

Extracción de antioxidantes del residuo de betabel (*Beta vulgaris*) por ultrasonido: comparación con métodos convencionales

Extraction of Antioxidants of Beetroot (*Beta vulgaris*) Residue by Ultrasound: Comparison with Conventional Method

José Luis Hernández-Traspeña ^a, Lisette M. Ramírez-Melo ^b, Nelly del Socorro Cruz-Cansino ^c, Luis Delgado-Olivares ^d, Esther Ramírez-Moreno ^e, José A. Ariza-Ortega ^f, Ernesto Alanís-García ^g

Abstract:

The beetroot residue has attracted attention among the scientific community for its nutritional composition, mainly for its antioxidants, which are important in the diet of people since they reduce the cellular damage generated by free radicals that are normally generated in the metabolism and during oxidative stress of non-communicable diseases; however, this waste is not consumed or marketed. For these reasons some methods are developed for the extraction of compounds without the use of solvents such as ultrasound (US), being an alternative for the extraction of compounds conserving their natural characteristics. The objective of this study was to extract the antioxidants from the beetroot residue (*Beta vulgaris*) using conventional and emerging technology. An aqueous, ethanolic, macerated and US extract was obtained. The results showed that in total phenolic compounds (TPC), the extraction by US obtained more of these compounds (534.64 AGE / 100g bs) with respect to the control. However, the highest extraction of betanins and betaxanthines was with water (1009.01 and 764.18 mg BE / 100g bs). Ultrasound is an emerging technology that could be used to extract antioxidant compounds from waste from food processing, reducing energy consumption, improving shelf life and product quality.

Keywords:

Ultrasound, beetroot, phenols, betanins, betaxanthines.

Resumen:

El residuo de betabel ha llamado la atención entre la comunidad científica por su composición nutrimental, principalmente por sus antioxidantes, los cuales son importantes en la dieta de las personas ya que estos disminuyen el daño celular generado por los radicales libres que se generan normalmente en el metabolismo y durante el estrés oxidativo de enfermedades no transmisibles; sin embargo este residuo no es consumido ni comercializado. Por estas razones se desarrollan algunos métodos para la extracción de compuestos sin el uso de solventes como lo es el ultrasonido (US), siendo una alternativa para la extracción de compuestos conservando sus características naturales. El objetivo de este estudio fue extraer los antioxidantes del residuo de betabel (*Beta Vulgaris*) utilizando tecnología convencional y emergente. Se obtuvo un extracto acuoso, etanólico, macerado y por US. Los resultados mostraron que en compuestos fenólicos totales (CFT), la extracción por US obtuvo mayor cantidad de estos compuestos (534.64 EAG/100g bs) con respecto al control. Sin embargo, la mayor extracción de betaninas y betaxantinas fue con agua (1009.01 y 764.18 mg EB/100g bs). El ultrasonido es una tecnología emergente que podría ser utilizado para la extracción de compuestos antioxidantes provenientes de residuos del procesamiento de los alimentos reduciendo el consumo de energía, mejorando la vida útil y la calidad del producto.

Palabras Clave:

Ultrasonido, betabel, fenoles, betaninas, betaxantinas.

^a Autor de Correspondencia, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias de la Salud, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4595-357X>, Email: he267607@uaeh.edu.mx

^b Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias de la Salud, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2188-4146>, Email: ra312924@uaeh.edu.mx

^c Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias de la Salud, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6671-3684>, Email: ncruz@uaeh.edu.mx

^d Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias de la Salud, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3506-8393>, Email: ldelgado@uaeh.edu.mx

^e Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias de la Salud, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3506-8393>, Email: esther_ramirez@uaeh.edu.mx

^f Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias de la Salud, ORCID: [0000-0002-2163-4593](https://orcid.org/0000-0002-2163-4593), Email: jose_ariza@uaeh.edu.mx

^g Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias de la Salud, ORCID: [0000-0003-1540-4908](https://orcid.org/0000-0003-1540-4908), Email: ernesto_alanis@uaeh.edu.mx

Introducción

El betabel (*Beta vulgaris*) es un alimento de bajo consumo, sin embargo, es uno de los tubérculos con mayor capacidad antioxidante (Kujala, *et al.*, 2000), ya que es una excelente fuente de betalainas (Czapski, *et al.*, 2009). Siendo también buena fuente de flavonoides, compuestos fenólicos y carotenoides (Ruberto *et al.*, 2007). Una parte de los compuestos bioactivos están asociados a los componentes de la fibra dietética (Sáyago, 2010). En el proceso de extracción se deja una cantidad considerable de residuo después de la filtración del jugo (Ruberto, *et al.*, 2007). Por esta razón se deben buscar recursos y/o el uso de valor agregado de estos desechos, ya que contienen compuestos bioactivos como fenoles y que se puede hacer uso de ellos en la industria alimentaria. El uso de estos desechos es barato y muy disponible, ya que son altamente rentables y minimiza el impacto ambiental (Makris *et al.*, 2007). Con la finalidad de aprovechar mayor cantidad de compuestos, se han desarrollado diversas técnicas de extracción para el aislamiento de compuestos antioxidantes (Merken y Beecher, 2000). Sin embargo, las extracciones son usualmente obtenidas mediante solventes, por lo que se podría emplear técnicas de extracción sin la aplicación de estos (Li, *et al.*, 2005). Una alternativa, son las tecnologías emergentes en donde se puede evitar el uso de solventes y maximizar el rendimiento. Entre estas tecnologías se encuentra el ultrasonido, el cual garantiza un contacto íntimo de la muestra con la extracción del disolvente y se utiliza para mejorar la extracción de lípidos, proteínas y compuestos fenólicos (Ignat, *et al.*, 2011). Por lo que el objetivo de este estudio fue extraer los antioxidantes del residuo de betabel (*Beta vulgaris*) utilizando tecnología convencional y emergente.

Materiales y métodos

Obtención del residuo de betabel

La muestra de betabel (*Beta vulgaris*) fue obtenida de un mercado local en Tulancingo, Hidalgo. México. Los frutos fueron lavados y pelados manualmente para posteriormente extraer con un extractor de jugos (Turmix, Standard, México) separando su jugo del residuo; el residuo se congeló a -32°C, y liofilizó (VWR 26671-581 Labconco, EE.UU.). Posteriormente se molió en un triturador (Blender, 38BL52 LBC10, Waring Comercial, EE.UU.) y se tamizó a un tamaño de partícula de 500 µm.

Extracción por ultrasonido

Se aplicó ultrasonido (VCX -1500, Sonics & Materials, Inc. Newtown, CT, EE.UU.) con una potencia de 1500W y una frecuencia constante de 20 kHz con una amplitud de onda de 77.5 % y con un tiempo de 9 min a una temperatura controlada (2±1.0°C). Los tiempos de impulso de onda fueron de 2 s. de encendido y 4 s. de apagado. Después se centrifugó (Allegra 25R™, Beckman Coulter; CA, USA) a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante para su posterior análisis.

Extracción con agua

Se realizó la extracción con agua desionizada de acuerdo a la metodología de Vulic, *et al.*, (2011). La muestra liofilizada (20 g) se extrajo mediante 3 lavados (60 min-160 mL, 30 min-80 mL, 30 min-80 mL) con un homogenizador (Wisestir□, HS-50A set, Wisd, laboratory instruments, USA). Después se centrifugó (Allegra 25R™, Beckman Coulter; CA, USA) a 10000 rpm, por 30 min a 25°C.

Extracción con solvente orgánico (etanol)

La extracción con etanol se realizó con las mismas condiciones antes descritas (Vulic, *et al.*, 2011).

Extracción por maceración

Para la extracción por maceración, se utilizó metodología de Ravichandran, *et al.*, (2011) con algunas modificaciones. Se tomó 1g de muestra y se adicionó 100 mL de una disolución de etanol-agua (50:50 v/v). Se colocó en un tubo para centrífuga con capacidad de 15 mL, posteriormente se centrifugaron (Wisestir□, HS-50A set, Wisd, laboratory instruments, USA) a 6000 rpm durante 10 min en una centrífuga. El sobrenadante se colectó y la centrifugación se repitió una vez más.

Una muestra sin tratamiento de extracción se utilizó como control, el cual se mezcló manualmente y se realizó la centrifugación como las técnicas de extracción antes mencionadas.

Determinación de compuestos fenólicos totales

La determinación de compuestos fenólicos totales se realizó por medio del método descrito por Stintzing, *et al.*, (2005). Se mezcló 100 µL del extracto del residuo de betabel con 500 µL de la solución con el reactivo de Folin-Ciocalteu y se añadieron 400 µL de carbonato de sodio al 7.5% y se mezcló. Se dejó reposar por 30 min. La

absorbancia de la mezcla se midió a 765 nm en un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA). El ácido gálico se utilizó como patrón de referencia y los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por 100 g de base seca (mg EAG/100 g bs).

Determinación de betalainas

Se realizó por el método descrito por Stintzing, et al, (2005). Se utilizó una longitud de onda de 535 nm para la cuantificación de betaninas (pigmentos rojos-púrpura) y de 480 nm para betaxantinas (pigmentos amarillos). La absorbancia se midió en un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA). El contenido de betaxantinas y betaninas se reportó como mg equivalentes de betalainas por 100 g de base seca (EB/100 bs) y se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{mg/L} = \left\{ \frac{A \cdot FD \cdot PM \cdot 1000}{\epsilon \cdot l} \right\}$$

Dónde: A= Absorbancia a 535 o 480 nm; FD= Factor de dilución; PM= Peso molecular; ϵ = Coeficiente de extinción molar; l= Volumen de celda (0.316cm³)
 Coeficientes de extinción molar: Para betaninas: $\epsilon=60000 \text{ L/ (mol cm)}$. PM = 550 gr/mol; y para betaxantinas: $\epsilon=48000 \text{ L/ (mol cm)}$. PM= 308 gr/mol.

Análisis Estadístico

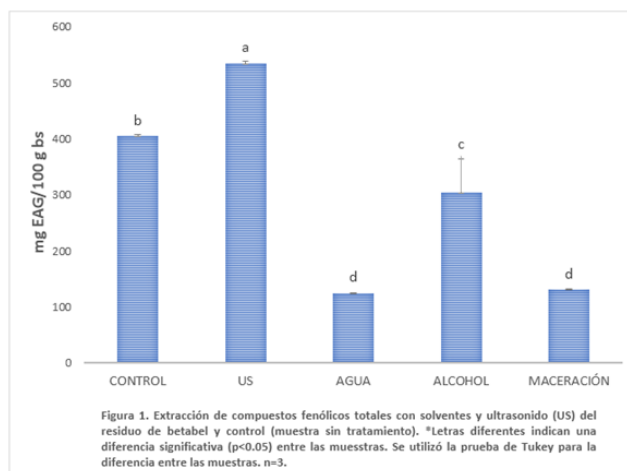
Los experimentos fueron realizados por triplicado, se realizó una análisis de varianza (ANOVA) y las diferencias entre las medias (\pm) desviación estándar (DE) fueron comparadas con una prueba de Tukey con una confiabilidad del 95%, utilizando el paquete estadístico SPSS versión 12.0.1, para Windows (SPSS Inc. Chicago, Illinois).

Resultados y discusión

Contenido de fenoles totales

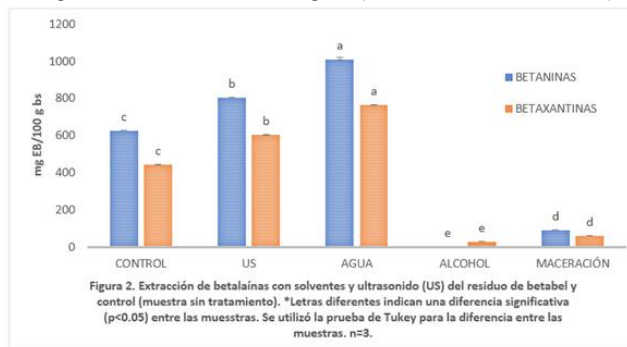
En la figura 1 se muestran los resultados obtenidos de CFT, observando que la muestra US (534.65 \pm 3.64 mg EAG/100 g bs) fue mayor significativamente ($p<0.05$) con respecto a todas las muestras. Este comportamiento fue similar a lo reportado por Zafra, et al. (2016), que comparó las extracciones convencionales (acuosa y alcohólica) con una muestra ultrasonificada del residuo de zarzamora (*Rubus fruticosus*), donde el incremento de compuestos fenólicos totales fue mayor del 35%. Los altos valores

obtenidos en la muestra US se deben a que el ultrasonido genera reducción de partículas haciéndolas más pequeñas y liberando sus compuestos (Pasquel et al., 2014)



Contenido de betaninas y betaxantinas

Se ha encontrado en estudios que en las partes no comestibles de diferentes alimentos como manzana, durazno y uvas hay hasta 10 veces más de betalainas que en las partes comestibles, principalmente los pigmentos rojos del epicarpio (Tenore, et al., 2012; Koubaa, et al, 2016). En la figura 2 se observa que la muestra US obtuvo mayor contenido de betaninas y betaxantinas (804.50 \pm 2.21 y 602.41 \pm 1.55 mg EB/100 g bs) que el control. Sin embargo, la extracción acuosa, fue el método con mayor diferencia significativa ($p<0.05$), obteniendo valores de 1009.01 \pm 8.86 y 764.18 \pm 2.11 mg EB/100 g bs, respectivamente. Este comportamiento fue similar a lo reportado por Yahia y Castellanos-Santiago (2008), donde realizaron extracciones con diferentes muestras de tuna la extracción más eficaz fue la acuosa, presentando los valores más altos de betalainas, atribuyéndose a que las betalainas son cromoalcaloides nitrogenados solubles en agua (Chauhan, et al., 2013).



Conclusión

El extracto obtenido por ultrasonido presentó mayores valores de compuestos fenólicos en comparación a todas las muestras, y aunque para betalainas, la muestra extraída con agua obtuvo los mayores resultados, la muestra ultrasonificada obtuvo mejor eficacia que el control. Por lo que el uso de esta tecnología emergente sin el uso de solventes podría ser utilizada como un método de extracción para compuestos bioactivos.

Referencias

- [1] Castellanos-Santiago, E., & Yahia, E. M. (2008). Identification and quantification of betalains from the fruits of 10 Mexican prickly pear cultivars by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(14), 5758-5764.
- [2] Chauhan, S. P., Sheth, N. R., Rathod, I. S., Suhagia, B. N., & Maradia, R. B. (2013). Analysis of betalains from fruits of *Opuntia* species. *Phytochemistry reviews*, 12(1), 35-45.
- [3] Czapski, J., Mikołajczyk, K., & Kaczmarek, M. (2009). Relationship between antioxidant capacity of red beet juice and contents of its betalain pigments. *Polish journal of food and nutrition sciences*, 59(2).
- [4] Goñi, I., & Hervert-Hernández, D. (2011). By-products from plant foods are sources of dietary fibre and antioxidants. In *Phytochemicals-bioactivities and impact on health*. IntechOpen.
- [5] Ignat, I., Volf, I., Popa, V. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food chemistry*, 126(4), 1821-1835.
- [6] Koubaa, M., Barba, F. J., Grimi, N., Mhemdi, H., Koubaa, W., Boussetta, N., & Vorobiev, E. (2016). Recovery of colorants from red prickly pear peels and pulps enhanced by pulsed electric field and ultrasound. *Innovative food science & emerging technologies*, 37, 336-344.
- [7] Kujala, T. S., Loponen, J. M., Klika, K. D., & Pihlaja, K. (2000). Phenolics and betacyanins in red beetroot (*Beta vulgaris*) root: Distribution and effect of cold storage on the content of total phenolics and three individual compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5338-5342.
- [8] Li, H., Chen, B., & Yao, S. (2005). Application of ultrasonic technique for extracting chlorogenic acid from *Eucommia ulmoides* Oliv. (*E. ulmoides*). *Ultrasonics Sonochemistry*, 12(4), 295-300.
- [9] Makris, D. P., Boskou, G., & Andrikopoulos, N. K. (2007). Recovery of antioxidant phenolics from white vinification solid by-products employing water/ethanol mixtures. *Bioresource technology*, 98(15), 2963-2967.
- [10] Merken, H. M., & Beecher, G. R. (2000). Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 48(3), 577-599.
- [11] Ravichandran, K., Saw, N. M. M. T., Mohdaly, A. A., Gabr, A. M., Kastell, A., Riedel, H., & Smetanska, I. (2011). Impact of processing of red beet on betalain content and antioxidant activity. *Food Res. Int.* 50, 2011, pp. 670-675.
- [12] Reátegui, J. L. P., da Fonseca Machado, A. P., Barbero, G. F., Rezende, C. A., & Martínez, J. (2014). Extraction of antioxidant compounds from blackberry (*Rubus* sp.) bagasse using supercritical CO₂ assisted by ultrasound. *The Journal of Supercritical Fluids*, 94, 223-233.
- [13] Ruberto, G., Renda, A., Daquino, C., Amico, V., Spatafora, C., Tringali, C., & De Tommasi, N. (2007). Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. *Food Chemistry*, 100(1), 203-210.
- [14] Sáyago-Ayerdi, S. G., & Goñi, I. (2010). *Hibiscus sabdariffa* L.: source of antioxidant dietary fiber. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 60(1), 79-84.
- [15] Stintzing, F. C., Herbach, K. M., Mosshammer, M. R., Carle, R., Yi, W., Sellapan, S., Akoh, C. C., Bunch, R. & Felker, P. 2005. Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) clones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(2): 442-451.
- [16] Tenore, G. C., Novellino, E., & Basile, A. (2012). Nutraceutical potential and antioxidant benefits of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) extracts. *Journal of functional foods*, 4(1), 129-136.
- [17] Vulic, J.J., Tumbas, V.T., Savatović, S.M., Đilas, S.M., Četković, G.S., & Čanadanović-Brunet, J.M. (2011). Polyphenolic content and antioxidant activity of the four berry fruits pomace extracts. *Acta periodica technologica*, (42), 271-279.
- [18] Zafra-Rojas, Q., Cruz-Cansino, N., Quintero-Lira, A., Gómez-Aldapa, C., Alanís-García, E., Cervantes-Elizarrarás, A., ... & Ramírez-Moreno, E. (2016). Application of ultrasound in a closed system: optimum condition for antioxidants extraction of blackberry (*Rubus fruticosus*) residues. *Molecules*, 21(7), 950.