se le da uso.

De acuerdo con los resultados obtenidos, relacionados a la capacidad antioxidante y a los compuestos

fenólicos totales de extractos obtenidos con disolventes en grado absoluto, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los tres métodos de extracción estudiados. En un trabajo comparativo de métodos de extracción para determinar compuestos fenólicos en semillas de uva, se probaron los métodos de maceración (convencional) y de extracción asistida por ultrasonido (rápido) y no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la concentración de compuestos fenólicos (15). Una gran ventaja de los métodos rápidos, como los evaluados en este trabajo (homogeneización o ultrasonido), es el corto tiempo requerido para la extracción. El tiempo es un factor que influencia la recuperación de compuestos antioxidantes, y se llega a reflejar en la degradación por oxidación (16). Por tal motivo, en la segunda parte del trabajo, cuando se compararon los dos disolventes en grados absolutos y diluidos, se utilizó el método de homogeneización, pues en éste se requiere menor tiempo para la extracción.

Por otro lado, sí se observó diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los extractos de los subproductos procedentes de diferente parcela; esto se puede deber a la presencia de fragmentos de flores, con coloraciones rojizas, que se percibe en mucho mayor cantidad en las muestras de la parcela Correbarranca I, respecto a las provenientes de la parcela Correbarranca II; tal coloración se debe al contenido de derivados de antocianinas en las flores de amaranto (17), lo que puede estar incrementando la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos de los subproductos provenientes de la parcela Correbarranca I. La diferencia en la cantidad de fragmentos de flores en las muestras analizadas se atribuye a diferencias en el método de recolección de la semilla.

Al analizar la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos totales de extractos de materiales vegetales, se debe considerar que varios factores pueden afectar el resultado, como son el tipo y variedad de cultivo, el tipo y tiempo de almacenamiento del material a analizar y el método de extracción utilizado, entre muchos otros (18). La importancia de los resultados obtenidos en este trabajo radica en la poca información existente respecto a propiedades antioxidantes de este material de desecho (subproductos de limpieza de la semilla de amaranto).

De los disolventes evaluados, el metanol fue el que logró extraer mayor cantidad de componentes antio-

xidantes, esto se debe a que este disolvente tiene la capacidad de causar daño al tejido a nivel de pared celular, permitiendo así la salida de componentes intracelulares (19). Se ha reportado que el metanol es un disolvente altamente efectivo en la extracción, esto ha sido probado en diversos estudios donde se compara con otros disolventes como agua, acetona y/o acetato de etilo (1, 20). Heşet *et al.* (21), obtuvieron una mayor extracción de compuestos fenólicos antioxidantes, usando metanol absoluto, cuando trabajaron con alforfón o trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*). El hecho de que ambos disolventes, metanol y etanol, diluidos con agua hayan logrado mayor extracción de compuestos con capacidad antioxidante (Tabla 3) que los disolventes absolutos, indica que los componentes antioxidantes mayoritarios son fenólicos, mismos que poseen una afinidad por medios acuosos combinados con disolventes polares, por ello a mayor dilución, mayor capacidad antioxidante detectada y mayor cantidad de compuestos fenólicos totales. Sultana *et al.* (22) también determinaron una mayor actividad antioxidante y contenido de fenólicos en extractos de plantas medicinales, cuando utilizaron metanol y etanol diluidos con agua (80%) que cuando usaron los disolventes en grado absoluto. Otra investigación realizada con alforfón o trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*), reporta mayor contenido de fenólicos totales cuando la extracción se realizó con etanol al 50%, incluso mayor que la obtenida con el disolvente absoluto o con agua (23). De lo anterior se deduce que los disolventes diluidos al 50% favorecen la disolución de los componentes con polaridad afín a la mezcla agua:etanol o agua: metanol (50:50). Diversos estudios han encontrado en el agua una menor capacidad de extracción de compuestos antioxidantes, incluyendo compuestos fenólicos (20). La capacidad antioxidante determinada en un material depende en gran medida de la naturaleza y polaridad del disolvente de extracción, esto debido a la interacción existente de los compuestos antioxidantes con otros componentes; por ejemplo, la interacción de compuestos fenólicos asociados a carbohidratos o proteínas, pueden afectar su solubilidad en disolventes determinados (1, 7). Existe una tendencia entre los resultados de la concentración de compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos con las diferentes concentraciones de los disolventes, indicando una relación proporcional-

mente directa (Figura 1). Lo anterior indica que la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos se debe principalmente a la presencia de compuestos fenólicos. El potencial antioxidante de las muestras de subproductos de limpieza del amaranto estudiadas es resultado de los fragmentos de flores y de la cascarilla de la semilla, por la función protectora que esta cascarilla desempeña, en este caso particular, en materiales con alto contenido de lípidos, como lo es la semilla de amaranto (1). Goristein *et al.* (24) reportaron $154 \pm 15,7$ mg EAG/100 g materia seca (correspondientes a $1,54 \pm 0,15$ mg EAG/g materia seca) en semilla integral de *A. hypochondriacus*, obtenido con solución acuosa de metanol al 50%. En el presente estudio, debido a la presencia mayoritaria de cascarilla y flores en el material analizado, se encontró una cantidad de $1,70 \pm 0,14$ mg EAG/g materia seca. Se detectó así mismo un contenido importante de compuestos fenólicos totales, lo cual indica que este material (subproductos de limpieza de la semilla de amaranto) sería potencialmente utilizable en productos de alimentación humana, adicionándola en productos como harinas integrales, frituras elaboradas a base de harina de amaranto, así como para alimentación animal. Dentro de los componentes bioactivos encontrados en los extractos, se encuentra el escualeno, que es un compuesto isoprenoide similar en su estructura al beta-caroteno, este compuesto no es muy susceptible a la peroxidación y llega a funcionar como protector a la exposición de radiación UV y radiación ionizante (25). La presencia de escualeno en estos extractos puede deberse a que las muestras analizadas contienen fragmentos de semillas. El 2,5-bis (1,1-dimetil) fenol, tiene una estructura relacionada a los antioxidantes sintéticos BHA y BHT, por lo que tendría aplicación potencial como antioxidante natural.

CONCLUSIONES

El método de homogeneización es una alternativa interesante para ser utilizada en la extracción de componentes antioxidantes ya que genera tiempos de extracción cortos. Los disolventes diluidos (50%), tanto metanol como etanol, son más eficientes en la extracción de componentes antioxidantes que los componentes absolutos, lo que indica que los componentes antioxidantes, del material residual analizado, son en su mayoría de carácter polar. El material residual, pro-

veniente de la limpieza de semilla de amaranto, puede tener usos potenciales como fuente de antioxidantes para la formulación de alimentos funcionales o alimentos susceptibles a la oxidación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a *Alternativas y Procesos de Participación Social A. C.* por el material de estudio, así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) de México por el apoyo financiero al proyecto titulado: “Extracción, Caracterización y Funcionalidad de Compuestos de Origen Vegetal Obtenidos de Materiales Mexicanos Empleados Como Condimentos. Obtención de Agentes Antimicrobianos, Antioxidantes e Ingredientes Funcionales”. O.A. López-Mejía agradece el apoyo para la realización de sus estudios doctorales al CONACyT y a la Universidad de las Américas Puebla, México.

REFERENCIAS

- Moure A., Cruz J.M., Franco D., Domínguez J.M., Sineiro J., Domínguez H., Nuñez M.J. y Parajó J.C. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem.* 2001; 72:145-171.
- DGN. Catálogo de Normas. Dirección General de Normas. Norma Oficial Mexicana NOM-043-SSA2-2005, Servicios Básicos de Salud. Promoción y educación para la salud en materia alimentaria. Criterios para brindar orientación. México; 2005. Disponible: <http://www.economia-noms.gob.mx/noms/inicio>. Consultado: 15/01/11.
- Codex Alimentarius. Normas oficiales del Codex. Nombres genéricos y sistema internacional de numeración de aditivos alimentarios, CAC/GL 36-1989; 2010. Disponible: http://www.codexalimentarius.net/web/more_info.jsp?id_sta=7. Consultado: 23/01/2011.
- Singh R., Chidambara K., Jayaprakasha G. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *Agr Food Chem.* 2002; 50: 81-86.
- Velasco R.J., Villada H.S., Carrera J.E. Aplicaciones de los fluidos supercríticos en la agroindustria. *Inf Tecnol.* 2007; 18(1):53-65.
- Liu G., Xu X., Hao Q., Gao Y. Supercritical CO₂ extraction optimization of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil using response surface methodology. *LWT-Food Sci Technol.* 2009; 42:1491-1495.
- Ajila C.M., Brar S.K., Verma M., Tyagi R.D., Godbout S., Valero J.R. Extraction and Analysis of Polyphenols: Recent trends. *Crit Rev Biotechnol.* 2011; 31(3): 227-249
- Ozsoy N., Yilmaz T., Kurt O., Can A., Yanardag R. In vitro antioxidant activity of *Amaranthus lividus* L. *Food Chem.* 2009; 116:867-872.
- Alvarez-Jubete L., Wijngaard H., Arendt E.K., Gallagher E. Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking. *Food Chem.* 2010; 119,770-778.
- Paško P., Barton H., Zagrodzki P., Gorinstein S., Fořta M., Zachwieja Z. Anthocyanins, total polyphenols and antioxidant activity in amaranth and quinoa seeds and sprouts during their growth. *Food Chem.* 2009; 115:994-998.
- AOAC, Official Methods of Analysis (17th Ed.). Association of Official Analytical Chemists. 2000. Gaithersburg, Madison, EUA.
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol.* 1995; 28:25-30.
- Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method Enzymol.* 1999; 299:152-178.
- USDA. National Nutrient Database for Standard Reference. United States Department of Agriculture. 2013; disponible: <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list>, Consultada: 30/04/2013.
- Da Porto C., Porreto E., Decorti, D. Comparison of ultrasound-assisted extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrason Sonochem.* 2013; 20:1076-1080.
- Dai J., Mumper R. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules.* 2010; 15:7313-7352. doi:10.3390/molecules15107313.
- Mujica-Sánchez A., Berti M. El cultivo del Amaranto (*Amaranthus spp.*): producción, mejoramiento genético y utilización. 1997; FAO, Oficina regional para América Latina y el Caribe.
- Dimitrios B. Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends Food Sci Technol.* 2006; 17:505-512
- Arranz M.S. Compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española: Metodología para su determinación e identificación. Tesis Doctoral. 2010; Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. Madrid, España.
- Kothari V., Gupta A., Naranigwal M. Comparative study of various methods for extraction of antioxidant and bacterial compounds from plant seeds. *J Nat Res-*

- medies. 2012; 12(2):162-173.
21. Heś M., Góreck D., Dziejczak K. Antioxidant properties of extracts from buckwheat byproducts. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 2012; 11(12):167-174.
 22. Sultana B., Anwar F., Ashraf M. Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules.* 2009; 14: 2167-2180; doi:10.3390/molecules14062167.
 23. Inglett G., Chen D., Berhow M., Lee S. Antioxidant activity of commercial buckwheat flours and their free and bound phenolic compositions. *Food Chem.* 2011; 125:923–929.
 24. Gorinstein S., Medina-Vargas O.J., Jaramillo N.O., Arnao-Salas I., Martinez-Ayala A.L., Arancibia-Avila P., Toledo F., Katrich E., Trakhtenberg S. The total polyphenols and the antioxidant potentials of some selected cereals and pseudocereals. *Eur Food Res Technol.* 2007; 225:321–328.
 25. Rodas B., Bressani R. Contenido de aceite, ácidos grasos y escualeno en variedades crudas y procesadas de grano de amaranto. *Arch Latinoam Nutr.* 2009. 59(1):82-87.

Recibido: 05-11-2013

Aceptado: 28-03-2014