

## EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES A PARTIR DE HOLLEJO DE UVA

*Luis Cruz\**, Guido Riera, Beatriz Zumalacárregui y Maylín Varela

*Facultad de Ingeniería Química, Instituto Superior Politécnico "José Antonio Echeverría", Ave. 114, No. 11901, Marianao, C.P. 19 390, La Habana, Cuba.*

*E-mail: lcruz@quimica.cujae.edu.cu*

### RESUMEN

Numerosos estudios reportados demuestran el carácter antioxidante de los polifenoles y sus beneficios para la salud humana. Se determinaron las condiciones más adecuadas para la extracción de polifenoles a partir de hollejo de uva. El material experimental fue previamente secado y molido. Las extracciones se realizaron a 55 °C, relación soluto-disolvente de 1:10 (m/v) durante 2,5; 4,0; 4,5 y 6 h, empleando como disolventes etanol, mezcla etanol-agua 1:1 (v/v), acetato de etilo y agua. Se realizaron extracciones a 35, 45, 55 y 65 °C, relaciones soluto-disolvente (m/v) de 1:5 y 1:10, con el disolvente y el tiempo resultantes de los primeros experimentos. Todas las extracciones fueron por contacto directo. La mezcla etanol-agua, a temperaturas entre 45 y 55 °C y con relación soluto-disolvente de 1:10 reportó los mayores valores de actividad antioxidantes, para un tiempo de extracción de 4 h.

**Palabras clave:** polifenoles, extracción, hollejo de uva, actividad antioxidante.

### ABSTRACT

#### **Polyphenol extraction from grape skin**

Many studies reported in the literature show the polyphenol's antioxidant character and their advantages for the human health. It was determined the more adequated conditions for the polyphenol extraction from the skin of grape. The experimental material was previously dried and milled. The extractions were developed to 55 °C, solute-solvent ratio of 1:10 (m/v) during 2.5; 4.0; 4.5 and 6 h employing ethanol, mixture ethanol-water 1:1 (v/v), ethyl acetate and water as solvents. Subsequently, extractions to 35, 45, 55 and 65 °C, solute-solvent ratios of 1:5 and 1:10 (m/v), were developed with the solvent and time obtained as a result of the first experiments. All extractions were by direct contact. The mixture ethanol-water, to temperature between 45 and 55 °C with 1:10 as solute-solvent ratio reported the bigger values of the antioxidant activity, with an extraction time of 4 h.

**Key words:** polyphenols, extraction, grape skin, antioxidant activity.

### INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas la reducción del impacto ambiental causado por la eliminación de desechos industriales ha sido un tema de creciente interés (1, 2).

La industria productora de vinos de uva origina, a nivel mundial, importantes volúmenes de residuos sólidos con elevados contenidos de compuestos fenólicos, los cuales ejercen efectos favorables en la salud humana debido a su elevada actividad antioxidante (3, 4). La extracción de los citados compuestos no solo disminuiría el impacto ambiental de los residuos, sino también permitiría un aprovechamiento más completo de la materia prima.

---

*\*Luis Cruz Viera: Ingeniero Químico (U.H., 1971). Especialista en Industria Alimentaria (ISPJAE, 1979). Doctor en Ciencias Técnicas (Cuba, 1989). Profesor Titular de la Facultad de Ingeniería Química del ISPJAE. Coordinador de la Maestría en Ingeniería Alimentaria. Desarrolla investigaciones en el campo de la conservación y el procesamiento de alimentos. Coordinador de proyectos internacionales.*

El objetivo del presente trabajo fue determinar las condiciones de operación más adecuadas para la extracción de polifenoles a partir del hollejo de la uva.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon hollejos de uvas (*Vitis vinífera* L.) var. *Tempranillo*, cosechadas en la provincia de Pinar del Río, los que, a su recibo, fueron envasados en bolsas de polietileno y conservados en congelación hasta su empleo.

Previo al proceso de extracción se procedió al secado del hollejo en una estufa marca AISET YLD6000 con precisión de 0,1 °C. Para el pesado de las muestras se dispuso de una balanza de precisión 0,01 g. La temperatura fue 60 °C y el secado se extendió por un período de 6 h, tiempo para el cual la humedad, expresada en base húmeda, resultó menor de 10 %. Para la reducción del tamaño de partícula se empleó un molino doméstico, seleccionando tamaños menores de 1 mm a partir de un tamizado.

La extracción se desarrolló por contacto directo. El sistema empleado estuvo compuesto por un matraz de tres bocas, en una de las cuales se conectó un condensador de reflujo para mantener invariable la relación soluto-disolvente, mientras que en otra se dispuso un agitador de vidrio conectado a un motor que mantuvo la agitación en 100<sup>-1</sup>. La boca restante estuvo destinada a la extracción de muestras. El matraz se sumergió en un baño de agua (precisión de 1 °C), con el objetivo de que la extracción se efectuara a la temperatura establecida.

La experimentación se encaminó, de manera inicial, a determinar el disolvente más apropiado así como el tiempo de extracción requerido. Las extracciones se llevaron a cabo a 55 °C, relación soluto-disolvente (m/v) de 1:10 y tiempo de extracción de 4 h, con los disolventes etanol, mezcla etanol-agua 1:1 (v/v), acetato de etilo y agua. Para determinar el avance de la extracción con el tiempo, esta se desarrolló a 45 °C, relación soluto-disolvente (m/v) de 1:10 y como disolvente el que reportó mejores resultados de los antes señalados, estableciendo como tiempos de extracción 2,5; 4,0; 4,5 y 6 h. Para determinar la influencia de la temperatura de extracción y la relación soluto-disolvente, se seleccionaron las temperaturas de 35, 45, 55 y 65 °C, y las relaciones (m/v) de 1:5 y 1:10. Todas las extracciones se efectuaron por triplicado.

La actividad antioxidante total se determinó mediante un procedimiento descrito (5), modificado posteriormente (6), a partir de la curva de calibración de una sal de amonio férrica ( $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) mediante la siguiente expresión:

$$AAT = \frac{(A - \frac{a}{b}) \cdot Vt \cdot Fd \cdot 1000}{PM} \quad (1)$$

donde: AAT: actividad antioxidante total; A: absorbancia del extracto; *a*: intercepto de la curva de calibración;

*b*: pendiente de la curva; *Fd*: factor de dilución; *Vt*: volumen total del extracto (mL); *PM*: peso de la muestra (g).

La actividad antioxidante total se expresó en g Fe<sup>2+</sup>/g de muestra.

Para determinar el tiempo de extracción y el disolvente a emplear se realizaron análisis de varianza y la prueba de rangos múltiples ( $p=0,05$ ).

Para determinar el comportamiento de la actividad antioxidante total con la temperatura y la relación soluto-disolvente, se ajustó el siguiente modelo:

$$AAT = b_0 + b_1T + b_2SS + b_3T^2 + b_4T \cdot SS \quad (2)$$

donde: *T*: temperatura; *SS*: relación soluto-disolvente.

La Tabla 1 reporta la codificación de las variables contempladas en el modelo.

La constante cinética se determinó a partir del método de las lambdas (7), partiendo de la suposición de que el proceso se correspondía con una cinética de primer orden (8, 9):

$$\ln(\lambda_\infty - \lambda_t) = \ln(\lambda_\infty - \lambda_0) - kt \quad (3)$$

Tabla 1. Codificación de las variables

Relación soluto-disolvente	SS	Temperatura (°C)	T	T <sup>2</sup>
1:5	-1	35	-3	+1
1:10	+1	45	-1	-1
		55	+1	-1
		65	+3	+1

donde:  $\lambda_{\infty}$ : absorbancia a dilución infinita;  $\lambda_t$ : absorbancia en un instante de tiempo;  $\lambda_0$ : absorbancia inicial;  $k$ : constante cinética, h<sup>-1</sup>;  $t$ : tiempo, h.

Para esta determinación solamente se tuvieron en cuenta los resultados correspondientes a la relación soluto-solvente de 1:10 (m/v).

La energía de activación del proceso se calculó a partir de las constantes cinéticas determinadas mediante su ajuste a una ecuación tipo *Arrhenius*:

$$\ln k = \ln A - \frac{Ea}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (4)$$

donde:  $Ea$ : energía de activación, kJ/kmol;  $k$ : constante cinética, k<sup>-1</sup>;  $n$ : orden de la reacción;  $R$ : constante de los gases ideales, kJ/(kmol.K);  $T$ : temperatura, K.

Para el procesamiento estadístico de toda la información experimental se empleó el programa Statgraphics Plus 5.1.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Fig. 1 representa la actividad antioxidante de los extractos obtenidos para cada uno de los disolventes investigados. La mezcla etanol-agua reportó una extracción significativamente superior ( $p=0,05$ ) a la obtenida con los restantes disolventes. Este comportamiento puede tener como origen la afinidad de los cita

dos compuestos con los polifenoles y su facilidad para formar puentes de hidrógeno con ellos (10). Estos resultados coinciden con los reportados (11). De manera general, en la literatura se reconoce la influencia del disolvente empleado sobre la extracción (2); un marcado incremento en el contenido de polifenoles es reportado para el caso de extractos alcohólicos (12). No obstante, en dependencia del disolvente pueden aparecer en los extractos sustancias que pueden dificultar la purificación de los extractos, disminuyendo el rendimiento de los antioxidantes (13).

La Fig. 2 muestra que entre 4 y 4,5 h de extracción se alcanzó una actividad antioxidante significativamente superior ( $p=0,05$ ). Si 45 °C no resulta una temperatura elevada, un tiempo prolongado de exposición, como 6 h, puede provocar la degradación de los polifenoles extraídos. De manera general los resultados obtenidos se corresponden con los reportados (10, 14), los cuales establecen que los mejores tiempos de extracción se encuentran entre 1 y 8 h. Este amplio rango indica lo contradictorio de los criterios contenidos en la literatura acerca de la extensión del proceso (2, 12, 15, 16).

La Tabla 2 reporta el modelo estadístico que describe el comportamiento de la actividad antioxidante con la temperatura y la relación soluto-disolvente.

La Fig. 3 representa la superficie de respuesta correspondiente al modelo obtenido. La mayor actividad antioxidante se obtuvo para temperaturas entre 45 y 55 °C (-1 y +1, respectivamente) y una relación soluto-disolvente de 1:10 (+1). Aunque este comportamiento se manifiesta para ambas relaciones soluto-disolvente, se aprecia una disminución de la actividad antioxidante total, cuando esta relación toma su menor valor.

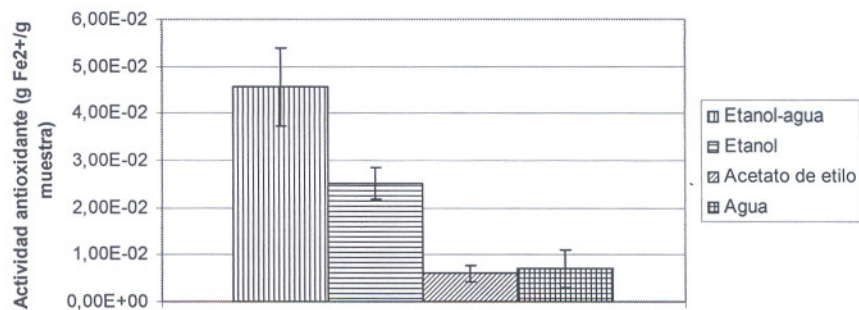


Fig. 1. Actividad antioxidante de los extractos obtenidos con cada disolvente. (letras iguales indican que no existen diferencias significativas)

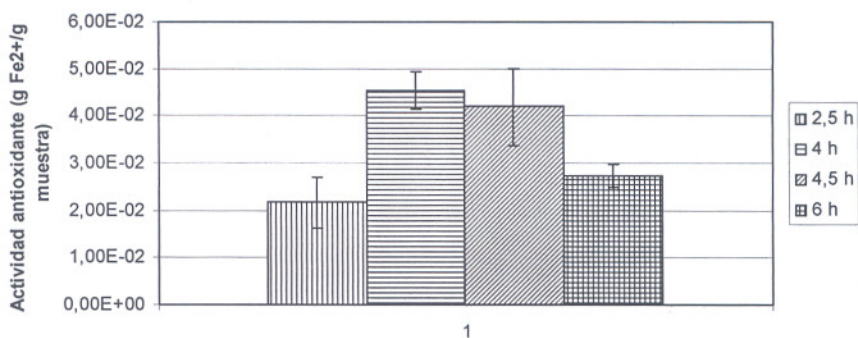


Fig. 2. Actividad antioxidante de los extractos con la mezcla etanol-agua y a 45 °C. (letras iguales indican que no existen diferencias significativas)

Tabla 2. Modelo estadístico que describe el comportamiento de la actividad antioxidante total con la temperatura y la relación soluto-disolvente

Variable	Coficiente
Término independiente	0,0454*
T	0,0002*
T <sup>2</sup>	0,0017*
T.SS	0,0007*

(\*)  $p \leq 0,01$

$R^2 = 92,04$

Error estándar de estimación = 0,0014

Error absoluto medio = 0,0010

Prueba de Durbin-Watson = 2,27 ( $p = 0,05$ )

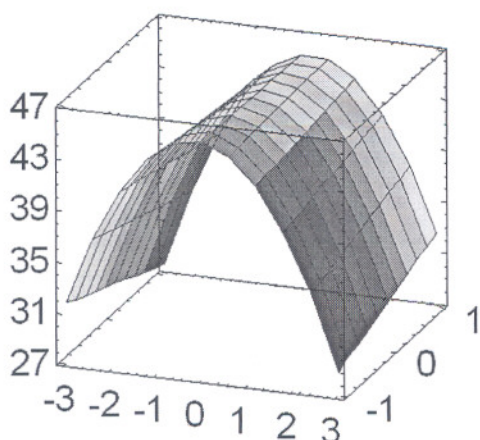


Fig. 3. Superficie de respuesta de la actividad antioxidante total (AAT), temperatura (T) y relación soluto-disolvente (SS).

La Fig. 3 muestra que el comportamiento de la actividad antioxidante con la relación soluto-disolvente varía en dependencia de la temperatura, lo que se corresponde con la inclusión del término de interacción, SS-T, en el modelo. La influencia de dicha interacción sobre la actividad antioxidante depende del solvente empleado (2). De 35 a 45 y 55 °C, la tendencia fue de un aumento de la actividad antioxidante. A 35 °C el efecto de la relación soluto-disolvente es contrario al descrito con anterioridad. Sin embargo, se aprecia que la diferencia entre la actividad antioxidante para la relación soluto-disolvente de 1:5 (31 g Fe<sup>2+</sup>/g de muestra) y 1:10 (28 g Fe<sup>2+</sup>/g de muestra) no resulta marcada, lo que pudiera indicar que a una temperatura de 35 °C, cercana a la ambiente, el efecto de la relación soluto-disolvente resulta prácticamente similar para los dos niveles investigados de dicha variable.

Por encima de 45 a 55 °C se produce una disminución de la actividad antioxidante, lo que puede estar motivado por la posible degradación de los polifenoles por su permanencia a las temperaturas de extracción más ele-

vadas. En la literatura se reporta la termosensibilidad de los polifenoles, en la cual se establece 60 °C como límite superior (17). Diversos autores plantean que si el aumento de la temperatura favorece la extracción por el incremento que ello provoca en la solubilidad de los solutos y en su difusividad, se produce la degradación de parte de los polifenoles (8, 18, 19).

La Tabla 3 reporta las constantes cinéticas para cada una de las temperaturas investigadas. La linealidad obtenida de los ajustes a la ecuación cinética de primer orden confirmó la suposición establecida. La Fig. 4 muestra la representación de ln k vs 1/T. La energía de activación fue de 26,81 kJ/mol. Para residuos de uva húmedos se ha reportado una energía de activación de 19,27 kJ/mol (20). El valor obtenido se aproxima al reportado de 27,5 kJ/mol para hollejos de uva de otra variedad (21), mientras que otros autores informaron valores de 49 y 54 kJ/mol (22).

Tabla 3. Constantes cinéticas correspondientes a las temperaturas de extracción

Temperatura (°C)	k (h <sup>-1</sup> )
35	1,7773
45	1,9889
55	2,7889

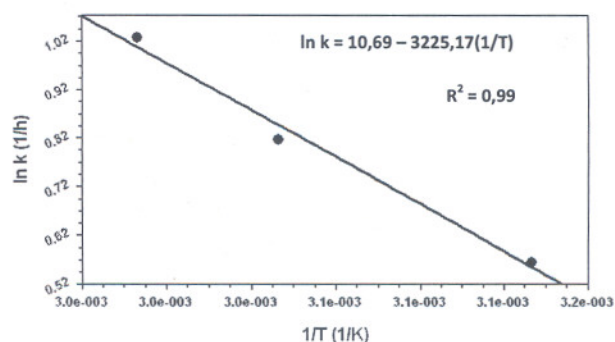


Fig. 4. Ajuste a un modelo tipo Arrhenius.

## CONCLUSIONES

Los mejores resultados dados por la actividad antioxidante de los extractos obtenidos, correspondieron al empleo de la mezcla etanol-agua como solvente y tiempo de extracción de 4 h. La temperatura y la relación soluto-disolvente, en interacción con la temperatura, determinan el comportamiento de la actividad antioxidante. Los mejores resultados se obtuvieron para una temperatura entre 45 y 55 °C y una relación soluto-disolvente de 1:10 (m/v). La cinética del proceso se correspondió con un primer orden, siendo la energía de activación de 26,81 kJ/mol.

## REFERENCIAS

1. Lafka, T. I.; Sinanoglou V. y Lazos E. S. *Food Chem.* 104: 1206-1214, 2007.
2. Spigno, G. y De Faveri, D. M. *J. Food Eng.* 78: 793-801, 2007.
3. Van de Wiel, A.; Van Golde, P. H. y Hart, H. C. *European J. Internal Medec.* 12: 484-489, 2001.
4. Khanna, S.; Venojarvi, M.; Roy, S.; Sharma, N.; Trikha, P. y Bagchi, D. *Free Radical Biol. Medec.* 33 (8): 1089-1096, 2002.
5. Benzie, I. F. y Strain, J. J. *Analytical Biochem.* 239: 70-76, 1996.
6. Pulido, R.; Bravo, L. y Saura-Calixto, F. *J. Agric. Food Chem.* 48: 3396-3402, 2000.
7. Frost, A. A. y Pearson, R. G. *Kinetics and mechanism*, La Habana, ed. Revolucionaria, 1968.
8. Spigno, G.; Tramelli, L. y De Faveri, D. M. *J. Food Eng.* 81: 200-208, 2007.
9. García, Y.; Núñez de Villavicencio, M.; Rodríguez, J. L.; Borrego, I. y Cruz, L. *Cienc. Tecnol. Alim.* 18 (3): 30-34, 2008.
10. Maier, T.; Schieber, A.; Kammerer, D. R. y Carle, R. *Food Chem.* 112: 551-559, 2009.
11. Lafka, T. I.; Sinanoglou, V. y Lazos, E. S. *Food Chem.* 104: 1206-1214, 2007.
12. Lapornik, B.; Prosek, M. y Wondra, A. G. *J. Food Eng.* 71: 214-222, 2005.
13. Pekić, B.; Kovač, V.; Alonso, E. y Revilla, E. *Food Chem.*, 61: 201-206, 1998.
14. Moure, A.; Cruz, J. M.; Franco, D.; Domínguez, J. M.; Sineiro, J.; Domínguez, H.; Núñez, M. J. y Parajó, J. C. *Food Chem.* 72: 145-171, 2001.
15. Pinelo, M.; Del Fabbro, P.; Marzocco, L.; Núñez, M. J. y Vicoli, M. C. *Food Chem.* 92: 109-117, 2005.
16. Amendola, D.; De Faveri, D. M. y Spigno, G. *J. Food Eng.*, 97: 384-392, 2010.
17. Cacace, J. E. y Mazza, G. *J. Food Sci.* 2003, 68 (1): 240-248, 2003.
18. Pinelo, M.; Rubilar, M.; Jerez, M.; Sineiro, J. y Núñez, M. J. *J. Agric. Food Chem.* 53: 2111-2117, 2005.
19. Yilmaz, Y. y Toledo, R. T. *J. Food Comp. Anal.* 19: 41-44, 2006.
20. Ruiz Celma, A.; López Rodríguez, F. y Cuadros Blázquez, F. J. *Food Bioprod. Proc.* 87: 247-253, 2009.
21. Clemente, G.; Bon, J.; Benedito, J.; Castell, A. y Sanjuán, N. *Cálculo de la energía de activación para el secado de piel de uva*, V Congreso Español de Ingeniería de Alimentos, Barcelona, 2008.
22. Azzouz, S.; Guizani, A.; Jomaa, W. y Belghith, A. *J. Food Eng.* 55: 323-330, 2002.