

## **Compuestos fenólicos y actividad antioxidante de extractos obtenidos con ultrasonido de potencia a partir de mezclas de Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) y pasta prensada de uva.**

**Rico Ramírez, J. <sup>a</sup>, Borrego Adame, A., Solís Ríos, E. <sup>a</sup>, Galaviz Corpus, E<sup>a</sup>, Martínez García J. J. <sup>a</sup>, Sáenz Esqueda, M.A. <sup>a</sup>, Femenia A. <sup>b</sup>, Minjares Fuentes, R. <sup>a,\*</sup>**

<sup>a</sup> Universidad Juárez del Estado de Durango. Facultad de Ciencias Químicas. Av. Artículo 123 s/n, col. Filadelfia, C.P. 35010, Gómez Palacio, Dgo, México

<sup>b</sup> Universitat de les Illes Balears. Departamento de Química. Cra Valldemossa km 7.5. CP 07120. Palma de Mallorca, España

\* rafael.minjares@ujed.mx

### **RESUMEN:**

Actualmente, la industria alimentaria ha mostrado gran interés en la obtención de extractos ricos en compuestos bioactivos con capacidad antioxidante usando diferentes tecnologías. Por tal motivo, el principal objetivo de este trabajo, fue el cuantificar el contenido de compuestos fenólicos así como la actividad antioxidante de extractos obtenidos mediante ultrasonido de potencia a partir de mezclas de Aloe vera y pasta prensada de uva. Mezclas de Aloe vera y pasta prensada de uva fueron sometidas a extracción asistida con ultrasonido (Hielscher UP400S) usando dos sonotrodos ( $\varnothing$ 14 y 40 mm) a diferente tiempo de extracción (5 y 10 min) a 20 °C. El contenido de compuestos fenólicos así como la actividad antioxidante fue analizada en los extractos obtenidos. El contenido de compuestos fenólicos oscilo entre <0.1 hasta ~1.5 meq de ácido gálico, mostrando el contenido más bajo las muestras que contenían un mayor porcentaje de Aloe vera. Es importante desatacar, que los extractos obtenidos usando el sonotrodo de 40 mm mostraron mayor contenido de compuestos fenólicos en comparación con los obtenidos con el sonotrodo de 14 mm. Estos resultados demostraron que el ultrasonido de potencia representa una alternativa para la recuperación de compuestos bioactivos a partir de mezclas que contienen residuos agroalimentarios..

### **ABSTRACT:**

Nowadays, food industry has been focused in the extraction of bioactive compounds with antioxidant capacity using different technologies. Thus, the main aim of this study was quantify the phenolic compounds and antioxidant capacity of extracts from Aloe vera and grape pomace blends using ultrasound technology. Aloe vera and grape pomace blends were treated with ultrasound using two different tip-horns (14 y 40 mm) and different time (5 and 10 min). All treatments were carried out at 20 °C. The content of phenolic compounds and also the antioxidant capacity from the different extracts were tested. Phenolic compounds ranged from <0.1 to ~1.5 meq gallic acid, showing the lowest concentrations those samples containing high concentration of Aloe vera. Also, it is important to note that extracts obtained with 40 mm tip-horn showed high phenolic compound content and antioxidant capacity compared with those obtained using 14 mm tip-horn. Therefore, these results demonstrate that ultrasound technology could be a good alternative to recovery the bioactive compounds from blends containing agro-food byproducts..

### **Palabras clave:**

Compuestos fenólicos, capacidad antioxidante, ultrasonido de potencia, Aloe vera, pasta prensada de uva

**Área:** Alimentos funcionales

## **INTRODUCCIÓN**

Actualmente, la industria alimentaria ha mostrado gran interés en la recuperación de diferentes compuestos bioactivos, especialmente en aquellos compuestos con potencial antioxidante y pudiesen ejercer un efecto benéfico sobre la salud. en este contexto, los compuestos fenólicos han sido objeto de numerosos estudios, debido a su capacidad de secuestrar radicales libres (Caldas *et al.*, 2018; Peixoto *et al.*, 2018).

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de las plantas, los cuales son sintetizados durante el desarrollo de la planta como una respuesta a diversos efectos adversos de tipo biótico y/o abiótico tales como infección, heridas y radiación ultravioleta (Shahidi y Naczk, 2003). Hoy en día, se han identificado mas de 8000 compuestos fenolicos en diferentes matrices vegetales. Particularmente, los polifenoles comprenden un grupo

extenso de sustancias de origen vegetal y casi todas ellas exhiben una marcada actividad antioxidante (Acosta-Estrada *et al.*, 2014; Shahidi y Naczk, 2003).

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos tiene interés desde un punto de vista tecnológico y nutricional. Así los compuestos fenólicos intervienen como antioxidantes naturales de los alimentos, por lo que la obtención y preparación de alimentos con un alto contenido de antioxidantes, a la vez que se obtienen alimentos más saludables, que incluso pueden llegar a englobarse dentro de los alimentos funcionales. Desde un punto de vista nutricional, esta actividad antioxidante se asocia con su papel protector contra enfermedades cardiovasculares y el cáncer, así como en procesos de envejecimiento, por lo que está siendo intensamente estudiado mediante ensayos “*in vivo*” e “*in vitro*” (Balasundram *et al.*, 2006; Wojdyło *et al.*, 2016). En este contexto, ha sido una gran cantidad de matrices vegetales las han sido propuestas para la obtención de este tipo de biocomponentes, siendo los residuos agroalimentarios y plantas de uso medicinal como el aloe vera, las principales materias primas utilizadas para la extracción (Galanakis, 2012).

Sin embargo, el proceso de extracción de este tipo de biocompuestos implica la aplicación, por una parte de elevadas temperaturas y por otra, el uso de solventes tóxicos que representan un riesgo para la salud y el medioambiente. Es importante destacar, que la mayoría de los efluentes resultantes de los procedimientos de extracción han tenido una mayor consideración ya que pueden generar no solo elevados costos de manejo sino también diferentes problemas ambientales y técnicos (Barba *et al.*, 2016; Caldas *et al.*, 2018; González-Centeno *et al.*, 2015). Esto ha llevado a la búsqueda de tratamientos especiales, que pueden eliminar posibles elementos tóxicos, y también para obtener un producto final que cumpla con los requisitos para pertenecer a una lista denominada GRAS (generalmente reconocido como seguro) y ser aceptado para consumo humano (Barba *et al.*, 2016; Caldas *et al.*, 2018).

Todo esto ha conducido al desarrollo de nuevas estrategias que permitan la recuperación de estos compuestos de este tipo de residuo minimizando el impacto sobre el medio ambiente, tal es el caso de los ultrasonidos de potencia los cuales son considerados una tecnología verde y respetuosa del medioambiente (Katsampa *et al.*, 2015). Por tal motivo, el principal objetivo de este trabajo, fue el aplicar la tecnología de ultrasonido de potencia a temperatura ambiente para la recuperación de compuestos fenólicos a partir de diferentes mezclas de gel de aloe vera y pasta prensada de uva, usando agua como agente extractor.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materia prima

El gel de Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller), procedente de plantas de 3 años de edad, y la pasta prensada de uva, específicamente piel y pulpa liofilizadas, fueron usadas como materia prima. Ambas materias primas fueron mezcladas en seco usando diferentes proporciones Aloe vera:pasta prensada de uva (75:25, 50:50 25:75; g:g), y sometidas a diferentes tratamientos con ultrasonido de potencia. Muestras 100% Aloe vera y 100% pasta prensada de uva fueron estudiadas como referencia.

### Extracción asistida con ultrasonido

La extracción asistida con ultrasonido de los compuestos fenólicos procedentes de las diferentes mezclas de Aloe vera y pasta prensada de uva, se realizó usando un equipo de ultrasonido Hielscher Ultrasonics UP400S (Alemania) con 400 W de potencia y una frecuencia de 24 kHz. El proceso de extracción se llevo a cabo en modo continuo y con una amplitud de potencia de 100%. La extracción asistida con ultrasonido se llevo a cabo usando dos sonotrodos de 14 y 40 mm de diámetro, a dos diferentes tiempos de aplicación, 5 y 10 min. Aproximadamente 1 g de las diferentes mezclas, incluyendo las muestras de referencia, fueron suspendidos en 100 mL de agua destilada dentro de un matraz enchaquetado. Todo el proceso se realizó a 20 °C, dicha temperatura fue controlada a 20 °C usando un sistema de recirculación de agua a 5 °C.

La suspensión, la cual contenía los diferentes compuestos fenólicos extraídos con asistencia acústica, fue separada por centrifugación a 18,000g por 30 min. El sobrenadante fue separado por decantación, congelado a -80 °C y liofilizado a 0.01 mBar a 20 °C. la muestra liofilizada fue almacenada en condiciones anhidras y en ausencia de luz para evitar la degradación de los diferentes compuestos bioactivos.

## **Determinación del contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante**

### **Preparación de la muestra**

La cuantificación de polifenoles totales y actividad antioxidante de las mezclas de Aloe vera y pasta prensada de uva se realizó a partir de los extractos metanólicos de las mismas. Para obtener dichos extractos, se colocaron 100 mg de cada muestra dentro de un vial, la cual se le añadieron 3 mL de metanol para posteriormente ser homogenizados mediante un Ultra Turrax T-50 a 10,000 RPM durante 1 minuto. Después se dejaron en agitación y refrigeración durante 24 horas, posteriormente se depositaron en tubos eppendorf para ser centrifugadas por 15 min a 4 °C a una velocidad de 15 000 rpm para después concentrar a 30 °C a un volumen alcohólico por 30 minutos para así poder obtener los extractos (Eim *et al.*, 2013).

### **Contenido de polifenoles totales**

Se utilizó el método de Folin-Ciocalteu para medir el contenido de compuestos fenólicos totales presentes en los extractos del gel de *Aloe vera* y pasta prensada de uva siguiendo el método propuesto por Singleton y Rossi (1965) con ciertas modificaciones para ser adaptado al análisis en celdas de cuarzo de 1 mL descritas por Gonzalez-Centeno *et al.* (2012).

De cada muestra se depositaron en un tubo de ensaye de 13×100: 125 µL de muestra, a los cuales se adicionó 400 µL de agua libre de CO<sub>2</sub>, 25 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu 2N, se agitaron y se dejaron reposar por 5 min, transcurrido este tiempo se agregaron 400 µL de una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7.5%). Los tubos fueron agitados nuevamente y se dejaron reposar por un tiempo de 35 min fuera del alcance de la luz.

Posteriormente se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro DR 5000 HACH. El ácido gálico fue el estándar empleado, del cual se construyó una curva de calibración con concentraciones de 25 – 150 ppm. Los resultados de la cuantificación fueron expresados como mg equivalentes de ácido gálico/100g de muestra.

### **Capacidad antioxidante por el método modificado SDS (lauril sulfato de sodio) -ferricianida**

Para la determinación de capacidad antioxidante mediante este método, se prepararon las siguientes soluciones, ácido clorhídrico (HCl) 1 M y SDS, diluyendo 1 g de SDS en 100 mL de agua. La solución de K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> (1% p/v) se preparó el mismo día del análisis, disolviendo 0.5 g en 1 mL de HCl 1 M y aforando hasta 50 mL con agua destilada. La solución de cloruro férrico (FeCl<sub>3</sub>) (0.1% p/v) se preparó también el mismo día del análisis disolviendo 0.1 g de FeCl<sub>3</sub> en 1 mL de HCl 1M aforando con agua destilada hasta 50 mL.

En tubos de ensaye se procedió de la siguiente manera, por cada 100 µL de solución problema se añadieron en cada tubo 1.26 mL de agua destilada, 40 µL de HCl 1M, 300 µL de la solución de ferri cianuro de potasio, 100 µL de SDS, 100 µL de FeCl<sub>3</sub> y 100 µL de MeOH para completar un volumen de 2 mL. La mezcla se incubó a 50°C durante 20 min en un baño de agua, posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente, y la absorbancia resultante a 750 nm midiéndose contra un blanco son extracto antioxidante. El color de la solución final fue estable durante 30 min. Se utilizó una curva estándar de Trolox (50 – 200 µM) para expresar los resultados en mg equivalentes de Trolox por cada 100 g de muestra liofilizada.

### **Análisis estadístico**

El efecto de los diferentes tratamientos con ultrasonido de potencia sobre el contenido de polifenoles totales, así también, la capacidad antioxidante evaluada por los métodos de DPPH y ABTS de las diferentes mezclas de Aloe vera y uva, se analizó mediante un análisis de varianza de una sola vía (One-way ANOVA) con un nivel de significancia de 0.05. posteriormente, la comparación de medias se realizó mediante la prueba de Fisher de diferencia mínima significativa (LSD), usando un valor de  $p < 0.05$ . todos los análisis fueron realizados mediante el software estadístico NCSS.

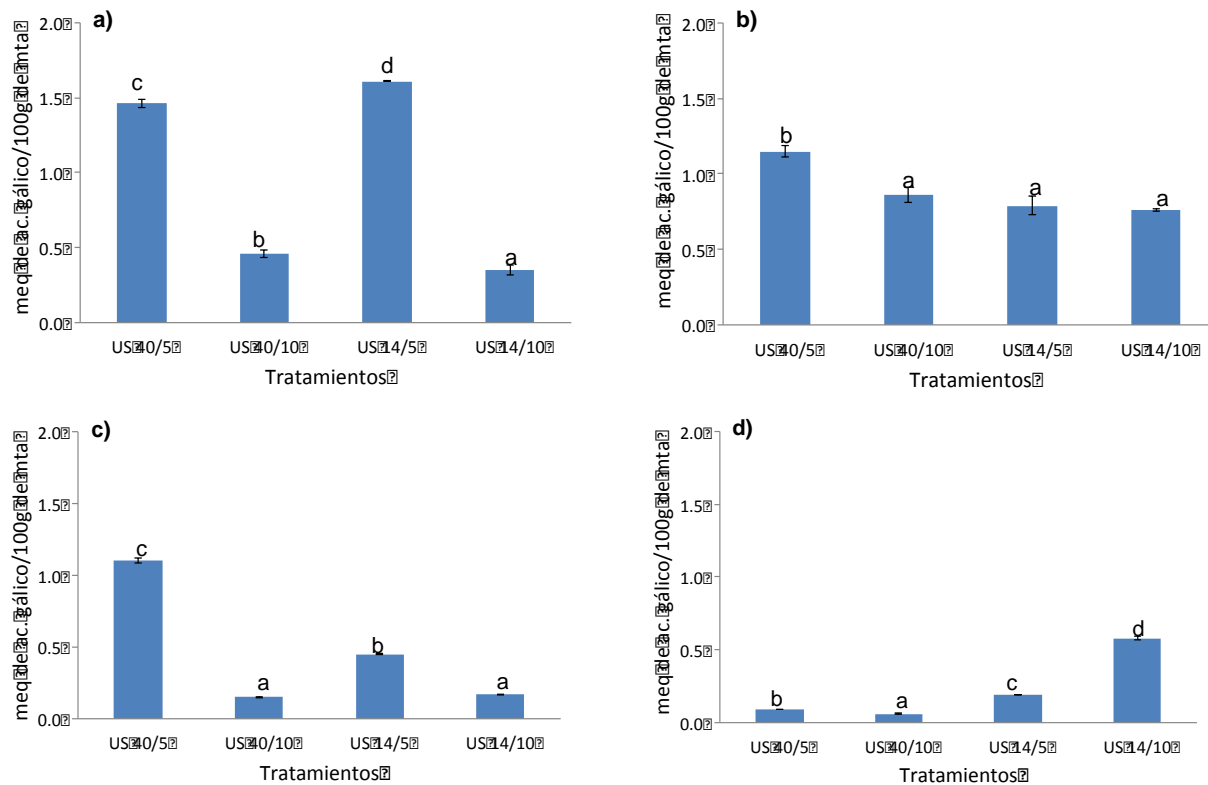
## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Compuestos fenólicos**

En la figura 1 se muestra el contenido de polifenoles totales presentes en los extractos de mezclas de *Aloe vera* y pasta prensa de uva obtenidos con asistencia acústica. En este caso, se observó que las condiciones de extracción usadas en este trabajo de investigación mostraron efecto significativo sobre el contenido de polifenoles ( $p < 0.05$ ) en las diferentes muestras analizadas.

Así pues, se puede observar que las muestras 100% uva (Fig. 1A) y 25% aloe-75% uva (Fig. 1B) mostraron una concentración de polifenoles totales mayor las muestras 50% aloe-50% uva (Fig. 1C), 75% aloe-25% uva (Fig. 1D) y 100% aloe (Fig. 1E), las cuales mostraron una concentración de polifenoles totales significativamente baja ( $p < 0.05$ ). Cabe destacar, que en la muestra 100% Aloe, el contenido de polifenoles totales no se vio afectado de forma significativa por los tratamientos aplicados ( $p > 0.05$ ) (Fig. 1E).

La variación en el contenido de polifenoles totales podría deberse a los diferentes tratamientos a los cuales fueron sometidas las muestras, mostrando una gran influencia el tiempo y el diámetro del sonotrodo con el cual fueron tratadas, generando diferencias en el contenido de polifenoles a comparación de usar un método convencional como agitación mecánica. Estos resultados varían a los reportados por Caldas *et al.* (2018) donde obtuvieron resultados de 58.2 meq de ac. gálico/100 g de muestra. Observando una variación entre estos resultados en comparación con los resultados obtenidos en el presente trabajo. Estos mismos autores sugieren que esta diferencia puede deberse a que existe una variedad de compuestos fenólicos que son más solubles en mezclas de disolventes que en disolventes acuosos puros, así como en los métodos de extracción.



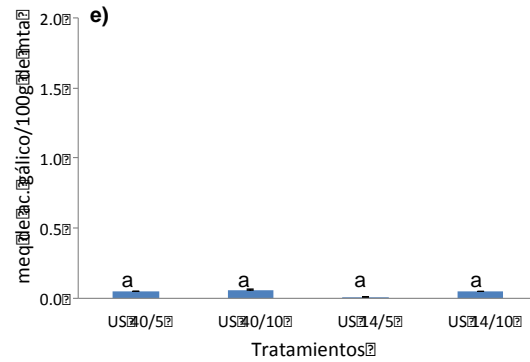
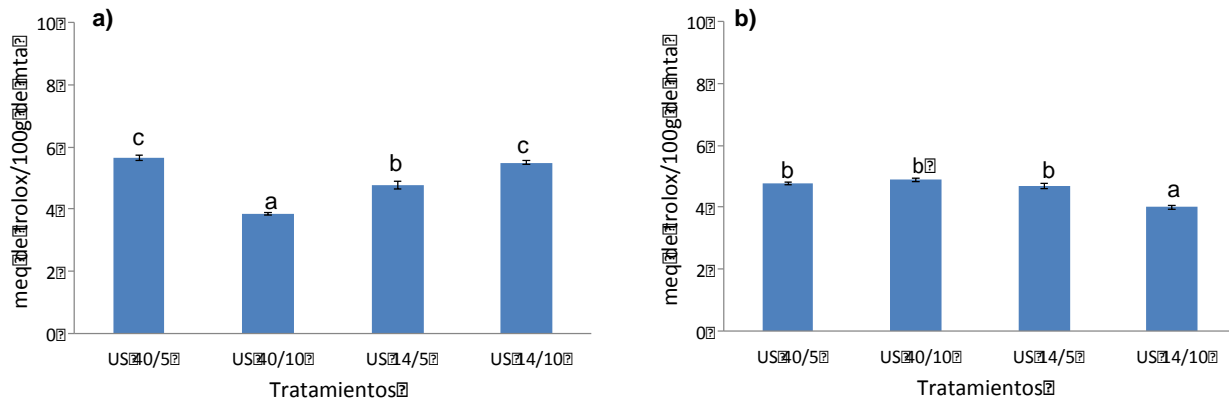


Figura 1. Contenido de polifenoles totales determinados por Folin-Ciocalteu de los diferentes extractos de aloe vera y uva obtenidos en diferentes condiciones de extracción asistida con ultrasonido: sonotrodo de 40 mm por 5 (US 40/5) y 10 min (US 40/10), sonotrodo de 14 mm por 5 (US 14/5) y 10 min (US 14/10). (A) muestra 100% de uva; (B) muestra 25% aloe-75% uva; (C) muestra 50% aloe-50% uva; (D) muestra 75% aloe-25% uva y (E) muestra 100% aloe. Las letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos.

**Actividad antioxidante evaluada por SDS (lauril sulfato de sodio) –ferricianida**

La capacidad antioxidante determinada por el método modificado SDS (lauril sulfato de sodio) –Ferricianida presente en los extractos de mezclas de *Aloe vera* y pasta prensada de uva obtenidos con asistencia acústica se muestran en la Figura 2. En esta figura se puede observar que los diferentes tratamientos aplicados para la obtencion de los extractos de las diferentes muestras afecto significativamente su capacidad antioxidante evaluada por el metodo modificado SDS – Ferricianidina ( $p < 0.05$ ). Los extractos obtenidos de la muestra 25% aloe-75% uva (Fig 2B) presentaron mayor capacidad antioxidante por este método, y presentó menor variabilidad con respecto a las condiciones de extraccion usadas. Por otra parte, los extractos obtenidos a partir de las muestras 50% aloe-50% uva (Fig. 2C), 75% aloe-25% uva (Fig. 2D) y 100% aloe (Fig 2E) presentan una menor capacidad antioxidante por este metodo, los extractos obtenidos de 100% aloe los que presentaron la capacidad antioxidante mas baja.



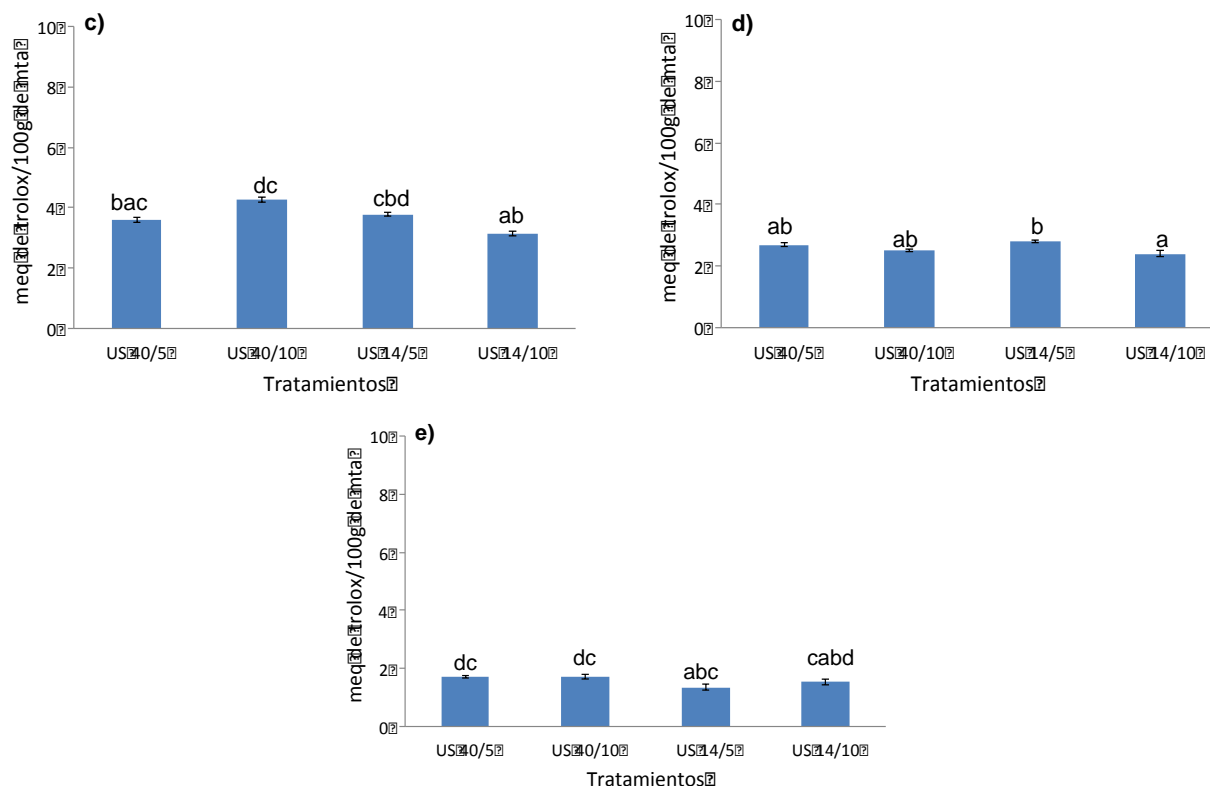


Figura 2. Capacidad antioxidante determinada por el método modificado SDS (lauril sulfato de sodio)–Ferricianida de los diferentes extractos de aloe vera y uva obtenidos en diferentes condiciones de extracción asistida con ultrasonido: sonotrodo de 40 mm por 5 (US 40/5) y 10 min (US 40/10), sonotrodo de 14 mm por 5 (US 14/5) y 10 min (US 14/10). (A) muestra 100% de uva; (B) muestra 25% aloe-75% uva; (C) muestra 50% aloe-50% uva; (D) muestra 75% aloe-25% uva y (E) muestra 100% aloe. Las letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos

La muestra 100% uva sonicada con un sonotrodo de 40 mm por 5 min (US 40/5) mostró una capacidad antioxidante mayor que el resto de los tratamientos (5.65 meq de TROLOX/100 g de mta) a diferencia del tratamiento US 40/10, el cual presentó menor capacidad antioxidante (3.84 meq de TROLOX/100 g de mta) de los tratamientos perteneciente a esta muestra, siendo esta muestra (100% uva) la que presento mayor capacidad antioxidante a diferencia de las demás. Estos resultados podrían atribuirse a la variabilidad de sonotrodo, el tiempo que fueron sometidas las muestras y las proporciones de pasta prensada de uva y aloe. Estos resultados varían a los reportados por González-Centeno *et al.* (2014) donde obtuvieron resultados de 18.54-25.90 meq de ac. gálico/100 g de muestra. De acuerdo con Goula *et al.* (2016) esta variación podría deberse a la temperatura y al tamaño de sonotrodo aplicados en los procesos de extracción a los que fueron sometidos las muestras ya que esto genera degradación en los polifenoles y en el potencial antioxidante que se pudieran obtener.

## CONCLUSIÓN

La aplicación de ultrasonido de potencia promueve una mayor recuperación de compuestos fenólicos con elevada capacidad antioxidante en comparación con métodos convencionales como es la agitación mecánica, demostrando ser una alternativa prometedora para intensificar el proceso de extracción de biocomponentes con actividad biológica a partir de diferentes matrices vegetales.

En comparación con otros métodos convencionales, en este trabajo realizado se usó agua como disolvente, evitando la pérdida de compuestos fenólicos y la reducción de la capacidad antioxidante al momento de retirar el solvente de la muestra, optimizando este método.

Altas temperaturas y la frecuencia de energía son factores que generan degradación de compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante, por lo cual, las muestras fueron sometidas a 20° C a una potencia y frecuencia de operación de 400 W y 24 kHz, mejorando el proceso evitando dicha degradación.

De acuerdo con el diseño experimental y los resultados obtenidos, las condiciones óptimas para obtener un mayor aprovechamiento de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante fueron encontrados mediante los tratamientos de ultrasonidos con sonotrodos de 40 y 14 mm de diámetro a un tiempo de 5 min.

## BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Estrada, B.A., Gutiérrez-Urbe, J.A., Serna-Saldívar, S.O., 2014. Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry* 152, 46-55.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* 99, 191-203.
- Barba, F.J., Zhu, Z., Koubaa, M., Sant'Ana, A.S., Orlie, V., 2016. Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. *Trends in Food Science & Technology* 49, 96-109.
- Caldas, T.W., Mazza, K.E.L., Teles, A.S.C., Mattos, G.N., Brígida, A.I.S., Conte-Junior, C.A., Borguini, R.G., Godoy, R.L.O., Cabral, L.M.C., Tonon, R.V., 2018. Phenolic compounds recovery from grape skin using conventional and non-conventional extraction methods. *Industrial Crops and Products* 111, 86-91.
- Eim, V.S., Urrea, D., Rosselló, C., García-Pérez, J.V., Femenia, A., Simal, S., 2013. Optimization of the drying process of carrot (*Daucus carota* v. Nantes) on the basis of quality criteria. *Drying Technology* 31, 951-962.
- Galanakis, C.M., 2012. Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science & Technology* 26, 68-87.
- González-Centeno, M.R., Comas-Serra, F., Femenia, A., Rosselló, C., Simal, S., 2015. Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera* L.): Experimental kinetics and modeling. *Ultrasonics Sonochemistry* 22, 506-514.
- Gonzalez-Centeno, M.R., Jourdes, M., Femenia, A., Simal, S., Rossello, C., Teissedre, P.L., 2012. Proanthocyanidin Composition and Antioxidant Potential of the Stem Winemaking Byproducts from 10 Different Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 11850-11858.
- González-Centeno, M.R., Knoerzer, K., Sabarez, H., Simal, S., Rosselló, C., Femenia, A., 2014. Effect of acoustic frequency and power density on the aqueous ultrasonic-assisted extraction of grape pomace (*Vitis vinifera* L.) – A response surface approach. *Ultrasonics Sonochemistry* 21, 2176-2184.
- Goula, A.M., Thymiatis, K., Kaderides, K., 2016. Valorization of grape pomace: Drying behavior and ultrasound extraction of phenolics. *Food and Bioprocess Technology* 100, 132-144.
- Katsampa, P., Valsamedou, E., Grigorakis, S., Makris, D.P., 2015. A green ultrasound-assisted extraction process for the recovery of antioxidant polyphenols and pigments from onion solid wastes using Box-Behnken experimental design and kinetics. *Industrial Crops and Products* 77, 535-543.
- Peixoto, C.M., Dias, M.I., Alves, M.J., Calhella, R.C., Barros, L., Pinho, S.P., Ferreira, I.C.F.R., 2018. Grape pomace as a source of phenolic compounds and diverse bioactive properties. *Food Chemistry* 253, 132-138.
- Shahidi, F., Naczki, M., 2003. Phenolics in food and nutraceuticals. Taylor & Francis.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144-158.

Wojdyło, A., Nowicka, P., Carbonell-Barrachina, Á.A., Hernández, F., 2016. Phenolic compounds, antioxidant and antidiabetic activity of different cultivars of *Ficus carica* L. fruits. *Journal of Functional Foods* 25, 421-432.