



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EXTRACCIÓN ASISTIDA POR
ULTRASONIDO DE
POLIFENOLES EN UVA**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA**

PRESENTA

LIDIA ESCUTIA GUADARRAMA



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Prof. Pedro Villanueva González
VOCAL	Profra. Liliana Virginia Raquel Saldivar y Osorio
SECRETARIO	Profra. María del Pilar Cañizares Macías
PRIMER SUPLENTE	Profra. Gloria García Ramírez
SEGUNDO SUPLENTE	Profra. Minerva Monroy Barreto

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 105-106 de la División de Estudios de Posgrado, sótano del edificio B, Facultad de Química, UNAM.

Dra. María del Pilar Cañizares Macías
ASESORA

Lidia Escutia Guadarrama
SUSTENTANTE

Parte de esta investigación ha sido publicada en:
Escutia Guadarrama, L. y Cañizares Macías, M.P.
*Extracción asistida por ultrasonido de polifenoles
en hollejo de uva.*
Industria Alimentaria 2010, 32, 36 – 40.

AGRADECIMIENTOS

A mi padre, Jaime Escutia Serrano q.e.p.d., por ser un pilar fundamental en mi formación como estudiante, pero principalmente como persona y por ser el mejor amigo que pude haber tenido en la vida. Gran parte de este logro te lo debo y lo comparto contigo donde quiera que estés. ¡GRACIAS!

A mi madre, Lidia Guadarrama Campuzano, por su incansable lucha para procurar que nunca me faltara nada, por sus sabios consejos como madre y como amiga y por estar SIEMPRE conmigo en las buenas y sobre todo en las malas, haciendo que las caídas no dolieran tanto. Te amo mamá.

A mi pequeña peluda de cuatro patas, mi compañera más fiel, que compartió conmigo desvelada tras desvelada durante toda la carrera y nunca se separó de mí mientras escribía este trabajo. Creo que ella se titula también.

A mi familia en general por el apoyo y el cariño que siempre me han brindado desde pequeña.

A mi segunda familia, mis amigos: Edgar, Galicia, Isidro Badillo, Bruno Landeros, Rosaura Rivera, Daniel Zárate, Karina Lorenzo, Verónica Gutierrez, Magy González, Anais Medina. Los mejores momentos a lo largo de la carrera los pasé con ustedes, juntos hemos reído, estudiado, cantado, bailado y, ¿por qué no?, hasta hemos llorado. Esta etapa no hubiera sido lo mismo sin ustedes, gracias por dejarme compartir a su lado tantos momentos que han enriquecido mi vida enormemente. ¡Los quiero muchísimo!

A mis compañeras de laboratorio: Lesli, Adalith, Lore y Maru por hacer el trabajo en el laboratorio más divertido. Gracias por su paciencia y apoyo.

A mi tutora, Dra. María del Pilar Cañizares Macías por las oportunidades que me brindó y su apoyo para la realización de esta tesis.

A la Facultad de Química y todos mis maestros por la sólida formación que me brindaron.

Finalmente, quisiera agradecer a todas las personas que no nombré arriba pero que han contribuido de alguna forma para la realización de esta tesis y que han sido parte de mi vida.

POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU

MARZO DE 2011

A MI PADRE

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
3. ANTECEDENTES	4
3.1 Origen, características e importancia de la uva.....	4
3.2 Composición química de la uva.....	5
3.2.1 Polifenoles.....	6
3.2.2 Determinación de polifenoles.....	9
3.2.3 Rol de los polifenoles en la salud humana.....	9
3.3 Métodos de extracción.....	11
3.4.1 Extracción tradicional.....	11
3.4.2 Extracción asistida por ultrasonido.....	12
3.4 Análisis por inyección en flujo.....	15
3.5.1 Fundamentos.....	16
3.5.2 Instrumentación.....	18
3.5.3 Aplicaciones.....	21
3.5 Extracción en fase sólida.....	21
4. METODOLOGÍA	25
4.1 Equipos e instrumentación.....	25
4.2 Reactivos y disoluciones.....	26
4.3 Muestras de uva.....	27
4.4 Procesos de extracción.....	28
4.5 Configuración del sistema de análisis por inyección en flujo (FIA) para la cuantificación de polifenoles.....	29
4.6 Acoplamiento de una minicolumna a la configuración de inyección en flujo para la extracción en fase sólida en línea.....	30

1. INTRODUCCIÓN

Los compuestos polifenólicos, son un grupo complejo de compuestos de origen vegetal principalmente, su principal característica es la presencia de uno o más anillos bencénicos con grupos hidroxilo. Los dos grupos principales de polifenoles son los ácidos fenólicos y los flavonoides; los ácidos fenólicos pueden ser clasificados en ácido benzóico y sus derivados y ácido cinámico y sus derivados, mientras que los flavonoides se dividen en subclases como los flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas entre otras.

Hasta ahora se conocen aproximadamente 5000 estructuras diferentes de flavonoides, lo cual habla de la complejidad química de estos compuestos. Esto hace que no sea posible hacer una identificación completa de todo el grupo de polifenoles ya que, además de que no todos están disponibles comercialmente como estándares, sería un análisis excesivamente extenso y costoso.

Sin embargo, el interés en los compuestos que forman el grupo de los polifenoles, está en continuo incremento, debido a sus propiedades antioxidantes. En este sentido, la obtención del índice de polifenoles totales, es una primera aproximación para estimar un “índice de antioxidantes totales”, por lo que es importante contar con un método que permita hacer esta cuantificación de polifenoles totales.

Hay que remarcar que debido a la complejidad química, las dificultades de extracción de los compuestos de la matriz y la presencia de interferentes inherentes a las muestras de alimentos, la determinación de polifenoles totales debe interpretarse sólo como un índice del contenido total de estos compuestos.

La importancia de estudiar la forma de extraer polifenoles del bagazo de uva, radica en que en la industria del vino se producen grandes cantidades de residuos de uva los cuales pueden ser aprovechados para la obtención de extractos que puedan ser procesados por la industria farmacéutica, para la obtención de suplementos alimenticios o para ser añadidos en cosméticos, por ejemplo.

En el capítulo dos se exponen los objetivos generales y específicos de esta tesis, mientras que en el capítulo tres, que corresponde a los antecedentes, se tratan con mayor detalle los fundamentos de la extracción asistida por ultrasonido, así como del sistema de análisis por inyección en flujo.

En este trabajo se propone un método para determinar el índice de polifenoles totales en bagazo y diferentes partes de la uva (piel, pulpa y semillas), mediante un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA), el cual permite realizar hasta 32 determinaciones por hora. La determinación en la reacción colorimétrica de Folin – Ciocalteu usa un reactivo del mismo nombre, cuyos componentes metálicos están inicialmente en un estado de oxidación 6+ y en presencia de fenoles se reducen al estado 5+, dando como resultado un complejo de azul de molibdeno cuya absorbancia es proporcional a la concentración de polifenoles en la muestra. Además, el método propuesto permite extraer estos compuestos de la uva, empleando energía ultrasónica, con una mayor eficiencia en comparación con el método tradicional de extracción mediante agitación magnética. Las metodologías utilizadas para llevar a cabo las extracciones y la cuantificación se explican a detalle en el capítulo cuatro.

Los resultados obtenidos de los procesos de extracción y detección, se analizan y se discuten en el capítulo cinco. Los resultados más destacados de este análisis se resumen a manera de conclusiones en el capítulo seis.

Finalmente, en el capítulo titulado “expectativas” se describe el trabajo a futuro para complementar la extracción en fase sólida de polifenoles acoplada al análisis por inyección en flujo.

2. OBJETIVOS

Objetivo general

Desarrollar un método que permita realizar la extracción de polifenoles en bagazo de uva mediante la irradiación con ondas de ultrasonido y cuantificarlos espectrofotométricamente con un sistema de análisis por inyección en flujo.

Objetivos específicos

- Utilizar un diseño factorial para la optimización de las condiciones de extracción de polifenoles en uva utilizando ultrasonido (tiempo de irradiación y tiempo de no irradiación).
- Determinar la precisión del método de extracción asistido por ultrasonido.
- Comparar los resultados de la extracción asistida por ultrasonido con el método tradicional de extracción por agitación y calentamiento.
- Evaluar la configuración de análisis por inyección en flujo para la cuantificación de polifenoles en uva (intervalo lineal, límite de detección y precisión).
- Acoplar una minicolumna de extracción en fase sólida al sistema de análisis por inyección en flujo y evaluar la retención de ácido tánico y ácido gálico en línea.

3.1 ORIGEN, CARACTERÍSTICAS E IMPORTANCIA DE LA UVA

La vid es un arbusto caducifolio que pertenece al género de las vitáceas (*Vitaceae*) y su nombre científico es *Vitis Vinifera*. Es una planta leñosa con el tronco retorcido y la corteza rugosa. Las hojas tienen lóbulos muy dentados. En los tallos, frente a la base de las hojas, aparecen unas estructuras alargadas, los zarcillos, que se enroscan alrededor de los obstáculos que encuentran. Las flores son pequeñas y de color verde, y cuelgan en racimos. Los frutos son las uvas que crecen agrupadas en racimos de entre 6 y 300 uvas (Jackson, 2008).

Existen signos de que, durante la edad de bronce, la uva se cultivaba en las costas del mar Mediterráneo al sur de Turquía. También se conoce que las uvas rojas fueron cultivadas por civilizaciones antiguas como los egipcios, griegos, fenicios y romanos. La propagación de los grupos humanos alrededor del mundo, permitió que el cultivo de la uva llegara a todos los continentes.



Figura 1. Mapa de la zona donde se cree que comenzó el cultivo de la uva.

La uva y sus productos como las pasas, jaleas, mermeladas y el vino, son los productos de horticultura más importantes a nivel mundial y consecuentemente son los de mayor interés comercial. Aproximadamente el 65% de los cultivos de uva a nivel mundial son destinados a la producción de vino, el 20% se consume como fruta fresca y el 15% se usa en la producción de pasas (Martín – Belloso & Marsellés – Fontanet, 2006).

3.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA UVA

La uva está formada por un 70 – 80% de agua, el porcentaje restante corresponde a sólidos disueltos que incluyen numerosos compuestos orgánicos e inorgánicos. Los grupos de compuestos más destacados son (Blouin & Guimberteau, 2002):

- Azúcares: corresponden a una gran porción de los sólidos disueltos, principalmente glucosa y fructosa.
- Ácidos orgánicos: son componentes muy importantes del jugo de uva y el vino ya que son responsables del sabor agrio y tienen una marcada influencia en la estabilidad, color y pH del vino. Los ácidos málico y tartárico representan el 90% del total de ácidos orgánicos presentes.
- Compuestos fenólicos: son el tercer grupo de compuestos más abundantes en la uva. Tienen una función determinante en el color y sabor de los vinos así como en su proceso de maduración. Se encuentran principalmente en las semillas y la piel de la uva.
- Compuestos nitrogenados: incluyen sales de amonio y compuestos orgánicos como aminoácidos, péptidos y proteínas. El contenido total de nitrógeno en la uva depende de la variedad, el clima y la fertilización, entre otros factores y se incrementa durante el periodo de maduración.
- Minerales: son parte de los nutrientes tomados del suelo por la planta, entre los más importantes están: potasio, sodio, hierro, fosfatos, sulfatos y cloruros siendo el potasio el más abundante (50 – 70% de los cationes presentes).

- Sustancias pécticas: las sustancias pécticas son los componentes principales de las paredes de todas las células vegetales. En la uva están presentes en las paredes celulares de la pulpa principalmente.

3.2.1 Polifenoles

El término *polifenoles* engloba a todas aquellas sustancias con varios grupos hidroxilo, que es el nombre común del hidroxibenceno.

Los fenoles se encuentran en muchos alimentos de origen vegetal como por ejemplo el cacao, la cebolla, el té, el vino tinto, etc. Estas sustancias influyen en la calidad, estabilidad y propiedades organolépticas de los alimentos ya que actúan como colorantes, antioxidantes y proporcionan sabor como se ejemplifica en la tabla 1.

Tabla 1. Algunas propiedades organolépticas atribuidas a compuestos fenólicos.

Propiedad	Compuesto
Color	Como las antocianinas, responsables de los tonos rojos, azules y violáceos de muchas frutas, hortalizas y derivados: fresas, ciruelas, uvas, berenjena, rábano, vino tinto, etc.
Sabor amargo	Como las flavanonas de los cítricos: la neohesperidina de la naranja o la oleuropeína en las aceitunas.
Astringencia	Como las proantocianidinas (taninos condensados) y los taninos hidrolizables como el ácido tánico, por ejemplo, en el vino.
Aroma	Fenoles simples como el eugenol en los plátanos.

La clasificación más común de estos compuestos está basada en su estructura química y los divide en los siguientes grupos:

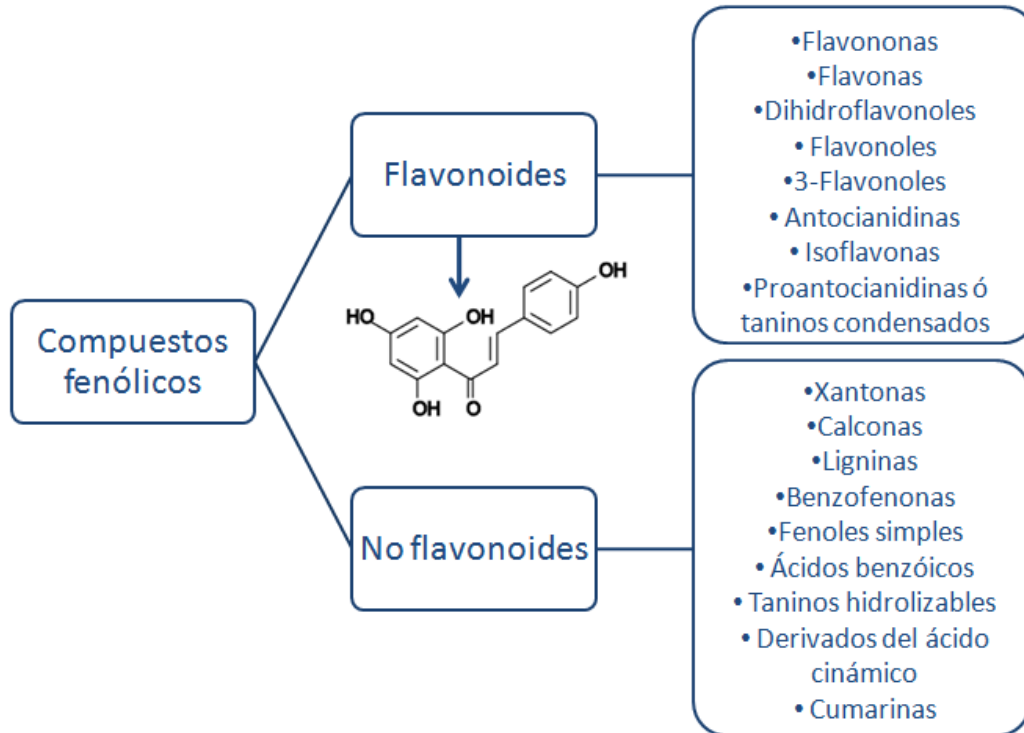


Figura 2. Clasificación de los compuestos fenólicos en base a su estructura.

Los compuestos fenólicos que se encuentran en los distintos alimentos constituyen una fracción muy compleja formada por un número muy grande de compuestos, algunos de los cuales no han sido identificados aún. La concentración de polifenoles de cualquier alimento también es muy variable ya que depende de varios factores como la especie y el grado de maduración del vegetal o fruto.

En los vinos, por ejemplo, se ha encontrado que los mayores constituyentes fenólicos son:

Tabla 2. Polifenoles mayoritarios en vino tinto y vino blanco (Frankel et al, 1995).

Fenol	Concentración en vino tinto (mg L ⁻¹)	Concentración en vino blanco (mg L ⁻¹)
Catequina	191	35
Epicatequina	82	21
Ácido gálico	95	7

Cianidina	3	0
Malvidin-3-glucosido	24	1
Rutina	9	0
Quercetina	8	0
Miricetina	9	0
Resveratrol	1.5	0

De la tabla anterior, todos los compuestos pertenecen a la clasificación de flavonoides, con excepción del ácido gálico.

El ácido tánico o ácido galotánico, cuya estructura se muestra en la figura 3, es también un compuesto importante en el vino. Perteneció al grupo de los taninos hidrolizables y está formado por moléculas de ácido gálico y glucosa; es responsable en gran medida del sabor astringente de los vinos tintos (Jackson, 2009).

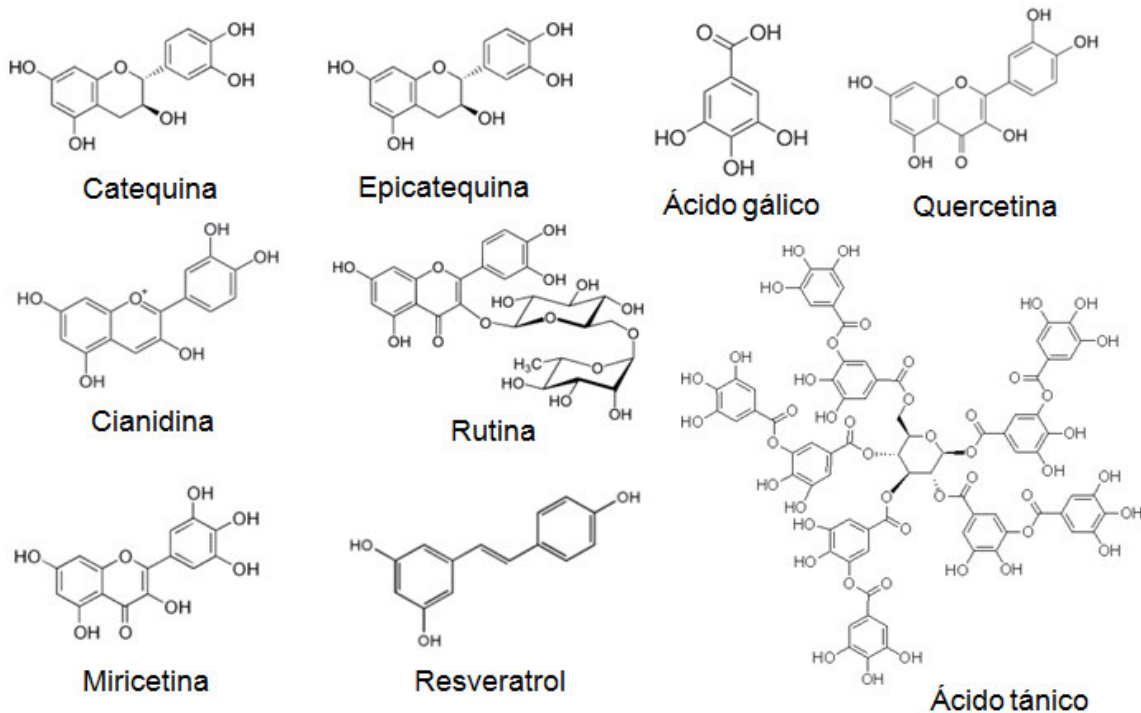


Figura 3. Estructuras de algunos de los polifenoles más importantes.

Se conoce que los flavonoides son el grupo simple de compuestos fenólicos más grande en los alimentos vegetales; estos son compuestos de bajo peso molecular que generalmente existen enlazados a moléculas de azúcares. Los compuestos incluidos en este grupo son los que contribuyen en mayor medida a las propiedades medicinales que se les han atribuido a los polifenoles.

Su estructura general se muestra en la figura 2.

3.2.2 Determinación de polifenoles

El método más usado y sencillo para la determinación del contenido total de polifenoles en alimentos es el ensayo de Folin – Ciocalteu para el cual se utiliza un reactivo del mismo nombre, que consiste en una disolución de iones complejos provenientes de los heteropoliácidos fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) y fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) en los cuales el molibdeno y el tungsteno se encuentran con estado de oxidación 6^+ (Ikawa et al, 2003)

Los constituyentes metálicos de estos iones complejos son reducidos por el grupo hidroxilo de los polifenoles formando un producto de color azul, que es una mezcla de azul de molibdeno y azul de tungsteno en donde los átomos metálicos tienen valencias mixtas que varían entre 5^+ y 6^+ (la composición no está aún bien conocida). La absorbancia de este producto se mide a 730nm y, mediante la ley de Lambert – Beer (Skoog, 2001), es posible relacionarla con la concentración de polifenoles totales frecuentemente referida como equivalentes de ácido gálico o ácido tánico.

3.2.3 Rol de los polifenoles en la salud humana

Los radicales libres son especies químicas que contienen un número impar de electrones y por lo tanto tienen un electrón no apareado en sus orbitales, lo que los hace altamente reactivos. Estos se encuentran en el humo del tabaco, las emisiones de los coches, los humos industriales y se generan en el cuerpo, cuando está expuesto a la luz ultravioleta procedente del sol y otras formas de

radiación. Producidos en exceso y sin control, el efecto destructivo de los radicales libres sobre las células del cuerpo, y, por lo tanto, sobre numerosos tejidos y órganos, puede ser muy grave.

Un gran número de investigaciones han demostrado que el daño causado por los radicales libres está implicado en una amplia gama de enfermedades y desórdenes que incluyen:

- Trombosis coronaria.
- Angina de pecho.
- Fallo cardiaco.
- Apoplejía.
- Daños cerebrales.
- Envejecimiento.
- Enfermedades renales.
- Cáncer.
- Desórdenes inflamatorios.
- Cataratas.
- Intoxicación.

En términos generales, el daño hecho por los radicales libres caracteriza la reacción química conocida como oxidación, y los ataques de los radicales libres a los tejidos se conocen como estrés oxidativo.

La principal acción de los antioxidantes consiste en retrasar o prevenir el deterioro, daño o destrucción en las células inhibiendo las reacciones en cadena provocadas por los radicales libres. El cuerpo humano cuenta con un sistema de defensa antioxidante que involucra enzimas y proteínas para prevenir el daño a estructuras biológicas como pueden ser los lípidos y el ADN; sin embargo, bajo ciertas circunstancias estas defensas pueden ser sobrepasadas y es necesario ingerir sustancias antioxidantes que puedan reforzar el sistema de defensa (Fernández – Pachón et al, 2004).

Debido a que algunos antioxidantes sintéticos pueden tener efectos tóxicos, se han hecho intensas investigaciones sobre la capacidad antioxidante de las sustancias contenidas en diversos productos naturales, como los polifenoles, que se encuentran en las uvas y el vino. El consumo de alimentos ricos en polifenoles se ha asociado a la prevención de enfermedades cardiovasculares (Leifert & Abeywardena, 2008) algunos tipos de cáncer (Galati & O'Brien, 2004) y el

envejecimiento prematuro entre otros padecimientos, gracias a sus propiedades antioxidantes.

El vino tinto, en especial, es considerado una excelente fuente de polifenoles; posee la ventaja de que están presentes en su forma soluble lo cual aumenta su biodisponibilidad y facilita su absorción en el organismos, en contraste con las frutas que los contienen en sus formas poliméricas e insolubles, firmemente unidas a la matriz. Aún cuando durante la elaboración del vino se transfiere una parte de los compuestos polifenólicos de la uva, una gran proporción de ellos queda en los residuos que genera este proceso, por lo que la industria farmacéutica los ha aprovechado para extraer los polifenoles remanentes y, mediante un tratamiento adecuado, poderlos transformar en suplementos alimenticios (Rózek et al, 2010).

3.3 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

En el análisis de productos naturales o alimentos, la extracción es un paso importante en el proceso de preparación de la muestra ya que permite aislar y purificar el componente químico que se desea cuantificar. Además, no solo permite separar el compuesto de interés de la matriz, también se eliminan sustancias que puedan interferir en pasos posteriores.

3.3.1 Extracción tradicional

Las técnicas de extracción tradicionales con disolventes están basadas en la elección correcta de los disolventes y el uso de calor y/o agitación para aumentar la solubilidad de los compuestos y la velocidad de transferencia de masa.

Se ha reportado (Wu et al, 2001) que estas técnicas presentan varios inconvenientes como son:

- Tiempos de extracción prolongados.
- Baja eficiencia.

- Muchos compuestos extraídos de productos naturales pueden degradarse durante el proceso de extracción con calor dada su inestabilidad térmica.

3.3.2 Extracción asistida por ultrasonido

El ultrasonido comprende la región de frecuencias acústicas que va de 18kHz a 100MHz, fuera del intervalo normal del oído humano.

Las ondas de sonido son transmitidas a través de cualquier sustancia, líquida, sólida o gaseosa, que posea propiedades elásticas induciendo movimientos vibracionales en las moléculas que forman parte de ésta. La transmisión de ondas de ultrasonido de alta frecuencia produce ciclos de expansión y compresión; las moléculas del medio se juntan durante la compresión mientras que en la expansión son separadas. Cuando esto ocurre en un medio líquido y la intensidad del ultrasonido es suficientemente alta, los ciclos de expansión producen una presión negativa que excede el límite de elasticidad local del líquido produciendo burbujas de aire o cavidades.

El proceso en el que las burbujas se forman, crecen y posteriormente colapsan se conoce como cavitación acústica (Luque de Castro & Priego Capote, 2007) y los pasos principales del proceso se ilustran en la figura 4. La importancia del proceso de cavitación no radica tanto en cómo se forman las burbujas, sino en lo que sucede cuando colapsan. En algún punto, la burbuja llega a un tamaño crítico en el que ya no puede absorber eficientemente la energía del ultrasonido por lo que implosionan violentamente generando temperaturas y presiones extremadamente altas en puntos definidos dentro del líquido; se ha estimado que la temperatura puede alcanzar los 5000°C, la presión 2000 atm y que la velocidad de enfriamiento posterior al colapso es de aproximadamente 10^{10} K/s (Suslick, 2010).

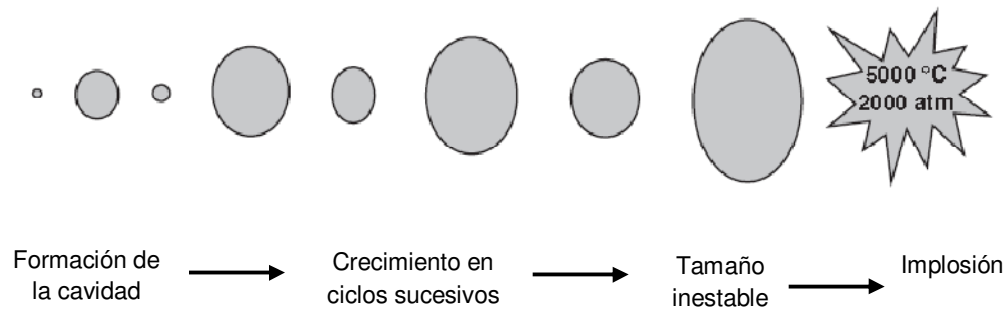


Figura 4. Representación del proceso de cavitación.

El tamaño de las burbujas es muy pequeño en relación al volumen del líquido (del orden de micras) lo que provoca que el calor producido se disipe rápidamente sin producir cambios súbitos en el medio.

Cuando la cavitación ocurre en un líquido cercano a la superficie de un sólido, la dinámica de este proceso cambia de manera considerable. En un medio homogéneo (sólo líquido), la cavidad retiene su forma esférica durante el colapso; sin embargo, al estar cerca de un sólido, la cavidad colapsa de forma asimétrica haciendo que partículas del líquido salgan proyectadas hacia la superficie del sólido, esto provoca alteraciones sobre la superficie que tienen como consecuencia un incremento en el área de contacto del sólido con el líquido (Suslick, 1998)

La extracción de compuestos orgánicos contenidos en tejidos vegetales y/o semillas puede mejorarse significativamente mediante el uso de la energía del ultrasonido. Los efectos mecánicos del ultrasonido proveen una mayor penetración del disolvente en la matriz y mejoran la transferencia de masa haciendo que la extracción sea más efectiva y en un tiempo menor en comparación con los métodos tradicionales (Mason et al, 1996).

El funcionamiento de un equipo sonicador está basado en un transductor electroacústico¹ cuyo material debe poseer propiedades piezoeléctricas. Al aplicar una polarización variable en un material piezoeléctrico, éste responde

¹ Dispositivo capaz de convertir la energía eléctrica en ondas de sonido de alta frecuencia.

comprimiéndose y expandiéndose de acuerdo a las oscilaciones de la señal eléctrica; de este modo se aprovecha la vibración ultrasónica del material para transmitirla a cualquier medio con el que esté en contacto (Bendicho & Lavilla, 2000).

Entre los diversos tipos de sonicadores que hay comercialmente disponibles, los dispositivos utilizados con mayor frecuencia como fuentes de ultrasonido para fines analíticos son (Luque de Castro & Priego Capote, 2007):

- a) *Baños de ultrasonido* que constan de un recipiente de acero inoxidable con un transductor unido a la base que opera a una frecuencia de 40KHz normalmente. Aunque estos equipos son relativamente económicos, presentan varias desventajas: 1) es difícil mantener un control sobre la temperatura porque se calientan con determinado tiempo de operación, 2) el nivel de potencia del ultrasonido no es lo suficientemente alto para hacer extracciones efectivas de analitos, 3) la disminución en la potencia con el tiempo y la falta de uniformidad en la transmisión del ultrasonido conducen a resultados no reproducibles. Por esta razón los baños de ultrasonido se utilizan principalmente para operaciones de limpieza y desgasificación de disolventes.



Figura 5. Baño de ultrasonido marca Branson.

- b) *Sondas de ultrasonido* que tienen la capacidad de irradiar las muestras con una potencia hasta cien veces mayor que la de un baño de ultrasonido. Además, a diferencia de los baños de ultrasonido en los que la energía de ultrasonido es transmitida a través de un medio líquido al recipiente donde

se lleva a cabo la extracción, la irradiación emitida por la sonda está focalizada sobre la muestra por lo que prácticamente se eliminan las pérdidas de energía y el fenómeno de cavitación se amplifica notablemente. Otra ventaja que ofrecen estos dispositivos es que mediante la fuente de poder se puede modular la potencia según lo requiera el problema.



Figura 6. Sonda de ultrasonido marca Branson.

Los estudios realizados en el campo de la sonoquímica han permitido el desarrollo de una gran variedad de aplicaciones de la energía ultrasónica que los químicos analíticos han podido explotar para disminuir el tiempo o los pasos involucrados en la preparación de muestras.

3.4 ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO

Los métodos de inyección en flujo son una consecuencia de los métodos de flujo segmentado, muy utilizados en los laboratorios clínicos en los años sesenta y setenta, para la determinación rutinaria y automática de distintas especies en sangre y orina, para diagnóstico médico.

Desde su introducción en 1975 (Ruzicka y Hansen, 1975) el análisis por inyección en flujo (FIA por sus siglas en inglés, Flow Injection Analysis) ha adquirido una gran importancia académica y práctica ya que permite automatizar una gran cantidad de procedimientos analíticos por vía húmeda. Esta técnica se caracteriza por tener un fundamento y manejo sencillo, bajo costo y una gran capacidad para lograr resultados con exactitud y precisión de forma rápida.

Posee la ventaja de que se pueden realizar determinaciones en continuo ya sea sólo inyectando la muestra o acoplando dispositivos que permitan llevar a cabo ciertos procesos en línea, según lo requiera la metodología. Entre estos procesos se pueden mencionar: difusión (Decnoop & Kraak, 1997), diálisis (Mataix & Luque de Castro, 2001), preconcentración de analitos mediante resinas (Hali Shabani et al, 2003), extracción líquido – líquido (Ruíz-Jiménez & Luque de Castro, 2003) y reacciones enzimáticas inmovilizando la enzima en diferentes soportes (Ángeles – Cañas & Cañizares – Macías, 2004).

3.4.1 Fundamentos

El fundamento físico del análisis por inyección en flujo está basado en la dispersión controlada de una zona de muestra inyectada en una corriente continua de un fluido portador. En estudios anteriores (Vanderslice et al, 1981) se ha comprobado que el transporte del portador y la muestra a través de la tubería se da bajo un régimen de flujo laminar, lo que permite que la zona de muestra se encuentre bien definida y evita que haya contaminación entre muestras inyectadas sucesivamente.

Al desplazarse por el tubo, la muestra comienza a dispersarse formando un gradiente de concentración con perfil parabólico que se explica por dos fenómenos (Cañizares, 2002) como se puede observar en la figura 6: 1) el transporte por convección asociado al flujo laminar que hace que las moléculas que se encuentran en el interior del tubo avancen más rápidamente que las que se encuentran en las paredes del mismo y 2) el transporte por difusión, originado por el gradiente de concentración, que puede ser axial (paralelo a la dirección del flujo) o radial (perpendicular a la dirección del flujo). La contribución de la difusión radial es mayoritaria porque tiende a igualar la concentración en todos los puntos de la muestra desplazando las moléculas de las paredes del tubo al centro y las del centro en dirección opuesta; este mecanismo retrasa la dilución longitudinal manteniendo así la identidad de la muestra inyectada.

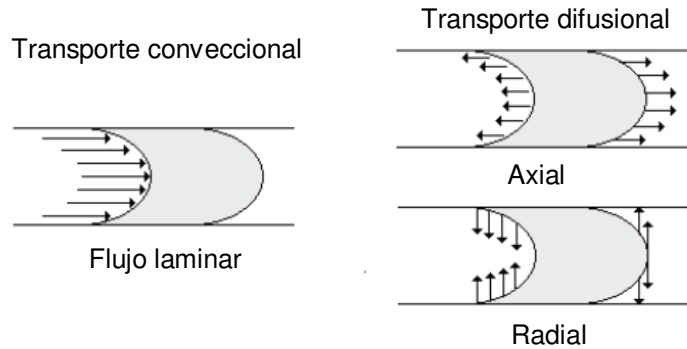


Figura 6. Fenómenos que influyen en el perfil de la zona de muestra en el sistema de flujo.

Al llegar la muestra a la celda de flujo, se obtiene una señal analítica en forma de pico cuya altura se relaciona con la concentración del analito a determinar. Los parámetros geométricos e hidrodinámicos del sistema FIA como son: caudal, volumen de inyección, longitud del reactor, etc., influyen en la forma del pico ya que mientras más tiempo permanezca la muestra dentro del sistema, mayor será la dilución de la misma lo que hará que se obtengan picos más anchos.

La figura 7 muestra una representación esquemática de los registros obtenidos en FIA. A esta representación se le denomina fiagrama y se define por los siguientes parámetros: a) la altura del pico, h , que corresponde a la parte más concentrada de la muestra, b) el tiempo de aparición, t_a , que pasa desde que se inyecta la muestra hasta que la línea base presenta un aumento de 1-2%, c) el tiempo de residencia, T , que es el tiempo que transcurre desde que se inyecta la muestra hasta que la señal llega a un máximo, d) el tiempo de retorno, T' , definido como el tiempo que transcurre desde el punto máximo de la señal hasta que esta vuelve a la línea base y e) Δt que se refiere al intervalo de tiempo en que aparece la señal y vuelve a la línea base.

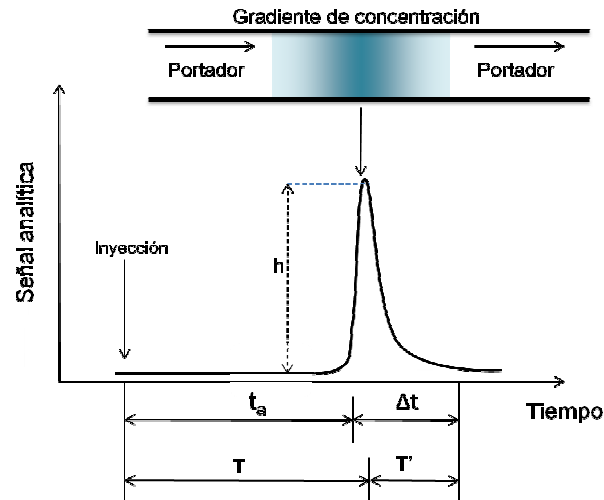


Figura 7. Representación de un diagrama indicando los parámetros que lo definen.

Dado que en el momento de la detección la muestra no se encuentra en condiciones de equilibrio, es de suma importancia que el tiempo de operación del sistema sea muy reproducible ya que pequeñas variaciones en el mismo pueden dar lugar a graves alteraciones en los resultados (Valcárcel & Luque de Castro, 1988).

3.4.2 Instrumentación

Hay cuatro unidades básicas que componen un sistema FIA a los cuales se les pueden hacer modificaciones para adaptar el sistema al problema que se quiera resolver:

- a) *Unidad de propulsión*: tienen la función de impulsar una o varias disoluciones a través del sistema a un flujo de caudal lo más constante posible y a baja presión (menor a 10 psi) a diferencia de las bombas que se usan en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. Los requerimientos para el funcionamiento ideal de la unidad de propulsión (Prados – Rosales et al, 2002) son: 1) tener una tasa de flujo reproducible ya sea en tiempos cortos o largos para poder predecir el tiempo de residencia del analito en el sistema y una dispersión constante y controlada, 2) contar de preferencia con varios canales (al menos cuatro), esto provee

mayor versatilidad, 3) mantener un flujo libre de pulsaciones, 4) tasas de flujo ajustables según se requiera, 5) presentar resistencia a reactivos y solventes agresivos y 6) no implicar un alto costo de inversión inicial.

Las unidades de propulsión que se usan normalmente son bombas de pistón, peristálticas, de jeringa o sistemas de presión ejercida por un gas o por gravedad. Las más comunes son las bombas peristálticas, que son dispositivos que mediante unos rodillos giratorios comprimen un fluido que se encuentra dentro de una tubería flexible; el continuo movimiento peristáltico de los tubos es lo que impulsa a los fluidos. Se tienen normalmente entre ocho y diez rodillos dispuestos en configuración circular como se observa en la figura 8. El caudal se controla mediante el diámetro interno del tubo y la velocidad del rotor.

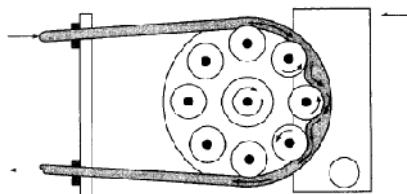


Figura 8. Diagrama de un canal en una bomba peristáltica.

- b) *Sistema de inyección*: permite insertar de forma reproducible un volumen de muestra (de 25 a 100 μL normalmente) medido con precisión en el fluido portador. La muestra debe ser insertada de golpe de tal forma que no provoque alguna perturbación en el flujo del portador, además, se busca que este proceso sea de fácil y rápida operación para aumentar la tasa de muestreo.

El sistema de inyección utilizado con mayor frecuencia actualmente es una válvula rotatoria de seis puertos ya que es muy reproducible al inyectar el volumen de la muestra, lo hace de manera rápida y es fácilmente automatizable.

Además, estas válvulas son altamente versátiles porque se pueden acoplar entre ellas de diferentes maneras, permitiendo armar una gran variedad de configuraciones de acuerdo a las necesidades del método que se requiera adaptar al sistema de análisis por inyección en flujo.

c) *Sistema de transporte y reacción:* las disoluciones son transportadas a través de la configuración de análisis por inyección en flujo mediante tuberías flexibles que adicionalmente fungen como conexiones entre las unidades que componen el sistema. Los tubos tienen un diámetro interno que va de 0.1 a 1.0 mm y están hechos con diversos materiales dependiendo de las disoluciones que se vayan a usar; por ejemplo, los tubos de Tygon® se utilizan para disoluciones acuosas y disoluciones alcohólicas que no excedan el 5% de contenido de alcohol, para disoluciones alcohólicas y algunos alcanos se utilizan tubos de Solvaflex®. Los conectores que permiten unir los tubos están hechos normalmente de politetrafluoroetileno o polimetilmetacrilato y pueden ser de diversas formas, T, Y, W, entre otros.

El reactor es normalmente un tubo de politetrafluoroetileno enrollado en forma de serpentín en un cilindro de aproximadamente 1 cm de diámetro, el objetivo de esto es aumentar la dispersión axial e incrementar el mezclado radial entre la muestra y el reactivo y obtener señales más simétricas.

d) *Sistema de detección:* el análisis por inyección en flujo puede utilizar una gran variedad de técnicas analíticas de detección que pueden ser ópticas (espectrofotometría UV-visible (Yeniceli et al,2004), quimioluminiscencia (Mervartová et al, 2007), espectroscopía infrarroja (Bouhsain,1999), espectrometría de absorción atómica (Attiyat & Christian, 1984) y de fluorescencia atómica (Wang, 2003) o electroquímicas (amperometría (Fernández – Abedul & Costa - García, 1996), voltimetría (Cañete et al, 1988)) e incluso se han adaptado biosensores (Chen & Karube, 1992).

Comercialmente se encuentran disponibles varios tipos de celdas de flujo como son las celdas en U, en Z o de óvalo. Típicamente tienen una longitud de paso óptico de 10 mm aunque también es posible encontrar algunas con longitud mayor.

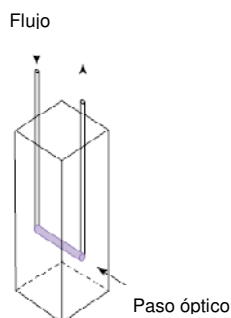


Figura 9. Celda de flujo en U para detección espectrofotométrica.

3.4.3 Aplicaciones

Como consecuencia de su gran versatilidad, es posible aplicar el análisis por inyección en flujo en diversas áreas de la química que requieran realizar análisis que sean rápidos y económicos. Además, ofrece la ventaja de que se reduce la intervención humana a diferencia de los métodos por lote lo cual favorece la precisión de los resultados.

Se han reportado trabajos en los que se ha aplicado la metodología FIA para análisis clínicos de rutina (Sakai et al, 1995), en la determinación de ingredientes activos en fármacos (Tzanavaras & Themelis, 2007), análisis de alimentos y bebidas (Ruiz – Capillas & Jiménez Colmenero, 2009) e incluso en estudios ambientales *in situ* (Laës et al, 2005) por mencionar algunas áreas.

3.5 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

La preparación de la muestra es frecuentemente el paso que consume más tiempo durante todo el proceso de análisis de alimentos, suelos, medicamentos, etc., pero a la vez es fundamental ya que el resultado del análisis depende en gran medida de que la muestra esté libre de sustancias que puedan ser interferencias.

La extracción en fase sólida se utilizó por primera vez en 1970 como una alternativa a la extracción líquido-líquido (Thurman, 2000). Permite aislar y/o preconcentrar analitos de un gas o líquido mediante su retención en una sustancia

adsorbente y su posterior recuperación con un eluyente apropiado. Esta técnica tiene muchas ventajas sobre la extracción líquido – líquido (Simpson, 2000):

- Es una herramienta sencilla y segura para la preparación de muestras previa al análisis.
- Se obtienen altos porcentajes de recobro de los analitos.
- Se puede automatizar.
- Es compatible con el análisis por cromatografía.
- En la extracción líquido – líquido normalmente se consumen grandes volúmenes de disolventes de alta pureza que implican un costo adicional por el tratamiento de residuos además de riesgos a la salud.
- Se eliminan algunos problemas prácticos como la formación de emulsiones de la extracción líquido – líquido.
- Se evita la pérdida de muestra ya que el analista no está en contacto con ella al momento de hacer la extracción y posteriormente la detección.

Los sorbentes utilizados en los cartuchos de extracción en fase sólida, pueden clasificarse de acuerdo al mecanismo de retención del analito en los siguientes grupos:

- a) Fase normal: la fase estacionaria es más polar que el disolvente o la matriz en la que se encuentra el analito. Se utilizan estos sorbentes cuando el analito está contenido en un disolvente orgánico; los principales mecanismos de retención involucrados son interacciones tipo puentes de hidrógeno o dipolo – dipolo.
- b) Fase reversa: el sorbente es más hidrofóbico que la muestra y se usa normalmente cuando el analito está en un disolvente acuoso. El mecanismo de interacción entre el analito y el sorbente es mediante fuerzas de Van der Waals.
- c) Intercambio iónico: se usa para compuestos que tienen carga al estar en disolución. El mecanismo de retención está basado principalmente en atracciones electrostáticas del grupo funcional cargado en el compuesto y

el grupo funcional con carga opuesta que está unido en la superficie de la sílice. El eluyente debe tener un pH tal que neutralice alguna de las dos cargas rompiendo la interacción entre el compuesto y el sorbente.

- d) **Exclusión molecular:** el mecanismo de separación está basado en el tamaño molecular del analito y el tamaño de poro del sorbente.

Las diferentes interacciones posibles que influyen en la retención del analito y la extensa variedad de sorbentes comercialmente disponibles proveen a la extracción en fase sólida de una poderosa característica: la selectividad.

El proceso de extracción en fase sólida consiste en cuatro pasos generales:

1. *Acondicionamiento de la fase adsorbente:* esto permite eliminar el aire alojado en los poros del adsorbente y activar la fase para que el mecanismo de retención funcione de forma apropiada.
2. *Retención:* el analito y posiblemente algunos componentes de la matriz se retienen en la fase adsorbente mediante interacciones que pueden ser de tipo Van der Waals, puentes de hidrógeno, fuerzas dipolo – dipolo o intercambio aniónico o catiónico. La interacción depende del tipo de analito y el adsorbente utilizado.
3. *Limpieza:* los componentes de la matriz que fueron retenidos en el paso anterior se retiran del adsorbente sin que esto afecte al analito.
4. *Elución:* mediante un disolvente apropiado se interrumpe la interacción analito – adsorbente permitiendo así que el analito sea retirado para su cuantificación.

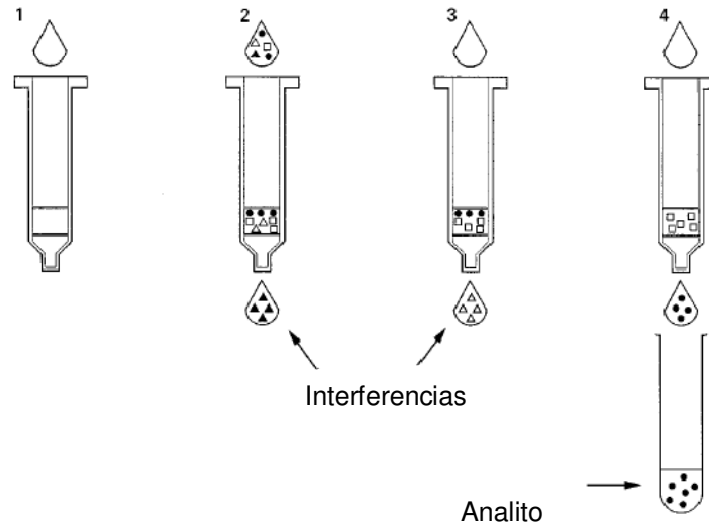


Figura 10. Representación de los cuatro pasos básicos de la extracción en fase sólida.

En varios trabajos se ha reportado el acoplamiento de un paso de preconcentración de analitos en línea con un sistema de análisis por inyección en flujo (El – Shahat et al, 2010; Meireles et al, 2003; Satinsky et al, 2002). Entre las ventajas que ofrece esta posibilidad se pueden mencionar: 1) permite la aplicación de muestras biológicas en estado líquido al sistema de análisis por inyección en flujo sin ningún tratamiento previo, 2) se miniaturiza el proceso haciendo el análisis más económico ya que se disminuye considerablemente la cantidad de muestra, reactivos y cartuchos necesarios para preconcentrar cada muestra y 3) es posible automatizar el proceso totalmente contando con el equipo adecuado (automuestreador, válvulas controladas por computadora, etc.) mejorando así la precisión del método ya que se reduce la intervención humana.

4. METODOLOGÍA

4.1 Equipo e instrumentación

- Espectrofotómetro UV – Visible: Varian modelo Cary 3 (Sydney, Australia)
- Celda de flujo de cuarzo: Hellman con volumen interno de 18 μL y 1 cm de paso óptico (USA)
- Bomba peristáltica: Gilson Minipuls 3 con 4 canales (Francia)
- Bomba peristáltica: Ismatec
- Válvulas de inyección de seis canales: Rheodyne (USA)
- Tubería de politetrafluoroetileno y Tygon y conectores de politetrafluoroetileno
- Balanza analítica: Explorer E12140 Ohaus con precisión de $\pm 0.1\text{mg}$ (Suiza)
- Parrilla de calentamiento: Thermolyne Cimarec 2 (USA)
- Potenciómetro: Oakton pH 500 series Modelo 00702-75
- Sonda de ultrasonido Branson modelo 250 con punta cilíndrica de titanio de 13 mm de diámetro, 20 kHz y 400W de potencia total
- Baño de ultrasonido Branson 2510
- Centrífuga: Hettich modelo EBA 20
- Licuadora: Osterizer
- Cartuchos para extracción en fase sólida: Strata, con las siguientes características:

Fase	NH_2
Área superficial ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	513
Tamaño de poro (Å)	70
Volumen de poro (mL g^{-1})	0.84
Tamaño de partícula promedio (μm)	55

4.2 Reactivos y disoluciones

Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico. Las disoluciones se sonicaron en el baño de ultrasonido antes de usarlas para desgasificarlas y evitar la formación de burbujas dentro del sistema de inyección de flujo; se almacenaron en frascos de plástico previamente etiquetados excepto la disolución del reactivo de Folin Ciocalteu que se almacenó en un frasco de vidrio color ámbar a 4 °C.

- Ácido tánico, $C_{76}H_{52}O_{46}$ (Sigma Aldrich)
 - Ácido gálico, $C_6H_2(OH)_3COOH$ (Sigma Aldrich)
 - Hidróxido de sodio en perlas, NaOH (J.T. Baker)
 - Fosfato de potasio monobásico, KH_2PO_4 (Mallinckrodt)
 - Carbonato de sodio, Na_2CO_3 (J.T. Baker)
 - Bicarbonato de sodio, $NaHCO_3$ (J.T. Baker)
 - Reactivo de Folin – Ciocalteu (Merck) se utilizó con una dilución 1:10.
- a) *Disolución de hidróxido de sodio 0.5 M:* se pesaron 4.5 g de perlas de hidróxido de sodio en un vidrio de reloj y se transfirieron a un matraz volumétrico de 250 mL. Se disolvió y se aforó con agua destilada. Se almacenó en un frasco de plástico previamente etiquetado.
- b) *Disolución de bicarbonato de sodio 0.1 M:* se pesaron 0.84 g de bicarbonato de sodio en un vidrio de reloj y después se transfirieron a un matraz volumétrico de 100 mL. Se disolvió y se aforó con agua destilada.
- c) *Disolución amortiguadora de carbonatos pH 10 0.1 M:* se pesaron 0.84 g de bicarbonato de sodio y se disolvieron en aproximadamente 50 mL de agua destilada, se introdujo el potenciómetro en la disolución y se ajustó el pH a 10 agregando gota a gota hidróxido de sodio 0.5 M con constante agitación

magnética. La disolución se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL y se añadió agua destilada suficiente para aforar.

- d) *Disolución amortiguadora de fosfatos pH 8 0.1 M*: se pesaron 1.36 g de fosfato de potasio monobásico y se disolvió en la mínima cantidad de agua destilada, se introdujo el potenciómetro y se ajustó el pH a 8 agregando hidróxido de sodio 0.5 M gota a gota con constante agitación magnética. La disolución se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL y se añadió agua destilada suficiente para aforar.
- e) *Disoluciones estándar de ácido tánico y ácido gálico*: en ambos casos se preparó una disolución madre pesando 25.0 mg de ácido tánico ó gálico, disolviéndolos en aproximadamente 80 mL de agua destilada y completando el volumen hasta la marca de aforo en un matraz volumétrico de 100 mL.

A partir de estas disoluciones, se prepararon estándares de diferentes concentraciones tomando alícuotas del volumen adecuado y aforando con agua destilada en matraces volumétricos de 10 mL.

4.3 Muestras de uva

Se analizaron muestras de uva roja de la variedad *red globe* provenientes de Sonora, México.

Para todos los experimentos, las uvas se lavaron y se molieron en una licuadora Osterizer. La pasta resultante se filtró hasta que el bagazo estuviera lo más seco posible. Se pesaron muestras de 1 g aproximadamente y se colocaron en vasos de precipitado para realizar las extracciones.

Una vez optimizado el método de extracción por ultrasonido, se separaron la piel, la pulpa y las semillas para analizarlas por separado. También se pesaron

muestras de 1 g y en el caso de las semillas se trituraron en un mortero antes de hacer la extracción.

4.4 Procesos de extracción

Para poder hacer una evaluación del método de extracción de polifenoles empleando energía ultrasónica, se llevó a cabo también la optimización de la extracción mediante agitación magnética y calentamiento.

En ambos casos, en un vaso de precipitados se colocó un gramo de bagazo de uva y se agregaron 20 mL de extractante.

- a) *Método de agitación magnética y calentamiento*: se evaluaron como extractantes agua destilada (pH cercano a 7), una disolución amortiguadora de $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ 0.1 M y pH=10 y una disolución de NaHCO_3 (HCO_3^-) 0.1 M (pH cercano a 8.25). Para cada disolución se realizaron las extracciones agitando a temperatura ambiente y 50°C por una hora. Una vez optimizado el extractante y la temperatura, se evaluaron diferentes tiempos de extracción: 15, 30, 45 y 60 minutos.

En el caso de las extracciones con calentamiento, se reguló la temperatura de la parrilla hasta observar que la temperatura del líquido se mantuviera entre 45 y 50°C y en ese momento se empezó a tomar el tiempo de la extracción.

- b) *Método de extracción con ultrasonido*: la irradiación de las muestras se realizó de forma indirecta utilizando un baño de ultrasonido y de forma directa con una sonda de ultrasonido.

En el caso del baño de ultrasonido, el vaso de precipitados con la muestra y el extractante se colocó dentro del recipiente lleno con agua y se probaron tiempos de extracción de 10, 20 y 30 minutos.

Para la extracción con sonda, se introdujo la punta 2 cm por debajo de la superficie del extractante. Se estudió un intervalo de tiempos de extracción de 2 a 10 minutos de irradiación total mediante ciclos de 40 segundos de

irradiación y 20 segundos de no irradiación. Los experimentos se hicieron con 30% y 50% de la potencia total de la sonda (125W y 200W respectivamente) y, una vez optimizado el tiempo y la potencia de irradiación, se hizo un diseño de 7 experimentos con ayuda del software Statgraphics para optimizar los ciclos de irradiación – no irradiación:

Tabla 3. Diseño factorial para la optimización de los ciclos de irradiación.

Experimento	irradiación (s)	No irradiación (s)
1	20	40.0
2	40	22.5
3	40	22.5
4	40	22.5
5	20	5.0
6	60	40.0
7	60	5.0

En los dos métodos, los extractos obtenidos se filtraron a gravedad y después se centrifugaron por 20 minutos a 4000 rpm y se llevaron a un volumen final de 25mL para su cuantificación. En algunos casos fue necesario hacer alguna dilución para que el valor de absorbancia medido estuviera dentro de los valores de la curva de calibración.

4.5 Configuración del sistema de análisis por inyección en flujo para la cuantificación de polifenoles.

En la figura 11 se muestra la configuración utilizada (Celeste, M. et al, 1992).

Para hacer el análisis la válvula se colocó primero en posición de llenado (ver figura 12) para llenar el bucle con la muestra. Se inyectaron 100 μ L del extracto en un fluido portador que fue agua destilada para confluir con el reactivo de Folin Ciocalteau y después con una disolución 0,5 M de NaOH para imponer un pH básico en el medio de reacción.

Los tres fluidos se acarrearón hasta el reactor, que constaba de un tubo de politetrafluoroetileno de 100 cm de longitud y 0.5 mm de diámetro interno enrollado a manera de serpentín, en donde el reactivo de Folin Ciocalteau reaccionó con los polifenoles dando como producto un complejo de azul de molibdeno cuya absorbancia se midió en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 730nm. La determinación se hizo por triplicado.

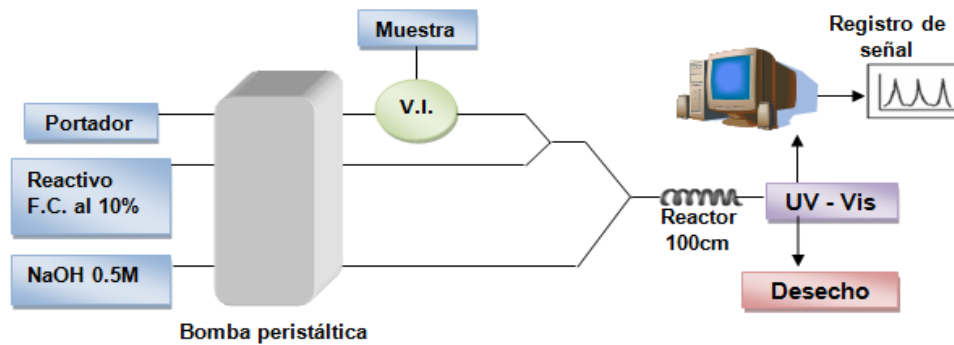


Figura 11. Configuración de análisis por inyección en flujo para determinar polifenoles totales en uva. V.I.: Válvula de inyección; F.C.: Folin – Ciocalteau.

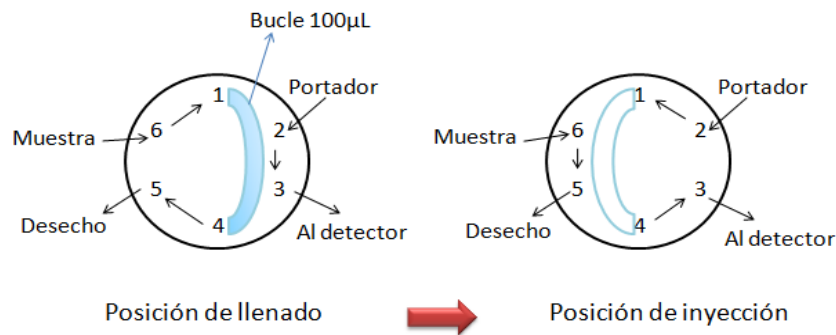


Figura 12. Diagrama del funcionamiento de la válvula de inyección.

4.6 Acoplamiento de una minicolumna a la configuración de inyección en flujo para extracción en fase sólida en línea.

Con la finalidad de incluir un paso de limpieza de la muestra en el sistema de análisis por inyección en flujo que permita la separación de los polifenoles del resto de los componentes de la matriz, se acopló una columna de extracción en fase sólida para retener los polifenoles, a la configuración de inyección de flujo de la figura 11. En la figura 13 se muestra la configuración final utilizada para este procedimiento.

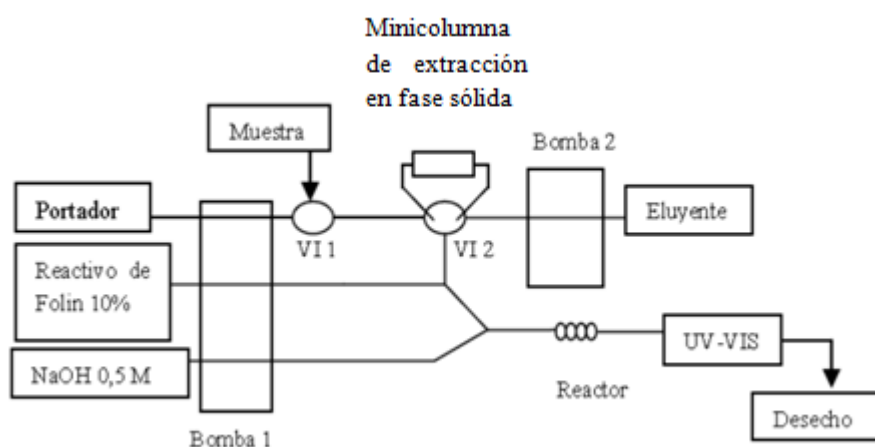


Figura 13. Configuración de análisis por inyección en flujo – extracción en fase sólida utilizada para acoplar un paso de pretratamiento de la muestra.

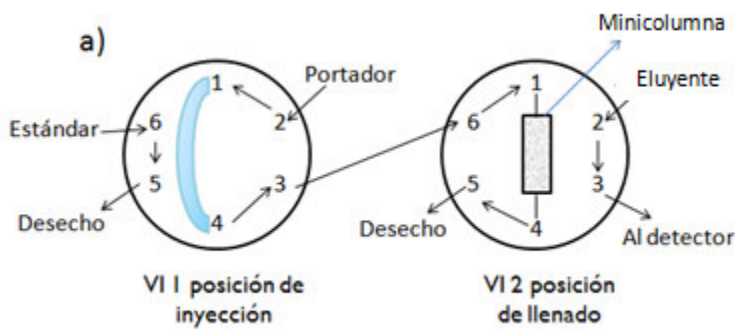
Para empacar la minicolumna se eligió como material adsorbente aminopropil – sílica con un tamaño de partícula promedio de 55 μm y un tamaño de poro de 70Å, el cual se extrajo de un cartucho para extracción en fase sólida, se colocó en un vial con un poco de agua y se empacó en un segmento de 1 cm de tubería de Tygon con ayuda de una jeringa. Los extremos se cerraron con algodón y se conectaron a los canales 1 y 4 de la válvula de inyección 2 (V.I. 2 en la figura 13) en lugar del bucle.

Se utilizaron estándares de ácido gálico y ácido tánico para hacer las pruebas de optimización.

Mediante el siguiente procedimiento general, se evaluó la influencia de la longitud de la columna, el pH del eluyente así como el caudal del mismo:

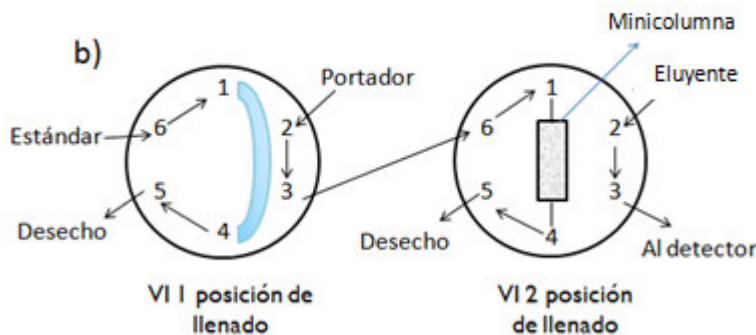
Como portador se utilizó agua destilada a un caudal de 0.7 mL/min. El reactivo de Folin – Ciocalteau al 10% y una disolución de NaOH 0,5M tuvieron un caudal de 1mL/min.

A continuación se describe la forma en que se conectaron las válvulas para cada paso del proceso de extracción en fase sólida.



ACONDICIONAMIENTO

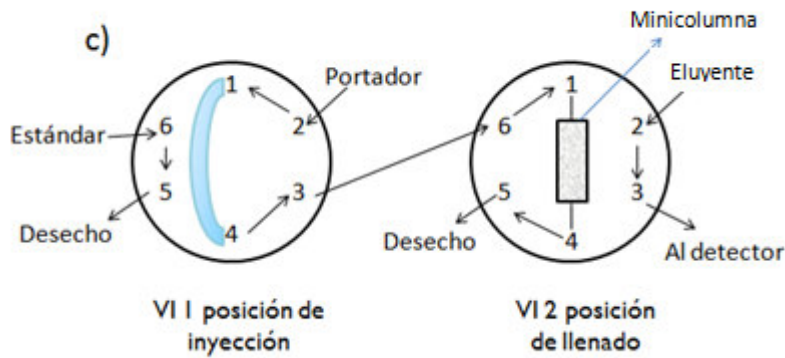
Antes de comenzar el análisis, se acondicionó la columna haciendo pasar agua destilada (portador) durante cinco minutos. Por el canal del estándar sólo entra aire en este paso.



LLENADO

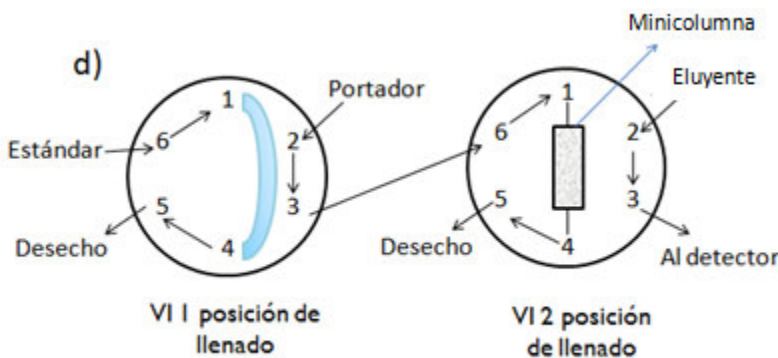
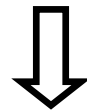
Se llenó el bucle de 100 μ L con el estándar.





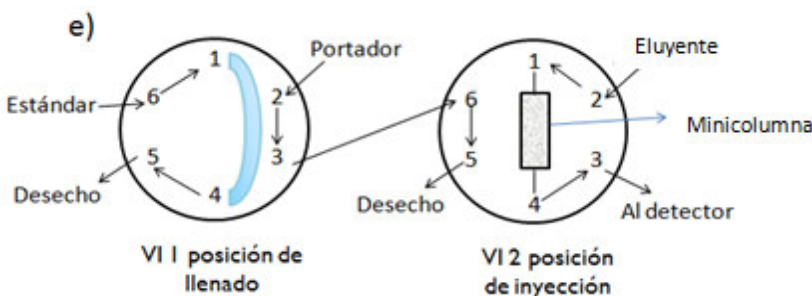
RETENCIÓN

Con la VI 1 en posición de inyección, los 100µL de muestra se transportaron hacia la VI 2 (posición de llenado) para que pasaran a través de la columna.



LIMPIEZA

Ambas válvulas se colocan en posición de llenado. En la VI 1 se llena el bucle para la siguiente determinación y por el canal 6 de la VI 2 entra agua destilada (portador) hacia la columna para quitar impurezas



ELUCIÓN

Para eluir el analito la VI 2 se cambió a posición de inyección permitiendo el flujo del eluyente por la columna, este sale por el canal 3 para mezclarse después en el reactor junto con el reactivo de Folin – Ciocalteau y la disolución de NaOH 0,5M.

El producto de esta reacción pasó por la celda de flujo y su absorbancia se midió a una longitud de onda de 730 nm.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Determinación del espectro de absorción del producto de reacción entre los analitos y el reactivo de Folin – Ciocalteu

Para saber a qué longitud de onda se debían hacer las mediciones de absorbancia, se obtuvo el espectro de absorción UV – Visible del producto de reacción entre el ácido gálico y el ácido tánico y el reactivo de Folin Ciocalteu en medio básico (NaOH 0.5 M). El barrido se hizo desde 200 a 800 nm y se obtuvo un máximo de absorbancia a 730 nm.

5.2 Elaboración de las curvas de calibración

Como en la literatura se reporta que los resultados obtenidos mediante el método de Folin – Ciocalteu para la determinación de polifenoles en uva o vino se expresan usualmente como equivalentes de ácido tánico o ácido gálico, se prepararon disoluciones estándar a partir de disoluciones madre de ácido gálico y ácido tánico de 250 mg L^{-1} y se inyectaron en el sistema de inyección en flujo, descrito en la sección 4.5. El registro de las absorbancias para cada estándar se muestra en los siguientes diagramas (figuras 15 y 16).

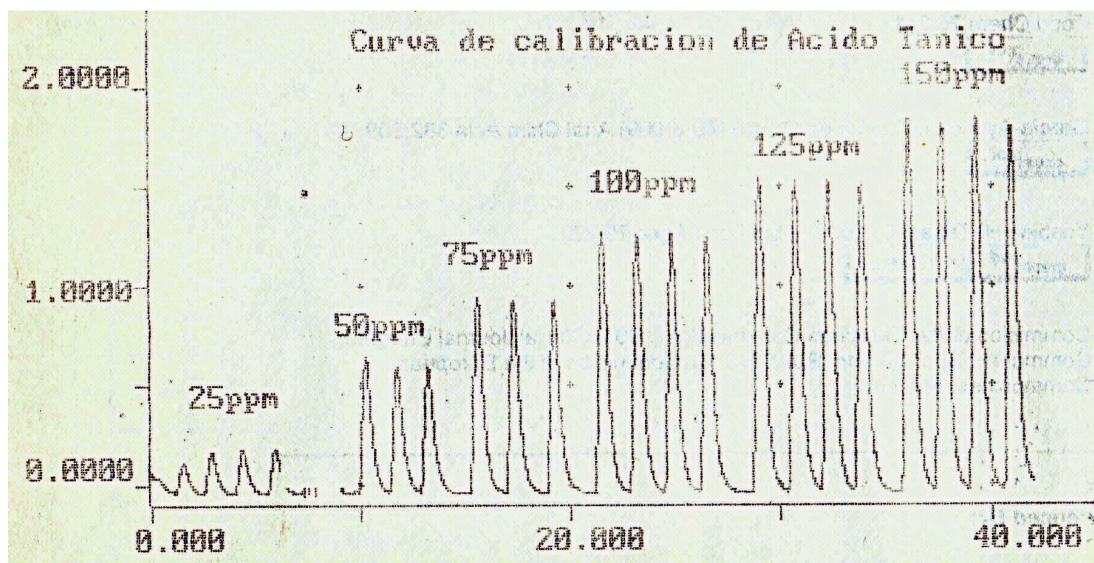


Figura 15. Diagrama de estándares de ácido tánico.

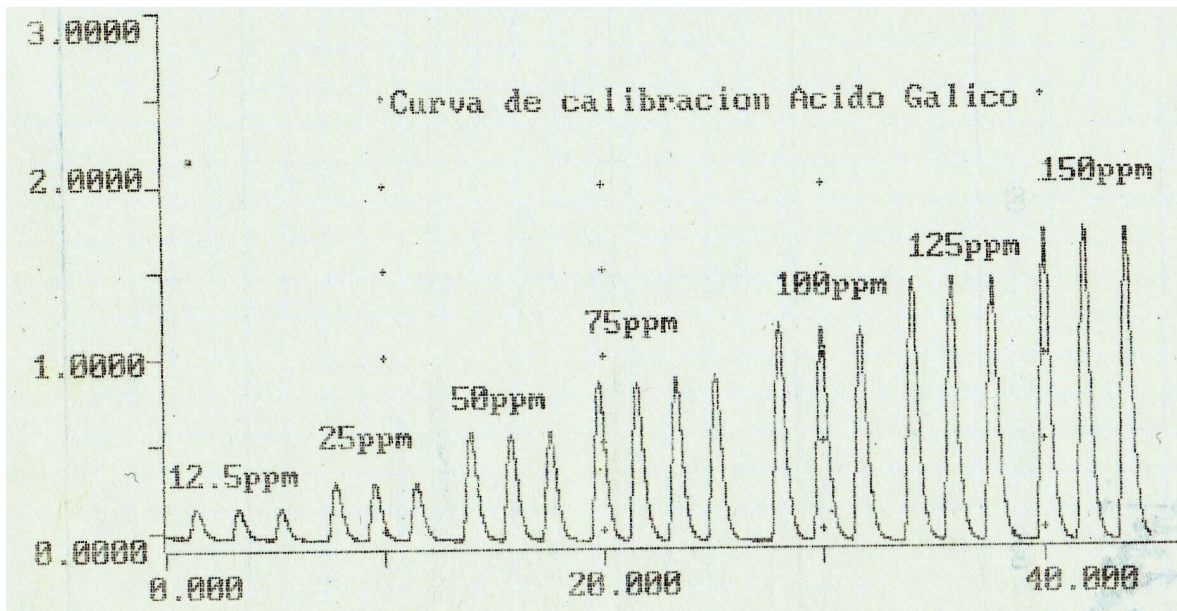


Figura 16. Diagrama de estándares de ácido gálico.

En la tabla 4 se presentan las concentraciones de los estándares utilizados y los valores de absorbancia promedio obtenidos de la medición de tres inyecciones sucesivas para cada estándar. La representación gráfica de ambas curvas de calibración se muestra en las figuras 17 y 18.

Tabla 4. Absorbancia promedio medida para cada estándar de ácido gálico y ácido tánico.

	12.5 mg L ⁻¹	25 mg L ⁻¹	50 mg L ⁻¹	75 mg L ⁻¹	100 mg L ⁻¹	125 mg L ⁻¹	150 mg L ⁻¹
Ácido gálico	0.1455	0.2888	0.5701	0.8822	1.1686	1.4653	1.7467
Ácido tánico	0.0381	0.1816	0.6079	0.9340	1.2729	1.5390	1.8478

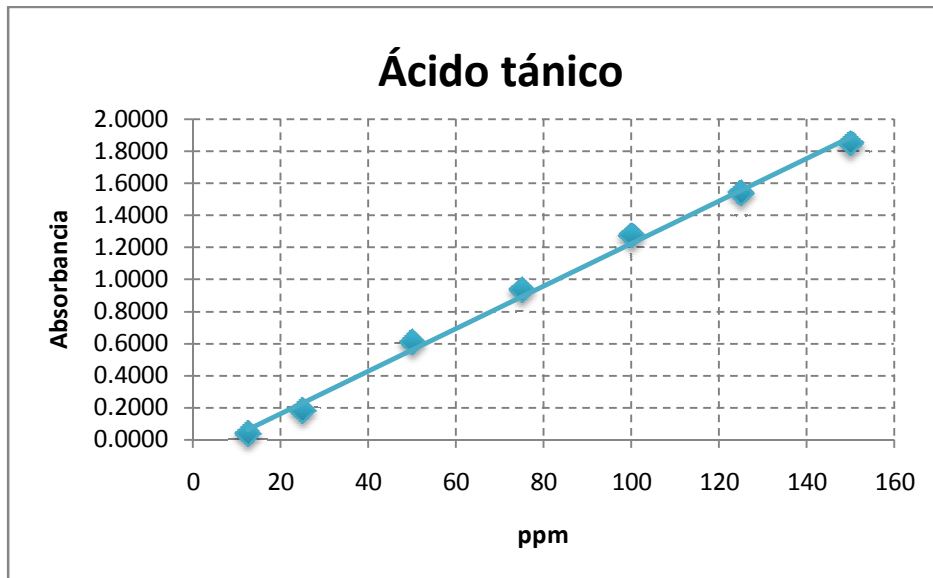


Figura 17. Curva de calibración de ácido tánico.

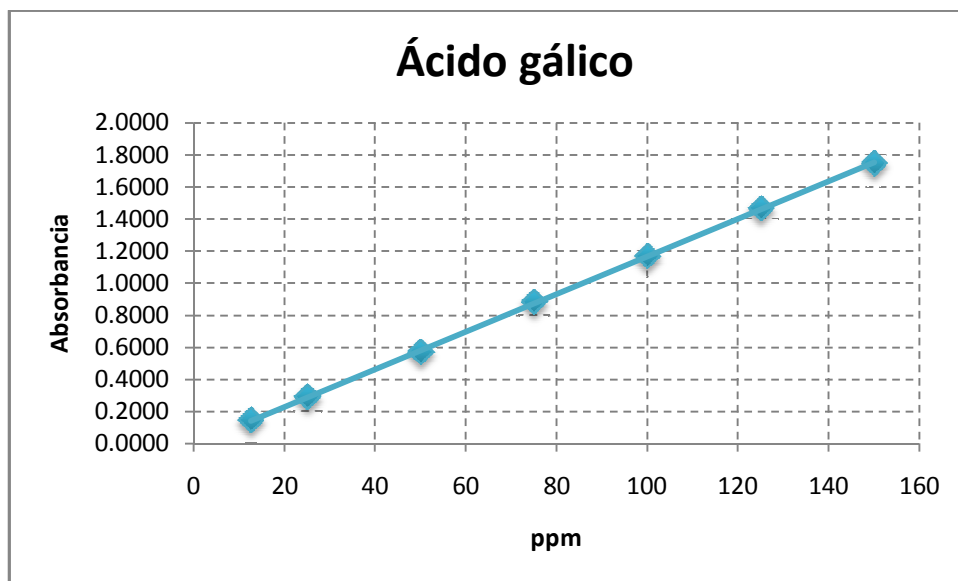


Figura 18. Curva de calibración de ácido gálico.

Tabla 5. Parámetros estadísticos de las curvas de calibración

Estándar	Pendiente	Ordenada al origen	R ²	Límite de detección	Intervalo lineal
Ácido gálico	0.0125 ± 0.0001	0.1517 ± 0.0053	0.9975	8.64 mg L ⁻¹	12.5 – 150 mg L ⁻¹
Ácido tánico	0.0133 ± 0.0004	-0.1022 ± 0.0338	0.9980	11.2 mg L ⁻¹	12.5 – 150 mg L ⁻¹

5.3 Repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio del método de detección

Para evaluar la precisión del método de detección, se utilizó ácido tánico y se realizó un estudio de ANOVA de un solo factor. Los datos reportados en la tabla 6 para cada réplica corresponden al promedio de tres mediciones.

Tabla 6. Reproducibilidad intralaboratorio para las mediciones de absorbancia de estándares de ácido tánico 90 ppm.

Día	Réplica 1 (mg L ⁻¹)	Réplica 2 (mg L ⁻¹)	Suma	Media
1	92.50 ± 0.61	93.47 ± 0.34	185.96 ± 0.95	92.98
2	92.48 ± 0.38	93.10 ± 0.34	185.58 ± 0.72	92.79
3	92.70 ± 0.59	91.90 ± 0.69	184.60 ± 1.28	92.30
4	91.71 ± 0.35	93.69 ± 0.46	185.40 ± 0.81	92.70
5	90.91 ± 0.59	91.11 ± 0.34	182.02 ± 0.93	91.01

Tabla 7. Análisis de varianza de un factor para la medición de estándares de ácido tánico

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	Probabilidad	Valor crítico F
Entre días	5.0361	4	1.2590	2.12	0.2154	5.19
Dentro de días	2.9671	5	0.5934			
Total	8.0033	9				

La hipótesis nula, H_0 , es: no hay diferencia significativa entre los resultados entre días y dentro de días.

Como el valor de F calculado, 2.12, no es mayor al valor crítico de $F_{4,5 P=0.05}$ 5.19, entonces se concluye que no hay una evidencia estadística de que exista diferencia significativa entre los resultados obtenidos para las mediciones entre días y dentro de días, por lo que se acepta la hipótesis nula, H_0 .

El valor de la repetibilidad relativa fue de 0.83% y el de la reproducibilidad relativa de 1.04%. A continuación se muestran los cálculos con los que se llegó a estos valores.

- Cálculo de reproducibilidad y repetibilidad del método de análisis

Repetibilidad (Sr)

$$S_r^2 = 0.5934$$

$$S_r = 0.7703$$

Reproducibilidad (S_{WR}²)

$$S_{WR}^2 = S_r^2 + S_{r \text{ entre días}}^2$$

$$S_{r \text{ entre días}}^2 = \frac{(MC_{\text{entre}} - MC_{\text{dentro}})}{nj} \text{ donde } nj \text{ es el número de columnas, 2.}$$

$$S_{r \text{ entre días}}^2 = \frac{1.2590 - 0.5934}{2} = 0.3328$$

$$S_{WR}^2 = 0.5934 + 0.3328 = 0.9262$$

Repetibilidad

$$\%DER = \left(\frac{S_r}{\bar{x}} \right) \times 100$$

$$\%DER = \left(\frac{0.7703}{92.36} \right) \times 100 = 0.83\%$$

Reproducibilidad

$$\%DER = \left(\frac{S_{WR}}{\bar{x}} \right) \times 100$$

$$\%DER = \left(\frac{0.9623}{92.36} \right) \times 100 = 1.04\%$$

5.4 Optimización de los procesos de extracción

La extracción por agitación magnética y la extracción asistida por ultrasonido fueron estudiadas con la finalidad de extraer la mayor cantidad posible de polifenoles.

5.4.1 Extracción por agitación magnética.

Se hicieron extracciones con tres disolventes diferentes a temperatura ambiente y 50°C, agitando por una hora en todos los casos. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 8. Optimización del disolvente y la temperatura para la extracción por agitación magnética.

Disolvente	Temperatura	mg ácido tánico / g de bagazo
Agua destilada	Ambiente	0.21 ± 0.08
Agua destilada	50°C	1.22 ± 0.03
Disolución de NaHCO ₃	Ambiente	1.32 ± 0.02
Disolución de NaHCO ₃	50°C	3.70 ± 0.05
Disolución amortiguadora de carbonatos 0.1M pH=10	Ambiente	3.12 ± 0.05
Disolución amortiguadora de carbonatos 0.1M pH=10	50°C	5.16 ± 0.37

Como puede observarse, la mayor cantidad de miligramos equivalentes de ácido tánico se obtuvo cuando se realizó la extracción a 50°C con la disolución amortiguadora de carbonatos pH=10. Por esta razón, se eligió este disolvente para optimizar el tiempo de extracción.

Tabla 9. Resultados para la extracción de polifenoles con una disolución amortiguadora de carbonatos pH = 10, 0.1M a diferentes tiempos y temperaturas.

Temperatura	Tiempo de agitación (minutos)	mg ácido tánico / g de bagazo
Ambiente	15	2.34 ± 0.02
Ambiente	30	3.69 ± 0.06
Ambiente	45	3.21 ± 0.01
Ambiente	60	2.46 ± 0.04
50 °C	15	6.16 ± 0.15
50 °C	30	7.09 ± 0.06
50 °C	45	7.03 ± 0.09
50 °C	60	6.59 ± 0.09

En los resultados mostrados en la tabla 9, se puede observar que el calentamiento favorece notablemente la extracción de los polifenoles; sin embargo, los tiempos de extracción mayores a 45 minutos propician la oxidación de estos compuestos y esto se ve reflejado en una disminución en el contenido de polifenoles totales.

Por esta razón, para la extracción con agitación magnética las condiciones seleccionadas fueron agitar durante 30 minutos controlando la temperatura a 50 °C, utilizando una disolución buffer de carbonatos 0.1M de pH = 10.

5.4.2 Extracción asistida por ultrasonido

En esta parte de la investigación se buscó mejorar la eficiencia del método de extracción por agitación empleado anteriormente mediante el uso de baño de ultrasonido (sonicación indirecta) y sonda de ultrasonido (sonicación directa).

5.4.2.1 Baño de ultrasonido

Primero se utilizó el baño de ultrasonido, se hicieron experimentos utilizando como disolventes NaHCO₃ 0.1M y una disolución amortiguadora de carbonatos 0.1 M de pH=10. Para cada disolvente se probaron tiempos de 10, 20 y 30 minutos de irradiación continua.

Tabla 10. Extracción de polifenoles a diferentes tiempos y con dos disolventes diferentes utilizando un baño de ultrasonido.

Disolvente	Tiempo de irradiación (minutos)	mg eq. ácido tánico/ g de bagazo
NaHCO ₃ 0.1M	10	0.37 ± 0.02
NaHCO ₃ 0.1M	20	0.68 ± 0.01
NaHCO ₃ 0.1M	30	0.69 ± 0.02
Disolución amortiguadora carbonatos 0.1M pH=10	10	1.09 ± 0.01
Disolución amortiguadora carbonatos 0.1M pH=10	20	1.68 ± 0.01
Disolución amortiguadora carbonatos 0.1M pH=10	30	1.68 ± 0.01

Al comparar estos resultados con los que se obtuvieron con el método de agitación magnética, es evidente que la extracción mediante baño de ultrasonido no es un buen recurso si se busca extraer la mayor cantidad de polifenoles posible, ya que las concentraciones que se detectan son mucho más bajas en comparación con la extracción que se realiza por el método de agitación magnética. Por ejemplo, si comparamos el resultado de la extracción por agitación a 50 °C por media hora, con el de la extracción por baño de ultrasonido con media hora de irradiación, ambos con una disolución amortiguadora de carbonatos pH = 10 como extractante, podemos observar que la cantidad de polifenoles por gramo de bagazo es 422% mayor en el extracto obtenido por agitación y calentamiento.

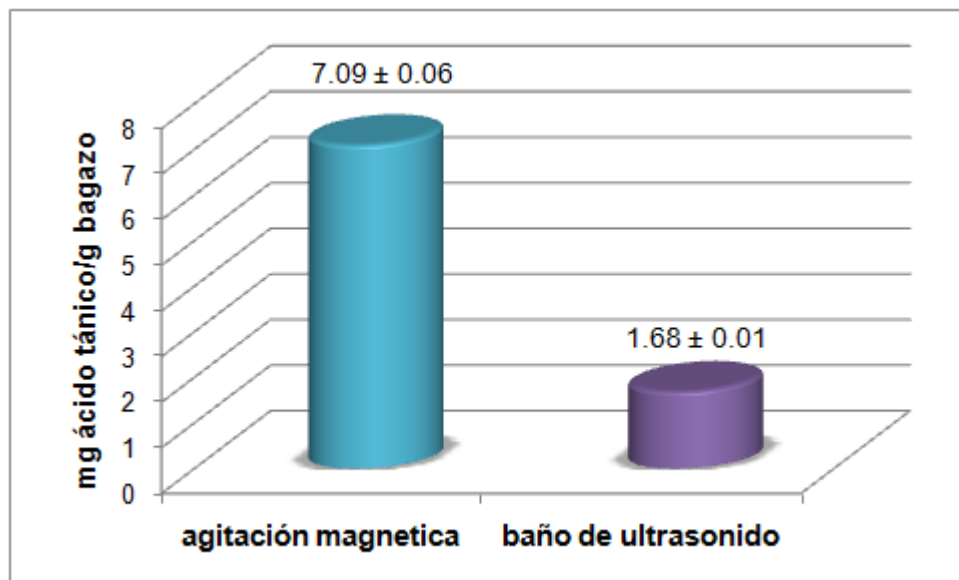


Figura 19. Comparación entre la extracción por agitación magnética a 50°C y la extracción mediante baño de ultrasonido, ambas por 30 minutos.

Al no obtener una mejoría en la eficacia de extracción con el baño de ultrasonido, se decidió trabajar con la sonda de ultrasonido que tiene la ventaja de que la irradiación está focalizada sobre la muestra.

5.4.2.2 Sonda de ultrasonido

En este caso hay varias variables que se optimizaron como los ciclos de irradiación – no irradiación, el tiempo total de extracción y la potencia a la que se irradia.

Los primeros experimentos tuvieron como finalidad conocer cómo influía el tiempo total de irradiación en la cantidad de polifenoles totales que se determinaba en las muestras y de esta manera decidir si era conveniente o no el uso de la sonda de ultrasonido para mejorar la eficacia de la extracción. El ultrasonido genera procesos oxidativos, por lo que un tiempo de irradiación prolongado podía dar como resultado una menor concentración de polifenoles. Además, también es necesario tener control sobre la temperatura: si ésta aumenta por encima de 50°C aproximadamente, los polifenoles dejan de ser estables y se descomponen.

En la tabla 11 se muestran los resultados obtenidos para la optimización del tiempo total de irradiación para la extracción de polifenoles de las muestras de bagazo de uva. El extractante utilizado fue la disolución amortiguadora de carbonatos de pH = 10, ya que en los experimentos anteriores se vio que se obtenían mejores resultados con éste, ya que el medio se encuentra amortiguado.

Para la optimización del tiempo de irradiación, se utilizaron ciclos de 40 segundos de irradiación por 20 segundos de no irradiación hasta completar el tiempo total para cada experimento

Tabla 11. Optimización del tiempo total de irradiación. Potencia total de la sonda: 30%

Tiempo total de irradiación (minutos)	mg ácido tánico /g de bagazo
2	8.68 ± 0.1
3	8.92 ± 0.1
4	9.51 ± 0.2
6	12.65 ± 0.1
8	11.12 ± 0.1
10	10.25 ± 0.1

También se utilizó la sonda al 50% de su potencia total, en este caso los tiempos totales de irradiación ensayados no excedieron los 6 minutos ya que si se irradia más tiempo, la temperatura de la muestra supera los 50°C y los polifenoles se descomponen.

Tabla 12. Optimización del tiempo total de irradiación. Potencia total de la sonda: 50%

Tiempo total de irradiación (minutos)	mg ácido tánico /g de bagazo
1	2.23 ± 0.1
2	4.11 ± 0.1
3	4.93 ± 0.1
4	6.04 ± 0.1
5	8.52 ± 0.1
6	7.92 ± 0.1

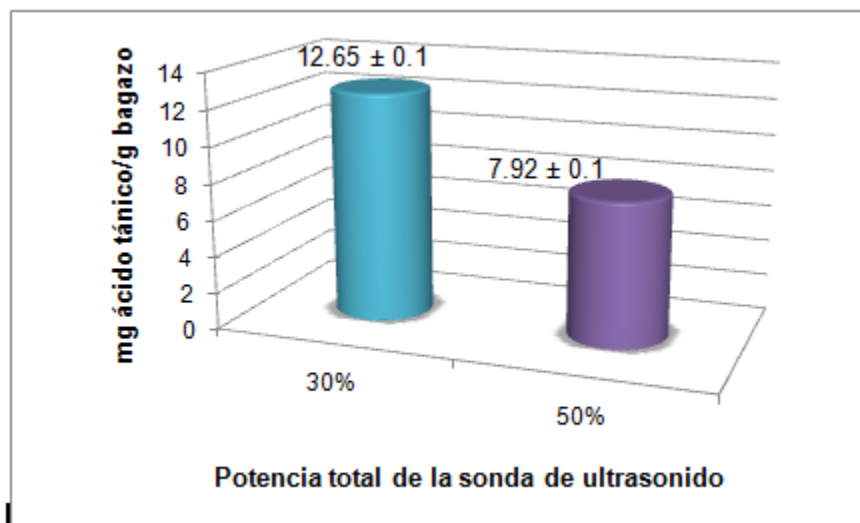


Figura 20. Comparación de los resultados obtenidos para la extracción de polifenoles con un tiempo total de irradiación de seis minutos, utilizando la sonda a 30% y 50% de su potencia.

De acuerdo a los resultados mostrados en la tabla 12, se puede ver que si se aumenta la potencia de la sonda a 50% no se consigue una mejora en la eficiencia de la extracción. En la gráfica presentada en la figura 20 se hace la comparación con los experimentos en los que se irradiaron las muestras por 6 minutos, utilizando la sonda al 50% de su potencia se disminuye la cantidad de polifenoles extraídos por gramo de bagazo en un 37.4% respecto al resultado obtenido cuando se trabajó con el 30% de potencia. Esto se debe a que cuando se aumenta la potencia se producen mayores efectos de oxidación en los polifenoles por el ultrasonido, además de que la temperatura en la muestra aumenta con mayor velocidad.

5.4.2.2.1 Optimización de los ciclos de irradiación – no irradiación

Como siguiente paso, se realizó la optimización de los ciclos de irradiación – no irradiación, para lo cual se utilizó el programa Statgraphics® para hacer un diseño de experimentos factorial 2^2 en el que los factores de entrada fueron el tiempo de irradiación y el tiempo de no irradiación y el factor de respuesta fue la concentración (mg ácido tánico/g de bagazo).

El software generó siete experimentos aleatorios, con cuatro de ellos se estudian los puntos máximos y mínimos, mientras que los otros tres corresponden a los puntos centrales con los que se calcula la precisión.

El intervalo establecido para los tiempos de irradiación fueron de 20 a 60 segundos y para los tiempos de no irradiación, de 5 a 40 segundos.

Los experimentos se realizaron el mismo día bajo las condiciones optimizadas anteriormente: disolución reguladora de carbonatos pH=10 0.1 M como extractante, 6 minutos totales de irradiación utilizando la sonda al 30% de su potencia total. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Diseño de experimentos 2² para optimizar los ciclos de irradiación – no irradiación de la extracción asistida por ultrasonido.

Número de experimento	Tiempo de irradiación (s)	Tiempo de no irradiación (s)	mg ácido tánico/g bagazo
1	20	40	10.67 ± 0.1
2	40	22.5	12.25 ± 0.1
3	40	22.5	11.29 ± 0.1
4	40	22.5	10.58 ± 0.1
5	20	5	11.31 ± 0.1
6	60	40	9.88 ± 0.1
7	60	5	10.77 ± 0.1

El gráfico de pareto, permite visualizar cuál de los factores tiene un mayor impacto sobre el resultado de la extracción. Si alguno de los factores traspasa la línea vertical que representa el test de 95% de significancia, quiere decir que tiene un efecto considerable en la extracción; esto también se comprueba con los valores P obtenidos mediante el análisis de varianza que se muestra en la tabla 14, para que alguno de los factores o ambos tengan una contribución significativa, el valor P debe ser menor a 0.05. Como puede observarse en la figura 21, ninguno de los factores traspasa este límite, por lo que se concluyó que los ciclos de irradiación – no irradiación, no contribuyen de forma significativa en la eficacia de la extracción.

Gráfico de Pareto estandarizado para absorbancia

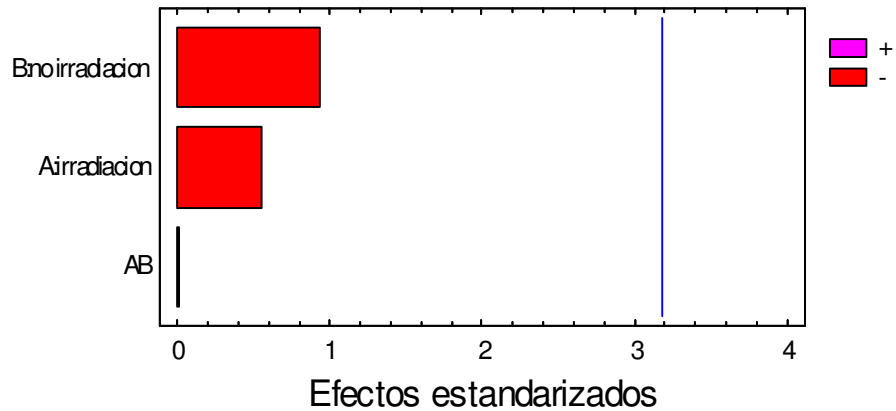


Figura 21. Gráfico de Pareto obtenido mediante el software Statgraphics.

Tabla 14. Análisis de varianza para el diseño de experimentos.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor F	Valor P
A: irradiación	0.002	1	0.002	0.30	0.6193
B: no irradiación	0.005	1	0.005	0.87	0.4200
AB	8.1 E-7	1	8.1 E-7	0.00	0.9910
Error	0.016	3			
Total	0.022	6			

En los resultados de la tabla 13 se observa que los ciclos de irradiación – no irradiación, con los que se obtiene una mayor extracción son 40 - 22.5 y 20 – 5. Si se eligiera el ciclo de 20 – 5, se requeriría de un mayor número de ciclos para completar el tiempo total de extracción y no se obtendría una mejora importante en el resultado. Por lo tanto, debido a que se vio que los ciclos no tienen una influencia significativa en el resultado de la extracción, se decidió continuar utilizando el ciclo de 40 segundos de irradiación y 20 segundos de no irradiación como en los ensayos anteriores.

5.5 Efecto del ultrasonido en el estándar de ácido tánico

Para evaluar la influencia de la energía de ultrasonido sobre el estándar de referencia, se preparó una disolución de ácido tánico con una concentración de 90 mg L⁻¹.

Se tomaron tres alícuotas de 10 mL, de cada una 5 mL se sometieron al proceso optimizado de extracción asistida por ultrasonido y se midió su absorbancia por triplicado con el sistema de análisis por inyección en flujo. Los otros 5 mL se midieron por triplicado sin haber sido irradiados, esto con la finalidad de hacer una comparación de los resultados con y sin ultrasonido.

Tabla 15. Concentración de disoluciones estándar de ácido tánico

Estándar	Concentración en mg L ⁻¹ (Con ultrasonido)	Concentración en mg L ⁻¹ (Sin ultrasonido)	% Recuperado
1	88.16 ± 0.4	91.35 ± 0.8	96.50 ± 0.84
2	83.38 ± 0.5	86.83 ± 0.4	96.03 ± 0.70
3	87.10 ± 0.4	93.74 ± 0.9	92.91 ± 0.94

Los resultados muestran recuperaciones promedio de 95.15% por lo que se comprueba que la concentración de ácido tánico no se ve afectada por la aplicación de energía de ultrasonido.

5.6 Cuantificación en piel, pulpa y semillas de uva roja

Para conocer la proporción de polifenoles que se encuentra en cada parte de la uva, se llevó a cabo la extracción asistida por ultrasonido con las condiciones optimizadas anteriormente, en muestras de 1g de piel, pulpa y semillas.

Los resultados se muestran en el gráfico de barras de la figura 22, el cual permite realizar una comparación más clara del índice de polifenoles en cada parte analizada.

Con este experimento se verifica que el mayor contenido de polifenoles se encuentra en la semilla, por esta razón es tan común que se comercialice el

extracto de semilla de uva como suplemento alimenticio antioxidante o como ingrediente de productos cosméticos.

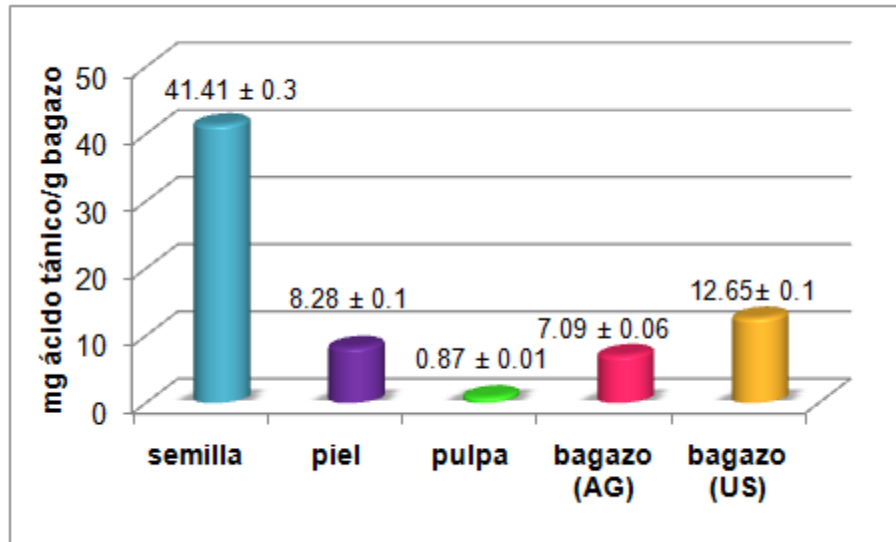


Figura 22. Gráfico comparativo del contenido de polifenoles en semilla, pulpa y piel de uva roja. También se compara la extracción en bagazo de uva utilizando agitación magnética (AG) y ultrasonido (US).

En el gráfico 22 se muestra también la diferencia entre la extracción de polifenoles en bagazo de uva con el método de agitación magnética y el método de ultrasonido.

Al utilizar la sonda de ultrasonido se mejora la extracción en un 78% en comparación con la extracción tradicional.

5.7 Repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio del método de extracción.

Con la finalidad de establecer la precisión del método de extracción asistida por ultrasonido, se realizó un estudio de ANOVA de un solo factor.

El mismo procedimiento descrito en la sección 5.3 se realizó utilizando extractos de bagazo de uva en vez de estándares de ácido tánico.

El valor de la repetibilidad relativa fue de 2.45% y el de la reproducibilidad relativa de 7.52%.

5.8 Evaluación de interferencias

Para evaluar si existen interferencias en los extractos para la cuantificación de polifenoles por el método de análisis por inyección en flujo, se realizaron fortificaciones en muestras de extractos de piel, semillas y bagazo de uva. Las fortificaciones se hicieron añadiendo una concentración conocida de 20 mg L⁻¹ (considerando el efecto de dilución) de una disolución estándar de ácido tánico a los extractos que se obtuvieron después de irradiar las muestras con la sonda de ultrasonido; se midió la absorbancia de un extracto sin fortificar y otro fortificado y a partir de este resultado se calcula el % de recuperación, se considera como el 100% la concentración obtenida en el extracto sin fortificar + 20 mg L⁻¹ y con la concentración del extracto fortificado se obtiene el % de recuperación.

Tabla 18. Porcentajes de recuperación para las fortificaciones en extractos de bagazo, semilla y piel de uva roja.

Muestra	Concentración en mg L ⁻¹	Concentración en mg L ⁻¹ (fortificada)	% recuperación
Semilla	1377.18 ± 19.50	1435 ± 45.12	102.76 ± 2.97
Piel	304.77 ± 9.25	301.77 ± 8.83	93.03 ± 3.51
Bagazo	487.45 ± 12.82	482.04 ± 16.45	95.00 ± 2.84

Los resultados que se reportan en la tabla anterior muestran recobros promedio de 102.76 ± 2.97% para los ensayos con semilla, 93.03 ± 3.51 % con piel y 95.00 ± 2.84% con bagazo, cuando se fortificaron los extractos con 20 mg L⁻¹ de ácido tánico. Por lo tanto, la aplicación de ultrasonido para la obtención de extractos de uva no afecta la cuantificación de los analitos de manera significativa.

El procedimiento de fortificación también se realizó en muestras de bagazo, piel y semilla antes de someterlas al proceso de extracción asistida por ultrasonido para analizar si se pierde una cantidad considerable de analitos durante dicho proceso.

Los resultados se expresan en este caso como mg equivalentes de ácido tánico / g de bagazo, ya que no se pesó exactamente la misma cantidad de muestra para cada ensayo.

Tabla 19. Porcentajes de recuperación para las fortificaciones en muestras de bagazo, semilla y piel de uva roja.

Muestra	Concentración en mg tánico/ g bagazo	Concentración en mg tánico/ g bagazo (fortificada)	% recuperación
Semilla	38.04 ± 1.1	35.76 ± 1.02	92.55 ± 7.09
Piel	7.16 ± 0.2	7.63 ± 0.2	98.42 ± 6.13
Bagazo	10.74 ± 0.1	11.16 ± 0.2	97.44 ± 1.53

Las recuperaciones cuando se adicionan 20 mg L⁻¹ de ácido tánico a las muestras junto con el extractante (disolución amortiguadora de carbonatos 0.1 M pH = 10) fueron en promedio: semilla 92.55%, piel 98.42% y bagazo 97.44%.

Lo anterior indica que durante la extracción no se pierde una cantidad de analito que afecte considerablemente su determinación mediante la configuración de análisis por inyección en flujo.

5.9 Extracción en fase sólida acoplada a un sistema de inyección en flujo: resultados preliminares.

Para acoplar la minicolumna para extracción en fase sólida se hicieron varios pasos de optimización:

- a) *Calibración:* se llevaron a cabo experimentos de calibración utilizando seis estándares con concentraciones de 60, 80, 100, 120, 140 y 160 mg L⁻¹ para ácido tánico y ácido gálico. Las medidas de todos los estándares se realizaron por triplicado y se utilizó NaOH a pH 10 para eluir los analitos de la columna. Se observó que la extracción de ácido gálico presenta un comportamiento lineal ($A=0.0019C + 0.0008$ y $R^2=0.9948$) en el intervalo de concentraciones

estudiado mientras que el ácido tánico se ajusta más a una tendencia polinomial ($A=3 \times 10^{-6} C^{1.6925}$ y $R^2=0.9926$).

La diferencia entre los comportamientos observados entre la curva de ácido tánico sin columna (figura 17) y la curva de ácido tánico con columna (figura 24) se debe principalmente al tamaño de la molécula y el aumento de la dispersión en el sistema FIA originado por la columna. El ácido tánico es una molécula muy grande como se mostró anteriormente en la figura 3, por esta razón es más complicado que pueda ser eluido de la columna y tarda más tiempo.

El ácido gálico en cambio, es una molécula más pequeña (figura 3) y tiene menos grupos OH que interaccionen con el grupo funcional de la columna ($-CH_2-CH_2-NH_2$) por lo que puede ser eluido con facilidad, presentando así un comportamiento lineal sin columna (figura 18) y con columna (figura 23).

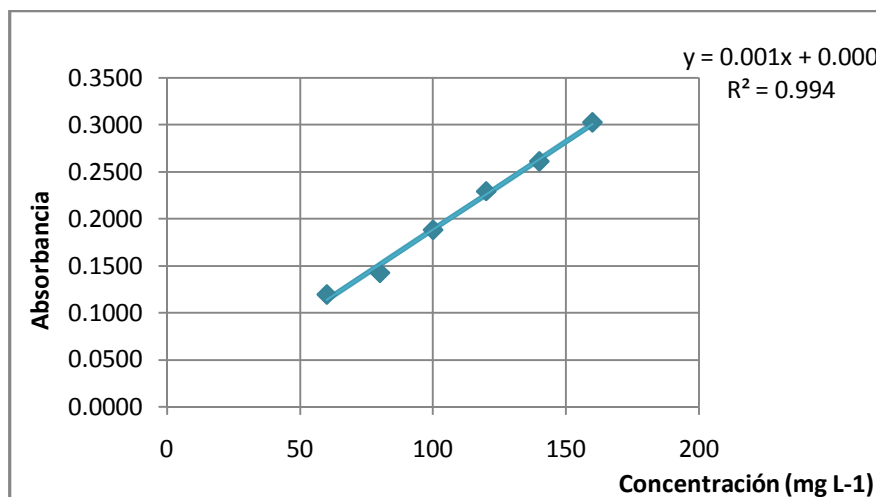


Figura 23. Curva de calibración para la elución de ácido gálico con NaOH pH = 10

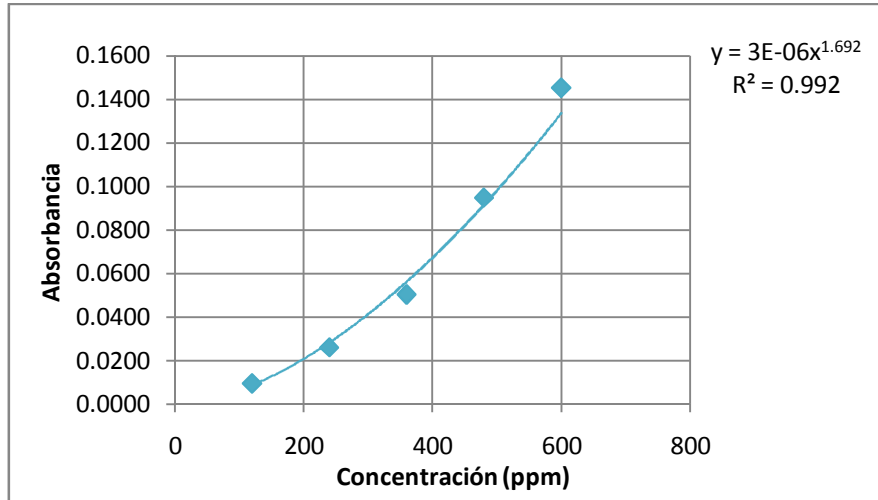


Figura 24. Curva de calibración para la elución de ácido tánico con NaOH pH = 10

b) *Influencia del amortiguamiento del pH:* se realizaron nuevamente las curvas de calibración usando una disolución reguladora de fosfatos 0.1M a pH 8 y otro de carbonatos 0.1M a pH 10, como eluyentes.

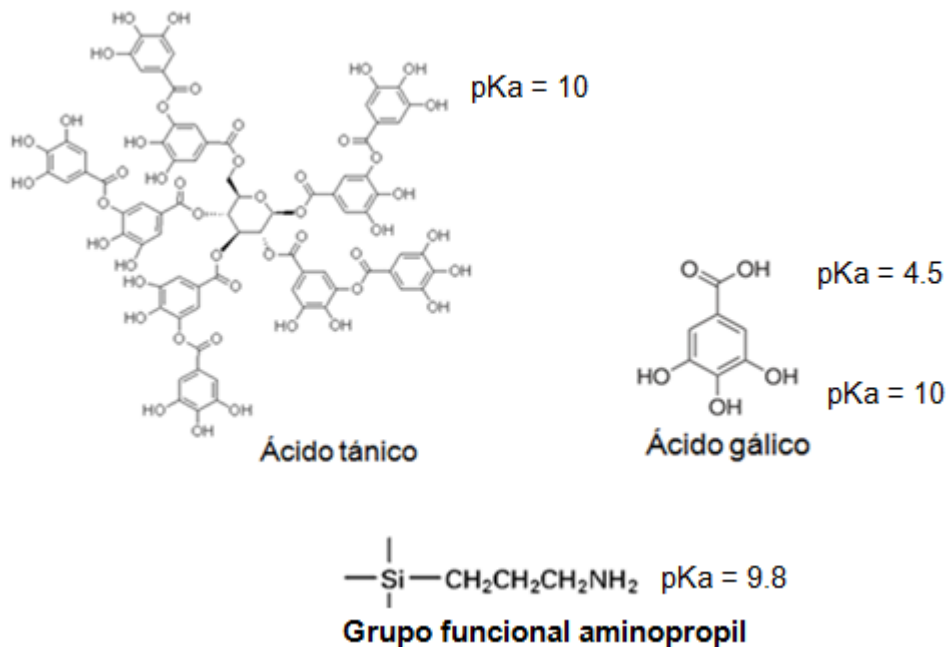


Figura 25. pKa de los analitos y del grupo funcional del sorbente empleado para la retención.

Como se observa en las figuras 25 y 26, el pH de elución tiene una mayor influencia para el ácido tánico. Esto se debe principalmente al tipo de interacciones que tiene esta molécula con el grupo aminopropil de la columna cuyo pKa es de 9.8 (figura 25).

Wang y sus colaboradores (2010) reportan que el punto isoeléctrico del ácido tánico es aproximadamente 4.5 y por lo tanto a valores de pH mayores a 4.5 el ácido tánico se encuentra como una especie cargada negativamente; el pH de retención fue 6 por lo que tanto el ácido tánico como el grupo funcional del sorbente están en su forma iónica y hay una fuerte interacción electrostática.

A pH 8, la amina se encuentra como NH_3^+ por lo que la interacción electrostática entre el ácido tánico y el sorbente es alta y por lo tanto resulta difícil eluirlo de la columna ya que además, también existen interacciones debidas a puentes de hidrógeno.

A pH 10, el grupo aminopropil se desprotona quedando como NH_2 , como esta es su forma neutra se elimina la interacción electrostática quedando sólo interacciones por puente de hidrógeno que son más fáciles de romper. Esto explica que a pH 10 el ácido tánico puede eluirse aproximadamente el doble que a pH 8.

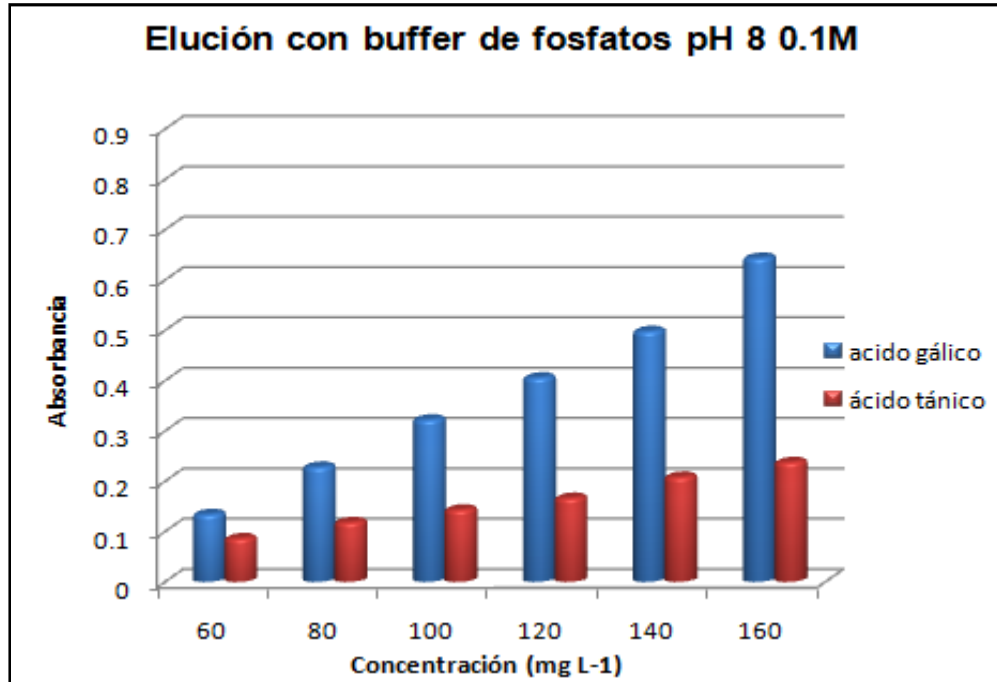


Figura 26. Comparación de los resultados obtenidos para la elución de ácido gálico y ácido tánico utilizando una disolución reguladora de fosfatos 0.1M de pH 8.

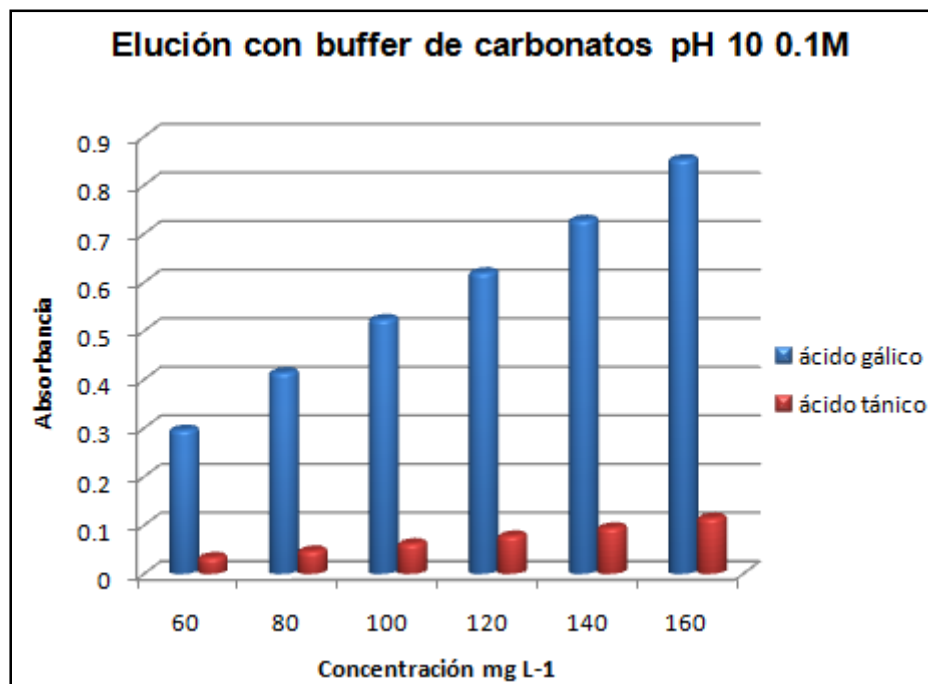


Figura 27. Comparación de los resultados obtenidos para la elución de ácido gálico y ácido tánico utilizando una disolución amortiguadora de carbonatos 0.1M pH de 10.

En el caso del ácido gálico, a pH 10 se eluye en promedio un 38% menos que cuando se utiliza a pH 8. Mediante un contraste con el estadístico t de student, se determinó si la diferencia entre las medias era significativa.

Se realizó el cálculo con las mediciones de absorbancia del estándar de 140 mgL^{-1} encontrándose que $t = 28.20$ y el valor de tablas para 4 grados de libertad es de $t_4 = 2.78$ a un nivel de significancia del 5%, por lo que la diferencia en los resultados es estadísticamente significativa y no se debe a errores en la medición. Las fórmulas para realizar este cálculo se muestran en el Anexo I.

Con lo anterior, se deduce que el ácido gálico tiene un pH máximo de elución alrededor de 8 y con pH más altos la elución presenta un comportamiento decreciente. Es necesario evaluar posteriormente la elución a valores de pH más bajos para poder comprender mejor el comportamiento del ácido gálico.

- c) *Análisis de mezclas de ácidos tánico y gálico:* para evaluar la respuesta del método al retener los dos analitos simultáneamente, se midió la absorbancia de cinco estándares que contenían ácido gálico de concentración fija (100 mg L^{-1}) y ácido tánico cuya concentración fue de 1 a 5 veces la del ácido gálico. Se observó que a pH 8 la señal del ácido gálico aumenta un 9.6% en presencia de ácido tánico con la misma concentración. Cuando la proporción es 1:5 (ácido gálico: ácido tánico) la interferencia del ácido tánico es mayor al 45%.

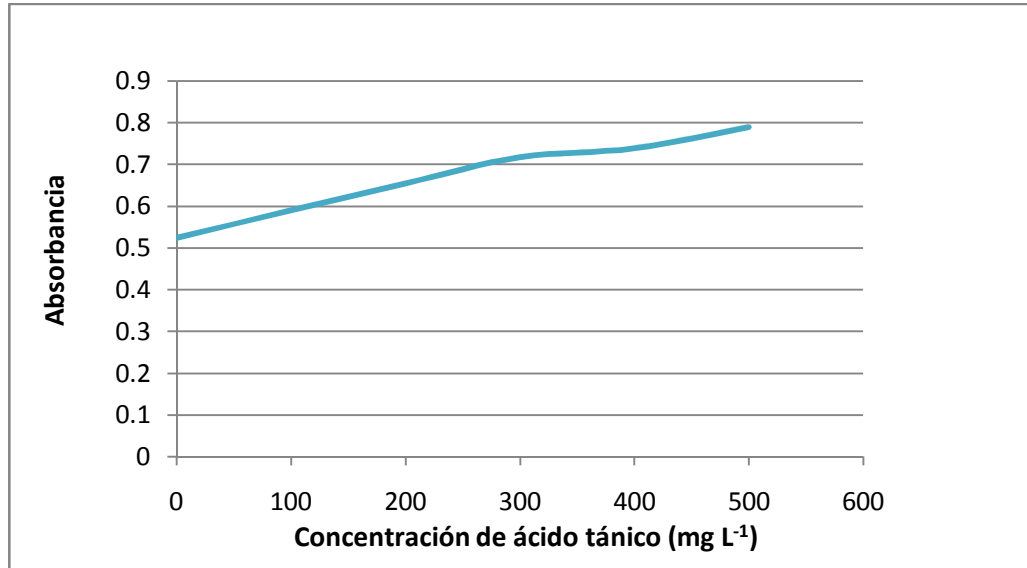


Figura 28. Elución de mezclas de ácido gálico con una concentración de 100 mg L⁻¹ con diferentes concentraciones de ácido tánico.

6. CONCLUSIONES

1. El método propuesto para la extracción de polifenoles en uva asistido por ultrasonido, con un disolvente no orgánico, permite que el tiempo de extracción disminuya un 80%, en comparación con el método tradicional de agitación magnética (30 minutos por agitación y 6 minutos por ultrasonido); además permite extraer los polifenoles con una mayor eficiencia ya que, como se puede apreciar en los resultados, la concentración de polifenoles totales detectada se incrementa en un 78%.
2. El tiempo y la potencia de irradiación influyen en la estabilidad de estos compuestos ya que pueden oxidarse y por lo tanto la concentración que se detecta será menor.
3. El análisis por inyección en flujo, permite realizar un promedio de 32 determinaciones por hora, reduce la intervención humana durante el análisis, por lo que se tiene una buena repetibilidad y reproducibilidad (0.83% y 1.04% respectivamente).
4. La extracción en fase sólida de ácido tánico y ácido gálico se acopló en línea a un sistema de análisis por inyección en flujo, mediante una minicolumna de 1cm de longitud empacada con un adsorbente de tipo aminopropil. Esta columna tiene la ventaja de ser reutilizable durante un promedio de 30 análisis, lo cual representa un ahorro considerable de cartuchos para extracción en fase sólida.
5. El mecanismo de elución es dependiente del pH, por lo que es importante amortiguar el medio.
6. A pH 10 se logra eliminar la interacción electrostática entre el ácido tánico y el grupo funcional aminopropil de la columna, por lo que se puede eluir mejor. Sin embargo, el pH óptimo para eluir ácido gálico es 8.

7. EXPECTATIVAS

La parte de la investigación en donde se estudia el acoplamiento de una minicolumna al sistema de análisis por inyección en flujo sigue en desarrollo. El objetivo principal de esta minicolumna es integrar un paso previo de pretratamiento en línea de la muestra al sistema FIA para la determinación de polifenoles en extracto de uva. De esta forma, se podrían cuantificar estos compuestos de forma más específica ya que con la reacción de Folin – Ciocalteau sólo podemos tener una aproximación (índice de polifenoles totales).

Una de las dificultades encontradas al trabajar con estándares de ácido tánico, fue que por el tamaño de la molécula resulta complicado poder retenerlo y eluirlo adecuadamente. Por esta razón, se propone también acoplar un paso en el que el ácido tánico se hidrolice y así poder retenerlo y eluirlo como ácido gálico que es una molécula más pequeña y, como se vio en los resultados de la sección 5.9, se eluye mejor que el ácido tánico a pH 8 que resulta menos agresivo para la columna.

8. REFERENCIAS

Ángeles – Cañas, A.N. and Cañizares – Macías, M.P. **Desarrollo de un sistema sensor para la cuantificación de glucosa en jugos de frutas.** *Revista de la Sociedad Química de México.* 48 (2004) pp.106 – 110.

Attiyat, A.S.and Christian, G.D. **Flow injection analysis – atomic absorption determination of serum zinc.** *Clinica Chimica Acta.*137 (1984) pp. 151 – 157.

Bendicho, C. and Lavilla, I. *Ultrasound Extractions* en Wilson, I. (2000) *Encyclopedia of Separation Science.* Londres, Editorial Elsevier, pp. 1448 – 1454.

Bouhsain, Z.; Garrigues, J.M.; Garrigues, S.; De la Guardia, M. **Flow injection Fourier transform infrared determination of caffeine in coffee.** *Vibrational Spectroscopy.* 21 (1999) pp. 143 – 150.

Cañete, F.; Ríos, A.; Luque de Castro, M. D.; Valcárcel, M. **Flow – injection cyclic voltammetry.** *Analytica Chimica Acta.* 211 (1988) pp. 287 – 292.

Cañizares, M.P. **Análisis por inyección en flujo: herramienta clave para la automatización analítica.** *Revista de la Sociedad Química de México.* 46 (2002) pp.167 – 174.

Celeste, M.; Tomás, C.; Cladera, A.; Estela, J.M.; Cerdá, V. **Enhanced automatic flow injection determination of the total polyphenol index in wines using Folin Ciocalteu reagent.** *Analytica Chimica Acta.* 269 (1992) pp. 21 – 28.

De la Rosa, L.A.; Álvarez – Parrilla, E.; González – Aguilar, G.A. 2010. *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability.* Blackwell Publishing. Singapur, pp. 53 – 80.

Decnop-Weever, L. G., Kraak, J. C. **Determination of sulphite in wines by gas-diffusion flow injection analysis utilizing spectrophotometric pH-detection.** *Analytica Chimica Acta.* 337 (1997) pp.125 – 131

El – Shahat, M.F.; Burham, N.; Abdel Azeem, S.M. **Flow injection analysis – solid phase extraction (FIA – SPE) method for preconcentration and determination of trace amounts of penicillins using methylene blue grafted polyurethane foam.** *Journal of Hazardous Materials.* 177 (2010) pp. 1054 – 1060.

Fernández – Abedul, M.T. and Costa – García, A. **Flow injection analysis with amperometric detection of naltrexone in pharmaceuticals.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 16 (1997) pp. 15 – 19.

Fernández-Pachón, M.S.; Villaño, D.; García – Parrilla, M.C.; Troncoso, A.M. **Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition.** *Analytica Chimica Acta.* 513 (2004) pp.113-118.

Galati, G. and O'Brien, P.J. **Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties.** *Free Radical Biology & Medicine.* 237 (2004) pp. 287 – 303.

Gimeno – Creus, E. **Compuestos fenólicos: un análisis de sus beneficios para la salud.** *Offarm.* 23 (2004) pp. 80 – 84.

Haji Shabani, A.M.; Dadfarnia, S.; Dehghan, K. **On-line preconcentration and determination of cobalt by chelating microcolumns and flow injection atomic spectrometry.** *Talanta.* 59 (2003) pp.719-725

Hui, Y.H. 2006. *Handbook of fruits and fruit processing.* Blackwell Publishing. USA.

Ikawa, M.; Schaper, T.D.; Dollard, C.A.; Sasner, J.J.; **Utilization of Folin – Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain Nitrogen Compounds.** *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* 51 (2003) pp. 1811 – 1815.

Laës, A.; Vuillemin, R.; Leilde, B.; Sarthou, G.; Bournot – Marec, C.; Blain, S. **Impact of environmental factors on in situ determination of iron in seawater by flow injection analysis.** *Marine Chemistry*. 97 (2005) pp. 347 - 356

Leifert, W.R. and Abeywardena, M.Y. **Cardioprotective actions of grape polyphenols.** *Nutrition Research*. 28 (2008) pp. 729 -737.

Jackson, R. 2009. *Wine Tasting: A Professional Handbook*. Academic Press, Elsevier. USA, pp 339 – 340.

K.S. Suslick. *Sonochemistry* en Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology; Cuarta edición, Editorial J. Wiley & Sons: New York, 1998, vol. 26, 517-541.

Luque de Castro, M.D. and Priego Capote, F. 2007. *Analytical applications of ultrasound*. Elsevier Science Publishers. Holanda. pp. 1 – 30.

Mason, T.J.; Paniwnyk, L.; Lorimer, J.P. **The uses of ultrasound in food technology.** *Ultrasonics sonochemistry*. 3 (1996) pp. S253 – S260.

Mataix, E. and Luque de Castro, M.D. **Determination of L-(-)-malic acid and L-(+)-lactic acid in wine by a flow injection-dialysis-enzymic derivatisation approach.** *Analytica Chimica Acta*. 428 (2001) pp.7 – 14.

Meireles, J.; Sklenarova, H.; Satinsky, D.; Solich, P.; Araújo, A.N.; Conceicao, M.; Montenegro, B.S.M. **Determination of bopindolol using the flow injection technique coupled with solid phase extraction.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 33 (2003) pp. 1149 – 1153.

Mervartová, K.; Polasek, M.; Martínez Calatayud, J. **Recent applications of flow injection and sequential injection analysis techniques to chemiluminescence determination of pharmaceuticals.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 45 (2007) pp. 367 – 381.

Rózek, A.; Achaerandio, I.; Güell, C.; López, F.; Ferrando, M. **Use of comercial grape phenolic extracts to supplement solid foodstuff.** *LWT - Food Science and Technology*. 43 (2010) pp. 623 – 631.

Ruíz – Jiménez, J. and Luque de Castro, M.D. **Flow injection manifolds for liquid – liquid extraction without phase separation assisted by ultrasound.** *Analytica Chimica Acta*. 489 (2003) pp.1 – 11.

Sakai, T.; Ohta, H.; Ohno, N.; Imai, J. **Routine assay of creatinine in newborn baby urine by spectrophotometric flow-injection analysis.** *Analytica Chimica Acta*. 308 (1995) pp. 446-450

Satinsky, D.; Karlicek, R.; Svoboda, A. **Using on-line solid phase extraction for flow-injection spectrophotometric determination of salbutamol.** *Analytica Chimica Acta*. 455 (2002) pp. 103 – 109.

Simpson, N. 2000. *Solid – phase extraction. Principles, techniques and applications*. Marcel Dekker, Inc.: USA.

Skoog, D.A. (2001) *Principios de Análisis Instrumental*. 5° edición, Editorial McGraw Hill.

Suslick, K.S. (2010) **Executive summary: The chemical and physical effects of ultrasound.** Recuperado el 18 de Julio de 2010 del sitio Web de The Suslick Research Group del departamento de Química de la Universidad de Illinois: <http://www.scs.uiuc.edu/suslick/sonochemistry.html>

Thurman, E.M. *Sorbent selection for solid-phase extraction*. en Cooke, M.; Poole, C.F.; Wilson, I.D. (2000) *Encyclopedia of Separation Science*. Londres, Editorial Elsevier, pp 4204 – 4212.

Tzanavaras, P.D. and Themelis, D.G. **Review of recent applications of flow injection spectrophotometry to pharmaceutical analysis.** *Analytica Chimica Acta*. 588 (2007) pp. 1-9

Valcárcel, M. and Luque de Castro, M.D. 1988. *Automatic Methods of Analysis*. Elsevier Science Publishers. Holanda. pp. 158 – 192.

Wang, J.; Zheng, S.; Liu, J.; Xu, Z. **Tannic acid adsorption on amino – functionalized magnetic mesoporous silica**. *Chemical Engineering Journal*. 165 (2010) pp. 10 – 16.

Wang, Z.; Zhang, Z.; Fu, Z.; Fang, L.; Luo, W.; Chen, D.; Zhang, W. **Mushroom tissue – based flow injection fluorescence system for the determination of isoprenaline**. *Analytica Chimica Acta*. 494 (2003) pp. 63 – 70.

Wu, J.; Lin, L; Chau, F. **Ultrasound – assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells**. *Ultrasonics Sonochemistry*. 8 (2001) pp. 347 – 352.

Yeniceli, D.; Dogrukol – Ak, D; Tuncel, M. **Determination of lansoprazole in pharmaceutical capsules by flow injection analysis using UV – detection**. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 36 (2004) pp. 145 – 148.

9. ARTÍCULO

TECNOLOGÍA

EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO DE POLIFENOLES EN HOLLEJO DE UVA

Lidia Escutia Guadarrama, María del Pilar Cañizares Macías

RESUMEN

La determinación de antioxidantes en alimentos es cada vez más importante debido a que pueden proteger a las células contra los efectos de agentes externos. Los compuestos fenólicos son antioxidantes que se encuentran en una gran variedad de alimentos, siendo la uva una de las frutas que contiene mayor concentración.

La industria vinícola produce una gran cantidad de desechos de uva. Éstos no son generalmente utilizados o suelen usarse como composta. Aunque la mayoría de los fenoles procedentes de la uva se encuentran en los productos finales (principalmente vino), una parte queda en el hollejo de la uva que podría ser aprovechado para extraerlos y generar suplementos alimenticios. Aunque hay muchos métodos para extraer polifenoles en uva, éstos son muy largos y en la mayoría de los casos la eficiencia de la extracción no es alta.

La aplicación de energías alternas no contaminantes, como el ultrasonido, para mejorar los métodos de extracción ha sido utilizada en algunas muestras, pero todavía no se ha extendido su uso debido a la novedad de la técnica.

En este trabajo se realizó un estudio para la extracción de polifenoles en residuos de uva utilizando como agente extractor una disolución amortiguadora de carbonatos y dos métodos de extracción diferentes: agitación magnética y ultrasonido. La cuantificación se llevó a cabo con un sistema automático de análisis por inyección en flujo, que permitió una frecuencia de muestreo de 36 determinaciones por hora. La concentración de polifenoles en los extractos de bagazo de uva cuando se aplicó energía de ultrasonido fue mayor al 40% y el tiempo de extracción disminuyó un 80%.

Palabras clave: uva, ultrasonido, extracción, polifenoles

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se ha incrementado el interés por conocer los alimentos que contienen entre sus constituyentes

compuestos antioxidantes, ya que éstos contrarrestan los efectos ocasionados por los radicales libres que se producen cuando el organismo está expuesto a radiaciones, contaminación ambiental o sustancias tóxicas. La ingesta de antioxidantes alimenticios potencia la protección contra dichos radicales libres, ya que ayudan a retrasar el envejecimiento de las células y protegen de las mutaciones celulares [Galati y O'Brian, 2004; Rodríguez Montealegre et al., 2006].

Los compuestos fenólicos poseen propiedades antioxidantes y se encuentran en muchas frutas y verduras. En la actualidad, la industria del vino está interesada en la extracción de polifenoles a partir de los residuos de uva con el objetivo de utilizarlos como suplemento alimenticio.

Los métodos de extracción de fenoles más utilizados en la industria de la alimentación se han enfocado a las extracciones clásicas como Soxhlet y líquido-líquido, que requieren tiempos de extracción largos y grandes cantidades de disolventes orgánicos [Bonilla et al., 1999].

La aplicación de energía de ultrasonido en los procesos de extracción ha permitido mejorar la eficiencia, el tiempo del proceso y disminuir o eliminar a los disolventes más tóxicos [Novak, Ivana et al., 2008; Valdez-Flores, Claudia y Cañizares Macías, M.P., 2007; Herrera, M.C. y Luque de Castro, M.D., 2004].

El intervalo de frecuencia en el que se utiliza el ultrasonido para ensayos no destructivos oscila entre los 0.5MHz y los 20MHz. El principio físico se basa en el proceso de cavitación que se origina por procesos de compresión y expansión, debido a que se genera una presión negativa en el líquido provocando bolsas de aire que se expanden hasta un tamaño crítico para colapsar finalmente. Dentro de la burbuja, la presión aumenta hasta 1000atm y la temperatura es mayor a 5000°C. El incremento en la presión favorece la penetración del disolvente y las temperaturas alcanzadas favorecen la solubilidad de los compuestos. La irradiación con ondas de ultrasonido provoca una alteración física en las membranas permitiendo que el área de contacto entre la fase sólida y la fase líquida sea mayor y, por lo tanto, se facilite la transferencia de los componentes deseados hacia el disolvente. [Azuola, R. y Vargas, P., 2007].

Facultad de Química, Departamento de Química Analítica. Universidad Nacional Autónoma de México. México. D.F., 04510, México.

TECNOLOGÍA

Para evaluar la eficiencia de la extracción de polifenoles totales en uva, éstos deben ser cuantificados. Uno de los métodos más comunes es por medio de la reacción redox propuesta por Folin-Ciocalteu. Ésta consiste de una disolución de fosfomolibdato y fosfotungstato con constituyentes metálicos oxidados con valencia +6. Los fenoles reducen este reactivo a un complejo azul de molibdeno-tungsteno cuya intensidad azul es directamente proporcional a la concentración de polifenoles en la muestra analizada [Hajimahmoodi, M. et al., 2008]. Este método se ha automatizado utilizando configuraciones de flujo continuo que han permitido mayor número de análisis por unidad de tiempo y menor gasto de reactivos y desechos [Celeste, M. et al., 1992].

En esta investigación se realizó un estudio para extraer polifenoles del hollejo de uva aplicando energía de ultrasonido con un dispositivo tipo sonda. El método se comparó con la extracción asistida por agitación y calentamiento. Para evitar utilizar disolventes tóxicos, las extracciones se realizaron con disoluciones de carbonatos a pH 10. También se comparó la cantidad de polifenoles totales provenientes de distintas partes de la uva: piel, semilla y pulpa.

PARTE EXPERIMENTAL

Instrumentación

Para llevar a cabo la extracción por ultrasonido se utilizó un sonicador ultrasónico digital Branson 450 (20KHz, 400W de potencia) equipado con una sonda cilíndrica de aleación de titanio de 13mm de diámetro.

Para cuantificar los polifenoles, se utilizó un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA) constituido por una bomba peristáltica Gilson, una válvula de inyección Rheodyne, tubería de teflón de 0.5mm de diámetro interno, tubería de Tygon y una celda de flujo de 18µL de volumen interno. La detección se llevó a cabo con un espectrofotómetro UV-Vis, Cary 3 de Varian.

También se utilizó un agitador magnético con temperatura controlada marca Thermo Scientific, una centrífuga Hettich EBA 20, baño de ultrasonido Branson 2510 y una balanza analítica Explorer Ohaus con precisión de 0.1mg.

Reactivos y disoluciones

Las disoluciones de extracción se prepararon a partir de

TERMINIX COMMERCIAL

Conoce Nuestros **Exclusivos Sistemas de Control:**

- FLY BARRIER
- RAPID FREEZE
- V-B DEFENSE SYSTEM
- FIVE STEP SYSTEM

Para obtener mayor información contacte al:
01-800-TERMINIX
www.terminix.com.mx

Nuestro negocio es **proteger al suyo**

SERVICIO CONVENIENTE

- Manejo integrado de plagas (MIP)
- Desinfección
- Control de insectos voladores
- Reubicación de aves
- Control de termitas (pre y postconstrucción)
- Tratamientos contra plagas de granos almacenados

Satisfacción **garantizada**

EXPERIENCIA Y CONOCIMIENTO

- Industria de Alimentos, Almacenes y Centros de Distribución
- Industria Química, Farmacéutica y Laboratorios
- Restaurantes
- Centros Comerciales, Tiendas de Autoservicio
- Hoteles y Moteles
- Instituciones Médicas
- Oficinas y Edificios
- Administradoras de Bienes Raíces, Casa-Habitación
- Escuelas, Iglesias e Instituciones Públicas

Trabajamos bajo protocolos de **AIB y la NPMA.**

TECNOLOGÍA

NaHCO₃ y Na₂CO₃, marca Baker. El pH se ajustó con NaOH (Baker).

Para la cuantificación de polifenoles se utilizó una dilución 1:10 del reactivo de Folin-Ciocalteu de Merck. La curva de calibración se preparó a partir de una disolución madre de 500µg/mL de ácido tánico (Sigma-Aldrich).

Preparación de las muestras

Se analizaron uvas rojas de mesa variedad "red globe" provenientes de Sonora, México.

Para el estudio de optimización, se molió la uva entera con una licuadora casera y se filtró. El bagazo se secó y se utilizó un gramo de éste para cada experimento. Una vez que se optimizó el método ultrasónico, se evaluó el contenido de polifenoles en la piel y las semillas.

MÉTODOS

Extracción de polifenoles en hollejo de uva

Para evaluar las características del método de extracción de polifenoles por ultrasonido, los resultados de éste se compararon con los obtenidos por agitación magnética sin aplicar ultrasonido. En todos los métodos de extracción, los extractos se centrifugaron por 20min a 4000rpm y se llevaron a un volumen final de 25mL para su cuantificación. En algunos casos, fue necesario hacer diluciones.

Extracción por agitación magnética (EAM): para este estudio, se evaluaron dos extractantes (bicarbonato de sodio 0.1moles/L y tampón de carbonatos 0.1moles/L) a diferentes temperaturas (25°C y 50°C) y tiempos de extracción (15min, 30min y 60min). Se utilizaron 20mL de extractante.

Extracción asistida por ultrasonido (EAUS): A un gramo de hollejo de uva se añadieron 20mL de tampón de carbonatos y se introdujo la sonda de ultrasonido 2cm por debajo del volumen máximo de extractante. Se aplicó ultrasonido con una amplitud de 120W durante 6min, con ciclos de 40s de irradiación y 20s de no irradiación.

Determinación de polifenoles

Para la cuantificación de polifenoles en los extractos provenientes de uva, se utilizó una configuración de análisis por inyección en flujo (FIA) que ha sido utilizada en varios artículos científicos [Celeste, M. et al., 1992; Cañiza-

res, M.P., Luque de Castro, M.D., 1996]. En la Figura 1 se muestra la configuración utilizada. Se inyectaron 100µL de los extractos, por medio de la válvula de inyección, dentro de un portador de agua para confluir primero con el reactivo de Folin-Ciocalteu (diluido 1:10) y después con un flujo de NaOH 0.1moles/L. A lo largo de un reactor de 100cm y 0.5mm de diámetro interno, se llevó a cabo la reducción del reactivo al complejo azul de molibdeno que se midió a 730nm. La curva de calibración se hizo con ácido tánico por ser el fenol mayoritario en uva. El intervalo lineal fue de 12mg/L a 150mg/L con una regresión lineal de 0.998 y una frecuencia de muestreo de 36 determinaciones por hora.

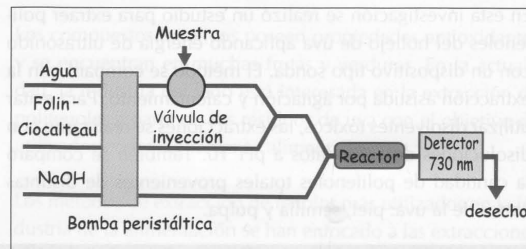


Figura 1. Configuración de análisis por inyección en flujo para determinar polifenoles totales en uva.

RESULTADOS

Con el objetivo de utilizar disolventes menos perjudiciales para el medio ambiente, se hizo el estudio de extracción de polifenoles utilizando disoluciones acuosas a un pH alcalino para favorecer la extracción de éstos.

Optimización de los procesos de extracción

EAM

Selección del extractante y condiciones de extracción

Se evaluó la extracción con agua destilada (pH cercano a 7), bicarbonato de sodio (pH cercano a 8) y un tampón de fosfatos (pH cercano a 10) a dos temperaturas: 25°C y 50°C. Los resultados mostraron que cuando se utiliza el buffer de carbonatos la concentración de polifenoles, aumenta un 30% con respecto al bicarbonato y un 70% en comparación con el agua. El aumento de la temperatura también favoreció la extracción de polifenoles aumentando un 30% cuando la extracción se hace a 50°C. Se evaluaron temperaturas mayores, pero se obtuvieron concentraciones menores por la oxidación de los compuestos extraídos. En la Figura 2 se muestran los resultados.

TECNOLOGÍA

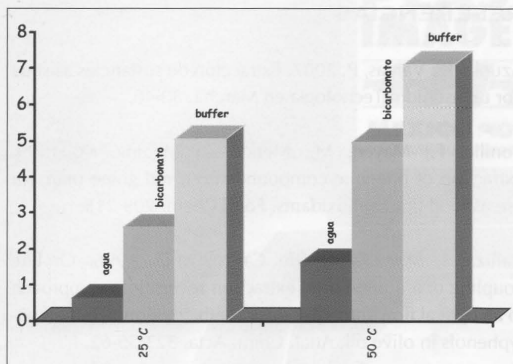


Figura 2. Comparación de extractantes utilizando EAM.

Para evaluar el mejor tiempo de extracción se utilizaron las condiciones óptimas de extracción: tampón de carbonatos pH 10 a 50°C. El tiempo de extracción se evaluó en un intervalo entre 10min y 60min. La concentración de polifenoles fue mayor al aumentar el tiempo de extracción, pero a partir de 30min ésta disminuyó, por lo que se seleccionó ésta como óptima.

EAUS

Para la extracción con ultrasonido se utilizó como extractante 20mL del tampón de carbonatos de pH 10. Los parámetros que se evaluaron fueron: amplitud y ciclos de irradiación y no irradiación.

Estudio de amplitud

Para la optimización de la amplitud, se hicieron pruebas previas a diferentes amplitudes para establecer el intervalo de estudio. Cuando se utilizaba una potencia superior a los 200W, el extracto que se obtenía era muy viscoso y de difícil manipulación; y con amplitudes inferiores a 100W, la concentración de polifenoles en los extractos era muy baja comparada con la EAM. Así, se decidió evaluar dos amplitudes: 125W y 200W a diferentes tiempos de extracción. En la Figura 3 se muestran los resultados obtenidos. Con una potencia de 200W se extrajo la máxima concentración de polifenoles a los 5 minutos, pero, después de este tiempo, la concentración disminuyó debido a la oxidación de los polifenoles por los ultrasonidos. Por otra parte, al aplicar 125W la concentración máxima de polifenoles fue a los 6 minutos de extracción, disminuyendo su valor después de este tiempo. Con una amplitud de 125W y 6 minutos de extracción, se extrae un 33% más de polifenoles que cuando se aplica el ultrasonido a 200W por 5 minutos.

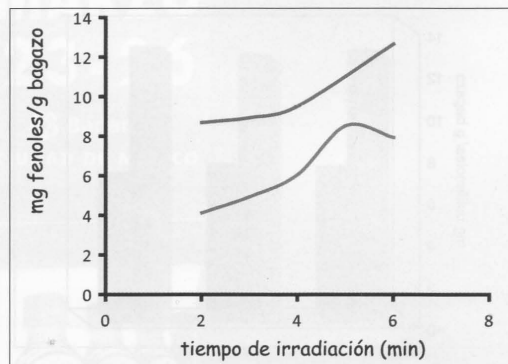


Figura 3. Estudio de la amplitud (W) y tiempo de irradiación de ultrasonidos para la extracción de polifenoles totales en uva. (-) 120W; (+) 200W.

Con las condiciones óptimas se evaluó también la extracción con metanol a diferentes proporciones, pero los resultados mostraron una disminución cercana al 80% en la concentración de polifenoles.

Evaluación de los ciclos de irradiación-no irradiación

La aplicación de ultrasonido en antioxidantes puede conducir a la oxidación de éstos debido a las vibraciones moleculares. Por esta razón, es necesario evaluar no sólo el tiempo de irradiación, sino intervalos de no irradiación. Se hizo un diseño factorial 2² y se encontraron las condiciones óptimas por medio de un estudio estadístico de ANOVA. Se evaluó un intervalo de irradiación de 20s a 60s y de no irradiación de 5s a 40s, de acuerdo a estudios preliminares. El diseño se realizó a las dos amplitudes seleccionadas: 125W y 200W. De acuerdo al estudio de ANOVA, el tiempo de descanso era importante para evitar la sobreexposición al ultrasonido, pero con descansos de no irradiación superiores a 20 segundos no hubo diferencia en la concentración cuantificada de polifenoles en los extractos.

Por lo tanto, las condiciones óptimas para extraer polifenoles de hollejo de uva fueron: amplitud 125W, ciclos de irradiación/no irradiación de 40s/20s y un tiempo de extracción de 6 minutos.

Comparación de los métodos de extracción

Los resultados mostraron que la eficiencia de extracción mejora al aplicar energía de ultrasonido: el contenido de polifenoles totales en el residuo de uva (hollejo) es un 44% mayor que cuando sólo hay agitación magnética y calentamiento, como se observa en la Figura 4.

TECNOLOGÍA

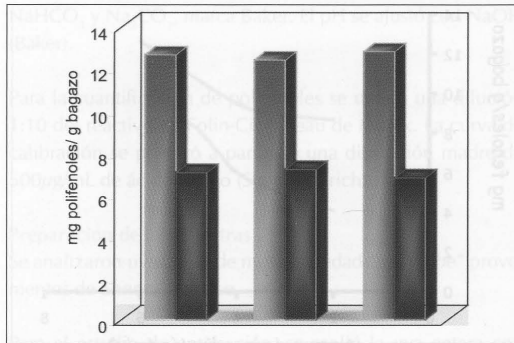


Figura 4. Concentración de polifenoles totales en extractos de residuos de uva (bagazo) obtenidos por EAM (■) y EAUS (▣).

La Figura 5 muestra los resultados obtenidos utilizando EAUS en diferentes partes de la uva. La semilla de uva es la que contiene mayor cantidad de polifenoles por gramo, mientras que la pulpa sólo contiene el 2% de este valor. También es importante el resultado obtenido para el hollejo, ya que la concentración de polifenoles encontrada es relativamente alta en comparación con la de piel (34% mayor), lo que demuestra la importancia de tratar estos residuos.

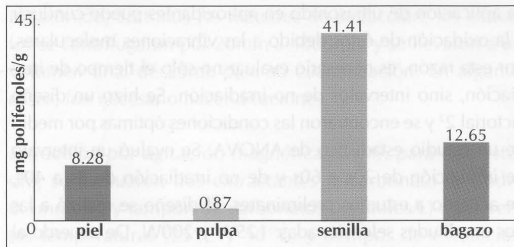


Figura 5. Concentración de polifenoles totales en diferentes partes de la uva, utilizando EAUS.

CONCLUSIONES

En este trabajo se comprueba que la energía de ultrasonido favorece los procesos de extracción en muestras sólidas. En este caso, la eficiencia de extracción aumentó en un 40% y el tiempo de análisis disminuyó de 30 minutos a tan sólo 6 minutos.

Los resultados muestran que la aplicación de ultrasonido en residuos de uva favorece la obtención de extractos con alto contenido de polifenoles, además de poder utilizar extractantes no tóxicos y de fácil manipulación.

REFERENCIAS

Azuola, R.; Vargas, P. 2007. Extracción de sustancias asistida por ultrasonido. *Tecnología en Marcha*. 30-40.

Bonilla, F.; Mayen, M.; Merida, J.; Medina, M. 1999. Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. *Food Chem.* 209-215.

Cañizares, M.P.; Luque de Castro, M.D. 1996. On-line coupling of a liquid-liquid extraction reversal flow approach to an optical flow-through sensor for the determination of polyphenols in olive oil. *Anal. Chim. Acta.* 323:55-62.

Celeste, M.; Tomás, C.; Cladera, A.; Estela, J.M.; Cerda, V. 1992. Enhanced automatic flow-injection determination of the total polyphenol index of wines using Folin-Ciocalteu reagent. *Anal. Chim. Acta.* 269:21-28.

Galati, G.; O'Brien, P.T. 2004. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Rad. Biol. and Med.* 37:287-303.

Hajimahmoodi, M.; Sadeghi, N.; Jannat, B.; Oveisi, M.R.; Madani, S.; Kiayi, M.; Akrami, M.R.; Ranjbar, A.M. 2008. Antioxidant activity, reducing power and total phenolic content of Iranian olive cultivar. *J. of Biol. Sci.* 8:779-783.

Herrera, M.C. y Luque de Castro, M.D. 2004. Ultrasound-assisted extraction for the analysis of phenolic compounds in strawberries. *Anal. Bioanal. Chem.* 1106-1112.

Novak, Ivana; Janeiro, Patricia; Seruga, Marijan; Oliveira-Brett, Ana Maria. 2008. Ultrasound extracted flavonoids from four varieties of Portuguese red grape skins determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal. Chim. Acta.* 630:107-115.

Rodríguez Montealegre, R.; Romero Peces, R.; Chacón Vozmediano, J.L.; Martínez Gascuña, J.; García Romero, E. 2006. Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *J. of Food Comp. and Anal.* 19:687-693.

Valdez-Flores, Claudia; Cañizares Macías, M.P. 2007. On line dilution and detection of vanillin in vanilla extracts obtained by ultrasound. *Food Chem.* 105:1201-1208.



ANEXO I

Límite de detección

Se define como la concentración del analito que proporciona una señal igual a la del blanco, y_B , más tres veces la desviación estándar del blanco, S_B , considerando que la probabilidad de este error es del 7%.

De acuerdo a los autores Miller & Miller (2002), es correcto utilizar el estadístico $S_{y/x}$ como una aproximación de la desviación estándar del blanco, S_B . El estadístico $S_{y/x}$ que estima los errores aleatorios en la dirección y , se calcula

como: $S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$ donde \hat{y}_i es el valor de absorbancia ajustada mediante

la ecuación de regresión y n es el número de puntos en la curva de calibración.

De igual manera, se puede sustituir la señal del blanco, y_B , como la ordenada al origen de la ecuación de regresión lineal.

Errores en la pendiente y en la ordenada al origen

Desviación estándar de la pendiente: $S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$

Desviación estándar de la ordenada al origen: $S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$

Comparación de dos medias experimentales

Para decidir si la diferencia entre dos medias muestrales es significativa se calcula

el estadístico t : $t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$, t tiene $n_1 + n_2 - 2$ grados de libertad.

S se calcula a partir de: $s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}$