

Estudio cinético de la extracción Sólido-Líquido de los compuestos polifenólicos del Residuo del Aguacate.

Francisco Segovia Gómez, Juan José Corral, María Pilar Almajano*

*Universidad Politécnica de Cataluña, Av. Diagonal, 647, 08028. España; E-Mails: francisco.segovia.gomez@upc.edu; jjcp91@hotmail.com; m.pilar.almajano@upc.edu. (*Autor corresponsal)*

Resumen

Cada vez más, los polifenoles son el centro de interés de muchas industrias alimentarias y de cosmética debido a su alta capacidad antioxidante. Además, se ha demostrado que su consumo a través de frutas y verduras ayuda a prevenir muchas enfermedades. El hueso de aguacate contiene una gran cantidad de polifenoles extraíbles, por eso, el objetivo de este estudio es optimizar su extracción a través del método de superficie de respuesta y obtener un modelo matemático que describa este proceso. Las extracciones se realizan en lotes a diferentes condiciones de temperatura y concentración de metanol. Una vez encontradas las condiciones que optimizan la extracción de polifenoles, se modeliza la extracción de los componentes contenidos en el hueso de aguacate para así poder escalar su extracción a la industria.

Palabras Clave: Extracción, polifenoles, aguacate, cinética.

Abstract

Increasingly, the polyphenols are the focus of many food and cosmetic industries due to their high antioxidant capacity. Furthermore, it has been shown that polyphenols intake through fruit and vegetables helps to prevent several diseases. The avocado pit contains a large amount of extractable polyphenols. Therefore, the objective of this study is to optimize their extraction by the response surface method and obtain a mathematical model that describes this process. The extractions are carried out in diverse temperature and concentration of methanol conditions, in batch. Once the conditions that optimize the extraction of polyphenols are found, is modelled in order to convert its extraction from the laboratory scale to the industry.

Keywords: Extraction, polyphenols, avocado, kinetics.

1. Introducción

1.1. Estado actual del arte

Los vegetales y frutas son alimentos que poseen gran cantidad de compuestos beneficiosos para la salud, además de ser alimentos imprescindibles en la dieta. Es por ello que se recomienda su consumo. Entre sus componentes se encuentran principalmente los glúcidos, las grasas y, aunque en menor cantidad, no por ello menos importante, las sustancias fenólicas [1]. Estas últimas son metabolitos secundarios de las plantas que poseen un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilos. Su complejidad abarca desde una molécula simple como el fenol hasta, por ejemplo, la quercetina, una flavona con varios anillos aromáticos, con características distintas dependiendo de la disposición y/o estructura de la molécula [2]. En los últimos tiempos se han estudiado gran cantidad de plantas, para caracterizarlas en base a la cantidad de polifenoles que poseen y sus posibles usos [3].

Las sustancias fenólicas o polifenoles se asocian también a cualidades y propiedades de prevención de enfermedades que se encuentran relacionadas con la presencia de radicales libres, tales como: insuficiencias cardiovasculares, hipertensión, procesos inflamatorios, asma, diabetes y alzheimer [4].

Esta capacidad antiradicalaria hace que los polifenoles sean también buenos agentes para ser aplicados a productos alimenticios, previniendo la peroxidación de los lípidos debido al ataque de los radicales libres [5] y actuarían protegiendo incluso frente a la oxidación causada por cationes

metálicos, ya que es conocido que algunos metales presentes en los alimentos, pueden participar directamente o indirectamente en la oxidación de los lípidos [6]. Estos cationes favorecen la creación de especies reactivas de oxígeno, perjudiciales para la salud. Además de lo expuesto, los polifenoles se han utilizado para la conservación de alimentos como agentes microbianos [7].

La industria de los alimentos produce gran cantidad de subproductos y desperdicios, los cuales pueden ser utilizados para obtener sustancias reutilizables para otros procesos o como materia prima “económica” [8,9]. Este tipo de residuo posee un gran impacto ambiental debido a la carga orgánica que tiene. Además, posee un costo asociado a este tipo de desecho: manipulación, transporte y almacenamiento, entre otros. Por ejemplo, en la industria de la naranja se producen grandes cantidades de piel y semillas con un alto contenido de polifenoles. En las industrias de la manzana, pera y melocotón, se obtienen grandes cantidades de piel que incluso pueden tener mayor cantidad de compuestos fenólicos que los obtenidos en la pulpa [10]. También en los residuos de la producción de vino y cerveza se pueden encontrar compuestos fenólicos [9,11]. Se han realizado diversos trabajos con la cascara de nueces, con arroz y trigo. En ellos se hallan gran cantidad de polifenoles, entre los que cabe destacar el ácido cinámico.

La industria del aguacate ha ido en aumento en los últimos años. Lo único que se aprovecha de esta industria es la pulpa, dejando a un lado la piel y la semilla. Esta última parte de la fruta es rica en polifenoles y además posee capacidad antioxidante y antimicrobiana [12]. Entre los polifenoles que posee están la (+)-catequina y (-)-epicatequina [13]. Ya hay unos estudios realizados en los que los extractos obtenidos con residuos de aguacate, son efectivos para evitar la oxidación y el crecimiento microbiano en empanadas de cerdo [14].

Por todo lo expuesto se puede concluir que los polifenoles obtenidos de estos residuos industriales pueden ser grandes antioxidantes y, en algunos casos, resultan mejores que los antioxidantes sintéticos tales como el BHA o BHT, que en dosis inadecuadas pueden ser tóxicos [15].

1.2. Metodologías de extracción de compuestos bioactivos

La extracción clásica con solventes orgánicos y variando la temperatura de extracción es la herramienta básica para obtener extractos fenólicos a partir de diferentes vegetales y de frutas así como a partir de sus residuos. Los solventes más utilizados son: metanol, etanol, acetona y hexano para las fracciones lipídicas de polifenoles. El rango de temperatura puede variar según el polifenol a extraer. Sin embargo, el valor de la temperatura no puede ser muy alta ya que se podría degradar el componente activo, restando efectividad al mismo [16,17]. Con este método se han elaborado extractos con borraja [6,18], semillas y residuos; residuos de uvas [19]; aserrín de madera de castaño [20]; bayas [21]; residuos de la planta Melissa [22], logrando excelentes resultados.

1.3. Cinéticas de extracción

El estudio de la cinética de extracción da una idea del comportamiento del proceso, la observación de la respuesta del sistema versus la temperatura, concentración de solvente y tiempo, para relacionarla con las ecuaciones adecuadas. Ello nos permite obtener coeficientes que describen el fenómeno para fabricar el modelo matemático que se ajusta al proceso y más adelante optimizar el mismo [16]. Además permiten determinar puntos de control en el proceso de extracción, ya que ofrece un panorama de las variables que afectan directamente el proceso.

El objetivo principal de este trabajo es establecer la cinética de extracción en la elaboración de extractos de la semilla de aguacate para su posterior uso como antioxidante natural, además de hallar la superficie de respuesta adecuada a las condiciones estudiadas.

2. Materiales y Métodos

2.1. Preparación de la Muestra

Se utilizaron las semillas del aguacate (*Persea gratissima*) del consumo doméstico. Las semillas se separaron manualmente del aguacate. Las semillas se pusieron en un congelador por debajo de 70 ° C para su posterior liofilización (Uniequip MC2L). Luego, fueron cortadas en forma de cubos, mediante. Cada cubo midió 6 mm x 6 mm x 6 mm y pesó $2 \pm 0,1$ g, aproximadamente. Estas muestras se conservaron en oscuridad en un desecador hasta su uso en las extracciones.

3.1. Extracción

Se realizaron dos tipos de extracciones para lograr los objetivos planteados:

3.1.1. Extracción por batch.

Fueron colocados $2 \pm 0,1$ g (20 cubos) de semilla de aguacate y se extrajeron con 100 ml de agua, agua: metanol (Panreac) en dos concentraciones diferentes (65:35, v / v y 30:70 v / v). Las extracciones se llevaron a cabo en matraces sellados, en multiagitadores (Selecta P1157) a 81 rpm. Estos experimentos se realizaron por triplicado a diferentes temperaturas (20, 40 y 60 ° C). A intervalos específicos de tiempo, se tomaron 200 µl de muestra y se colocaron en nevera esperando su análisis. Antes de dos horas, las muestras se analizaron para determinar el contenido total de fenoles totales y capacidad antioxidante.

3.2. Contenido de polifenoles totales (TPC)

TPC se determinó espectrofotométricamente siguiendo el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu [23]. Se tomaron muestras de los extractos preparados. Se colocó, 7,7% (v / v) de la muestra diluida a 1:04 utilizando como agua milli-Q disolvente, en una placa por triplicado. Añadido 4% (v / v) de reactivo de Folin-Ciocalteu y 30.77% (w / w) de sodio anhidro solución de carbonato, y, finalmente, la adición de 80 l de agua Milli-Q. Se dejó reaccionar durante 1 hora en el cuarto oscuro y la absorbancia se midió a 765 nm utilizando un Fluorimetrics Fluostar Omega (Perkin-Elmer, París, Francia). El contenido de fenoles totales se expresó como mg equivalentes de ácido gálico (GAE) / g de extracto liofilizado.

3.3. Determinación de la capacidad antioxidante total

La capacidad antioxidante se midió siguiendo la metodología descrita por Marca-Williams, Cuvelier y Berset (1995) [24] donde la tasa de decoloración de un radical libre estable, 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH •) se monitorizó a una longitud de onda característica en la presencia de la muestra. En su forma más radical DPPH • absorbe a 515 nm, disminuyendo su absorción en la reducción de un antioxidante. En todos los casos, la tasa de inhibición de DPPH • era proporcional a la concentración de la muestra añadida al medio. La siguiente ecuación se eligió con el fin de obtener la tasa de inhibición de DPPH •:

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(1 - \text{Absorbance}_{\text{sample}})}{\text{Absorbance}_{\text{blank}}} \times 100 \quad (1)$$

La capacidad antioxidante se expresó como equivalentes de Trolox (TE mg) y se refiere al volumen (L).

3.4. Modelado matemático de la cinética de extracción

Debido a la similitud entre la extracción y la cinética de la adsorción, el objetivo es ajustar los datos de extracción por lotes para la ecuación de Peleg [25]. La ecuación propuesta por Peleg en 1988 es:

$$C(t) = C_0 + \frac{t}{K_1 + K_2 \cdot t} \quad (2)$$

donde $C(t)$ es la concentración de fenólicos (mg GAE / L,) en el tiempo t (min), C_0 es la concentración fenólica en el tiempo cero (mg GAE / L), K_1 es la tasa de Peleg constante (min • L / mg GAE) y constante de la capacidad de K_2 Peleg (L / mg GAE). Como C_0 es cero para todos los experimentos, la ecuación 2 se puede escribir como:

$$C(t) = \frac{t}{K_1 + K_2 \cdot t} \quad (3)$$

Ecuación 4 es muy similar a la ecuación de Peleg [26], donde k' es la constante de velocidad de extracción (L / mg GAE • min) y C_{eq} es la concentración fenólica en equilibrio (mg GAE / L).

$$C(t) = \frac{t}{1/k' C_{eq}^2 + t/C_{eq}} \quad (4)$$

3.4. Diseño Experimental

Un diseño factorial 2^3 , fué utilizado para determinar la influencia de las variables: temperatura, concentración de metanol y tiempo en el proceso de extracción de polifenoles. En la Tabla 1 se puede apreciar los rangos y el código de cada una de las variables utilizadas para este estudio.

Tabla 1. Valores y códigos de la variables para su estudio estadístico.

Codigo	T (°C)	t (min)	Concentración de Metanol (% in v)
-1	20	5	0
0	40	245	35
1	60	485	70

3.5. Análisis usando la metodología de superficie de respuesta (RSM)

El RSM se realizó con la versión 16.2.1 del software Minitab (Minitab, Inc.). El modelo cuadrático para cada respuesta fue la siguiente:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (5)$$

Donde, Y es la respuesta predicha; β_0 es una constante; β_i es el coeficiente lineal; β_{ii} es el coeficiente cuadrático, β_{ij} es el coeficiente de interacción de las variables i y j , y X_i y X_j son variables independientes.

La adecuación del modelo se determinó mediante la evaluación de la falta de ajuste, coeficiente de determinación (R^2) obtenido a partir del análisis de la varianza (ANOVA) que se ha generado por el software. La significación estadística del modelo y las variables del modelo se determina al nivel de probabilidad del 5% ($\alpha = 0,05$). El software utiliza la ecuación modelo cuadrático para la construcción de superficies de respuesta. Superficie de respuesta tridimensional y gráficos de contorno se generaron graficando una respuesta vs dos variables independientes, manteniendo siempre la solución óptima. Representaciones gráficas de superficie de respuesta se determinaron para cada variable de respuesta. Los gráficos se hizo por el software Matlab versión R2013b (The MathWorks, Inc. 2013, USA).

4. Resultados y Discusión

4.1. Extracciones en Batch

A continuación se muestran los resultados obtenidos para las extracciones realizadas en las diferentes concentraciones de metanol y las temperaturas de 20 °C, 40 °C y 60 °C.

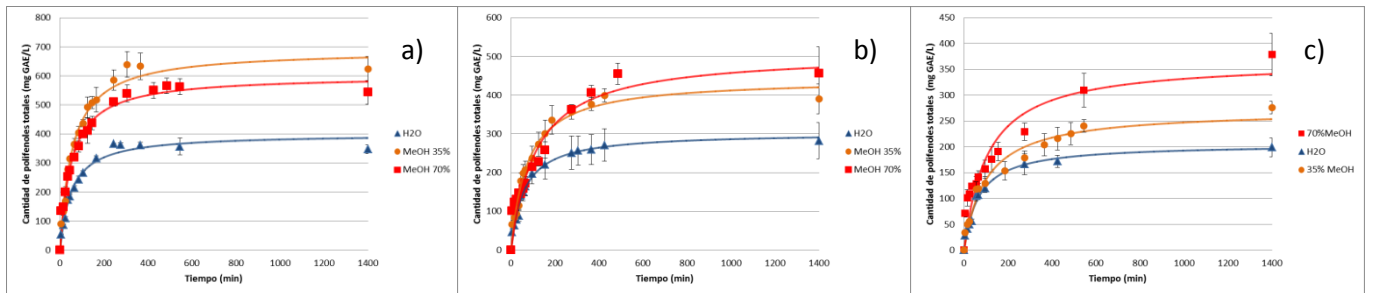


Figura 1. Curvas de extracción en batch, de polifenoles totales contenidos en la semilla de aguacate con agua, metanol 35% y metanol 70% medidos a: a) 60°C; b) 40°C; y c) 20°C.

En la figura 1a, se observa que a 60 °C, se alcanza el equilibrio pasadas 2 horas y 45 minutos aproximadamente. También la importancia de utilizar metanol a la hora de extraer los polifenoles totales, ya que se extraen casi un 80% más de polifenoles con metanol que con agua.

Además, se puede concluir que no existe una relación proporcional entre el porcentaje en volumen de metanol y los polifenoles extraídos, ya que extraen más con una concentración de 35% en metanol que no con una de 70%. Este hecho resulta una ventaja porque hay menor cantidad de solvente orgánico, aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas. También depende de la naturaleza de los compuestos que se encuentren en la semilla, ya que, algunos pueden ser más solubles en agua que otros y en combinación con el metanol se pueden extraer varios tipos de compuestos [27].

En la figura 1b, a 40 °C se alcanza el equilibrio pasadas aproximadamente 8 horas. Como era de esperar y a diferencia de las curvas obtenidas a 60 °C, se extraen más polifenoles cuanto mayor es la concentración de metanol en el solvente.

Una vez obtenidas las cantidades de polifenoles totales, se procedió a determinar la capacidad antioxidante total en el tiempo final de extracción (equilibrio) de los extractos realizados. En la Figura 2 se encuentran reflejados los valores obtenidos.

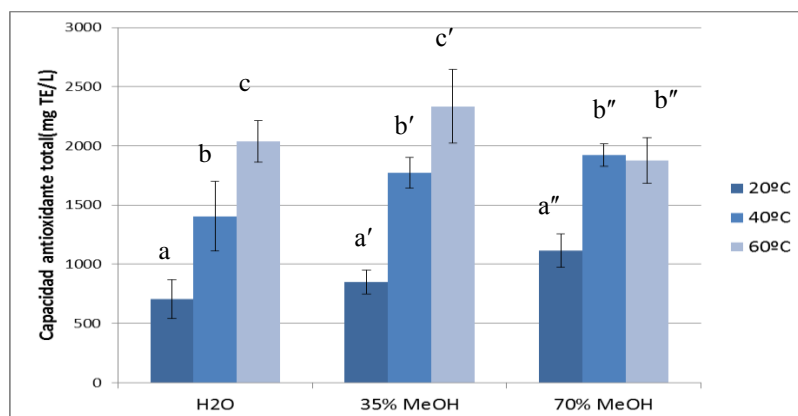


Figura 2. Capacidad antioxidante total de los extractos de la semilla de aguacate medidos en el equilibrio.

En esta figura, se observa que cuanto mayor es la temperatura para un mismo solvente, mayor es la capacidad antioxidante total obtenida, aunque en el caso de del metanol al 70%, no hay diferencias significativas entre 40 y 60 ° C, esto puede deberse a que a 60°C los compuestos fenólicos más termolábiles pierden su capacidad antiradicalaria presentando este comportamiento [28].

4.2. Adecuación de la cinética de extracción a un modelo matemático

Los datos experimentales obtenidos durante las extracciones en batch se han ajustado a la ecuación de Peleg tal y como se explica en el apartado. Los parámetros ajustados de la ecuación 3 y su concordancia con los datos experimentales se muestra en la Tabla 2. El ajuste de la ecuación es bueno, $0.98 < R^2 < 0.89$, demostrando que este modelo matemático describe acertadamente el proceso que se realizó. Por otra parte, el comportamiento observado también se corresponde con trabajos llevados a cabo por otros investigadores en la misma área de extracción de polifenoles de fuentes naturales [11].

Tabla 2. Parámetros de la ecuación de Peleg ajustados a los valores de los polifenoles totales en las extracciones por batch.

Ecuación: $C(t) = \frac{t}{K_1 + K_2 \cdot t}$					
Temperatura	Solvente	K1 ($\cdot 10^{-1}$ min·L/mg GAE)	K2 ($\cdot 10^{-3}$ L/mg GAE)	R ²	RMSE (mg GAE/L)
20 °C	H ₂ O	3.22	4.87	0.98	8.65
	MeOH 35%	3.62	3.69	0.97	15.63
	MeOH 70%	2.87	2.73	0.89	34.18
40 °C	H ₂ O	1.91	3.30	0.99	10.95
	MeOH 35%	1.65	2.26	0.98	18.63
	MeOH 70%	2.21	1.97	0.93	37.46
60 °C	H ₂ O	1.26	2.50	0.98	18.90
	MeOH 35%	7.96	1.45	0.97	33.47
	MeOH 70%	8.41	1.66	0.98	26.86

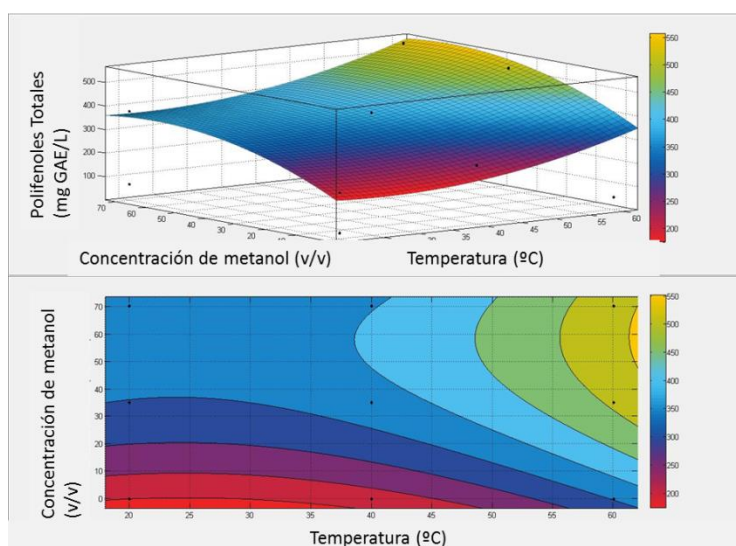
4.3. Obtención de las condiciones óptimas de extracción usando RSM

Los datos experimentales de polifenoles totales se ajustaron a la ecuación de superficie de respuesta (ecuación 5) como se muestra la Figura 3. Los parámetros obtenidos se muestran en la tabla 5. Aparte de algunos parámetros de la ecuación, los demás presentan valores significativos ($p < 0,05$). Además, la ecuación tiene un coeficiente $R^2 = 0,950$; siendo un ajuste alto, cuando son despreciados las interacciones que tienen poca significancia.

Tabla 5. Coeficientes β_i , β_{ii} , β_{ij} , de la ecuación 5 para el resultado obtenido.

Parámetro	Coefficiente	Valor de p
Constante (β_0)	-98.82	0.05
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	3.33	0.01
Tiempo (min)	1.41	0.01
Metanol (% , v/v)	0.83	0.24
Tiempo (min) \times Tiempo (min)	$-1.87 \cdot 10^{-3}$	0.01
Metanol (%) \times Tiempo (min)	$3.74 \cdot 10^{-3}$	0.09

De acuerdo con la respuesta de la superficie, las condiciones óptimas son 60°C , 386 min de extracción y 53,50% de metanol. En esas condiciones el contenido de polifenoles totales máximo sería de 564,71 mg GAE / L, sin embargo, realizando el experimento la cantidad de polifenoles totales fue de $635,23 \pm 25,95$ mg GAE / L, esto refleja una desviación del 11.1 % con respecto al valor real así se justifica que teniendo un ajuste alto no es suficiente para representar el proceso de extracción fielmente, pero sería una buena aproximación a la hora de empezar un nuevo experimento.

**Figura 3.** Superficie de respuesta, cantidad de polifenoles totales versus concentración de metanol (v/v) y la temperatura ($^{\circ}\text{C}$).

5. Conclusiones

La manipulación de las variables en el proceso de extracción por batch mejora la cantidad de polifenoles extraídos, además de acortar el tiempo requerido. Por otra parte, la extracción de los componentes activos de un material celular es muy compleja y según la naturaleza del solvente y sus condiciones es posible extraer diferentes tipos de polifenoles.

Los datos se ajustan a la ecuación de Peleg, lo cual permite una modelización de lo que sucede durante el proceso de extracción.

Por último, la aplicación de la metodología de superficie de respuesta mostró indicios de los valores óptimos para la extracción para así tener un punto de inicio en los próximos experimentos.

6. Referencias

1. R. Martínez, P. Torres, Ma. Meneses, J. Figueroa, J. Pérez-Álvarez, M. Viuda-Martos M, *Food Chem*, Vol. 135(3), pp. 1520–1526, (2012).
2. I. Ignat, I. Volf, V. Popa, *Food Chem*, Vol. 126(4), pp. 1821-1835, (2011).
3. M. Rubilar, M. Pinelo, M. Ihl, E. Scheuermann, J. Sineiro, M. Nuñez, *J. Agric. Food Chem*, vol. 54(1), pp. 59–64, (2006).
4. C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, L. Jime, *Am J Clin Nutr*, vol. 79, pp. 727-747, (2004).
5. V. Perumalla, N. Hettiarachchy, *Food Res. Int.*, vol. 44(4), pp. 827-839, (2011).
6. M. Wettasinghe, F. Shahidi, *Food Chem.*, vol. 75, pp. 49–56, (2001).
7. M. Jordán, V. Lax, M. Rota, S. Lora, J. Sotomayor, *J. Agric. Food Chem.*, vol. 60, pp. 9603-9608, (2012).
8. J. Ayala-Zavala, V. Vega-Vega, C. Rosas-Domínguez, H. Palafox-Carlos, J. Villa-Rodriguez, M. Siddiqui MW, *Food Res. Int.*, vol. 44(7), pp. 1866-1874, (2011).
9. H. Wijngaard, N. Brunton, *J. Food Eng.*, vol. 96(1), pp. 134-140, (2010).
10. N. Balasundram, K. Sundram, S. Samman, *Food Chem.*, vol. 99(1), pp. 191-203, (2006).
11. M. Guerrero, J. Torres, M. Nuñez, *Bioresour. Technol.*, vol. 99(5), pp. 1311-1318, (2008).
12. J. Rodríguez-Carpena, D. Morcuende, M. Estévez, *Meat Sci.*, vol. 89(2), pp. 166-173, (2011).
13. Y-Y. Soong, P. Barlow, *Food Chem.*, vol. 88(3), pp. 411-417, (2004).
14. J. Rodríguez-Carpena, D. Morcuende, M. Andrade, P. Kylli, M. Estévez, *J. Agric. Food Chem.*, vol. 59(10), pp. 5625-5635, (2011).
15. A. Moure, J. Cruz, D. Franco, J. Domínguez, J. Sineiro, H. Domínguez H, *Food Chem.*, vol. 72, pp. 145-171, (2001).
16. G. Spigno, L. Tramelli, D. De Faveri, *J. Food Eng.*, vol. 81(1), pp. 200-208, (2007).
17. C. Tubtimdee, A. Shotipruk, *Sep. Purif. Technol.*, vol. 77(3), pp. 339-346, (2011).
18. M. Wettasinghe, F. Shahidi, *Food Chem.*, vol. 67, pp. 399-414, (1999).
19. M. Pinelo, J. Sineiro, M. Nuñez, *J. Food Eng.*, vol. 77(1), pp. 57-63, (2006).
20. F. Gironi, V. Piemonte, *Chem. Eng. Res. Des.*, vol. 89(7), pp. 857-862, (2011).
21. J. Cacace, G. Mazza, *J. Food Eng.*, vol. 59(4), pp. 379-389, (2003).
22. S. Herodez, M. Hadolin, M. Skerget, K. Zeljko, *Food Chem.*, vol. 80, pp. 275-282, (2003).
23. V. Singleton, J. Rossi, *Amer. J. Enol. Viticult.*, vol. 16, pp. 144-158, (1965).
24. W. Brand-Williams, M. Cuvelier, C. Berset, *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 28(1), pp. 25-30, (1995).
25. A. Bucić-Kojić, M. Planinić, S. Tomas, M. Bilić, D. Velić, *J. Food Eng.*, vol. 81(1), pp. 236-242, (2007).
26. L. Rakotondramasy-Rabesiaka, J. Havet, C. Porte, H. Fauduet, L. Sep. Purif. Technol., vol. 76(2), pp. 126-131, (2010).
27. K. Tananuwong, W. Tewaruth, *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 43(3), pp. 476-481, (2010).
28. J. Michiels, C. Kevers, J. Pincemail, J. Defraigne, J. Dommès, *Food Chem.*, vol. 130(4), pp. 986-993, (2012).

7. Agradecimientos

A la UPC, por el apoyo brindado.