



XVI CONGRESO CYTAL®

Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos

Certificamos que

**María Belén Buglione, Marta Susana Agüero, Daniel Alfredo Martínez, Marcela
Viviana Filippi, Florencia Cayolo, Jorge Federico Maldonado**

ha participado en calidad de

AUTOR DEL TRABAJO: "COMPUESTOS POLIFENOLICOS EN BAGAZO DE PERA Y MANZANA"

XVI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos | CYTAL 2017

7º Simposio Internacional de Nuevas Tecnologías

Vº Simposio Latinoamericano sobre Higiene y Calidad de Alimentos

3º Simposio de Innovación en Industrias Alimentarias.

18 – 20 de Septiembre | Sheraton Hotel | Mar del Plata

Dra. Paula Salas
Vicepresidente CYTAL 2017
Presidente AATA Central

Ing. Qca. María Isabel Yeannes
Presidente CYTAL 2017
Presidente AATA Filial Mar del Plata

COMPUESTOS POLIFENOLICOS EN BAGAZO DE PERA Y MANZANA

Agüero, M.S.¹, Buglione, M.B.¹, Martínez, D.A.¹, Filippi, M.V.², Cayolo, F.¹,
Maldonado, J.F.¹

¹*Escuela de Veterinaria y Producción Agroindustrial. UNRN,* ²*Escuela de Producción,
Tecnología y Medio Ambiente. UNRN. Río Negro, Argentina. e-mail:*

mbuglione@unrn.edu.ar

RESUMEN

Los jugos concentrados de pera y manzana obtenidos en las agroindustrias del Alto Valle y Valle Medio de la provincia de Río Negro, constituyen importantes commodities para la economía de la región. Sin embargo, estas industrias generan una gran cantidad de residuos orgánicos sólidos (conocidos como bagazo u orujo) ricos en compuestos que, de ser extraídos, podrían ser valiosos en la industria alimenticia o farmacéutica. Un ejemplo de éstos son los compuestos polifenólicos, reconocidos por sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas.

El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de compuestos polifenólicos en orujos de manzana y pera; y evaluar la capacidad de extracción de estos compuestos que pueden ejercer solventes de distinta polaridad.

Inicialmente, el orujo de manzana y el de pera se secaron y se molieron, para obtener partículas de entre 0,1 a 0,5 mm de diámetro. Posteriormente se prepararon extractos en los cuales se determinó la concentración de polifenoles totales y sólidos solubles. Para ello, se utilizaron 4 solventes diferentes: agua, etanol, acetona y n-hexano. En cada extracto, la determinación del contenido de polifenoles totales se realizó con el reactivo de Folin Ciocalteu, a pH básico. Con este reactivo los polifenoles dan una coloración azul a la solución. La valoración se hizo luego utilizando un espectrofotómetro UV/VIS a 765 nm. Para la curva de calibrado se utilizó ácido gálico como estándar. Los resultados se expresaron en unidades equivalentes de ácido gálico, en ppm en base a

peso seco (mg ácido gálico/kg orujo). La concentración de sólidos solubles en cada extracto se determinó con un refractómetro de ABBE, a 20°C.

En todos los extractos se detectaron compuestos fenólicos, a excepción de los extractos obtenidos con hexano en que la extracción fue nula. Los niveles más elevados se encontraron en aquellos obtenidos a partir de orujo de manzana. Por otro lado, con los solventes más polares (agua y etanol) se logró extraer mayor cantidad de polifenoles que con los menos polares. Paralelamente, la concentración de sólidos totales resultó también superior en los extractos acuoso y etanólico, con respecto a los alcanzados con solventes menos polares como acetona y n-hexano.

Los resultados sugieren que el agua es efectiva para extraer compuestos polifenólicos de una matriz vegetal, lo cual es satisfactorio si se considera la posibilidad de utilizar los bagazos en formulaciones nutraceuticas. Por otro lado, señalan la importancia de considerar ciertos materiales residuales de actividades agroindustriales como fuente de recursos económicos de orden superior.

Palabras claves: bagazo, polifenoles, sólidos solubles

1. Introducción

Los jugos concentrados de pera y manzana obtenidos en las agroindustrias del Alto Valle y Valle Medio de la provincia de Río Negro, constituyen importantes *commodities* para la economía de la región ya que el 95% del jugo producido se exporta –siendo EE.UU el principal comprador, utilizándolo para endulzar gaseosas). Los jugos concentrados se obtienen por extracción y concentración del jugo de distintas variedades de pera (*Pyrus communis*) y manzana (*Malus domestica*).

Considerando que, la producción nacional de manzanas y peras en 2015 fue de 1,8 millones de toneladas Storti 2016, -de las cuales se industrializaron 381.000 toneladas de manzana para la producción de jugos concentrados y sidra- y 240.000 toneladas de pera –para jugos-, se comprende fácilmente que la generación de residuos orgánicos sólidos (conocidos como bagazo u orujo) es muy importante. Estos residuos, constituidos por cáscaras, restos de pulpa, semillas y pedúnculos, poseen una concentración elevada de carbohidratos y fibra, bajo contenido de proteínas, aminoácidos esenciales, vitaminas y sales, terminan dispuestos en formas que tienen escaso valor económico, compostados, depositados como rellenos sanitarios o incluidos en alimentos para animales.

En este trabajo se investiga la presencia en orujos de componentes propios de las frutas, los polifenoles. El método de Folin-Ciocalteu es comúnmente usado para determinar el contenido total de compuestos fenólicos en plantas y alimentos (García Martínez *et al.*, 2015; Beltrán *et al.*, 2013; Astorga, 2012; Morillas-Ruiz y Delgado-Alarcón, 2012; Palomino *et al.*, 2009).

Los compuestos fenólicos tienen su origen en el reino vegetal, son sintetizados *de novo* por las plantas. Constituyen uno de los principales metabolitos secundarios en los vegetales y su presencia en el reino animal se debe a la ingestión de éstos. Poseen uno o más grupos fenólicos en su estructura molecular, la cual varía desde moléculas simples como los ácidos fenólicos a compuestos altamente polimerizados como son los taninos. Presentan diferentes actividades biológicas, siendo su capacidad antioxidante la más importante debido a su capacidad para quelar metales, inhibir la actividad de la enzima lipooxigenasa y de neutralizar radicales libres (Morillas-Ruiz y Delgado-Alarcón, 2012; Robles *et al.* 2007).

En estudios *in vitro* se ha demostrado una elevada actividad antioxidante de los compuestos fenólicos incluso mayor que la presentada por vitaminas y carotenoides. Existe una correlación significativa entre componentes antioxidantes, particularmente compuestos fenólicos, y actividad antioxidante, así como también un efecto hipocolesterolémico. Los polifenoles presentes en alimentos y bebidas son potentes inhibidores de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), por lo que pueden reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Robles *et al.*, 2007).

La concentración y tipos de compuestos polifenólicos presentes en un alimento varía en función de la especie vegetal, parte del vegetal considerada, fotoperíodo, grado de madurez, condiciones edafoclimáticas, procesado y condiciones de almacenamiento (García *et al.*, 2015). Astorga (2012) informó que el contenido de estos compuestos aumenta al acercarse a la madurez del fruto. Además, al comparar los tejidos de los frutos a cosecha, la concentración de compuestos fenólicos y actividad antioxidante fue siempre mayor en piel que en pulpa. Por otro lado, el procesamiento de la fruta también afecta la concentración y estabilidad de los compuestos polifenólicos. Tal como señalaron Kaur y Kapoor (2001), los métodos de conservación y/o procesado de los productos vegetales son responsables de la reducción de los antioxidantes naturales de las frutas y hortalizas, y por tanto de que éstas tengan menor capacidad de protección de la salud que las consumidas en fresco o recién recolectadas. Robles *et al.* (2007) informaron que los procesos de pelado y cortado agravan el problema, ya que se

incrementa la actividad metabólica y descompartimentalización de enzimas y sustratos, causando oscurecimiento, ablandamiento, deterioro microbiológico y desarrollo de sabores y olores indeseables. El procesamiento mínimo da como resultado el incremento en la tasa de respiración y producción de etileno del producto en minutos generando un impacto potencial en los compuestos fitoquímicos y en las propiedades antioxidantes beneficiosas para la salud que poseen los frutos en su estado intacto. El orujo de manzana se altera rápidamente, como todos los alimentos muy húmedos, cuando se abandonan en contacto del aire ya que los constituyentes antioxidantes son muy susceptibles a degradación cuando se exponen a oxígeno, luz y altas temperaturas. Si llegara a demostrarse que los orujos mantienen altas cantidades de componentes bioactivos después del proceso industrial de obtención de jugos, entonces un tratamiento de extracción y purificación de polifenoles que puedan ser incluidos en dietas tendientes a prevenir enfermedades crónico-degenerativas, estaría plenamente justificada.

2. Materiales y métodos

Se trabajó con bagazos provenientes de la Industria Jugos S.A. ubicada en la zona del Alto Valle de la provincia de Río Negro. Los bagazos húmedos generados por el procesamiento de manzanas y peras fueron trasladados a Choele Choel –una distancia de 150 km) para ser utilizados en diferentes estudios. En este trabajo se utilizaron 2 tipos de bagazo: de pera y de manzana. Primero se los dispuso sobre mallas rectangulares, con el propósito de secarlos al sol (para minimizar la proliferación microbiana). Una vez secos, se sometieron a un proceso de triturado con una moledora comercial de granos para lograr un tamaño de partícula uniforme (entre 0,1 a 0,5 mm de diámetro). A excepción de la moledora de granos, todos los equipos utilizados en este trabajo están disponibles en el laboratorio de Investigación y Docencia de la Escuela de Medicina Veterinaria y Producción Agroindustrial de la Universidad Nacional de Río Negro, con sede en Choele Choel, Río Negro, Argentina.

2.1. Obtención de los extractos a partir de bagazo de manzana y pera

Se utilizaron muestras de cada orujo seco y molido. Los extractos se prepararon en relación 1:10 p/p utilizando 4 solventes de diferente polaridad: n-hexano, acetona, etanol y agua. Las mezclas se colocaron en erlenmeyer, sellado con film, para minimizar la evaporación del solvente. Se procedió a la agitación durante 3 h de cada mezcla, con un agitador magnético -a temperatura ambiente y también a 60°C cuando el solvente era agua. Una vez finalizado el proceso de extracción, se pesó y en caso de ser

necesario se corrigió el peso del extracto agregando solvente, se filtraron utilizando una bomba de vacío. Los extractos recién preparados o conservados a -20°C se utilizaron para la determinación de fenoles y sólidos solubles. Se determinó la densidad de cada extracto (calculando la relación masa/volumen) a efectos de calcular el volumen total del extracto, que posibilite los cálculos de concentración de fenoles.

2.2. Cuantificación de fenoles totales

La determinación de polifenoles se realizó con el reactivo de Folin-Ciocalteu. La técnica, descrita por Waterhouse (2012) se basa en el siguiente fundamento: los compuestos fenólicos se oxidan por el reactivo de Folin-Ciocalteu, que está formado por la mezcla de ácido fosfotúngstico ($\text{H}_3\text{W}_{12}\text{O}_{40}$) y ácido fosfomolibdico ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$). En presencia de fenoles, este reactivo se reduce a una mezcla de óxidos azules de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), pasando de un color amarillo a azul. La intensidad de color azul se mide espectrofotométricamente a 765 nm. Para ello se trataron 20 μL de cada extracto con 100 μL del reactivo de Folin- Ciocalteu 2 N (Biopack) y 300 μL de solución de $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ al 20 %. Los tubos se incubaron durante 30 minutos a 40°C en un baño de agua, en oscuridad, y se leyó su absorbancia en espectrofotómetro UV/VIS.

Los resultados se calcularon en base a la comparación con una curva de calibración realizada con un compuesto polifenólico: el ácido gálico $-\text{C}_6\text{H}_2(\text{OH})_3\text{COOH}-$, en un rango de concentración entre 0 y 500 ppm. Los resultados fueron expresados como equivalentes de ácido gálico, ppm en base a peso seco del orujo.

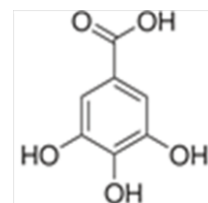


Figura 1: Estructura polifenólica del ácido gálico

2.3. Determinación de sólidos solubles

Los sólidos solubles de cada extracto se determinaron utilizando un refractómetro de ABBE, a temperatura ambiente. Se determinó además los sólidos solubles de cada solvente para corregir los valores obtenidos en los extractos.

3. Resultados y Discusión

3.1. Contenido de sólidos solubles.

La concentración de sólidos solubles en los extractos se expresa en Brix (donde 1 Brix = gramos de sólidos/100 g muestra). Se determinaron los Brix de los solventes puros y este valor se restó al obtenido para los extractos. La concentración de sólidos

solubles de los solventes puros fue: agua: 1.0, etanol: 20, hexano 27.2 y acetona 16.2. La concentración de sólidos solubles fue la misma en los distintos extractos (0,2 Brix), independientemente del tipo de orujo o solvente utilizado, lo que indicaría que la mayoría de los sólidos solubles se encuentran libres en la matriz extracelular de los orujos y pasan fácilmente al solvente de extracción.

3.2. Contenido de fenoles

En la Fig. 2 se muestra el contenido de fenoles en los extractos de orujo de pera y manzana, luego de ser tratados con solventes de distinta polaridad. Los resultados se expresan en ppm ($\mu\text{g/g}$ de orujo). Éstos se calcularon en base a la curva de calibrado construida con ácido gálico, donde resultó $Y=0,0012X + 0,0021$ y $R^2=0,9998$.

Por otro lado, se observó que el contenido de polifenoles disminuyó cuando los extractos fueron almacenados en freezer (-20°C). La determinación de polifenoles en el extracto acuoso de orujo de pera obtenido a 60°C realizada luego de 3 días a -20°C , disminuyó de 1851 a 1410 ppm (24%). En el extracto acuoso obtenido a temperatura ambiente-, el contenido de polifenoles disminuyó de 857 a 750 ppm (12,5%). Esta variación sería atribuible a la actividad enzimática de las enzimas propias de los tejidos vegetales, que se extraen en medio acuoso. De acuerdo a lo señalado por García Martínez *et al.* (2015), los polifenoles pueden ser oxidados por enzimas presentes en los tejidos vegetales, dando lugar a productos de color pardo.

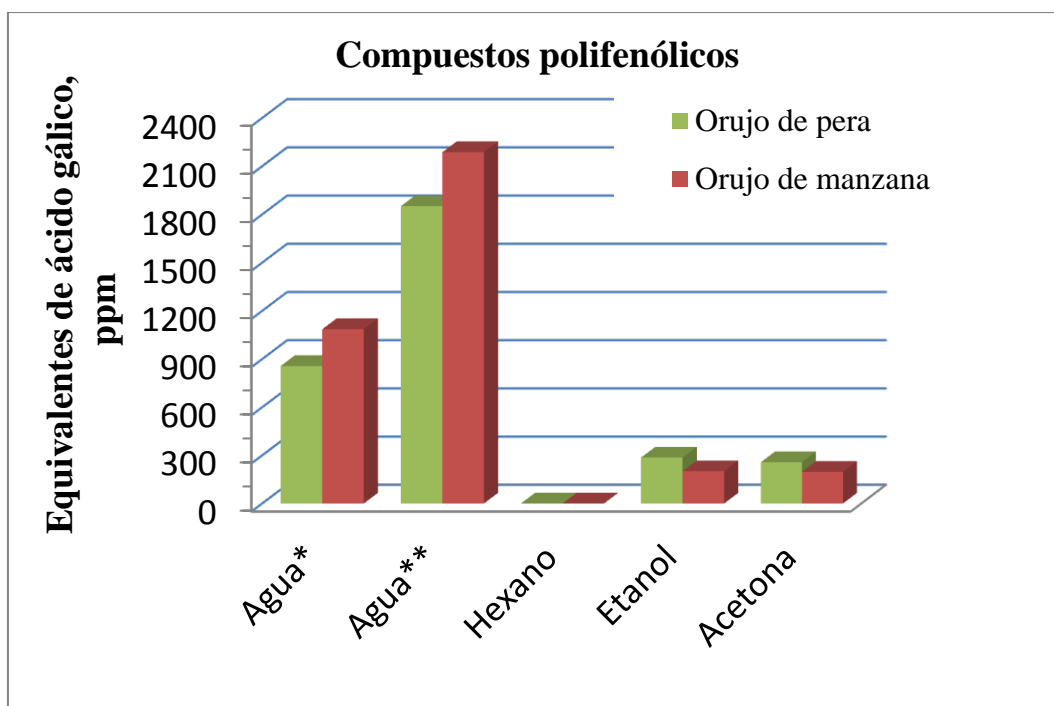


Figura 2: Concentración de fenoles en orujo de pera y manzana extraídos con distintos solventes. *: Solvente a temperatura ambiente (20°C) y ** a 60°C respetivamente.

Se observó que la mejor extracción de polifenoles se logra con agua a 60°C. El solvente apolar hexano no logró extraer compuestos polifenólicos de los orujos. En los tratamientos con los solventes etanol y acetona no se observaron importantes diferencias, indicando igual eficiencia en la extracción. Considerando que polaridad de los solventes está dada por su constante dieléctrica (hexano: $\epsilon=2$, acetona: $\epsilon=21$, etanol: $\epsilon=24$ y agua; $\epsilon=82$), se encontró una correlación positiva entre la concentración de fenoles y la polaridad de los solventes empleados (Fig 3).

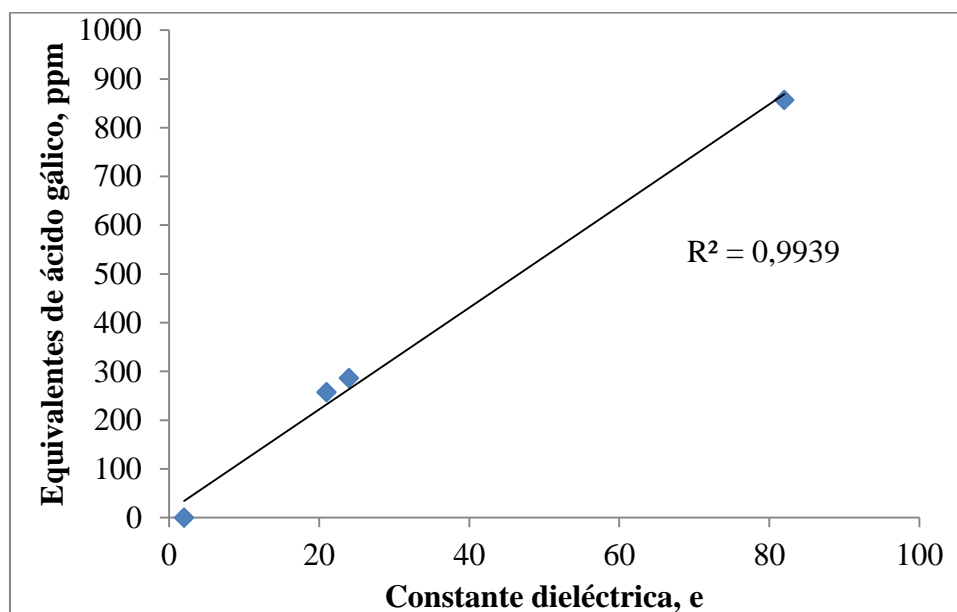


Figura 3: Correlación positiva entre la polaridad del solvente de extracción y el contenido de fenoles de los orujos.

4. Conclusiones

Se identificó la existencia de compuestos polifenólicos en orujo de pera y manzana. Dado que éstos se encuentran principalmente en la piel de las frutas (porque su formación es luz-dependiente), en paredes celulares y en vacuolas intracelulares, el procesamiento de las frutas en la industria, los expone y son alterados por la acción del oxígeno ambiental. En este trabajo se comprobó que siguen detectándose polifenoles en los orujos de manzana y pera, aún sometiendo la fruta a diferentes procesos industriales.

Las propiedades químicas moleculares de un solvente son importantes para mejorar el rendimiento de la extracción de polifenoles. Entre los estudiados, el agua (que es el más polar) fue el que mejor extracción de polifenoles, lo cual reviste particular importancia para aplicaciones en el diseño de alimentos funcionales, suplementos dietéticos y formulaciones farmacéuticas. El n-hexano, solvente apolar y lipofílico, no logró extraer polifenoles de los orujos.

Los residuos sólidos que producen las industrias que procesan peras y manzanas, contienen compuestos polifenólicos, de alta importancia nutracéutica que podrían ser recuperados para generar productos interesantes para la salud humana. Podrían ser útiles en las industrias alimentaria y médico-farmacéutica para el diseño de productos que intervengan en la prevención de las enfermedades asociadas al estrés oxidativo, dando así valor agregado a un residuo agroindustrial.

5. Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Consejo de Investigación, Desarrollo y Transferencia de Tecnología de la UNRN, Resolución 290/2015, PI 40-A-411. Los autores agradecen a la empresa JUGOS S.A. por la provisión del orujo empleado en los ensayos.

6. Referencias

- Astorga Canahuate, C. 2012. Determinación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante en cuatro cultivares de pera en distintos estados de desarrollo del fruto. Tesis Universidad de Talca (Chile).
- Beltrán Delgado, Y., Morris Quevedo, H., de la Cruz, R., Quevedo Morales, Y., Bermúdez Savón, R. 2013. Contenido de fenoles totales en extractos de *Pleurotus* obtenidos con solventes de diferente polaridad. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 2013; 32(2): 121-129
- García Martínez, E.; Fernández Segovia, I.; Fuentes López, A. 2015. Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. <http://hdl.handle.net/10251/52056>. Ultimo acceso: 06/07/2017.
- Kaur, C. y Kapoor, H.C. 2001. Antioxidants in fruits and vegetables- the millennium's health. *Int. J. Food Sci. Technol.* 36:703-725.
- Morillas-Ruiz, J.M. y Delgado-Alarcón, J.M. 2012. Análisis nutricional de alimentos vegetales con diferentes orígenes: evaluación de capacidad antioxidante y compuestos fenólicos totales. *Nutr. clín. diet. hosp.* 32(2):8-20
- Palomino G.L.; García P., C.; Gil G., J.; Rojano, B.; Durango R., D. 2009. Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). *Palo vitae, Revista De La Facultad De Química Farmacéutica*, 16 (3):388-395
- Robles-Sánchez, M, Gorinstein, Sh, Martín-Belloso, O, Astiazarán-García, H, González-Aguilar, G, Cruz-Valenzuela, R. 2007. Frutos tropicales mínimamente procesados: Potencial antioxidante y su impacto en la salud. *Interciencia*, 32(4), 227-232.
- Storti L. 2016. Informes de cadenas de valor 1(13). Ministerio de Hacienda y Finanzas Públicas Presidencia de la Nación. http://www.economia.gob.ar/peconomica/docs/Complejo_fruta_pepita.pdf. Ultimo acceso: 06/07/2017.
- Waterhouse, A. 2012. Folin-Ciocalteu Micro Method for Total Phenol in Wine. <http://waterhouse.ucdavis.edu/faqs/foolin-ciocalteu-micro-method-for-total-phenol-in-wine>. Ultimo acceso: 06/07/2017