Obtención de Extractos Hidro-Alcohólicos de Limoncillo (*Cymbopogon citratus*) como Antioxidante Natural

Armando Alvis*, Walter Martínez, Guillermo Arrazola

Universidad de Córdoba, Programa de Ingeniería de Alimentos, Facultad de Ciencias Agrícolas, Grupo de Investigación Procesos y Agroindustria de Vegetales, Carrera 6 No 76- 103, Km 3, vía Cereté. Córdoba-Colombia (e-mail: aalvis2@hotmail.com)

* Autor a quien debe dirigirse la correspondencia

Recibido May. 12, 2011; Aceptado Jun. 30, 2011; Versión Final recibida Sep. 15, 2011

Resumen

Se determinó la actividad antioxidante del extracto hidro alcohólico de limoncillo, mediante dos métodos: i) 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico (ABTS); y ii) reductor férrico de poder antioxidante (FRAP). Se determinó también el contenido de fenoles empleando el reactivo de Folin Ciocalteu y se evaluó la efectividad *in vivo* de dicho extracto usando grasa como matriz oxidante y el método de Rancimat. El etanol al 50% v/v, resultó ser el mejor solvente para extraer los constituyentes bioactivos capaces de estabilizar el material lipídico proveniente de la grasa de cerdo y protegerlos frente a la oxidación. De acuerdo con los resultados el extracto de limoncillo exhibe un elevado contenido de compuestos fenólicos anti radicales y un alto poder reductor. En cuanto a la efectividad antioxidante se encontró que el extracto con una concentración de 250 ppm logra duplicar el tiempo de inducción con respecto a la grasa control.

Palabras clave: extracto hidro-alcohólico, limoncillo, *Cymbopogon citratus*, antioxidantes

Obtaining Hydro-alcoholic Extracts of Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) as a Natural antioxidant

Abstract

The antioxidant activity of hydro-alcoholic extract of lemongrass was determined using two methods: i) 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS); and ii) ferric reducing antioxidant power (FRAP). The content of phenols using the Folin Ciocalteu reactant was also determined and the *in vivo* effectiveness of this extract using lard as a parent oxidant and the Rancimat method was evaluated. Ethanol 50% v/v was the best solvent to extract the bioactive constituents capable of stabilizing the lipid material from pork fat and protect it against oxidation. According to the results lemongrass extract exhibits a high antiradical phenolic compound content and a high reducing power. Regarding the antioxidant effectiveness it was found that lemongrass extract with a concentration of 250 ppm can double the time of induction with respect to the control fat.

Keywords: hydro-alcoholic extract, lemongrass, *Cymbopogon citratus*, antioxidant

INTRODUCCIÓN

El limoncillo (*Cymbopogon citratus*) es una hierba perenne, perteneciente a la familia de las poaceas. Es reconocida como una de las plantas medicinales más usadas en América Latina, por sus múltiples usos terapéuticos y su agradable aroma a limón (Carbajal, 1991; Miranda, 1995; Cápiro et al., 2001). Por otro lado en la hoja de limoncillo se han identificado algunos compuestos antioxidantes entre los cuales están isoorientina 2-O-ramnósido, isoorientina y swertiajaponina este último con mayor capacidad antioxidante (Montoya et al., 2003; Cheel et al., 2005; Orrego y Leiva, 2008).

Recientemente, se ha encontrado que los aceites esenciales de limoncillo (LG) y la canela contienen algunas propiedades anti fúngicas y poder antioxidante siendo utilizadas en plátanos (Maqbool et al., 2010b). Además, el limoncillo ha demostrado su actividad como antiinflamatorios ya que pueden estar involucrados en los efectos inhibidores por la producción de citoquinas, como también, diuréticos antisépticos, actividades neuroconductuales, antimicrobianos y fungistático; el extracto de limoncillo ejerce una acción antiinflamatoria ya que pueden estar involucrados. Bachiega et al. (2011) reportan que el extracto de limoncillo puede ser un posible factor de inhibición del factor de transcripción NF-B.

Especies comunes de plantas medicinales se utilizan como fórmulas de post-parto y en suplementos alimenticios entre estos se encuentran: *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis, *Basella alba* L., *Ricinus communis* L., *Poikilospermum suaveolens* (L.) Merr., *Gouania leptostachya* DC. Var. *leptostachya*, *Schefflera* sp. cf. *Schefflera bengalensis* Gamb., *Blumea balsamifera* (L.) DC., *Chromolaena odoratum* (L.) King et Robin and *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (Kannika Panyaph et al., 2011).

La mayoría de hierbas aromáticas contienen compuestos antioxidantes que son sustancias capaces de retardar la oxidación de los compuestos lipídicos presentes en alimentos, disminuyendo de esta manera su deterioro durante el almacenamiento. La oxidación es causada por un conjunto de reacciones complejas, siendo particularmente importantes las reacciones de radicales libres (Martinello y Pramparo, 2005). Dichos compuestos pueden ser de origen natural o sintético hoy los más usados en la industria, dentro de este último grupo se encuentra el Hidroxianisol Butilado (BHA), Hidroxitolueno Butilado (BHT) y Ter Butil Hidroquinona (TBHQ). Estos compuestos han sido cuestionados en cuanto a su seguridad dado que sospecha que son perjudiciales para la salud (Ree et al., 2001).

Debido a lo anterior, en la actualidad existe una importante presión del medio consumidor que incentiva la obtención de productos que provengan de fuentes naturales. Por lo tanto esta investigación tuvo como objetivo determinar la actividad y efectividad antioxidante del extracto de limoncillo como antioxidante natural.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con hojas de limoncillo (*Cymbopogon citratus*) se recolectaron aleatoriamente en los meses de octubre y noviembre del año 2009, en los campos de la cadena de plantas aromáticas de la ciudad de Montería (Córdoba, Colombia) ubicada a 18 msnm y una temperatura promedio de 27 °C. Las muestras se secaron en estufa Memmert con circulación forzada de aire a 50 °C ± 1 . El material seco se homogenizó empleando un molino de cuchillas Grindomix, modelo GM200 de alta velocidad (tamaño de partícula máximo de 0.5 mm.). El material seco y homogenizado se almacenó en una desecadora durante la realización de los ensayos programados.

Influencia del grado alcohólico

Los extractos fueron preparados empleando un agitador FISCHER ISOTEMP, modelo 11-102-495H a 1200 r.p.m.; para ello se pesó $1,0 \pm 0,1$ g del material almacenado y se le adicionó 20 mL de disolvente (mezcla de etanol/agua) a diferentes concentraciones desde cero (0) (agua pura) hasta 100 % (equivalente a etanol al 95 %), en tubos con tapas rosca durante una hora. El contenido de fenoles se determinó siguiendo el procedimiento descrito por Slinkard y Singleton (1977) empleando el reactivo de Folin-Ciocalteu. Se tomó una alícuota de 50 μ L de los extractos

convenientemente diluido y se le adicionó 2500 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido (1:10), cinco minutos más tarde se agregó 2000 µL de solución 7,5 % de carbonato de sodio. Esta mezcla de reacción se dejó en reposo durante dos horas. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro GENESYS 20 a 765nm y se empleó ácido gálico como sustancia de referencia para la curva de calibración. El contenido total de fenoles se expresó (mg ácido gálico/Litro). Todas las determinaciones analíticas se realizaron por triplicado. Encontrada la concentración alcohólica más apropiada para la extracción de los compuestos fenólicos de las hojas de limoncillo, se procedió a la obtención de los correspondientes extractos. Los mismos fueron convenientemente diluidos e inmediatamente analizados por triplicado para determinar la capacidad antioxidante mediante los ensayos *FRAP* y *ABTS*

Ensayo FRAP (Ferric Reducing Activity Power)

Se realizó de acuerdo con el procedimiento propuesto por (Benzie y Strain, 1996). El mismo consistió en añadir 1500 µL del reactivo FRAP recién preparado a 50 µL de extracto en un tubo de ensayo. La reacción se efectuó a 37°C±1 y se leyó la absorbancia a 593 nm, mediante espectrofotómetro Genesys 20, luego de transcurrido 30 minutos. La curva de calibración de Fe²⁺ se hizo preparando soluciones de concentración conocida en el intervalo de 200 a 1500 µM de Fe²⁺ en medio acuoso, empleando la sal de Mohr [Fe(NH₄)₂SO₄·6H₂O].

La actividad antirradical

Se realizó empleando el radical catiónico ABTS^{•+}. [(ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)], que se obtuvo a través del persulfato de potasio, siguiendo el método propuesto por Re et al, (1999) se dejó 10 minutos como tiempo final de la reacción de decoloración del radical ABTS. Un (1) mL de la solución diluida de radical ABTS (con absorbancia 1,00 ± 0,02 UA) se añadió a un tubo de ensayo que contenía 50 µL de extracto y a otro conteniendo 50 µL del disolvente el cual se tomó como referencia. Una vez transcurrido los diez minutos se leyó la absorbancia de ambos a 734 nm. La curva de calibración se preparó tomando como sustancia de referencia el Trolox, (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-2-cromanocarboxílico) considerado análogo de la vitamina E, en concentraciones entre cero (0) y 7 µM. La variación de las réplicas analíticas siempre fueron menor al 10% para ambos ensayos en caso contrario, los análisis eran repetidos para confirmar el valor. La capacidad antioxidante se expresó en mg de Trolox /100ml.

Finalmente se midió la efectividad antioxidante *in vivo*, el ensayo fué llevado a cabo empleando el equipo RANCIMAT modelo 743 (Metrohm, Suiza), para ello se empleó como matriz oxidante grasa de cerdo sin adición alguna de antioxidante (extraída por prensado a temperatura ambiente 27 °C). La temperatura de reacción fue de 110 °C ±1 y el flujo de aire de 20 L/h. El extracto etanólico previamente calculado fueron añadidos a los tubos de reacción conteniendo 3,0 ± 0,1 g de grasa, a fin de tener una concentración final de compuestos fenólicos antioxidantes entre 0 y 100 mg/Kg.

La relación entre los tiempos de inducción de la grasa control y la grasa conteniendo antioxidantes fue la base para la evaluación de la efectividad antioxidante. El efecto de la actividad antioxidante de los extractos de limoncillo fue expresado como Factor de Protección, calculado de acuerdo con la siguiente expresión (1):

$$\text{Factor de protección (F.P.)} = \frac{\text{Tiempo de inducción de la grasa estabilizada}}{\text{Tiempo de inducción de la grasa control}} \quad (1)$$

Diseño experimental.

Para la determinación de la concentración alcohólica más apropiada en la extracción de los compuestos fenólicos del limoncillo el factor fue: concentración alcohólica en cinco niveles (100% agua), (25:75 etanol /agua), (50:50 etanol /agua), (75:25 etanol /agua), (95% etanol), y para la efectividad antioxidante *in vivo* el factor fue la concentración antioxidantes en cinco niveles con tres repeticiones para cada tratamiento. Una vez obtenidos los datos experimentales se procedió a la aplicación del análisis de varianza (ANOVA) sobre las variables respuestas estudiadas para

verificar las diferencias estadísticas entre los tratamientos. Posteriormente, se aplicó el test de rangos múltiples de Duncan a un nivel de significancia del 5 %. Para el análisis e interpretación de los datos experimentales se utilizó el software estadístico STATISTICA, versión 8.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El grado alcohólico tiene efecto significativo ($p < 0.05$) en la extracción de los compuestos fenólicos contenidos en las hojas de limoncillo. La figura 1, muestra el comportamiento de la extracción de los compuestos antioxidantes contenidos en las hojas de limoncillo a diferentes concentraciones etanolicas.

Fig. 1: Influencia del grado alcohólico en la extracción de los compuestos fenólicos para limoncillo, empleando soluciones de etanol como disolvente. (* Para 0%, corresponde a agua pura ** el alcohol empleado fue etanol)

Como se evidencia en la figura 1 los compuestos fenólicos extraídos aumentan cuando aumenta la concentración alcohólica, sin embargo este fenómeno solo se presenta hasta cuando se alcanza una concentración de etanol del 50%, concentración a la cual se obtiene la máxima extracción de dichos compuestos de allí en adelante el grado alcohólico no mejora la extracción de dichos compuestos.

Orrego y Leiva (2008), encontraron que los compuestos fenólicos mayoritarios y responsables de la actividad biológica del limoncillo son: isoorientina, swertiajaponina e isoorientina 2-O-ramnósido, estos compuestos se caracterizan por ser solubles en soluciones etanolicas. Una posible explicación del comportamiento que sigue la extracción de los compuestos fenólicos, puede atribuírsele a la polaridad de los diferentes compuestos presentes en el extracto, lo cual deja entender que dichos compuestos tienen una polaridad muy semejante a la que se alcanza en una solución etanol- agua (1:1). Lo cual optimiza su extracción.

La caracterización del extracto de limoncillo en cuanto a su actividad fenólica y antioxidante obtenido a una concentración etanólica del 50% v/v se presenta en la tabla 1.

Tabla 1. Caracterización del extracto de limoncillo en cuanto a su actividad antioxidante y contenido fenólico.

Extracto	Fenoles mg/L ²	ABTS ³	FRAP ⁴
Limoncillo	404,4(3,2)	1477 (4,1)	4146,9 (12,1)

Los valores de fenoles, ABTS y FRAP Corresponden a media y entre paréntesis la desviación estándar (n=3) ² mg de ácido gálico/L; ³ mg de Trolox/L; ⁴ μmoles de Fe²⁺/L.

Los resultados encontrados muestran que el extracto de limoncillo, posee un elevado contenido de compuestos anti radicales y un alto poder reductor, mayores a los que exhibieron otras plantas aromáticas como hierba buena, menta, perejil en las cuales la mayor actividad antirradical y reductora fue de 161 mg/L y 404 micro moles del catión ferrico/L (Rodríguez et al., 2006).

La efectividad antioxidante del extracto se explica por las figuras 2 y 3

Fig. 2: Tiempos de inducción de la grasa control y estabilizada a diferentes concentraciones fenólicas

La efectividad antioxidante de dichos compuestos se comprobó empleando grasa de cerdo en la cual se observó que los compuestos fenólicos presentes en las hojas de limoncillo neutralizan los radicales formados por las condiciones drásticas a la que es sometida la matriz oxidante, lo cual se evidenció por el aumento lineal de los tiempos de inducción de la grasa estabilizada con dicho extracto. Gianni et al. (2005) evaluando 11 muestras de aceites esenciales en la cual está el limoncillo, encontraron la capacidad de compuestos antioxidantes, para controlar la degradación de matrices lipídica, para lo cual utilizaron (1, 1 – difenil – 2 - picrilhidrazil) (DPPH). En el ensayo DPPH, los compuestos fenólicos con actividad antioxidante, que forman parte de los presentes en *C. odorata*, *C. citratus*, *R. officinalis* y *C. longa* mostraron importante eficacia, con una inhibición radical que van desde 0,42 hasta $64,3 \pm 59,6 \pm 0,45\%$.

Finalmente se evidencia que el extracto de limoncillo ejerce un marcado e importante efecto protector de la grasa contra la oxidación, lo cual es atribuible a los compuestos antioxidantes presentes en el extracto, figura 3.

En la figura 3 se evidencia que los compuestos presentes en el extracto comienzan ejercer protección a la matriz grasa con la menor concentración empleada (50 ppm). (Valenzuela y Nieto, 1995).

Lo anterior conduce a plantearse que el poder antioxidante de esta planta es debido al elevado contenido de fenoles, pues este es relativamente elevado y está representado por fenoles solubles en un sistema agua-etanol (1:1), figura 1. Aunque no se puede descartar la existencia de otras sustancias que también contribuyan a esa actividad antioxidante tan elevada, los aceites esenciales pueden ser una fuente fácilmente accesible de nuevos compuestos con propiedades antioxidantes (Bassolé et al., 2001). Por otra parte se pone de manifiesto la alta efectividad de dichos compuestos en la estabilización de la grasa de cerdo, en la cual alcanza a doblar el tiempo de inducción con respecto a la grasa control o no estabilizada empleando tan solo una concentración de 250 ppm.

Fig. 3: Efecto Protector del extracto de limoncillo a la grasa de cerdo.

CONCLUSIONES

El extracto de limoncillo exhibe un alto contenido de compuestos fenólicos antirradicales, y un alto poder reductor, incluso logrando sobrepasar a otras plantas aromáticas estudiadas por otros autores y reconocidas por el elevado contenido en dichos compuestos. En cuanto a la efectividad antioxidante se encontró que el extracto alcanza un factor protector de dos con una concentración de 250 ppm, ó lo que es lo mismo logra duplicar el tiempo de inducción con respecto a la grasa control. Los compuestos antioxidantes encontrados en las infusiones de limoncillo mostraron efectividad antioxidante en la estabilización de la grasas presentando una alternativa para la industria de alimentos, de embutidos crudos y curados.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su total agradecimiento a la Universidad de Córdoba, grupo de Investigación Procesos y Agroindustria de Vegetales, Codecyt y al Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria (IIIA).Habana. Cuba.

REFERENCIAS

- Bachiega, T. F y J.M. Sforzi, *Lemongrass and citral effect on cytokines production by murine macrophages*. *Journal of Ethnopharmacology* 137, 909–913 (2011).
- Bassolé, I.H.N., A. Lamien-Meda, B. Bayal, L.C. Obame, A.J. Ilboud, C. Franz, J. Nova, R.C.Nebie y M.H. Dicko, *Chemical composition and antimicrobial activity of Cymbopogon citratus and Cymbopogon giganteus essential oils alone and in combination*. *Phytomedicine* 18, 1070–1074 (2011).
- Benzie, I. y J. Strain, *The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay*. *Anal biochem* 239 (2), 70-76 (1996).
- Capiro, N., L. Sánchez, G. Fonseca, L. Baluja, y E. Borges, *Capacidad protectora de Cymbopogon citratus (DC) Stapf. Ante el daño genético inducido por estrés oxidativo*. *Rev Cubana Invest Biomed* 20 (1) 33-8 (2001).
- Carbajal, D., *Pharmacological screening of decoction commonly used in Cuba folk medicine*. *Journal Ethnopharmacol.* 33(1), 21-41 (1991).

Cheel, J.C., J. Theoduluz, J. Rodriguez y Schmeda-Hirschmann, *Free radical scavengers and antioxidants of rom lemongrass (Cymbopogon citrates (DC) Stapf)*. Journal Agricultural Food Chemistry, 53, 2511-2517 (2005).

Gianni Sacchetti, Silvia Maietti, Mariavittoria Muzzoli, Martina Scaglianti, Stefano Manfredini, Matteo Radice y Renato Bruni, *Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods*. Food Chemistry 91, 621–632 (2005).

Kannika Panyaph, Tran Van On, Panee Sirisa-Ard, Pratchaya Srisa-Nga, Sunee ChansaKaow y Surapol Nathakarnkitku, *Medicinal plants of the Mien (Yao) in Northern Thailand and their potential value in the primary healthcare of postpartum women*. Journal of Ethnopharmacology 135, 226–237 (2011)

Maqbool, M., A. Ali y P.G. Alderson,. *Effect of cinnamon oil on incidence of anthracnose disease and postharvest quality of bananas during storage*. Int. J.Agric. Biol. 12, 516–520 (2010b)

Martinello, M y M. Pramparo, *Poder Antioxidante de Extractos de Romero Concentrados por destilación Molecular*. Información tecnológica16 (5)17-20 (2005).

Miranda, M., *Programa nacional de plantas medicinales*. Rev Cubana Farm, 30:95 (1995).

Montoya, B., V. Lemeshko, J. López, A. Pareja, A. Urrego y R. Torres, *Actividad antioxidante de algunos extractos vegetales*. Vitae 10(2) 72-79 (2003).

Orrego, C. y R. Leiva, *Efecto de antioxidantes derivados de productos naturales, sobre la modificación oxidativa in vitro, de lipoproteínas de baja densidad (LDL)*. Tesis de maestría. Universidad de Talca, Talca. (2008).

Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, *Antioxidant activity applyng an improved ABTS radical cation decolorization assay*. Free Radic. Biol. Med., 1231-1237 (1999).

Ree, M., H. Fujiwara y D. Thompson, *Comparative metabolism, covalent binding and toxicity of BHT congeners in rat liver slices*. Chemico-Biological Interactions 138, 155–170 (2001)

Rodríguez, J., O. Valdez y A. Alemán, *Evaluación de la actividad antioxidante de cinco hierbas aromáticas*. Revista Ciencia y Tecnología de Alimentos 16(1): 30 – 36 (2006).

Slinkard, K. y V. Singleton, *Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods*, Journal Enol. Vitic. 28(1) 49-55 (1977).

Valenzuela, A. y S. Nieto, *Los antioxidantes protectores de la calidad en la industria alimentaria*. Aceites y Grasas 310-321 (1995).