

COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES A PARTIR DE RESIDUOS DE LA INDUSTRIA VITIVINÍCOLA

V.A. Guntero^{(1)*}, M.B. Longo⁽¹⁾, S.A. Ciparicci⁽¹⁾, R.E. Martini⁽²⁾, A.E. Andreatta^(1,2)

(1) UTN, Fac. Reg. San Fco. Av. de la Universidad 501, 2400, San Francisco, Córdoba.

(2) IDTQ- Grupo Vinculado PLAPIQUI – CONICET- FCEFyN - UNC. Av. Vélez
Sarsfield 1611, Córdoba

E-mail*: vaniguntero@gmail.com

Resumen: Actualmente, la industria vitivinícola genera como residuo el orujo de la uva, provocando un alto impacto ambiental. Estos residuos poseen elevado contenido de polifenoles (conocidos como antioxidantes naturales), los cuales representan los metabolitos secundarios más importantes. En el presente trabajo se estudiaron dos métodos de extracción no convencionales para extraer compuestos fenólicos: extracción asistida por ultrasonido (UAE) y extracción asistida por microondas (MAE). El contenido de polifenoles totales se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu por espectrofotometría. Se comparó el rendimiento de extracción y el contenido de polifenoles totales entre ambos métodos encontrando que MAE aumenta el rendimiento y reduce el tiempo de extracción.

Palabras clave: Polifenoles, Ultrasonido, Microondas.

1. Introducción

En los últimos años, los compuestos fenólicos procedentes de fuentes naturales han sido sujeto de interés en muchas investigaciones científicas debido a sus efectos positivos sobre la salud humana, atribuidos principalmente a sus actividades antioxidantes (Bucić-Kojić y *col.*, 2011). Los potenciales beneficios de los polifenoles

* vaniguntero@gmail.com

de las plantas se evalúan desde el concepto de estrés oxidativo, el cual surge de un exceso de formas activas del oxígeno, y se relaciona con el envejecimiento, enfermedades cardiovasculares y del sistema nervioso, entre otros (Santos-Buelga y *col.*, 2010).

Por otra parte, la industria vitivinícola genera residuos orgánicos que resultan altamente contaminantes para el medio ambiente. La producción de uva en Argentina en el año 2013 fue 28.717.487,30 quintales métricos, de la cual un 70 % está destinada a la producción de vino (Instituto Nacional de Vitivinicultura, 2013). La distribución de residuos generados en una bodega corresponden a un 62 % de orujos, 14 % de lías, 12 % de raspón, 12 % de lodos depurados (Ruggieri y *col.*, 2009). Los orujos se producen durante el prensado de la uva, y están constituidos por piel y semillas. El resto de los residuos son lías que se generan en el proceso de clarificación de la fermentación del vino; raspón, constituido por ramas y hojas de la vid, y los lodos del tratamiento de aguas residuales (Ventosa y *col.*, 2011).

Por lo general, estos residuos son quemados o usados para la alimentación del ganado (Luque-Rodríguez y *col.*, 2005) a pesar de que presentan compuestos naturales, taninos y polifenoles, que son atractivos por su poder antioxidante en las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria principalmente. En este sentido, en cosmética se utilizan para el tratamiento de la piel seca y la protección contra el envejecimiento. Ayuda a equilibrar el pH de la piel, es hipoalergénica y no irritante (Luque-Rodríguez y *col.*, 2005). Por lo que la utilización de dichos residuos reduce el impacto ambiental, y a su vez que aumenta el valor agregado del producto.

El proceso de extracción es importante en el aislamiento e identificación de compuestos fenólicos. La capacidad de extracción depende del disolvente, la naturaleza y preparación de material a extraer, la estructura química de los compuestos fenólicos, temperatura, tiempo de extracción, relación sólido-líquido, método de extracción empleado y la posible presencia de sustancias de interferencia (Bucić-Kojić y *col.*, 2011).

El presente estudio tuvo como objetivo investigar la influencia de distintos solventes, temperatura, tiempo y potencia de la extracción de polifenoles de semillas de uva de la especie *Vitis vinífera* variedad Tannat, mediante dos métodos alternativos, la extracción

asistida por ultrasonido y la extracción asistida por microondas. Ambos métodos reducen el tiempo de extracción y aumentan el rendimiento.

UAE es mucho más rápido que los métodos tradicionales debido a la elevada superficie de contacto entre la fase sólida y líquida, y a la reducción del tamaño de partículas (Casazza y *col.*, 2010). Además, la cavitación acústica produce la ruptura de las paredes celulares, intensificando la transferencia de masa y mejorando el efecto de penetración del disolvente en el tejido vegetal y capilar (Da Porto y *col.*, 2013).

La MAE se utiliza para una amplia variedad de productos vegetales. Ofrece una rápida entrega de energía al volumen de disolvente y matriz vegetal, con un posterior calentamiento de ambos de manera eficiente y homogénea, debido a la rotación del dipolo del solvente. Dado que el agua dentro de la matriz vegetal absorbe la energía de microondas, se provoca la ruptura celular por sobrecalentamiento interno, lo que facilita la absorción de los productos químicos de la matriz, mejorando la recuperación de nutraceuticos (Wang y *col.*, 2006).

2. Materiales y métodos

2.1. Material vegetal

El material vegetal utilizado se obtuvo como hollejo en el proceso de elaboración del vino y fue suministrado amablemente por una empresa ubicada en Colonia Caroya, provincia de Córdoba, Argentina, en Marzo 2014. El hollejo, compuesto por pieles, semillas y tallos, se almacenó a -18 °C. Antes de la extracción se secó a temperatura ambiente. Seguidamente, se separaron manualmente las semillas y se molieron con un picador doméstico a máxima velocidad, 750 W, hasta obtener una muestra homogénea, con un tamaño de partícula medio de 1680 µm. La humedad fue de 30,65 % y se determinó por diferencia de pesada.

2.2. Reactivos

Los solventes utilizados en las extracciones fueron: agua destilada, alcohol etílico absoluto (Cicarelli, 99,5 %), metanol absoluto pro-análisis (Cicarelli, 99,8 %); reactivo

Folin – Ciocalteu (Biopack), y como patrón en el método colorimétrico se utilizó ácido gálico anhidro (Biopack, 98 %).

2.3. Extracción asistida por ultrasonido

La extracción de los compuestos fenólicos derivados de la uva por medio de ultrasonido se llevó a cabo bajo diferentes condiciones: solventes (agua, etanol, metanol), tiempo (20, 40 y 60) min, temperatura (30, 40, 50 y 60) °C. Se pesaron 0,5 g de muestra molida en tubos eppendorf, se le agregaron 5 ml de solvente y se agitó (agitador orbital, ThermoScientific). Los experimentos se realizaron por triplicado en un equipo de ultrasonido de 70 W de potencia y 40 kHz de frecuencia.

Posteriormente, las muestras se filtraron utilizando papel de filtro (banda negra, 125 mm, Munktell) y se evaporaron en estufa a 50 °C. Una vez evaporado totalmente el solvente, se taparon. La concentración de polifenoles totales se determinó por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu.

2.4. Extracción asistida por microondas

Se utilizó un microondas de 900 W de potencia de salida y 2450 MHz de frecuencia. Las variables estudiadas fueron: tiempo (3, 6 y 9) minutos, potencia (20, 40, 60, 80 y 100) %, solventes (agua, mezcla de etanol – agua en distintas proporciones). Se pesaron 0,5 g de muestra en un frasco de vidrio de 100 ml, se agregaron 20 ml de solvente y se llevaron al microondas. Los extractos se filtraron con papel de filtro (banda negra, 125 mm, Munktell) y se evaporaron en microondas a máxima potencia. La concentración de polifenoles totales se determinó por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. Todas las experiencias se realizaron por triplicado.

2.5. Contenido de polifenoles totales

Se determinó mediante el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu de acuerdo a (Ivanova y *col.*, 2011) con algunas modificaciones. La curva de calibrado se realizó con soluciones estándar de ácido gálico en el rango de concentraciones entre 0,1 a 1 mg/ml. Todos los análisis se realizaron por triplicado. Las mediciones se llevaron a cabo en un espectrofotómetro UV-Cercano Visible (Zeltec, ZL-5000 Plus) a 760 nm, luego de 10 min de la extracción. La respuesta del método se describe mediante la Ec. (1).

$$ABS_{760} = 1,890 PT - 0,0512 \quad (1)$$

$$R^2 = 0,9910$$

El rendimiento de polifenoles totales se expresó como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra.

3. Resultados y discusión

3.1. Extracción asistida por ultrasonido

Se analizó el efecto del tiempo, temperatura y solventes sobre el material vegetal. El rendimiento se expresó como gramos de extracto por 100 g de muestra.

La Figura 1 muestra los rendimientos de las extracciones UAE con agua, etanol, metanol a (30, 40, 50 y 60) °C y a (20, 40 y 60) minutos como tiempo de extracción.

Se observó que utilizando agua como disolvente el rendimiento es considerablemente inferior al obtenido con etanol o metanol. Esto puede ser debido a que tanto el metanol como el etanol son sustancias que aumentan la solubilidad del material orgánico con menor polaridad. El rendimiento máximo obtenido con etanol a 40 min y 60 °C fue de 10,59 g extracto/ 100 g de muestra, mientras que el obtenido con metanol fue de 10,46 g extracto/ 100 g de muestra a 20 min y 50 °C. Asimismo, se puede observar que cuando se utiliza alcohol como solvente a temperaturas más elevadas se observa una disminución del extracto con el tiempo, lo cual puede ser debido a la degradación térmica (Ghasemzadeh y *col.*, 2014) o como efecto del ultrasonido (Zhang y *col.*, 2015).

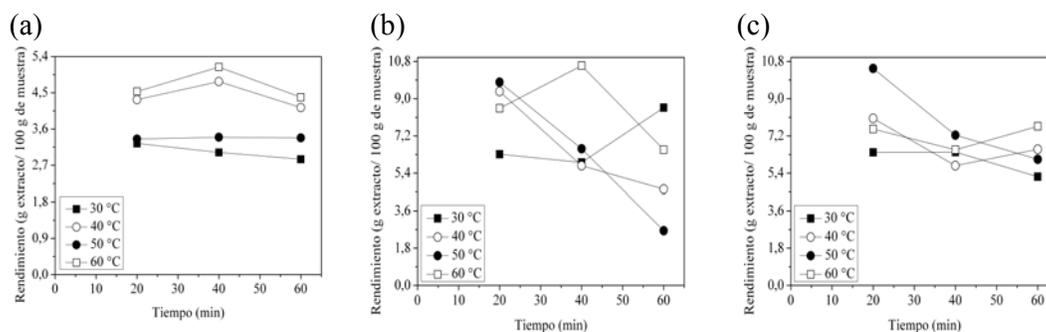


Figura 1. Rendimiento de la extracción por UAE utilizando (a) agua, (b) etanol, (c) metanol como solvente a diferentes temperaturas y diferentes tiempos de extracción.

La Figura 2 muestra la cantidad de polifenoles totales de las extracciones UAE con agua, etanol, metanol respectivamente a (30, 40, 50 y 60) °C variando los tiempos de extracción en (20, 40 y 60) minutos. La mayor concentración de polifenoles totales se obtuvo utilizando metanol como disolvente en un tiempo de 60 min a 60 °C, siendo la misma de 8,80 mg ácido gálico/ g de muestra.

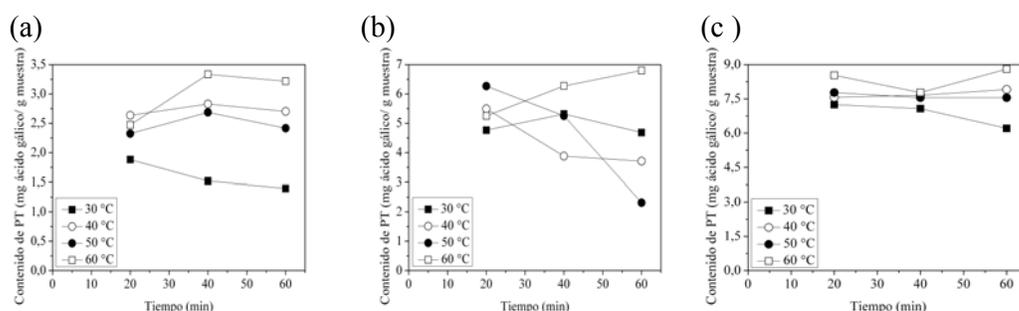


Figura 2. Contenido de polifenoles totales por UAE utilizando (a) agua, (b) etanol, (c) metanol como solvente a diferentes temperaturas y diferentes tiempos de extracción.

3.2. Extracción asistida con microondas

Se analizó el efecto del tiempo, potencia y solventes sobre el extracto total obtenido. El rendimiento se expresó como gramos de extracto cada 100 g de muestra. La Figura 3 muestra los rendimientos de las extracciones MAE con agua, mezcla de etanol – agua en distintas relaciones (1:1 y 3:1) respectivamente, a (20, 40, 60, 80 y 100) % de potencia variando los tiempos de extracción en (3, 6 y 9) minutos.

El mayor rendimiento se obtuvo utilizando una mezcla de etanol-agua en relación 1:1 durante 6 min, a una potencia del 40 % siendo el mismo de 58,22 g extracto/ 100 g de muestra. Como ha sido demostrado por otros autores (Petigny y col., 2014; Liu y col., 2014) existen valores óptimos de la potencia utilizada, los cuales pueden estar determinados por el perfil de temperatura alcanzado durante el calentamiento y/o por la degradación de los compuestos por efecto de este perfil de temperatura o de la acción propia del microondas.

Al igual que se observó para la UAE, en algunos casos se puede observar una disminución del extracto obtenido con el tiempo, especialmente a potencias elevadas y cuando mayores cantidades de etanol son utilizadas, debido también a una posible degradación del material.

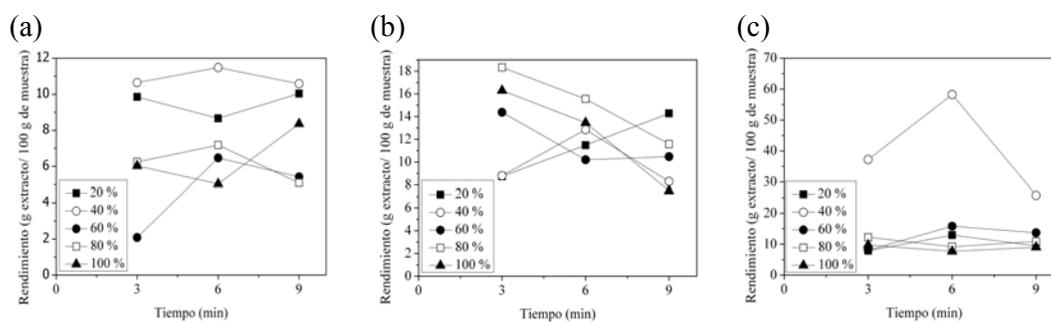


Figura 3. Rendimiento de la extracción por MAE utilizando (a) agua, (b) mezcla etanol-agua (3:1), (c) mezcla de etanol-agua (1:1) como solvente a diferentes potencias y diferentes tiempos de extracción.

La Figura 4 muestra la concentración de polifenoles totales de las extracciones MAE con agua, mezcla de etanol – agua en distintas relaciones a (20, 40, 60, 80 y 100) % de potencia y (3, 6 y 9) minutos como tiempo de extracción. La mayor concentración de polifenoles totales se obtuvo utilizando agua como disolvente en un tiempo de 6 min a potencia del 80 %, siendo la misma de 17,19 mg ácido gálico/ g de muestra.

El mayor rendimiento de polifenoles obtenido con agua pura puede deberse a que la presencia de agua podría aumentar el volumen del material vegetal, lo que aumenta el área de superficie de contacto entre la matriz de la planta y el solvente (Li y col., 2004) (Rostagno y col., 2003). Otra explicación razonable podría ser que la adición de una cierta cantidad de agua incremente la constante dieléctrica de la mezcla solvente, lo cual ayuda a absorber la energía de microondas, aumentando así la extracción. Si bien, la adición de agua en etanol aumenta la constante dieléctrica de la mezcla, el factor de disipación disminuye. Esto significa que aunque la mezcla solvente es capaz de absorber una alta energía de microondas en comparación con etanol puro por su mayor constante dieléctrica, la mezcla no sería capaz de disipar el calor tan eficazmente (Hemwimon y col., 2007).

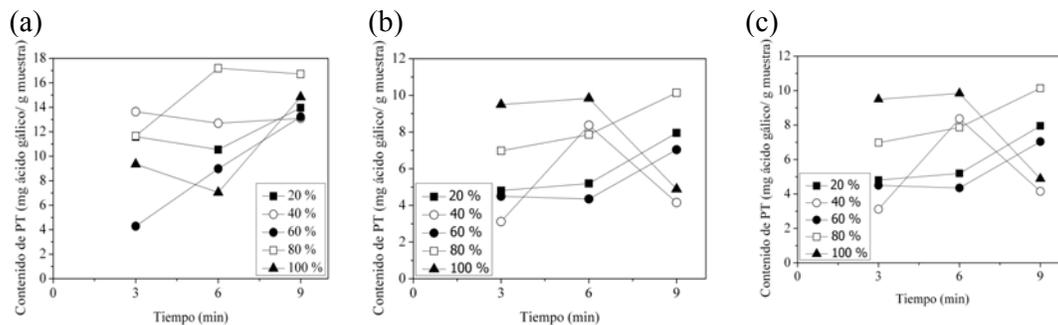


Figura 4. Concentración de polifenoles totales por MAE utilizando (a) agua, (b) mezcla etanol-agua (3:1), (c) mezcla etanol-agua (1:1) como solvente a diferentes potencias y diferentes tiempos de extracción.

4. Conclusiones

En el presente trabajo se estudiaron dos métodos de extracción no convencionales para extraer los compuestos fenólicos que fueron la extracción asistida por ultrasonido y extracción asistida por microondas. El contenido de polifenoles totales se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu por espectrofotometría. Se comparó el rendimiento de extracción y el contenido de polifenoles totales entre ambos métodos encontrando que MAE aumenta el rendimiento y reduce el tiempo de extracción.

5. Agradecimientos

Los autores agradecen a CONICET, Universidad Tecnológica Nacional, Universidad Nacional de Córdoba, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por la ayuda económica recibida y a Bodegas Nanini de Colónica Caroya, (Córdoba, Argentina) por habernos facilitado la variedad de uva.

6. Referencias

- Bucić-Kojić, A.; Planinić, M.; Srećko, T.; Jokić, S.; Mujić, I.; Bilić, M.; Velić, D. (2011). Effect of Extraction Conditions on the Extractability of Phenolic Compounds from Lyophilised Fig Fruits (*Ficus Carica* L.). *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 61, 195-199.
- Casazza, A.; Aliakbarian, B.; Mantegna, S.; Cravotto, G.; Perego, P. (2010). Extraction of phenolics from *Vitis vinifera* wastes using non conventional techniques. *Journal of Food Engineering*, 100, 50-55.

Da Porto, C.; Porretto, E.; Decorti, D. (2013). Comparison of ultrasound assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 1076-1080.

Ghasemzadeh, A.; Jaafar, H.; Karimi, E.; Rahmat, A. (2014). Optimization of ultrasound assisted extraction of flavonoid compounds and their pharmaceutical activity from curry leaf (*Murraya koenigii* L.) using response surface methodology. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14, 318.

Hemwimon, S.; Pavasant, P.; Shotipruk, A. (2007). Microwave assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*, *Separation and Purification Technology*, 54, 44–50.

Instituto Nacional de Vitivinicultura, 2011. www.inv.gov.ar

Ivanova, V.; Dörnyei, Á.; Márk, L.; Vojnoski, B.; Stafilov, T.; Stefova, M.; Kilár, F. (2011). Polyphenolic content of Vranec wines produced by different vinification conditions. *Food Chemistry*, 124, 316-325.

Li, H.; Bo, C.; Zhang, Z.; Yao, S. (2004). Focused microwave assisted solvent extraction and HPLC determination of effective constituents in *Eucommia ulmoides* Oliv. (*E. ulmoides*). *Talanta*, 63, 659–665.

Liu, W.; Zhou, C.; Zhao, J.; Chen, D.; Li, Q. (2014). Optimized microwave assisted extraction of 6-gingerol from *Zingiber officinale* roscoe and evaluation of antioxidant activity in vitro. *Acta Scientiarum Polonorum*, 13, 155-168.

Luque-Rodríguez, J. M.; Luque de Castro, M. D.; Pérez, J.P. (2003). Ultrasound: A powerful tool for leaching. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 22, 41-47.

Petigny, L.; Périno, S.; Minuti, M.; Visinoni, F.; Wajzman, J.; Chemat, F. (2014). Simultaneous Microwave Extraction and Separation of Volatile and Non Volatile Organic Compounds of Boldo Leaves. From Lab to Industrial Scale. *International journal of molecular sciences*, 15, 7183-98.

Rostagno, M.A.; Palma, M.; Barroso, C.G. (2003). Ultrasound assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A*, 1012, 119–128.

Ruggieri, L.; Cadena, E.; Martínez-Blanco, J.; Gasol, C.M.; Rieradevall, J.; Gabarrell, X.; Gea, T.; Sort, X.; Sánchez, A. (2009). Recovery of organic wastes in the Spanish wine industry. Technical, economic and environmental analyses of the composting process. *Journal of Cleaner Production*, 17, 830-838.

Santos-Buelga, C.; Escribano-Bailon, M.T.; Lattanzio, V. (2010). Recent Advances in Polyphenol Research.

Ventosa, E.; Clemente, R.; Pereda, L. (2011). Gestión integral de residuos y análisis del ciclo de vida del sector vinícola: De residuos a productos de alto valor añadido. *LifeHAproWINE*.

Wang L.; Weller, C.L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 300-312.

Zhanga, Q.; Shen, H.; Fan, X.; Shena, Y.; Wanga, X.; Songa, Y. (2015). Changes of gallic acid mediated by ultrasound in a model extraction solution. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22, 149-154.