

Influencia de la aplicación de ultrasonidos de potencia en la extracción de fenoles y flavonoides totales a partir de hojas de brócoli

C.P. Pérez-Arenas, E. Mares-Mares, M.R. Abraham-Juárez, C. Ozuna*

Departamento de Alimentos, División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato, Campus Irapuato-Salamanca. *cesar.ozuna@ugto.mx

RESUMEN:

El objetivo general de esta investigación fue evaluar el efecto del tiempo y la temperatura en la concentración de fenoles y flavonoides totales en hojas de brócoli durante la extracción asistida por ultrasonidos de potencia (UP). Los extractos fueron preparados empleando 5 g de harina de hojas deshidratadas de brócoli y 100 mL de metanol al 80%. Posteriormente, los extractos fueron sonicados en un baño ultrasónico de 5 L (40 kHz, $5.57 \pm 0.87 \text{ kW/m}^3$) a diferentes tiempos (15, 30 y 45 min) y temperaturas (30, 40 y 50°C). Una vez obtenidos los extractos, se evaluó el contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) y flavonoides totales (FT). Con base en los resultados obtenidos, las concentraciones de CFT y FT en los extractos oscilaron de 15.70 ± 0.98 a $36.68 \pm 0.77 \text{ mg EAG/g P.S.}$ y 17.09 ± 1.32 a $24.14 \pm 0.53 \text{ mg ER/g P.S.}$, respectivamente. En el caso de la concentración de CFT, el incremento del tiempo de exposición a UP contribuyó al aumento significativo ($p < 0.05$) de la extracción de dichos compuestos. Sin embargo, al superar la temperatura de 40°C, la concentración de CFT disminuyó. Respecto a la concentración de FT en los extractos, el aumento del tiempo y la temperatura de extracción asistida con UP favoreció su extracción ($p < 0.05$).

Palabras clave: Tecnologías no térmicas, subproductos, compuestos bioactivos.

ABSTRACT:

The main aim of this research was to evaluate the effect of extraction time and temperature on total phenolic and flavonoid content in broccoli leaf during extraction assisted by power ultrasound (PU). The extracts were prepared using 5 g of dehydrated broccoli leaf meal and 100 mL of 80% methanol. Subsequently, the extracts were sonicated in an ultrasonic bath of 5 L (40 kHz, $5.57 \pm 0.87 \text{ kW/m}^3$) at different times (15, 30, and 45 min) and temperatures (30, 40, and 50°C). Once the extracts were obtained, the content of total phenolic compounds (TFC) and total flavonoids (TF) was evaluated. Based on the results, the concentrations of TFC and TF in broccoli leaf extracts ranged from 15.70 ± 0.98 to $36.68 \pm 0.77 \text{ mg GAE/g DW}$ and from 17.09 ± 1.32 to $24.14 \pm 0.53 \text{ mg RE/g DW}$, respectively. In the case of TFC concentration, the increase in the time of UP exposure contributed to a significant increase ($p < 0.05$) in the extraction of these biocompounds. However, when the temperature of 40°C was exceeded, the concentration of TFC decreased. Regarding TF concentration in the extracts, the increase in the time and the temperature of extraction assisted by PU favored its extraction ($p < 0.05$).

Keywords: Non-thermal technologies, by-products, bioactive compounds.

Área de trabajo: Aprovechamiento y valorización de subproductos

INTRODUCCIÓN

La industria agroalimentaria representa uno de los sectores económicos estratégicos del estado de Guanajuato (Gutiérrez Robles *et al.*, 2017). Esta industria produce una gran cantidad de desechos y subproductos que representan una gran fuente de contaminación. En México, los subproductos vegetales son utilizados como material de abono para plantas o como ingredientes para alimentos balanceados para ganado. Sin embargo, está demostrado que son fuente potencial de compuestos bioactivos con capacidad de ser utilizados para garantizar la calidad e inocuidad de los alimentos (Cilla *et al.*, 2018). Actualmente, las hojas de brócoli (*Brassica oleracea italica*) están siendo estudiadas debido a su contenido de compuestos bioactivos tales como compuestos fenólicos, flavonoides y así mismo su capacidad antioxidante (Ferreira *et al.*, 2018; Gutiérrez Robles *et al.*, 2017).

En los últimos años ha surgido un gran interés en el uso de tecnologías no térmicas para los procesos de extracción de compuestos bioactivos, tal es el caso de los ultrasonidos de potencia (UP) (Chemat *et al.*, 2017). El fundamento de extracción de los UP consiste en la aplicación de ondas acústicas que

producen el fenómeno de cavitación. Este fenómeno provoca la variación de presiones acústicas, las cuales inducen la producción de microburbujas que se expanden y colapsan al mismo tiempo que promueven el fenómeno de implosión (Chemat *et al.*, 2017; Ozuna *et al.* 2015). Durante la implosión se libera la energía acumulada ocasionando un choque mecánico a la estructura de la célula, logrando así que, el solvente entre a la célula y favorezca la extracción de los compuestos bioactivos (Ozuna *et al.*, 2015). Los UP representan una tecnología que contribuye a la disminución del costo del proceso y permite aumentar la calidad y bioactividad de los extractos obtenidos (Chemat *et al.*, 2017).

Respecto a procesos de extracción de compuestos bioactivos asistido por UP, Paz *et al.* (2015) extrajeron compuestos antioxidantes de plantas nativas del desierto mexicano. Estos investigadores observaron que las principales variables del proceso que ejercieron una fuerte influencia en la extracción de estos compuestos fueron la proporción sólido-líquido y la concentración de etanol empleada como solvente. Por otro lado, Deng *et al.* (2015) estudiaron la capacidad antioxidante y antimicrobiana de extractos de hojas y corteza de vara de oro de Canadá (*Solidago canadensis* L.) obtenidos por UP. Finalmente, Flores Corral y Peláez Mendoza (2018) estudiaron la capacidad antioxidante de extractos de hojas de guanábana (*Annona muricata* L.) obtenidos por UP. Los autores concluyen que, empleando una potencia de 60 W, un tiempo de 25 min y una concentración del solvente hidroalcohólico al 90% fueron las condiciones que permitieron aumentar la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos.

El objetivo general de esta investigación fue evaluar el efecto del tiempo y la temperatura en la concentración de fenoles y flavonoides totales en hojas de brócoli durante la extracción asistida por ultrasonidos de potencia (UP).

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de materia prima para la generación de extractos

La recolección de las hojas externas de brócoli se llevó a cabo en la Empresa Agroalimentaria Mar Bran (Planta No.1) de la ciudad de Irapuato, Gto. Posterior a su recolección, las hojas fueron seleccionadas, lavadas y desinfectadas. Enseguida, se cortaron, retirando los nervios, para después ser deshidratadas por aire caliente a 60°C empleando un horno de secado (CE3F, Shel Lab, Estados Unidos) hasta alcanzar un peso constante (Gutiérrez Robles *et al.*, 2017). Posterior a su deshidratación, las hojas deshidratadas fueron pulverizadas, tamizadas (Tamaño de malla No. 14) y almacenadas en frascos de vidrio en oscuridad a 25°C.

Extracción asistida por ultrasonidos de potencia

La extracción de compuestos bioactivos asistida por ultrasonidos de potencia (UP) a partir de hojas de brócoli se realizó empleando matraces Erlenmeyer de 250 mL adicionando 5 g de harina de hojas de brócoli y 100 mL de metanol al 80% como solvente. Los matraces fueron sonicados a través de un baño ultrasónico de 5 L con una frecuencia de 40 kHz y potencia nominal máxima de 120 W (ULTRASONS HD, Selecta S.A., España) durante 15, 30 y 45 min a temperaturas de 30, 40 y 50°C. La densidad acústica media del baño fue de 5.57 ± 0.87 kW/m³, la cual fue determinada por el método calorimétrico reportado por Ozuna *et al.* (2015).

Determinación de compuestos fenólicos totales

Se realizó la determinación siguiendo el método propuesto por Slinkard *et al.* (1999) con ligeras modificaciones. Los valores de absorbancia fueron leídos a 765 nm a través de un espectrofotómetro UV-Vis (GENESYS 10S, Thermo Scientific™, EUA) y el contenido fenólico total de las muestras se reportó en mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de peso seco (mg EAG/g P.S).

Flavonoides totales

La determinación del contenido de flavonoides totales en las muestras se llevó a cabo siguiendo el método de Khanam et al. (2012), leyendo los valores de absorbancia a una longitud de onda de 415 nm a través de un espectrofotómetro UV-Vis (GENESYS 10S, Thermo Scientific™, EUA). Los resultados fueron reportados como mg equivalentes de rutina por grano de peso seco (mg ER/g P.S).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante del análisis de varianza (ANOVA) con un análisis *post-hoc* de Tukey. Para determinar diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos, los datos experimentales se analizaron en el programa estadístico Statgraphics Versión 16.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fenoles totales. La Fig. 1 muestra el efecto del tiempo (15, 30 y 45 min) y la temperatura (30, 40 y 50°C) de extracción de compuestos fenólicos totales (CFT) asistida por UP (40 kHz; 120 W) a partir de hojas deshidratadas de brócoli a 60°C durante 24 h.

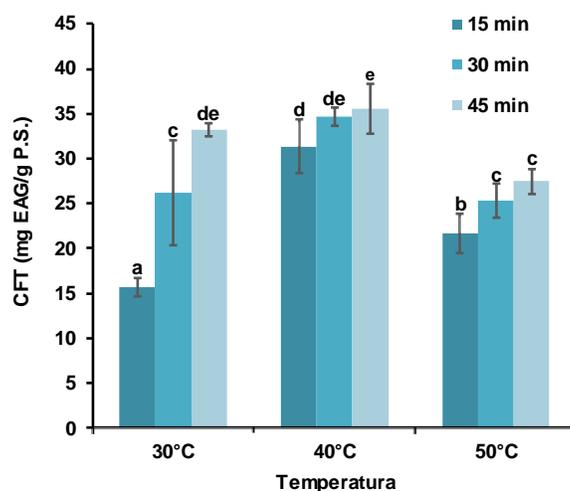


Figura 1. Efecto de la temperatura y el tiempo asistida por ultrasonidos de potencia (40 kHz; 120 W; $5.57 \pm 0.87 \text{ kW/m}^3$) sobre la concentración de compuestos fenólicos totales partir de hojas deshidratadas (60°C, 24 h) de brócoli. Letras diferentes indican grupos homogéneos (Tukey, $p < 0.05$).

En términos generales, la concentración de compuestos fenólicos totales (CFT) de los extractos metanólicos de hojas de brócoli oscilaron de $15.70 \pm 0.98 \text{ mg EAG/g P.S.}$ a $36.68 \pm 0.77 \text{ mg EAG/g P.S.}$ Las concentraciones de CFT obtenidos en esta investigación son congruentes con los valores reportados por diversos autores para extractos hojas de olivo (Ahmad-Qasem et al., 2013) y laurel (Muñiz-Márquez et al., 2013) obtenidos a partir de una extracción asistida por UP.

Respecto al tiempo de extracción, en las tres temperaturas estudiadas se observó un incremento significativo ($p < 0.05$) de la concentración de CFT al aumentar el tiempo del tratamiento. Sin embargo, este aumento fue más pronunciado en la temperatura de 30°C en comparación con 40 y 50°C. En este sentido, a 30°C, el incremento de la concentración de CFT de 15 a 45 min fue de un 133.51%. Por otro lado, para las temperaturas de 40 y 50°C, este aumento fue de un 13.35% y 26.64%, respectivamente. En el caso de la temperatura de extracción, se observó que el uso de una temperatura de 40°C contribuyó a incrementar la extracción de CFT en los primeros 15 min en comparación con las temperaturas de 30 y 50°C (31.33 ± 3.14 , 15.70 ± 0.98 y $21.69 \pm 2.17 \text{ mg EAG/g P.S.}$, respectivamente). Respecto a las tres temperaturas estudiadas, la temperatura de 50°C fue la menos efectiva para el proceso de extracción de CFT en hojas deshidratadas de brócoli.

Flavonoides Totales. La Fig. 2 muestra el efecto del tiempo (15, 30 y 45 min) y la temperatura de extracción (30, 40 y 50°C) asistida por UP (40 kHz; 120 W) sobre el contenido de flavonoides totales (FT) de hojas deshidratadas de brócoli a 60°C durante 24 h.

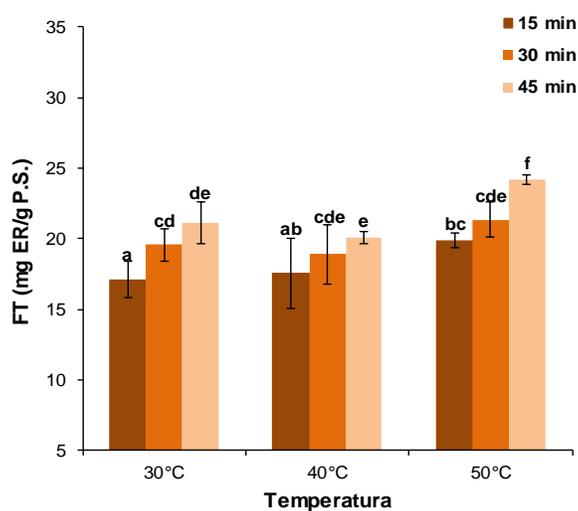


Figura 2. Efecto de la temperatura y el tiempo asistida por ultrasonidos de potencia (40 kHz; 120 W; $5.57 \pm 0.87 \text{ kW/m}^3$) sobre la concentración de flavonoides totales partir de hojas deshidratadas (60°C, 24 h) de brócoli. Letras diferentes indican grupos homogéneos (Tukey, $p < 0.05$).

La concentración de flavonoides totales (FT) de los extractos metanólicos de hojas de brócoli oscilaron de $17.09 \pm 1.32 \text{ mg ER/g P.S.}$ a $24.14 \pm 0.53 \text{ mg ER/g P.S.}$. Los valores obtenidos en esta investigación son congruentes a los reportados por Abdennacer et al. (2014) para extractos metanólicos de hojas de *Lycium intricatum* Boiss ($28.91 \pm 1.92 \text{ mg ER/g P.S.}$).

En todas las temperaturas estudiadas, el incremento del tiempo de extracción aumentó significativamente ($p < 0.05$) la concentración de FT en los extractos obtenidos. Respecto al efecto de la temperatura de extracción, se puede observar en la Fig. 2 que el incremento de este factor contribuyó a extraer una mayor concentración de FT.

Contrario a lo observado en CFT, el empleo de una temperatura de extracción de 50°C benefició la extracción de FT. Por ejemplo, a los 45 min del proceso, se obtuvo una concentración final de FT de $21.10 \pm 1.4433 \text{ mg ER/g P.S.}$ y $24.14 \pm 0.33 \text{ mg ER/g P.S.}$ para 30 y 50°C, respectivamente. La tendencia obtenida en esta investigación es congruente por la reportada por Wang et al. (2018) para la extracción de compuestos bioactivos de hojas de olivo asistida por UP. Estos autores afirman que las condiciones que maximizaron la extracción de FT fue el empleo de una temperatura de 55°C y un tiempo de 55 min.

Con los resultados obtenidos en esta investigación, se puede concluir que las variables del proceso, tales como el tiempo y la temperatura, son de gran importancia para maximizar la extracción de compuestos bioactivos en un proceso asistido por UP. Futuras investigaciones deben centrarse en la optimización de dichas variables para aumentar el rendimiento de extracción de los CFT y FT.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad-Qasem, M. H., Cánovas, J., Barrajon-Catalan, E., Micol, V., Cárcel, J. A., & García-Pérez, J. V. (2013). Kinetic and compositional study of phenolic extraction from olive leaves (var. Serrana) by using power ultrasound. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 17, 120-129.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540-560.
- Cilla, A., Bosch, L., Barberá, R., & Alegría, A. (2018). Effect of processing on the bioaccessibility of bioactive compounds—a review focusing on carotenoids, minerals, ascorbic acid, tocopherols and polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 68, 3-15.
- Deng, Y., Zhao, Y., Padilla-Zakour, O., & Yang, G. (2015). Polyphenols, antioxidant and antimicrobial activities of leaf and bark extracts of *Solidago canadensis* L. *Industrial Crops and Products*, 74, 803-809.
- Ferreira, S. S., Passos, C. P., Cardoso, S. M., Wessel, D. F., & Coimbra, M. A. (2018). Microwave assisted dehydration of broccoli by-products and simultaneous extraction of bioactive compounds. *Food Chemistry*, 246, 386-393.
- Gutiérrez Robles, M. E., Franco Ramírez, A. C., Cerón García, A., Abraham Juárez, M. R., & Ozuna, C. (2017). Extracción de compuestos bioactivos a partir de subproductos vegetales del sector agroalimentario del Estado de Guanajuato. *Jóvenes en la Ciencia*, 2(1), 1334-1339.
- Khanam, U. K. S., Oba, S., Yanase, E., & Murakami, Y. (2012). Phenolic acids, flavonoids and total antioxidant capacity of selected leafy vegetables. *Journal of Functional Foods*, 4(4), 979-987.
- Muñiz-Márquez, D. B., Martínez-Ávila, G. C., Wong-Paz, J. E., Belmares-Cerda, R., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2013). Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Laurus nobilis* L. and their antioxidant activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(5), 1149-1154.
- Ozuna, C., Paniagua-Martínez, I., Castaño-Tostado, E., Ozimek, L., & Amaya-Llano, S. L. (2015). Innovative applications of high-intensity ultrasound in the development of functional food ingredients: Production of protein hydrolysates and bioactive peptides. *Food Research International*, 77, 685-696.
- Paz, J. E. W., Márquez, D. B. M., Ávila, G. C. M., Cerda, R. E. B., & Aguilar, C. N. (2015). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from native plants in the Mexican desert. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22, 474-481.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.