

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES



TRABAJO FIN DE MASTER (*Practicum*)

MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL Y
AGROALIMENTARIA

**EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS
NATURALES DE INTERÉS INDUSTRIAL**

JULIO 2.015

Alumno: **JOSÉ LUIS TRILLO CONTRERAS**

Tutores:

EMILIO MOLINA GRIMA (UAL)

ANTONIO PALLARÉS BAYO (DERETIL)

ÍNDICE

1.	RESUMEN.....	3
2.	INTRODUCCIÓN	3
2.1.	<i>El estrés oxidativo</i>	3
2.2.	<i>Funciones biológicas de los Polifenoles</i>	4
2.3.	<i>Clasificación de los Polifenoles</i>	7
2.4.	<i>Fuentes naturales principales de Polifenoles</i>	9
2.5.	<i>Composición de la uva (Vitis vinífera)</i>	10
3.	OBJETIVOS	12
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	13
4.1.	<i>Materiales</i>	13
4.2.	<i>Métodos</i>	13
4.2.1.	Caracterización de la pepita de uva	13
4.2.2.	Extracción	15
4.2.2.1.	Extracción hidroalcohólica	15
4.2.2.2.	Extracción acuosa.....	16
4.2.3.	Separación sólido-líquido	16
4.2.4.	Purificación	17
4.2.4.1.	Purificación por fermentación	17
4.2.4.2.	Purificación mediante el uso de resinas.....	18
4.2.5.	Concentración y Desección	19
4.2.6.	Determinación del contenido en Polifenoles Totales	19
4.2.7.	HPLC.....	20
4.2.8.	Residuo Seco.....	21
4.2.9.	Método DPPH	21
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
5.1.	<i>Estudios de las extracciones de polifenoles</i>	23
5.1.1.	Estudios preliminares de solubilidad	23
5.1.2.	pH	24
5.1.3.	Temperatura	26
5.1.4.	Tiempo de extracción	27
5.1.5.	Estudios de diluciones crecientes de ratio harina de pepita de uva / agua (p/p)	29
5.2.	<i>Propuesta de receta para extracción acuosa con lavado de torta</i>	31
5.3.	<i>Purificación de los extractos acuosos</i>	32
5.3.1.	Fermentación de los azúcares reductores con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32
5.3.2.	Purificación mediante el empleo de resinas adsorbentes	34
5.3.3.	Ensayos de estabilidad de catequina en sólido y líquido	38
5.4.	<i>Comparativa de extractos y actividad antioxidante</i>	39
6.	CONCLUSIONES.....	41
7.	BIBLIOGRAFÍA	43

1. RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares suponen la principal causa de muerte en el mundo. Numerosos estudios han demostrado en los últimos años los efectos beneficiosos de la ingesta de Polifenoles sobre la salud, especialmente sobre el sistema cardiovascular, fundamentalmente debido a sus propiedades antioxidantes. Estos compuestos presentan efectos vasodilatadores, son capaces de mejorar el perfil lipídico en sangre y pueden atenuar el desarrollo y aparición de aterosclerosis al prevenir la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Además, presentan claros efectos antiinflamatorios y apoptóticos en el endotelio vascular.

En este trabajo se realiza, primeramente, una revisión de los polifenoles desde el punto de vista estructural, sus funciones biológicas y los distintos grupos de polifenoles que pueden formarse en los vegetales. A continuación, la metodología de estudio se centra en el desarrollo de un bioproceso de producción de Polifenoles a partir de la harina de pepita de uva (*Vitis vinífera*): extracción en agua, purificación de los mismos en columna de adsorción y estabilización del producto frente a la oxidación.

Estudios anteriores han versado sobre la extracción y purificación de estos mismos polifenoles de la harina de pepita de uva pero, empleando disolventes orgánicos para la etapa extractiva. En el presente trabajo, al hacer uso, únicamente de agua como líquido extractor, conseguimos un perfil polifenólico distinto, que a la postre resultó en un producto con un poder antioxidante 21% superior al obtenido de extractos hidroalcohólicos.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. El estrés oxidativo

Se ha estimado que aproximadamente un 2% del oxígeno consumido por un ser humano sano va a la formación de especies reactivas del oxígeno, muchas de las cuales

son radicales libres. Cuando la generación de estos radicales libres sobrepasa las barreras de defensa antioxidantes del organismo, se produce daño de las estructuras biológicas por lesión química, proceso al cual denominamos estrés oxidativo.

El daño oxidativo que estas especies reactivas pueden causar en las macromoléculas orgánicas son de fatal consecuencia al reaccionar con lípidos, proteínas, carbohidratos y DNA, tanto en el interior celular como con componentes extracelulares, por lo que pueden desencadenar un daño irreversible que si es muy extenso, puede llevar a la muerte celular [1]. Entre las numerosas patologías asociadas al estrés oxidativo están las dos principales causas de muerte en los países desarrollados: la arterioesclerosis y el cáncer, aunque otras patologías como las cataratas, la artritis reumatoide, la diabetes y la enfermedad de Alzheimer tienen como etiología también el estrés oxidativo.

El proceso biológico de envejecimiento se acelera en función de la magnitud del estrés oxidativo al que se vea sometido el organismo. Las defensas antioxidantes de los organismos aeróbicos son de tipo enzimático y no enzimático. La primera defensa antioxidante es intracelular y la constituyen las enzimas Superóxido Dismutasa, Catalasa, Glutación Peróxidasa y Hemo-Oxigenasa, entre otras. Los antioxidantes no enzimáticos extracelulares presentes en el suero sanguíneo son moléculas de bajo peso molecular como la Vitamina C, Vitamina E y Ácido úrico, además de otras sustancias presentes en menor concentración como β -carotenos, Bilirrubina, Ubiquinona y Glutación. Estas sustancias son capaces de atrapar especies reactivas del oxígeno, consumiéndose en este proceso. Los principales antioxidantes extracelulares son compuestos naturales que se ingieren en la dieta, como las Vitaminas A, E y C, o los Polifenoles [2].

2.2. Funciones biológicas de los Polifenoles

Efecto antioxidante

La capacidad de los polifenoles para actuar como antioxidantes depende de la presencia de grupos hidroxilos (-OH) en su estructura. Al estar unidos a un anillo bencénico, los grupos hidroxilos confieren al polifenol la habilidad para actuar, ya sea como donante de un átomo de hidrógeno, Hydrogen Atom Transfer (HAT) o como

donante de un electrón, Singel Electron Transfer (SET) a un radical libre (u otras especies reactivas).

En el caso en particular de los Polifenoles de tipo flavonoides, pueden, además, actuar como antioxidantes a través de un mecanismo que involucra su habilidad para reaccionar con ciertos metales de transición (Cu, Fe). Tal reacción evita la formación de los radicales libres hidroxilo (a partir de peróxido de hidrógeno en la reacción de Fenton) y superóxido (a partir de oxígeno molecular) que, de otra manera, catalizarían ambos metales al estar en su estado libre y reducido (es decir, redox-activos). Por tanto, los flavonoides que exhiben en el anillo B de su estructura hidroxilos catecólicos, promueven además un efecto antioxidante a través del mencionado mecanismo de quelatación de especies metálicas (**Figura 5**) [3].

Efecto vasodilatador

La homeostasis vascular se consigue gracias a una adecuada producción y biodisponibilidad del NO (Óxido Nítrico). Este mediador juega un papel fundamental en la regulación del tono vascular. Varios estudios realizados en anillos de aorta o en arterias mesentéricas de ratas han revelado que el efecto vasodilatador de los flavonoides, se debe principalmente a la producción de óxido nítrico en el endotelio y al aumento del guanosín-monofosfato cíclico (GMP_c).

Efecto antilipémico y antiaterogénico

Una de las propiedades beneficiosas más estudiadas de los polifenoles es su capacidad para mejorar el perfil lipídico. De este modo, pueden prevenir el desarrollo y aparición de aterosclerosis. Esta enfermedad se caracteriza principalmente por la progresiva obstrucción de las arterias como consecuencia de la acumulación de lípidos en la pared del endotelio vascular. Estos compuestos son capaces de atenuar el inicio y la progresión de esta enfermedad debido a su habilidad para dificultar la oxidación de las LDL. Son capaces, además, de producir un incremento en la concentración de colesterol HDL en el plasma, y también de inhibir la migración y proliferación de macrófagos al endotelio vascular, impidiendo así, el consecuente proceso inflamatorio vascular [4].

Efecto antitrombótico y antiinflamatorio

La agregación plaquetaria también juega un papel fundamental en el desarrollo de la aterosclerosis, y el efecto antiagregante puede asociarse con una menor incidencia y prevalencia de la enfermedad cardiovascular. El efecto antitrombotico de los polifenoles puede justificarse en base a su capacidad para inhibir enzimas implicadas en la síntesis de eicosanoides, como el tromboxano A₂ (TXA₂), la ciclooxigenasa (COX), y la lipooxigenasa (LPO). Estos compuestos inhiben, por lo tanto, la síntesis de moléculas derivadas del ácido araquidónico que están directamente involucradas en la regulación de la homeostasis vascular. Además, algunos polifenoles como la quercetina y el resveratrol poseen propiedades antiinflamatorias, y pueden modular e inhibir la actividad de la COX y la LPO, implicadas en la liberación de mediadores inflamatorios, tales como interleuquinas y prostaglandinas, en pacientes con alto riesgo de enfermedad cardiovascular [5].

Efecto antitumoral

Actualmente se sabe que existe una asociación entre la incidencia de cáncer y la dieta, al describirse la posible relación fisiopatológica entre el cáncer y la peroxidación lipídica, por lo que impedir este proceso mediante el uso de antioxidantes, como los polifenoles, podría ser fundamental en la prevención de diferentes tipos de tumores malignos. Además, los antioxidantes de los polifenoles, pueden inducir la apoptosis de algunas células neoplásicas y actuar como coadyuvantes de los agentes quimioterápicos [6].

Muchos de los mecanismos moleculares sobre los que actúan los polifenoles todavía están por dilucidar. Son muchos los polifenoles y muchas sus dianas potenciales. Además, se debe tener en cuenta que los mecanismos que un polifenol active pueden no ser los mismos si es administrado individualmente o si lo hace formando parte de una mezcla compleja de distintos polifenoles.

2.3. Clasificación de los Polifenoles

Desde un punto de vista estructural, los compuestos fenólicos pueden clasificarse en fenoles simples (**Figura 1**) y polifenoles (**Figura 2**). Estos últimos se caracterizan por tener uno o más grupos fenoles, y se dividen a su vez en xantonas, estilbenos, antraquinonas, lignanos (y polímeros de estos) y los flavonoides.

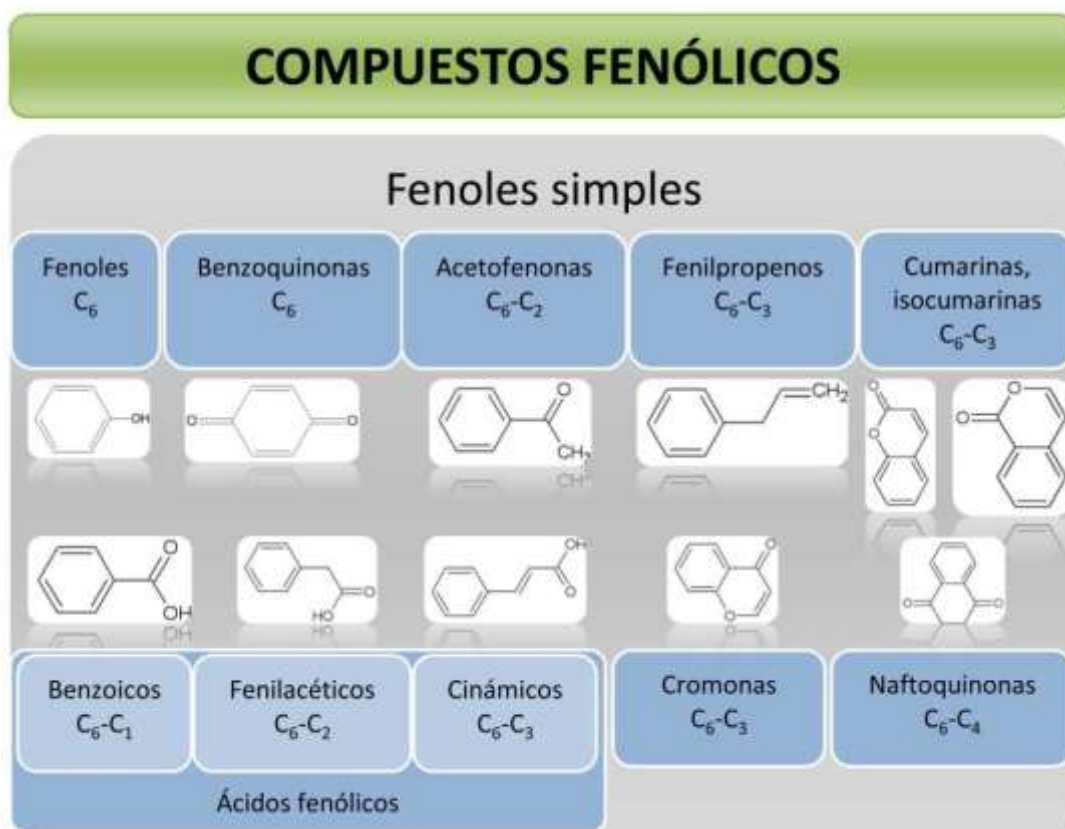


Figura 1. Tipos de Compuestos Fenólicos, clasificados según su estructura: **Fenoles Simples**

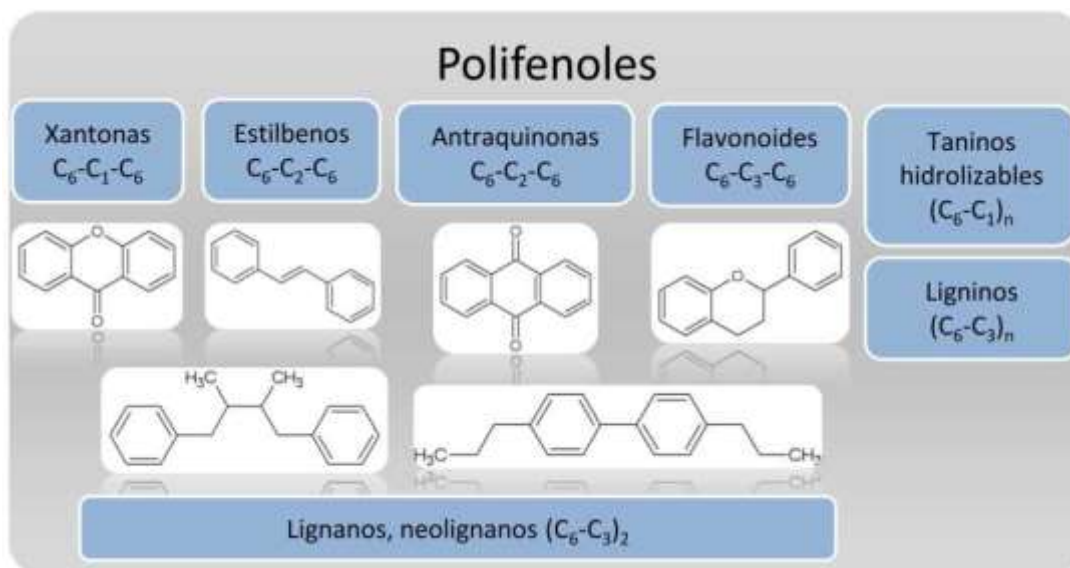


Figura 2. Tipos de Compuestos Fenólicos, clasificados según su estructura: **Polifenoles**

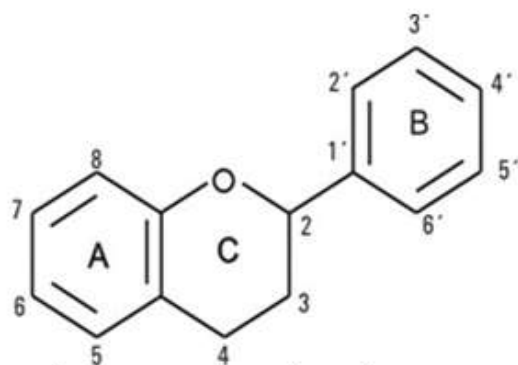


Figura 3. Estructura química de Compuesto Fenólico: Flavonoide

La biosíntesis de los flavonoides como producto del metabolismo secundario de las plantas tiene lugar a través de dos importantes rutas primarias: la ruta del ácido shikímico y la ruta de los poliacetatos. Los flavonoides son los compuestos polifenólicos más abundantes en las plantas y casi todos

son considerados pigmentos, y abarcan todo el espectro de la luz visible y ultravioleta. Se caracterizan por una estructura benzo- γ -pirona (C₆-C₃-C₆) que permite la sustitución en diversas posiciones de diferentes grupos funcionales como hidroxilos, metoxilos u O-glucósidos (Figura 3), lo que explica las más de 8.000 estructuras caracterizadas hasta la fecha, y que se pueden clasificar como flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianinas y flavanoles (Figura 4).

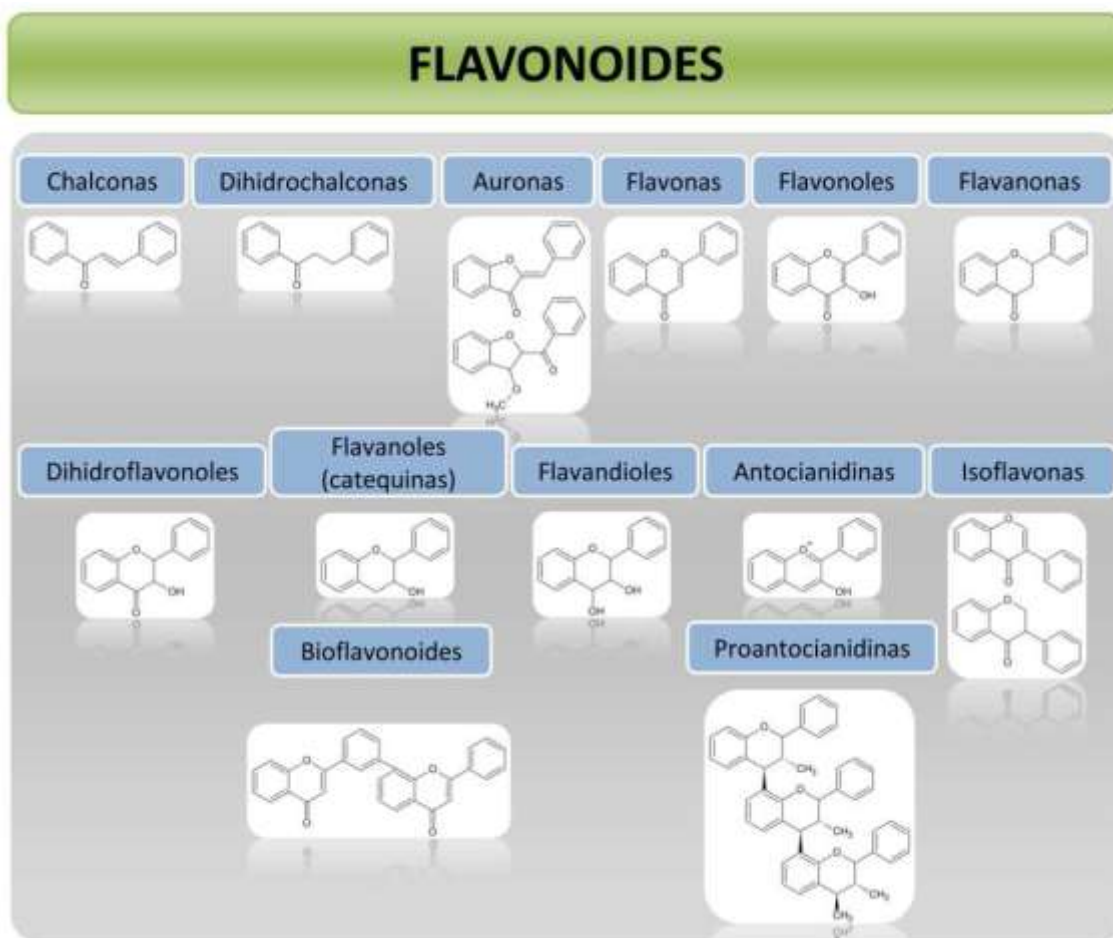


Figura 4. Clasificación estructural de los Compuestos Polifenólicos de tipo Flavonoides

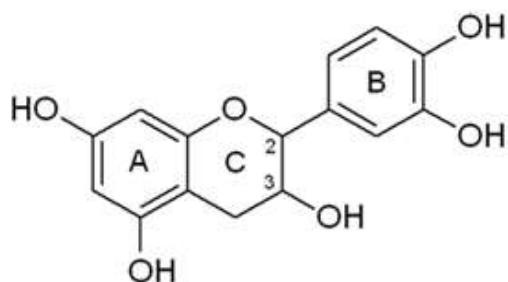


Figura 5. Estructura química de Compuesto Polifenólico: Flavanoles

Los flavanoles poseen el anillo C saturado y un grupo hidroxilo en el carbono C-3 (**Figura 5**). Pueden aparecer como monómeros o como polímeros con distintos grados de polimerización. Los flavanoles más representativos en los alimentos son de tipo flavan-3-ol, y estos

pueden aparecer como monómeros (catequinas), como dímeros condensados entre sí, y como oligómeros (procianidinas), o bien pueden aparecer como polímeros (proantocianidinas o taninos condensados). La catequina ha mostrado ser un antioxidante más potente aún que el ácido ascórbico (vitamina C), la Vitamina E o los carotenoides [7].

2.4. Fuentes naturales principales de Polifenoles

El contenido cualitativo y cuantitativo de polifenoles es diferente en cada especie vegetal. Entre las plantas con alto contenido en polifenoles se encuentran el cacao (*Theobroma cacao*), la uva (*Vitis vinifera*), el té (*Camelia sinensis*), la manzana (*Malus domestica*) y diversas bayas (**Tabla 1**). Así pues, las fuentes mayoritarias de polifenoles en la dieta humana son principalmente las frutas, el té, el vino y el chocolate. En el cacao, los flavanoles están principalmente en forma de epicatequinas, catequinas y procianidinas. El vino es rico en catequinas y procianidinas, y en el té los flavanoles se encuentran fundamentalmente como derivados de galatos (galocatequina, epigalocatequina y galato de epigalocatequina, principalmente) [8].

Tabla 1. Fuentes mayoritarias de polifenoles en la dieta humana. Los principales polifenoles presentes en la uva son de tipo flavonoides: antocianinas, flavanoles, flavandioles y taninos.

Fuentes principales de Polifenoles en la naturaleza	
Compuestos Polifenólicos	Fuente vegetal
Ácidos Fenólicos	
Ácidos Hidroxicinámicos	Albaricoques, arándanos, zanahorias, cereales, peras, cerezas, cítricos, oleaginosas, melocotones, ciruelas, espinacas, tomates, berenjenas
Ácidos Hidroxibenzóicos	Arándanos, cereales, oleaginosas
Flavonoides	
Antocianinas	Arándanos, grosellas, cerezas, cerezas amargas, fresas, uvas
Chalconas	Manzanas
Flavanoles	Manzanas, arándanos, uvas , cebolla, lechuga
Flavandioles	Uvas
Flavanonas	Cítricos
Flavonoles	Manzanas, judías, arándanos, alforfón, cerezas, endibia, puerros, lechugas, cebollas, olivas, pimientos, tomates
Flavonas	Cítricos, apio, perejil, espinacas
Isoflavonas	Soja
Xantonas	Mango
Taninos	
Condensados	Manzanas, uvas , melocotones, ciruelas, mangos, peras
Hidrolizables	Granadas, frambuesas

2.5. Composición de la uva (*Vitis vinifera*)

En la estructura de la uva se pueden distinguir dos partes claramente diferenciadas: las semillas y el pericarpo, o conjunto de tejidos que las envuelve (**Figura 6**). En el pericarpo pueden distinguirse tres tipos de tejidos, organizados concéntricamente alrededor de las semillas: el endocarpo, más interno, y con una textura más gelatinosa; el mesocarpo, intermedio, y que ocupa el mayor volumen de la baya; y el exocarpo, el más externo, y que contiene la epidermis, recubierta por una cutícula cerosa y algunas capas celulares subepidérmicas [9].

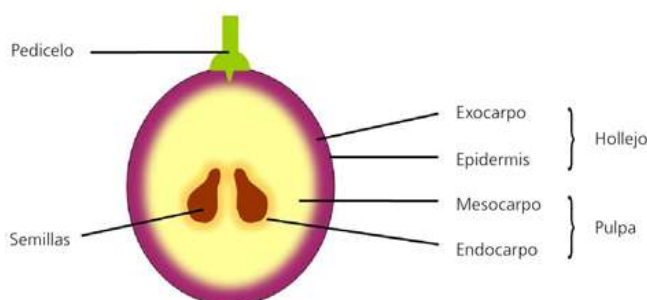
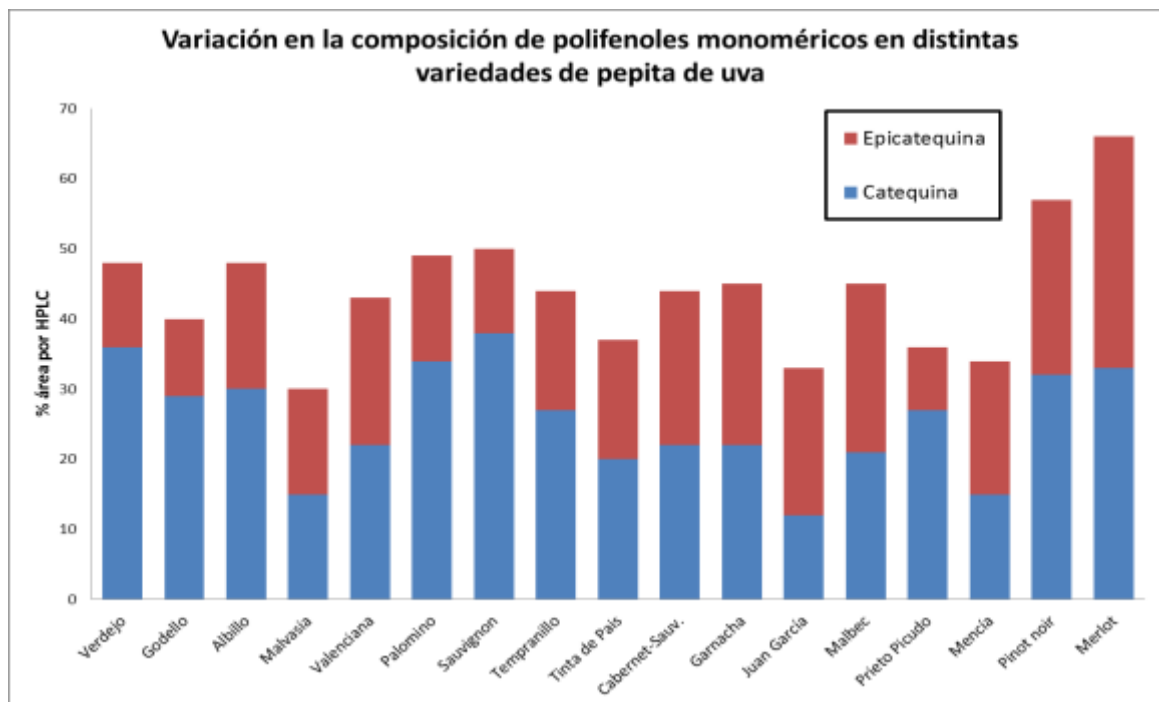


Figura 6. Esquema de las estructuras tisulares de un fruto de uva (corte transversal)

Los diferentes tejidos que forman el fruto presentan, cada uno, una composición química diferente. Además de esta diferenciación en la composición según el tipo de tejido analizado, podemos encontrar la misma variación en los mismos compartimentos según la variedad o especie de uva que se trate, lo cual hace que la determinación de la composición química resulte difícil y costosa (**Gráfica 1**). Es por ello que se hace una simplificación para expresar los parámetros clásicos de humedad, fibra, cenizas, proteínas, grasas y carbohidratos (**Tabla 2**).

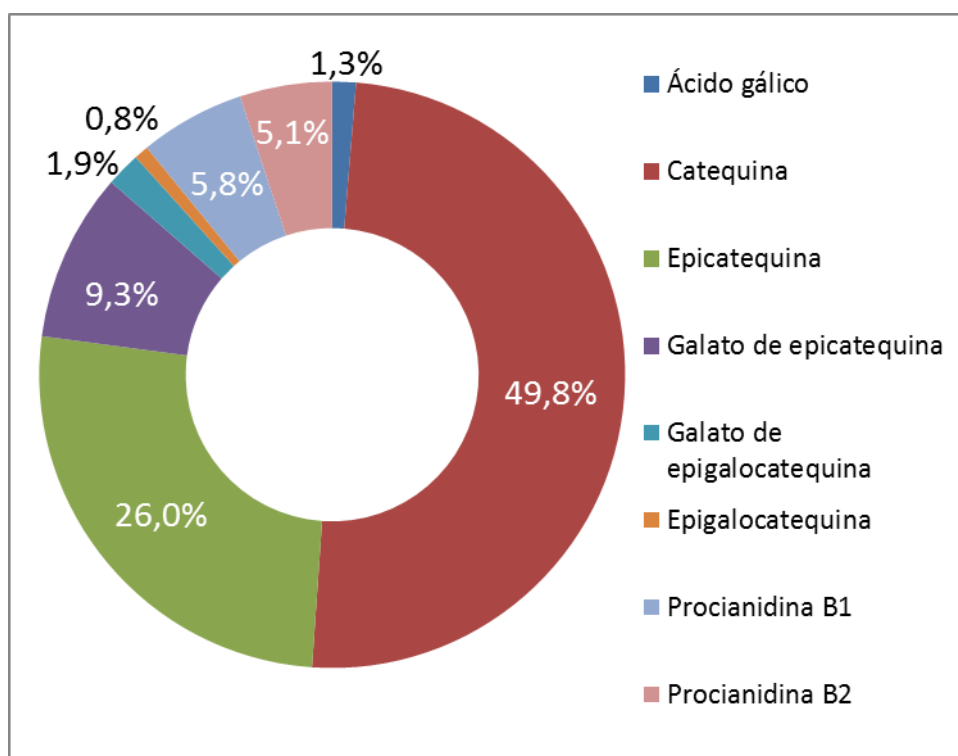


Gráfica 1. Composición en catequina y epicatequina para distintas variedades de pepita de uva, cuantificados por integración de la señal correspondiente para cada especie en HPLC [10]

Tabla 2. Composición química y de los minerales presentes en un promedio de distintas variedades de semillas de uva, expresadas sobre peso seco. [11] [12]

Componente (g./100g. peso seco)		Minerales	
Humedad	7,33	Calcio (Ca)	0,44
Proteína	8,49	Magnesio (Mg)	0,13
Grasa	8,16	Sodio (Na)	0,04
Ceniza	7,00	Potasio (K)	1,40
Carbohidratos	29,2	Hierro (Fe)	0,03
Fibra cruda	46,1	Manganeso (Mn)	0,82
Fibra soluble	9,76	Fósforo (P)	0,18
Fibra insoluble	36,4	Azufre (S)	0,09
Calorías totales (Kcal/100g.)	224	Zinc (Zn)	0,98
Contenido Polifenólico	8,39		

No sólo es de interés determinar la composición global de la semilla de uva, sino también la concentración en los principales polifenoles presentes (**Gráfica 2**).



Gráfica 2. Especies Polifenolicas mayoritarias en distintas variedades de pepita de uva (g./100g. polifenoles totales) [13]

3. OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo ha consistido en desarrollar un método para la extracción y purificación de los Polifenoles a partir de la harina de pepita de uva (*Vitis vinifera*) en agua, de manera que se evite el empleo de otros disolventes, y obtención de un producto “*solvent free*”. Para ello, partimos de unos antecedentes de extracción hidroalcohólica que ya se han trabajado en Deretil Vitatech, y vamos a basar nuestro estudio de extracción en los mismos parámetros ensayados: pH, Temp., tiempo de extracción, ratio sólido-líquido.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

Todos los ensayos se han realizado con harina de pepita de uva tinta ecológica (*Vitis vinifera*), prensada en frío, molida y deshidratada, procedente de Explotaciones Hnos. Delgado (Ciudad Real, España) con un contenido medio de polifenoles totales EAG (Equivalentes de Ácido Gálico) de 6-8%, y de 0,5-0,4% y 0,25-0,20% en Catequinas y Epicatequinas, respectivamente.

Todos los reactivos empleados han sido de alta pureza (grado analítico). Los disolventes utilizados fueron agua descalcificada procedente de ósmosis y etanol industrial, para la caracterización de la harina de pepita de uva, extracción acuosa e hidroalcohólica y para la purificación en columna. Además, se empleó Ácido Sulfúrico industrial del 98% para el ajuste a pH=1. Para la purificación de los polifenoles en columna se utilizó la resina de adsorción del tipo Amberlite. Para el resto de pruebas analíticas se ha empleado agua purificada desionizada (18 mS/cm) producida por una unidad Milli-Q (Millipore, Merck Millipore, Alemania).

4.2. Métodos

4.2.1. Caracterización de la pepita de uva

La caracterización de la harina de la pepita de uva para determinar la composición promedio de dicha harina, se realizó conforme a la receta para la extracción hidroalcohólica de polifenoles desarrollado por Deretil Vitatech: Se prepararon muestras con una proporción de materia prima/disolvente de 1:5. El disolvente empleado es una mezcla de Etanol y agua acidificada con Ácido Sulfúrico hasta un pH de 1, siendo la proporción Etanol/Agua 1:1 (p/p). La disolución resultante se mantiene en agitación a temperatura ambiente (22-25°C aproximadamente), durante 4 horas. Transcurridas las 4 horas en agitación, la disolución se centrifuga para separar la parte sólida (la harina de pepita de uva en suspensión) de la líquida. Las condiciones de centrifugación son 7.000 rpm durante 10min. a 20-25°C. Durante todo

el proceso de extracción y centrifugación, la disolución se mantiene en atmósfera inerte con N₂ para preservarlo de la oxidación por el oxígeno ambiental (**Figura 7**).

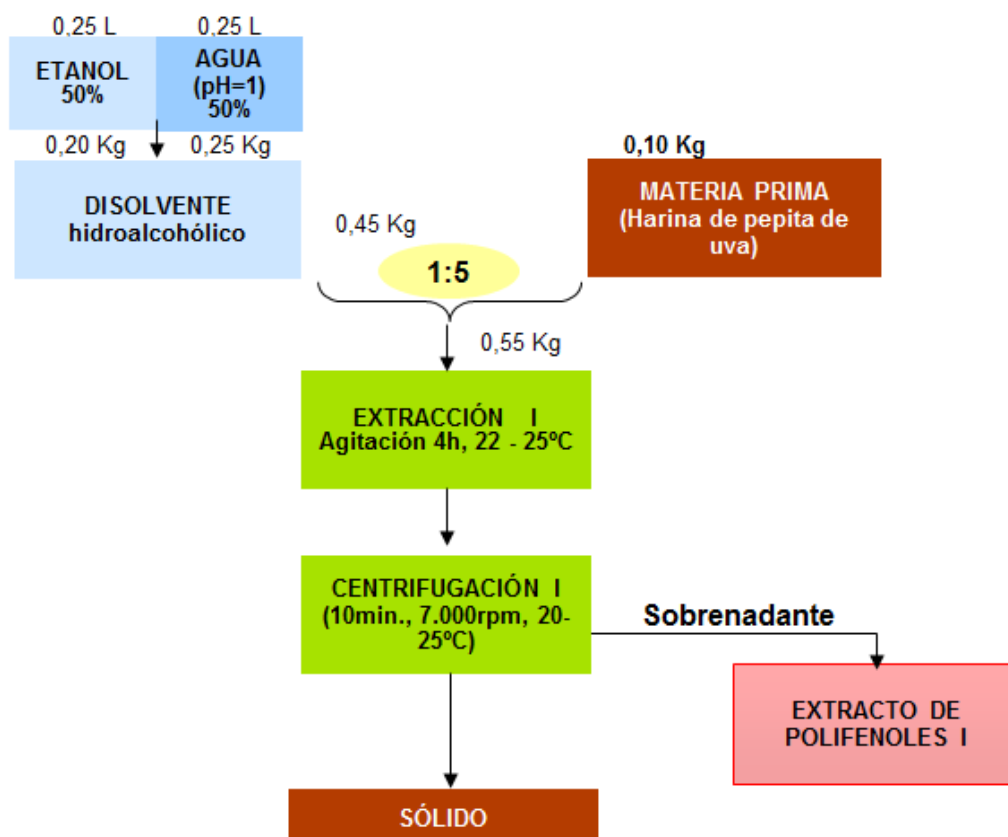


Figura 7. Diagrama de flujo del proceso de caracterización de la harina de pepita de uva. La figura muestra la primera etapa de extracción y centrifugación de un total de tres para lograr una extracción del 100% del contenido polifenólico en la harina de pepita de uva.

Concluida la centrifugación, se recoge el sobrenadante líquido, que contendrá los polifenoles y otros compuestos extraídos, y se incorpora disolvente fresco al sedimento para realizar dos extracciones más en las mismas condiciones. Se tiene asumido, tanto por bibliografía [14],[15] como experimentalmente [16], que tres extracciones hidroalcohólicas en estas condiciones son suficientes para extraer el 100% de los polifenoles presentes en la harina de pepita de uva.

Una vez se han recogido los sobrenadantes de las tres extracciones hidroalcohólicas, se juntan, se pesan y se analizan por HPLC [17], Folin-Ciocalteu [18] y se les hace una pérdida por secado. El contenido total de Polifenoles totales EAG [18], catequinas y epicatequinas se determinan por balance de masas. El resultado se puede ver en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Contenido total en Polifenoles (g./100g. de harina de pepita de uva) obtenido de la caracterización de la harina por balance de masas.

Polifenoles Totales EAG (g./100g. de harina de Pepita de Uva)	Catequina (g./100g. de harina de Pepita de Uva)	Epicatequina (g./100g. de harina de Pepita de Uva)
7,20%	0,43%	0,20%

4.2.2. Extracción

El objetivo del trabajo es la extracción de los polifenoles de la pepita de uva en agua y su purificación. La extracción sólido-líquido se puede definir como un fenómeno de transporte de materia en el cual, los solutos contenidos en una matriz sólida pasan a la fase líquida mediante contacto íntimo del disolvente con dicha matriz. Uno de los factores más importantes es la transferencia de materia de los compuestos de interés a la matriz líquida, la cual está muy influenciada por los siguientes parámetros: temperatura, ratio sólido-líquido, tamaño de partícula, pH, tiempo de agitación, parámetros que hemos estudiado previamente en la extracción hidroalcohólica y que hemos aplicado a la extracción acuosa.

4.2.2.1. Extracción hidroalcohólica

La extracción hidroalcohólica de la harina de la pepita de uva que tuvo lugar fue para la caracterización de esta, por lo que sucedió bajo las mismas condiciones que para el ensayo de caracterización:

- Ratio 1:5 de materia prima/disolvente hidroalcohólico (EtOH/Agua 1:1, p/p).
- pH=1
- Tiempo de extracción de 4 horas
- Temperatura: 25°C.

Las extracciones tuvieron lugar en matraz de vidrio, y se mantuvo en agitador orbital a temperatura ambiente (22-25°C) durante el tiempo estipulado. Del mismo

modo que en la caracterización, la disolución se mantuvo siempre en atmósfera inerte con N₂.

4.2.2.2. Extracción acuosa

La extracción acuosa de la harina de la pepita de uva se ensayó bajo varias condiciones de temperatura, ratio sólido-líquido, pH y tiempo de extracción para mejorar el rendimiento de extracción hasta encontrar el óptimo.

Las extracciones tuvieron lugar en matraz de fondo redondo provisto de tres bocas esmeriladas, agitación mecánica, calentado en manta calefactora estándar a 100°C (oscilación térmica de $\pm 2^\circ\text{C}$). Finalizado el proceso, los extractos se han refrigerado hasta una temperatura aproximada de 20°C. Al igual que antes, la disolución se mantuvo siempre en atmósfera de N₂.

4.2.3. Separación sólido-líquido

Inicialmente se probó la separación de los sólidos en suspensión del líquido mediante filtración a vacío con papel de filtro de 46 μm . de tamaño de poro, aproximadamente, y un gramaje de 80-120 g/m². Debido a la casi nula filtrabilidad de la muestra, se decidió hacer dicha etapa de separación mediante centrifugación (Sorvall® RC-5C Plus, Thermo Scientific, EEUU) a 7.000 rpm durante 10 minutos, manteniendo una temperatura de 20-25°C.

Tras la centrifugación, se recuperó el sobrenadante procedente de la extracción. Dado que el sedimento retiene parte del líquido de extracción, se realiza un lavado del sólido con el mismo disolvente extractor para recuperar, prácticamente, la totalidad de los componentes disueltos en el líquido. Tras el lavado y centrifugación, se descarta el sedimento, recogiendo el nuevo sobrenadante que será llevado, junto con el anterior, a purificación.

4.2.4. Purificación

4.2.4.1. Purificación por fermentación

La fermentación de los extractos de harina de pepita de uva se planteó como una forma simple y económica de purificación, eliminando gran parte del residuo seco presente en los extractos acuosos en forma de azúcares fermentables, para así lograr mejorar el resultado de pureza sin requerir el paso por columna de adsorción ni el uso de disolventes orgánicos (Etanol) para la elución de los polifenoles, es decir, lograr un proceso “solvent free”. Para determinar el efecto del proceso fermentativo sobre este aspecto, y si resulta viable implantarlo, se realizaron estudios previos de fermentación en distintas condiciones. Para ello, se realizó una extracción acuosa, bajo las condiciones ya establecidas (100°C; pH=4,5; Ratio 1:10; 30min. de extracción), se centrifugó, y el sobrenadante se dividió en cuatro alícuotas para cuatro ensayos distintos. La primera alícuota se inoculó con un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* (Levadura comercial, Levital) para una concentración de biomasa de 1,7g./L., y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. En la segunda alícuota se duplicó la concentración de biomasa en el extracto, hasta 3,3g./L, y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La tercera y cuarta alícuota se diluyeron a la mitad para comprobar si existía inhibición del crecimiento microbiano por una excesiva presencia de Polifenoles en el medio, y se inocularon con 1,7g./L de biomasa; además, la tercera alícuota llevaba suplemento de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La biomasa para inoculación se activó y adaptó previamente al medio en presencia de Polifenoles a 35°C durante 30min. Todas las alícuotas con los inóculos se mantuvieron en atmósfera de N_2 , para impedir la multiplicación del microorganismo, y fomentar la fermentación. Se fueron tomando muestras durante el desarrollo del proceso para analizar la presencia y evolución del Residuo seco, y la variación de los Polifenoles Totales EAG, y catequinas y epicatequinas al inicio y al final del proceso.

4.2.4.2. Purificación mediante el uso de resinas

Cargado y lavado de la columna

Un extracto acuoso centrifugado se hace pasar por una columna de adsorción, a un **ratio de 40mL. resina / g. Polifenoles**, a un **caudal de 4,4mL. / min** [19]. El volumen de líquido muerto que permanece en el sistema se puede calcular como el 40% del volumen que ocupa la resina más el volumen de conducción en el circuito.

Una vez retenidos los Polifenoles en la resina, se lava la columna con varios volúmenes muertos de agua para eliminar impurezas que son, generalmente, de naturaleza más polar que los polifenoles, azúcares, sales minerales, ácido orgánicos, entre otros, siendo eluidos con agua (reducción del residuo seco). El número de volúmenes muertos de lavado se determinó tras analizar la evolución del residuo seco y comprobar que el agua no elimina más residuo seco tras 4-5 volúmenes muertos.

Elución de los Polifenoles

Considerando el sistema como una extracción sólido-líquido, la capacidad de retención y de elución va a depender de la naturaleza de la resina y la polaridad del disolvente, es decir, del coeficiente de reparto entre la fase líquida y la fase sólida. El éxito de la desorción vendrá dado por la polaridad del eluyente. Debido a la naturaleza apolar de los compuestos de interés, será necesario modificar la polaridad del agua por adición de disolvente orgánico.

El disolvente orgánico escogido para esta etapa fue el etanol, lo cual se justifica al tratarse de un aditivo alimentario, comúnmente empleado como disolvente o conservante de otros aditivos, como colorantes, saborizantes y antioxidantes, de productos alimentarios, cosméticos, farmacéuticos, etc [20].

La desorción de la columna tuvo lugar mediante elución isocrática, en gradiente, para mejorar la eficiencia de la separación. Al variar la relación de etanol/agua en los disolventes de elución, se varía la polaridad, permitiendo separar fracciones, según el interés de los compuestos presentes en ellos. Al aumentar la

concentración de etanol, la competencia entre el disolvente y la resina por los polifenoles es mayor. Los compuestos más polares se eluirán para soluciones más diluidas en etanol. Los polifenoles de interés, en cambio, eluirán para soluciones de etanol más concentradas. Además, el empleo de un gradiente de elución tiene también, por interés, acondicionar progresivamente a la resina a la presencia del disolvente, ya que la elución con etanol provoca un incremento de volumen de la resina próximo al 25% de su volumen, así como la formación de burbujas, con tendencia a romper el frente de elución y crear caminos preferenciales. Por ello, se empleó un gradiente creciente de etanol hasta alcanzar el 72% (p/p). Las fracciones de elución se llevaron a analizar mediante HPLC, Folin-Ciocalteu y se les hace una pérdida por secado para determinar el rendimiento de purificación y el balance de materia durante el proceso.

4.2.5. Concentración y Desección

Tras purificar la muestra de polifenoles, el objetivo es eliminar cualquier traza de disolvente presente en el purificado y llevarlo hasta estado sólido, ya que permite mejorar la estabilidad del producto y ahorrar costes por recuperación de reactivos (EtOH). Para ello, la fracción recuperada de la purificación que presenta la totalidad de los polifenoles es llevada a destilación mediante Rotavapor Hei-VAP (Heidolph Instruments, Alemania) para recuperar, en primer lugar, el Etanol a 51°C y 175 mbar de presión de vacío. Una vez hayamos retirado este del sistema, aumentamos el vacío hasta 72 mbar para proceder a eliminar el agua. Al término de esta etapa, eliminamos el resto del agua mediante desecador a vacío a 70°C durante 24 horas. El producto seco queda como un sólido rojo que se desprende y recoge fácilmente sin necesidad de adicionar coadyuvante de la solidificación.

4.2.6. Determinación del contenido en Polifenoles Totales

Las muestras fueron analizadas espectrofotométricamente para determinar el contenido fenólico total por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. Dicho método se basa en la reducción en medio alcalino de una mezcla formada por ácido

fosfotúngstico ($H_3W_{12}O_{40}$) y ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) por acción de fenoles, dando como resultado óxidos azules de Tungsteno (W_8O_{23}) y Molibdeno (Mo_8O_{23}). Para ello se realizó una dilución 1:10 (p/p) entre la muestra extracto y etanol/agua a pH 1. A continuación se adicionaron 20 μ L de dicha dilución a una cubeta, seguidos de 2mL de agua destilada, 140 μ L de reactivo Folin-Ciocalteu y 480 μ L de una disolución de bicarbonato sódico al 20%. La mezcla se mantuvo en reposo durante una hora a oscuridad y temperatura ambiente; transcurrido el tiempo se añadieron 1,35 mL de agua destilada. La absorbancia de las muestras fue medida a 765 nm usando un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1603, Japón) por triplicado. Se preparó un blanco de la misma forma pero sin muestra. El ácido gálico es un ácido fenólico natural que en virtud de su alta solubilidad en agua, bajo costo y amplia disponibilidad comercial, permite su empleo como estándar en las curvas de comparación del ensayo de Polifenoles totales (PFT). La concentración de fenoles totales se expresa como mg de Equivalentes de Ácido Gálico (EAG) por unidad de peso usando la ecuación $y=1615.765*Abs + 1.79839$ [21].

4.2.7. HPLC

El análisis de cromatografía líquida se realizó en un sistema de HPLC Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EEUU) acoplado a una bomba cuaternaria, toma de muestras automática (autosampler), degasificador y detector UV. La separación y cuantificación de los polifenoles tuvo lugar en una columna analítica YMC Pack Pro C18 (150 mm x 4,6 mm, tamaño de partícula de 5 μ m, tamaño de poro de 120Å). La fase móvil para elución consistió en buffer fosfato 0,1% y acetonitrilo conforme al siguiente gradiente: 0-2 min., gradiente isocrático 80:20; 2-20min., gradiente lineal 5:95; 20-30min., isocrático 5:95, con un flujo de 1 mL/min y medición a una longitud de onda de 279 nm. Los volúmenes de inyección fueron 10 μ L. Todos los solventes y muestras fueron filtradas mediante un filtro de 0,22 μ m (Millipore, Merck Millipore, Alemania) antes del análisis por HPCL.

La identificación y cuantificación de los polifenoles presentes en las muestras se obtuvo por comparación de los espectros UV, áreas y tiempos de retención de los

picos respecto al patrón standard Mix de Polifenoles elaborado por el Departamento de Análisis de Deretil Vitatech.

4.2.8. Residuo Seco

El término Residuo Seco se aplica a la materia restante tras la evaporación del agua de una muestra y su secado a una temperatura determinada. El residuo total incluye al “residuo no filtrable”, que es el que queda retenido al filtrar la muestra, y al “residuo filtrable”, que es el que atraviesa el filtro. Estos dos términos se corresponden con el de sólidos o residuos en “suspensión” y “disueltos”, respectivamente.

La determinación del residuo seco a 105°C se efectuó por el método gravimétrico después de la evaporación y desecación de la muestra. Una cantidad conocida y homogeneizada de muestra (5-10 g.) es evaporada y secada hasta peso constante a 105°C, como incremento de tara. Para el cálculo del Residuo Seco total a 105°C se sigue la **Ecuación 1**.

$$\%Residuo\ Seco = \frac{(R - T) * 100}{M}$$

R = peso del crisol con el residuo seco en mg.

T = tara del crisol vacío en mg.

M = peso de la muestra utilizada en mg.

Ecuación 1. Cálculo del Residuo Seco por el método gravimétrico por diferencia de peso a 105°C

4.2.9. Método DPPH

Se determinó la capacidad antioxidante de las muestras de Polifenoles mediante un método basado en la estabilidad del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), debido a la deslocalización del electrón desapareado, que le otorga una coloración violeta característica a 517 nm de absorción, en solución etanólica. Cuando

una disolución de DPPH entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno o con otra especie radical (R•) se produce la forma reducida DPPH-H ó DPPH-R con la consecuente pérdida del color y, por lo tanto, la pérdida de la absorbancia. La cuantificación de esta pérdida de absorbancia nos sirve como herramienta para medir *in vitro* el porcentaje de inhibición de radicales libres.

La disolución de DPPH se debe elaborar en metanol al 80% (mezcla metanol:agua 80:20) para una concentración final de $1,26 \times 10^{-4}M$. Una vez preparada, se deja, mínimo una hora antes de su uso, a temperatura ambiente y en oscuridad para que se active el radical. Esta disolución es viable durante 48 horas. Justo antes de su uso se mide la absorbancia a 517 nm para obtener el valor A_0 . Del mismo modo, la muestra rica en Polifenoles a evaluar se lleva a una concentración de 320 ppm con metanol al 80%. Para el inicio del ensayo, se mezclan la disolución DPPH y la disolución de la muestra a evaluar según una proporción 39:1 [22]. Una vez realizada la mezcla, dejamos en oscuridad durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se da la siguiente reacción de inhibición del radical DPPH:

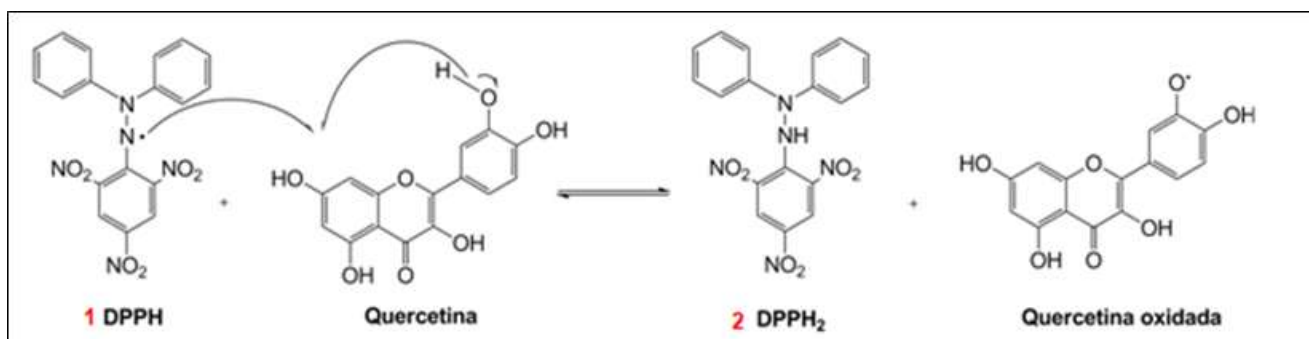


Figura 8. Mecanismo de la reacción de inhibición del radical DPPH por presencia de grupos -OH en compuestos polifenólicos, debido a su capacidad para actuar como donador de átomos de Hidrógeno (Hydrogen Atom Transfer, HAT).

Tras 15 minutos de incubación se mide la absorbancia final (A_f). Para el cálculo del porcentaje de inhibición de radicales libres se emplea la **Ecuación 2**.

$$\% \text{ inhibición de radicales libres} = \frac{(A_0 - A_f)}{A_0} \cdot 100$$

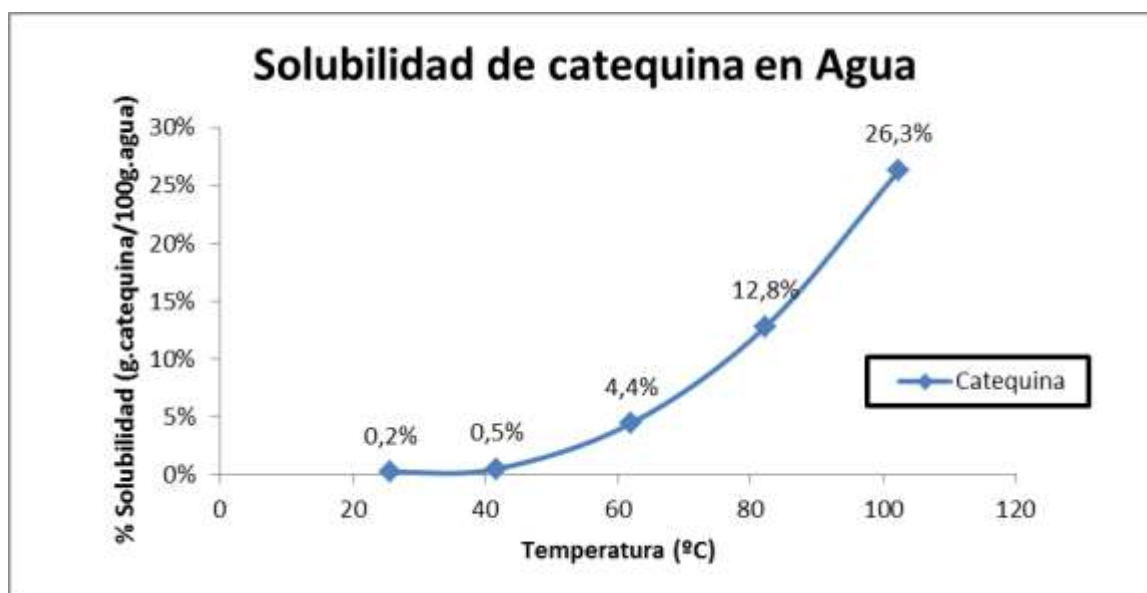
Ecuación 2. Expresión para el cálculo del porcentaje de inhibición de radicales libres mediante el método DPPH

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Estudios de las extracciones de polifenoles

5.1.1. Estudios preliminares de solubilidad

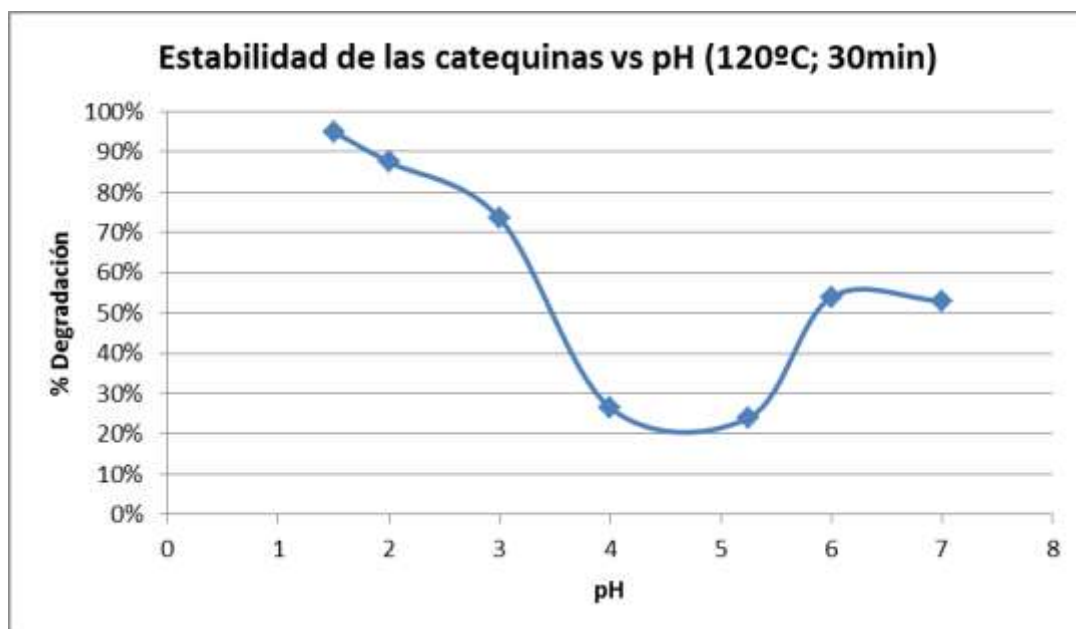
Inicialmente, vamos a establecer unas condiciones de trabajo en las cuales sabemos que toda la catequina presente en la harina de pepita de uva va a solubilizarse a temperatura ambiente. Necesitamos conocer la mínima cantidad agua necesaria para solubilizarlo por completo, y que nuestros siguientes ensayos de extracción no se vean limitados por falta de solubilidad. Las limitaciones que podemos encontrarnos son de tipo técnico: tener la mínima cantidad de agua para poder trabajar con una adecuada agitación (relación entre la cantidad de harina y de agua (ratio) de 1:5, que ya es bastante baja); que en las condiciones de trabajo establecidas no tengamos pérdida de catequinas por precipitación al enfriar. La Gráfica 3 de solubilidad nos permitió conocer dicho dato. El criterio de trabajo en los siguientes ensayos será para ratio 1:10 de harina de pepita de uva / agua (p/p), asegurándonos que nos estaremos limitados por falta de solubilidad [23] [24] [25].



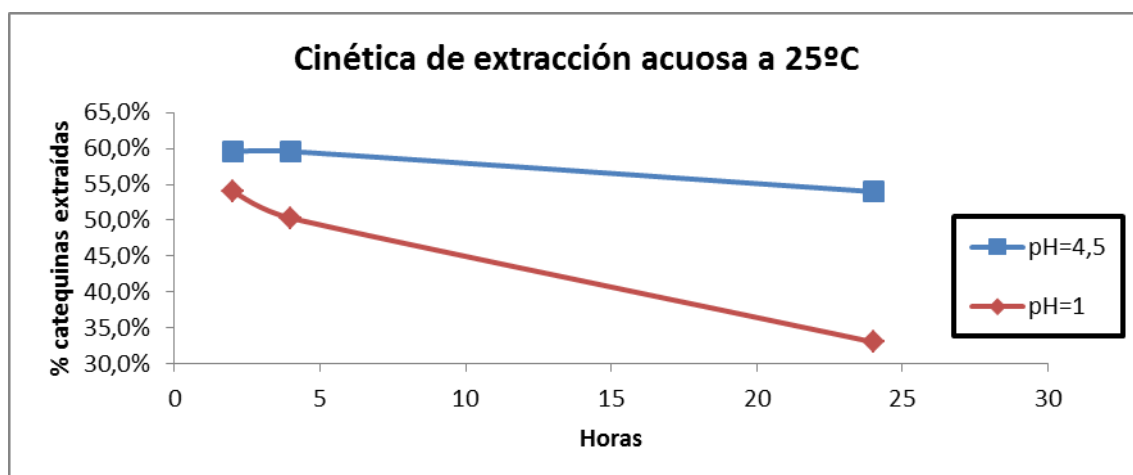
Gráfica 3. Estudio de solubilidad de la catequina en agua para distintas temperaturas expresado como g. catequina / 100g. agua

5.1.2. pH

Sabemos, tanto por bibliografía [26] como por antecedentes experimentales, de la importancia del pH en la extracción de los polifenoles, dado que el pH ácido se hace necesario para romper las interacciones proteína-polifenoles [27] [28] [29], facilita la extracción de polifenoles por la formación de sales de antocianidinas, y por su implicación directa en la estabilidad de algunos compuestos polifenólicos, principalmente de las catequinas y epicatequinas (**Gráfica 4**). Las catequinas siguen una cinética de degradación pH-dependiente, donde el pico de estabilidad del sistema se alcanza para un rango de pH entre 4 y 5,2. Para valores por debajo de pH=4 no se observa variación en los datos de Polifenoles Totales pero sí desaparición de catequinas/epicatequinas por polimerización que no tiene lugar a través de los grupos fenólicos, mientras que para $\text{pH} \geq 6$ sí observamos una caída de Polifenoles Totales por Folin-Ciocalteu por degradación oxidativa. Los datos de estabilidad para estos compuestos muestran que se degradan con suma facilidad cuando se mantienen en condiciones de pH alcalino, llegando a ser degradados por completo a las pocas horas. Por este motivo, los estudios realizados para fijar las condiciones de pH con las que vamos a trabajar han sido en medio ácido: $\text{pH}=1$ y $\text{pH}=4,5$ (**Gráfica 5** y **Gráfica 6**).

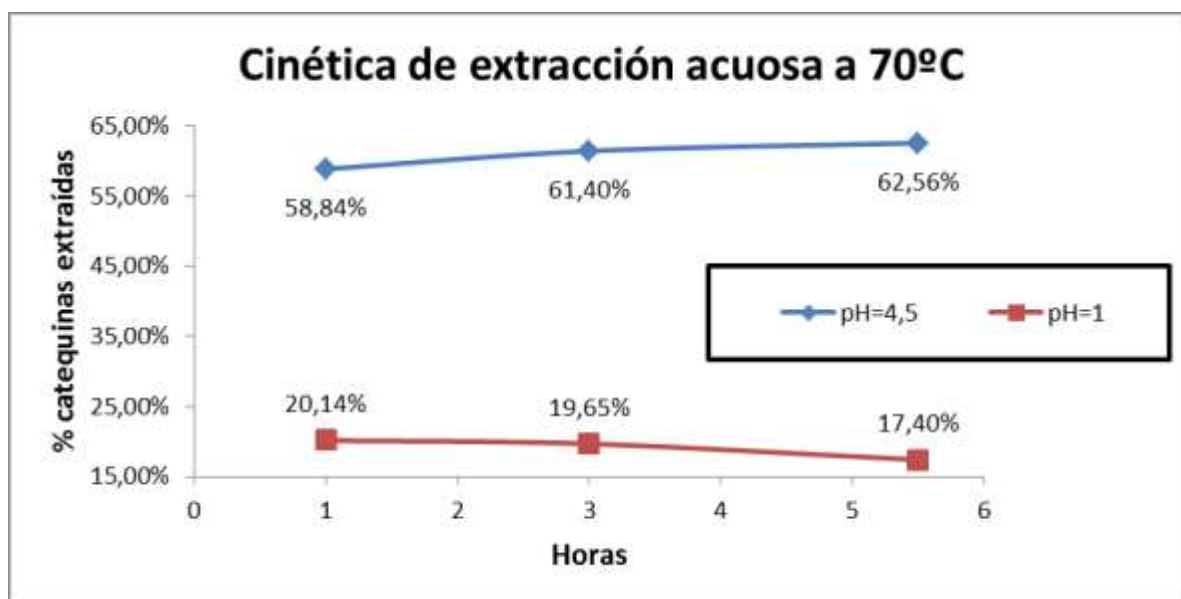


Gráfica 4. Estabilidad de las catequinas vs pH. Ensayo realizado a 120°C y 30min. de extracción [30].



Gráfica 5: Rendimientos obtenidos tras la extracción sin disolventes alcohólicos a distintos pH. Temperatura 25°C; ratio 1:10 (p/p) duración 24h. El % de catequinas extraídas se expresa como g.catequinas extraídas / g. totales de catequinas presentes en la harina.

La **Gráfica 5** muestra que las catequinas caen, casi inmediatamente, a pH=1 por polimerización. En la **Gráfica 6** queremos ver el comportamiento de estas en combinación con elevadas temperaturas.



Gráfica 6: Rendimientos de extracción de catequina, obtenidos tras extracción sin disolventes alcohólicos a distintos pH. Temperatura 70°C; ratio 1:10 (p/p); duración 5h. y media. El % de catequinas extraídas se expresa como g.catequinas extraídas / g. totales de catequinas presentes en la harina.

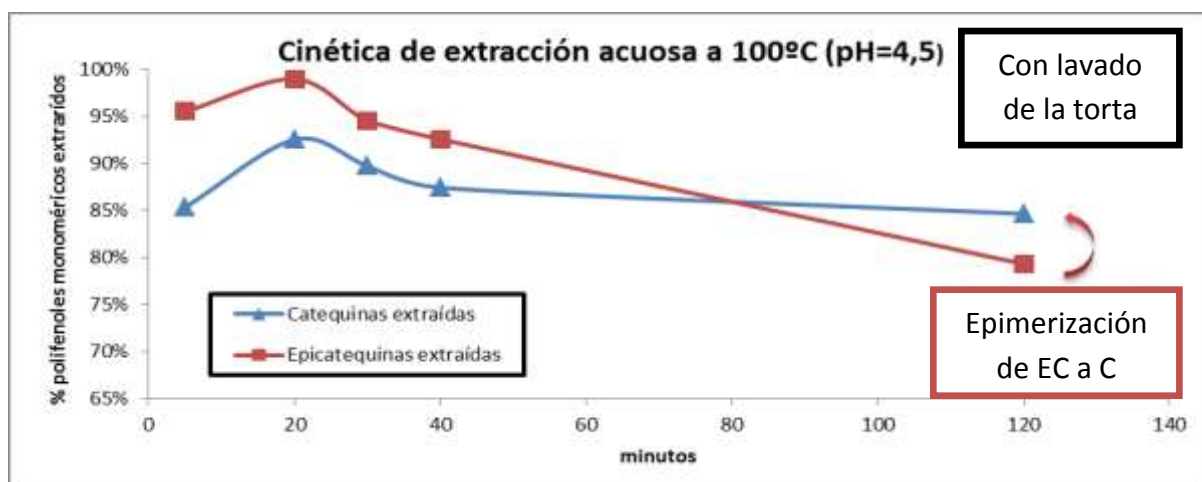
Vemos que, a la hora, a 70°C, caen mucho las catequinas a pH=1 comparado con pH=4,5. Es fácilmente atribuible este efecto a pH=1 a la más que probable polimerización de monómeros polifenólicos (catequinas) para dar lugar a oligómeros, ya que en las condiciones de experimentación se favorece este fenómeno (temperatura elevada y pH ácido) [31] [32]. Con estos datos podemos pensar que no

sólo es mejor el proceso de extracción para un pH más elevado, sino que además ganamos en estabilidad de los polifenoles monoméricos (catequinas). La temperatura es muy crítica en combinación con el pH, por eso elegimos trabajar con pH=4,5 como el óptimo [33] [34] [35].

5.1.3. Temperatura

No obstante, a la luz de los resultados anteriores, el rendimiento de extracción sigue siendo bajo, ya que más de un 40% de las catequinas permanecen sin extraer a pH=4,5. La polimerización y degradación de estas, aunque posible, no justificarían un descenso tan grande, ya que la experimentación tiene lugar en atmósfera inerte (ausencia de O₂) para prevenir la degradación de los polifenoles por oxidación [36] [37]; tampoco podría justificarse por una falta de solubilidad, como ya se vio en los datos de la **Gráfica 3**.

Vamos a probar otras temperaturas con el fin de mejorar el rendimiento de extracción, ya que la extracción de catequinas sigue una cinética temperatura-dependiente, donde a medida que se aumenta la temperatura, se mejora la extracción de compuestos polifenólicos [38]; sin embargo, también se acelera la cinética de degradación de las catequinas [39] [26], por lo que habrá que encontrar un punto de consenso entre mejora de la extracción y menor pérdida de catequinas por degradación [40].



Gráfica 7: Cinética de extracción de catequinas y epicatequinas en medio acuoso a pH=4,5, con lavado de la torta. (100°C; 2 horas; ratio 1:10).

La extracción para temperaturas de 100°C para tiempos muy cortos [41] [42] parece mostrar que las catequinas se mantienen relativamente estables (**Gráfica 7**): siguen degradándose, por propia inestabilidad térmica del producto, pero no parece existir una caída tan acusada, y esto se debe a la epimerización de epicatequinas hacia catequinas [43] [44]. Esta reacción de isomerización está desplazada siempre hacia la forma trans- (catequina), y la presencia de elevadas temperaturas acelera dicha epimerización [45] [46], estableciéndose un equilibrio entre degradación y conversión en el isómero trans-.

5.1.4. Tiempo de extracción

La **Gráfica 7** representa el ensayo de una cinética de extracción rápida (2 horas) donde vemos un pico máximo de rendimiento de extracción a un tiempo muy corto, entre 20-30 minutos, y que va decayendo para tiempos superiores a la hora hasta estabilizarse en una pendiente descendente muy suave, similar a un comportamiento asintótico [47] [48]. Los rendimientos de extracción para dicho ensayo se reflejan en la **Tabla 4**, y muestra que los mejores resultados para un proceso de extracción en medio acuoso son para tiempos muy cortos (20-30 minutos). Nos decantamos por un tiempo de extracción de 30 minutos.

Tabla 4: Rendimiento de extracción en medio acuoso vs tiempo (100°C; pH=4,5; ratio 1:10).

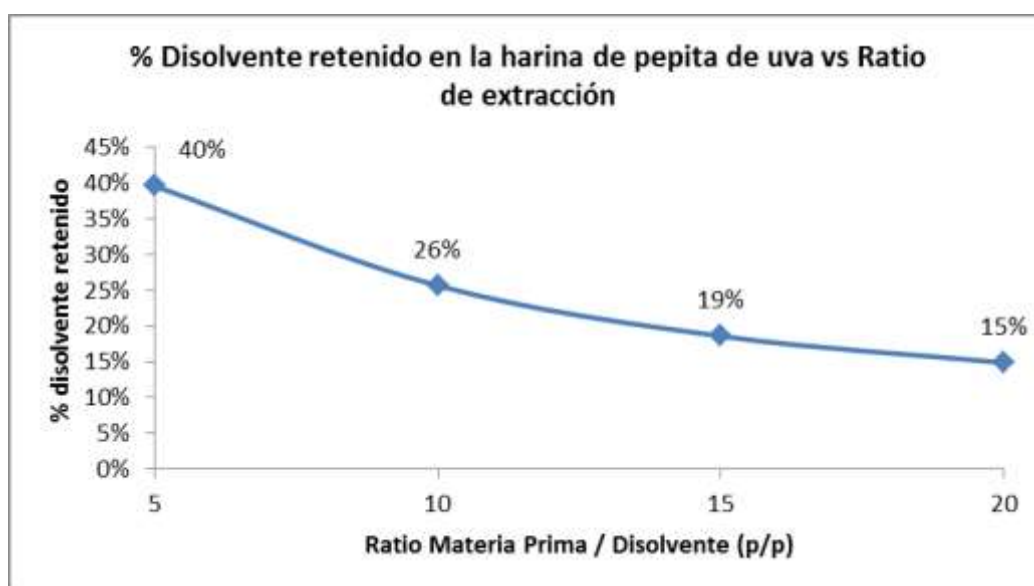
Minutos a reflujo	Rendimiento de extracción
5	85%
20	93%
30	90%
40	87%
120	85%

Con la optimización de todos estos datos para la extracción de Polifenoles en agua tenemos el siguiente rendimiento de extracción para catequinas y Polifenoles Totales EAG:

Tabla 5. Rendimientos de extracción para catequinas y Polifenoles Totales con lavado de la torta tras centrifugación, bajo condiciones óptimas ensayadas: 100°C; pH=4,5; Ratio 1:10; 30min. de extracción.

Ratio de extracción (p/p)	pH	Temperatura de extracción	Minutos a reflujo	Rendimiento de extracción de catequinas (con lavado de la torta)	Rendimiento de extracción de Polifenoles Totales
1:10	4,5	100°C	30	90%	35%

Hemos visto en la **Tabla 5** que el ratio 1:10 de materia prima/disolvente (p/p) para la extracción a 100°C en medio acuoso y pH=4,5 es suficiente para la solubilización de la práctica totalidad de las catequinas y epicatequinas (80-90% tras lavado de la pepita de uva), en cambio, el rendimiento de extracción para Polifenoles es muy bajo (entre el 25-35% del total de la pepita de uva). La extracción de muchos de estos compuestos polifenólicos entraña mayor dificultad debido a que presentan una solubilidad muy baja en solución acuosa, y por el porcentaje de aguas madre que queda en la torta. Por ello planteamos dos posibles alternativas para la mejora del rendimiento de extracción: aumentar la dilución empleada en la extracción acuosa (**Gráfica 8**); a mayores diluciones, menor porcentaje de aguas madre con producto quedan retenidos en la harina.



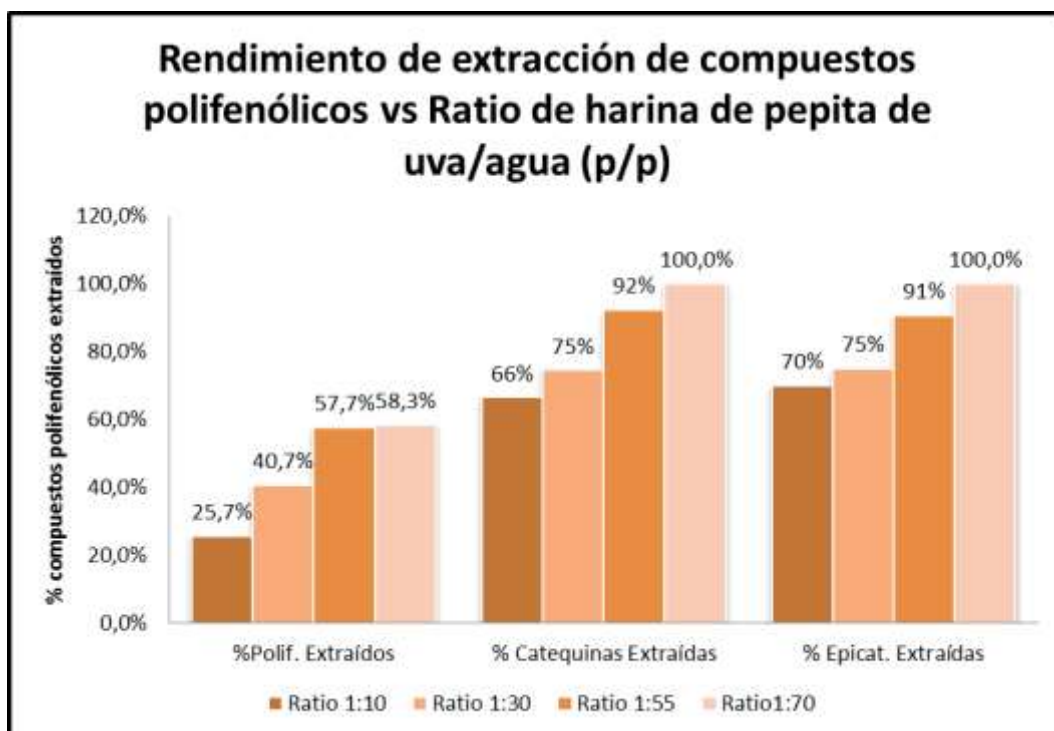
Gráfica 8. Porcentaje de aguas madre con producto que quedan retenidos en la harina de pepita de uva, a diluciones crecientes. Fuente: Deretil Vitatech.

Tabla 6. Rendimiento de extracción en medio acuoso de los compuestos de interés, con y sin lavado de la harina de pepita de uva, bajo condiciones óptimas ensayadas: 100°C; pH=4,5; Ratio 1:10; 30min. de extracción.

	Rendimiento PF Extraídos	Rendimiento Catequinas Extraídas	Rendimiento Epicatequinas Extraídas
Sin lavado	25,7%	66,5%	70,0%
Con lavado	34,7%	89,8%	94,6%

La otra opción es el lavado de la torta (**Tabla 6**). La harina de pepita de uva retiene hasta 3 veces su peso en agua. El lavado de la torta obligaría a recoger todo el sólido, resuspender y centrifugar, ¿qué es mejor en términos de productividad?. Esta cuestión nos conduce a realizar estudios de diluciones crecientes.

5.1.5. Estudios de diluciones crecientes de ratio harina de pepita de uva / agua (p/p)



Gráfica 9: Rendimientos de extracción de compuestos polifenólicos en medio acuoso vs distintos ratios materia prima / disolvente acuoso (p/p). (100°C; pH=4,5; 30 min. de extracción).

Con diluciones crecientes vemos que se logra mejorar la extracción de catequinas y epicatequinas hasta valores del 100% de estos compuestos presentes en la harina de pepita de uva (**Gráfica 9**). Los polifenoles totales también mejoran sus rendimientos de extracción, aunque no tanto, hasta casi un 60%, y parece que se estabilizan para ratios superiores a 1:50. Debe ser porque hasta ese ratio hemos logrado solubilizar todos los compuestos más solubles, mientras que los polifenoles que quedan sin extraer son compuestos de más alto peso molecular, más apolares, de gran tamaño y estructura más compleja, y serían necesarias cantidades de disolvente mucho mayores. Como ejemplo tenemos la Rutina, un glucósido polifenólico de tipo flavonoide (**Figura 9**) que presenta una solubilidad de 12,5-13 mg. en 100mL., es decir, para la solubilización de 1g. de Rutina harían falta 7.700mL. de agua.

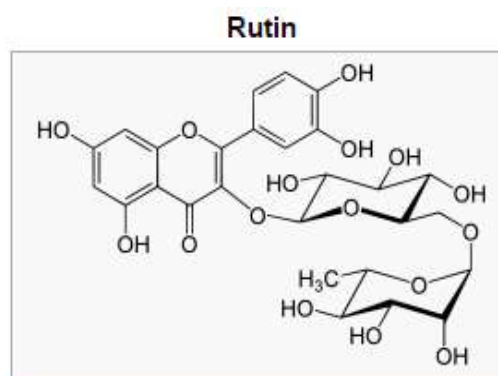


Figura 9. Estructura molecular de la Rutina

En base a los criterios de solubilidad de estos Polifenoles de mayor peso molecular y/o apolares, sería necesario establecer ratios de 1:500 – 1:600 para permitir extraer la práctica totalidad de los compuestos polifenólicos (haciendo equivalencia, suponemos que la totalidad de los Polifenoles existentes en la harina de pepita de uva son glucósidos de la Rutina, y tendríamos como máximo 7,2g. de Rutina en 100g. de pepita de uva. Haciendo cálculos, necesitaríamos 55.000mL. de agua para solubilizar los 7,2g. de Rutina presentes en 100g. de pepita de uva, lo que supondría un Ratio de extracción de 1:550)

La búsqueda de la dilución óptima debe estar consensuada con la viabilidad del proceso, ya que una alta relación de materia prima/agua (p/p), aunque permite aumentar el rendimiento de extracción, genera un gran volumen de reacción que posteriormente requerirá ser reducido durante una etapa adicional de evaporación, con el consiguiente coste energético, de tiempo y personal. No obstante, se descartó utilizar extractos tan diluidos, pese a los buenos datos de rendimiento, por el problema

que supone trabajar con grandes volúmenes. Se prefiere trabajar a un ratio menor, que también logra muy buenos resultados de extracción: ratios entre 1:10 y 1:30.

5.2. Propuesta de protocolo para extracción acuosa con lavado de torta

Con todos estos datos podemos proponer una receta para la obtención de los Polifenoles de la harina de pepita de uva mediante extracción en agua, con lavado de torta:

- Cargar 100g. de agua a temperatura ambiente y añadir 10g. de harina de pepita de uva. Desplazar el aire con N₂
- Calentar la suspensión anterior hasta reflujo y mantener a esta temperatura durante 30min.
- Enfriar la suspensión hasta temperatura ambiente.
- Una vez enfriado, centrifugar a 7.000 rpm durante 10min. Tras separar el líquido, lavar el sedimento con 30g. de agua (la harina de pepita de uva retiene hasta 3 veces su peso en agua). Volver a centrifugar en las mismas condiciones y juntar ambos sobrenadantes y analizar RS, Folin y HPLC.

En base a este protocolo, obtenemos los resultados de rendimiento de extracción y pureza (respecto residuo seco) para el extracto acuoso, que aparecen reflejados en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Rendimiento de extracción en agua para polifenoles de la harina de pepita de uva, según la receta propuesta, y su pureza, respecto residuo seco.

	PF EAG	Catequinas	Epicatequinas
Rendimiento de extracción con lavado	34,7%	89,8%	94,6%
Pureza (respecto residuo seco)	16,1%	2,5%	1,2%

5.3. Purificación de los extractos acuosos

Para mejorar los datos de pureza mostrados en la **Tabla 7** para la extracción acuosa de los Polifenoles de la harina de pepita de uva, tenemos dos alternativas:

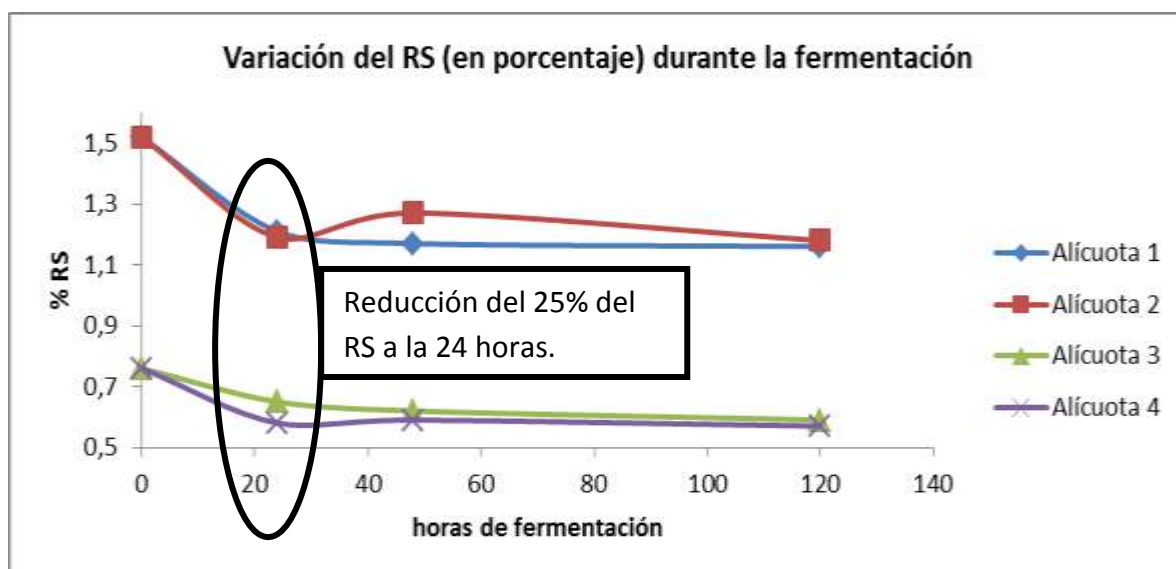
- Degradación de los azúcares reductores mediante fermentación con levadura.
- Empleo de resinas de adsorción.

5.3.1. Fermentación de los azúcares reductores con *Saccharomyces cerevisiae*

Tabla 8. Composición de algunos de los principales carbohidratos presentes en un promedio de distintas variedades de pepita de uva, expresadas sobre peso seco [12] [49].

Azúcares (g./100g. peso seco)	
Arabinosa	0,70
Fructosa	8,91
Glucosa	7,95
Manosa	0,61
Pectina	3,92
Ramnosa	1,70

La harina de pepita de uva contiene azúcares, de los cuales, una gran proporción son fermentables (**Tabla 8**). Los datos muestran que existe una considerable caída del residuo seco en todos los ensayos, del 25% para las primeras 24 horas de fermentación (**Gráfica 10**), y sin mostrar diferencia aparente por la existencia una mayor concentración de biomasa, o mayor dilución del medio de fermentación, o presencia o ausencia de Sulfato amónico. Esta caída inicial en el residuo seco se corresponde con un aumento en la pureza de las especies de interés, pero para tiempos mayores existe una destrucción de monómeros de catequina y epicatequina que no justificaría la implantación de este proceso. El aumento de pureza a las 24 horas de fermentación contrasta con la caída de esta para las 120 horas, eliminando casi totalmente las catequinas (**Gráfica 11**).



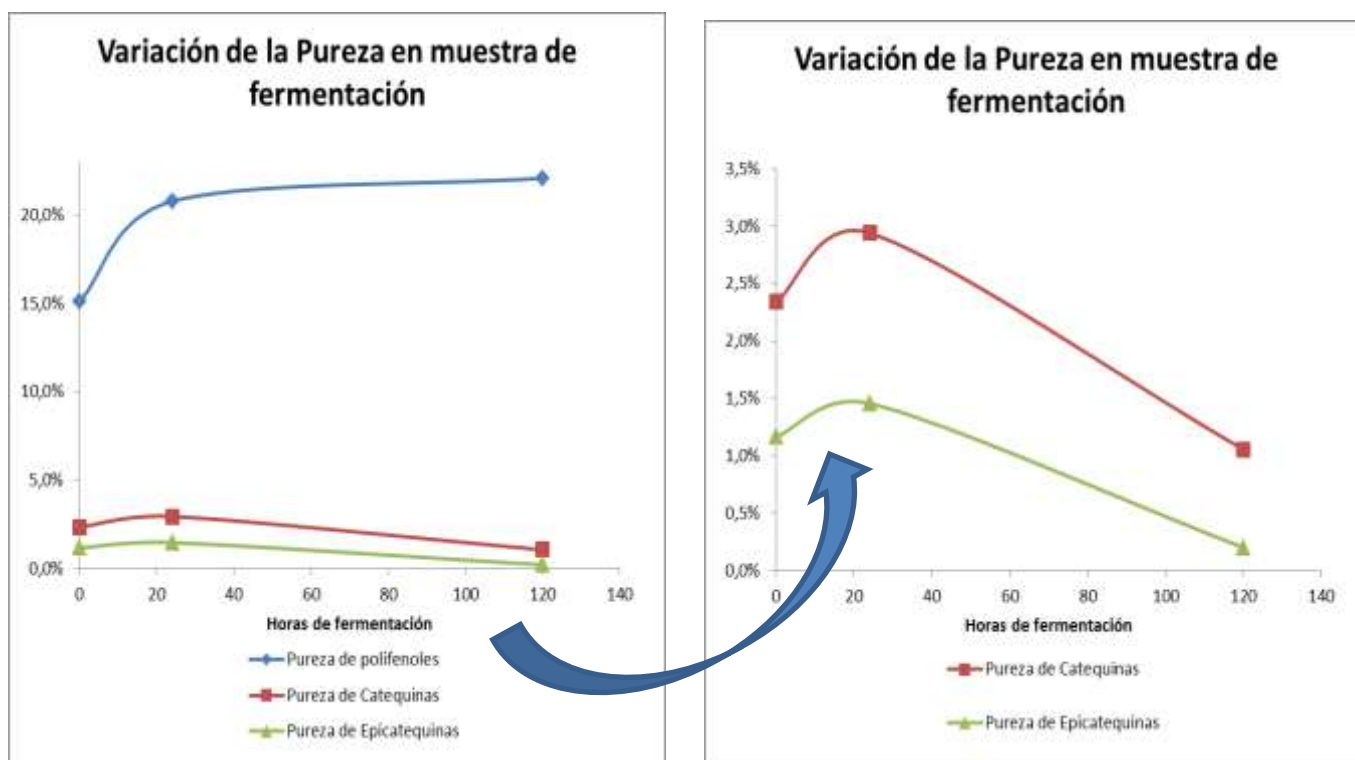
Gráfica 10. Variación del Residuo Seco durante la fermentación. La composición de las alícuotas es:

- Alícuota 1 (◇), 2,5g./L extracto acuoso + 1,7g./L de biomasa + 0,01 g. de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$;
- Alícuota 2 (□), 2,5g./L extracto acuoso + 3,3g./L de biomasa + 0,01 g. de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$;
- Alícuota 3 (Δ), 1,25g./L extracto acuoso + 1,7g./L de biomasa + 0,01 g. de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$;
- Alícuota 4 (x), 1,25g./L extracto acuoso + 1,7g./L de biomasa, sin $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

No esperábamos que se produjera una caída tan grande de la catequina y epicatequina durante el proceso fermentativo. La metabolización de los azúcares por la levadura parece revertir hacia los polifenoles monoméricos conforme avanza la fermentación. Del mismo modo, las condiciones en las que se produce este proceso (25°C y pH=4,5), sabemos, por la **Gráfica 5**, que conducen a la degradación de las catequinas por polimerización de estas, ya que los datos de Polifenoles Totales no varían durante la fermentación (**Gráfica 11**). Sí encontramos una mejora en el resultado para tiempos de fermentación más cortos (24 horas). No obstante, esperábamos que hubiera una mejora de los datos de pureza mayor del experimentado (**Tabla 10**); esto parece indicar que en la composición de la pepita de uva, muchos de los azúcares son ácidos orgánicos no fermentables: tartratos, malatos, fumaratos, entre otros (**Tabla 9**) [49] [50] [51].

Tabla 9. Contenido en ácidos orgánicos de un promedio de distintas variedades de pepita de uva, expresadas como concentración sobre un extracto acuoso (g./L)

Ácidos orgánicos (g./L)	
Ácido tartárico	6,78
Ácido málico	2,28
Ácido succínico	0,82
Ácido fumárico	2,16·E-03



Gráfica 11. Variación de la pureza (respecto al residuo seco) durante el proceso de fermentación.

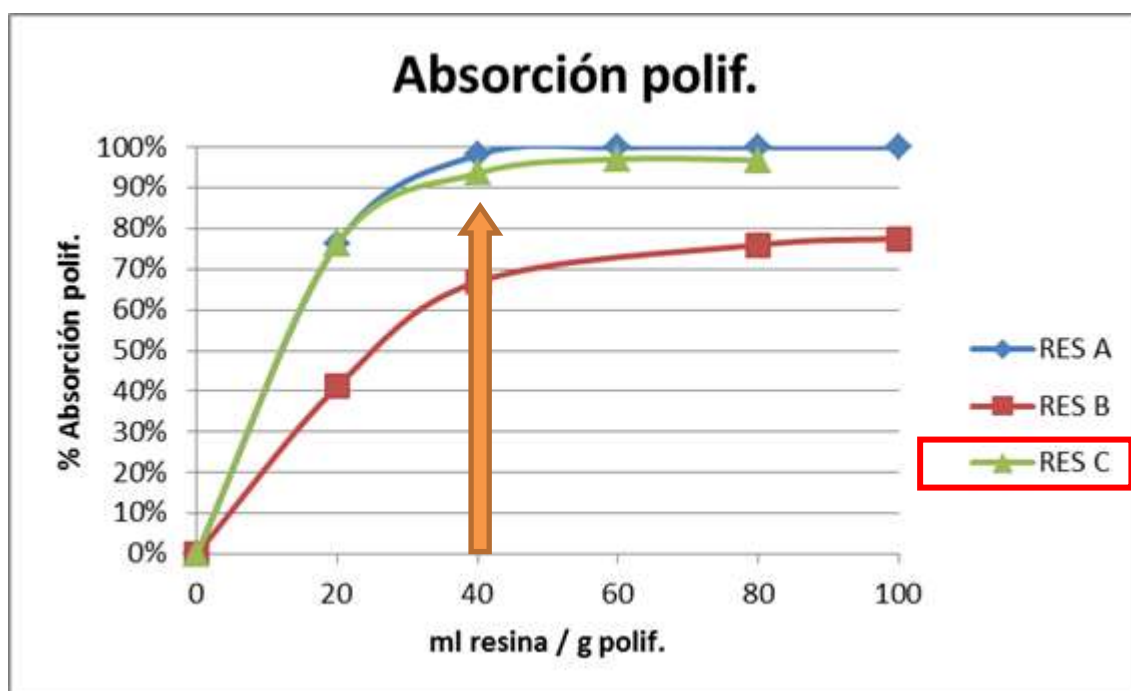
Tabla 10. Variación de la pureza (respecto residuo seco) para las especies de interés durante el proceso de fermentación con *S. cerevisiae*. (*) Los datos de pureza mostrados para tiempo cero muestran una ligera diferencia con los observados en la **Tabla 7**. La introducción de residuo seco (impurezas) en forma de biomasa y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, en las muestras de fermentación justifica dicha variación.

Horas de fermentación	PUREZA POLIF	PUREZA CATEQ	PUREZA EPICATEQ
0 horas	15,1%*	2,3%*	1,2%*
24 horas	20,8%	2,9%	1,5%
120 horas	22,1%	1,1%	0,2%

5.3.2. Purificación mediante el empleo de resinas adsorbentes

De la purificación de los polifenoles de la hoja de olivo y de los extractos de Stevia, se determinó la mejor resina adsorbente, por lo que se ha utilizado la misma, al ser una materia prima muy cara. Además, esta elección no se aleja y está dentro del rango óptimo de efectividad de las resinas de este tipo [52] [53]. Así, en A. Gupta [54], se dice que “La pureza de un extracto de catequinas se incrementó hasta un 77,2%

usando resinas RES-C, frente a los 68,6% y 59,3% que lograron resinas RES-B y RES-A, respectivamente”. De la experiencia adquirida anteriormente se concluye usar un ratio de adsorción de 40mL. de resina / g. Polifenoles para la resina seleccionada [19] (**Gráfica 12**), y un caudal de 4,4mL. / min. como se describe en el Apartado 4.2.4.2.



Gráfica 12. Capacidad de adsorción de Polifenoles Totales EAG por unidad de volumen de distintas resinas comerciales (RES A, RES B y RES C).

Hemos trabajado a un pH al cual sabemos que las catequinas se muestran estables, que coincide con el pH al que acaba la extracción. Inicialmente, tratamos la elución de la columna adsorbente con agua, dado que buscamos un proceso que sea sin el empleo de disolventes orgánicos. Realizamos lavados de la resina durante 4-5 volúmenes muertos con agua (un Volumen Muerto (VM) se corresponde con el 40% del volumen que ocupa la resina más el volumen del circuito de conducción), hasta que el residuo seco que sale de la columna es cero. Sin embargo, vemos que con el agua no se logra eluir nada de los Polifenoles, y que estos están retenido en la columna, por lo que será necesario modificar la polaridad del líquido de elución con diluciones de Etanol/agua crecientes. Se eligió un gradiente de elución de 10%-30%-60%-72% para permitir el acondicionamiento de la resina a la presencia de Etanol y evitar la

formación de burbujas en el lecho de la resina, ya que podría generar caminos preferenciales por la ruptura del frente de elución. Los resultados de la purificación en columna de adsorción para el extracto acuoso, con el Balance de Materia de las especies de interés, se muestran en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Datos de Balance de Materia de la purificación de un extracto acuoso obtenido según la receta propuesta para la extracción de Polifenoles en agua. N.D., No Detectado

Muestras	g. PF EAG	g. catequinas	g. epicatequinas	g. Residuo Seco
Extracto	1,5	0,23	0,12	9,3
Aguas Madre	N.D.	N.D.	N.D.	6,10
Volúmenes de lavado H2O (5xVM)	N.D.	N.D.	N.D.	1,53
Elución con diluciones de EtOH/agua hasta 72%	1,31	0,24	0,12	1,67
BALANCE DE MATERIA DE LA PURIFICACIÓN	87,3%	≈100%	≈100%	--

Como puede verse, en las aguas madre se logra eliminar gran parte del residuo seco, sin existir elución de nada de los Polifenoles, que quedan totalmente retenidos en la columna adsorbente. Del mismo modo, el agua de lavado tampoco consigue eluirlos, y sólo se logra con el empleo de distintas diluciones de Etanol/agua. Resulta reseñable que el balance de materia no se llega a cerrar por completo para Polifenoles Totales, pero sí para catequinas y epicatequinas, máxime cuando estos son también polifenoles, por tanto, si existen pérdidas de Polifenoles EAG, también deberían disminuir las catequinas y epicatequinas. Estos compuestos, al ser monoméricos, Polifenoles de bajo peso molecular, se eluyen con relativa facilidad en la columna en presencia de EtOH; además, por su menor tamaño, podrían penetrar en los huecos o poros de la resina y salir más fácilmente; en cambio, otros Polifenoles de mayor peso molecular como los taninos condensados, polímeros u oligómeros de muchas subunidades, pueden quedar retenidos en la matriz porosa de la resina con más

fuerza, de manera que ven más impedida su salida y sea necesario emplear un eluyente mucho más apolar (mayor concentración de EtOH, >72% EtOH, y/o elución con medio básico).

Tabla 12. Resultados de purificación tras paso por columna de adsorción para los compuestos de interés, y tras concentración y secado mediante Rotavapor a 51°C y desecador en estufa de vacío a 70°C.

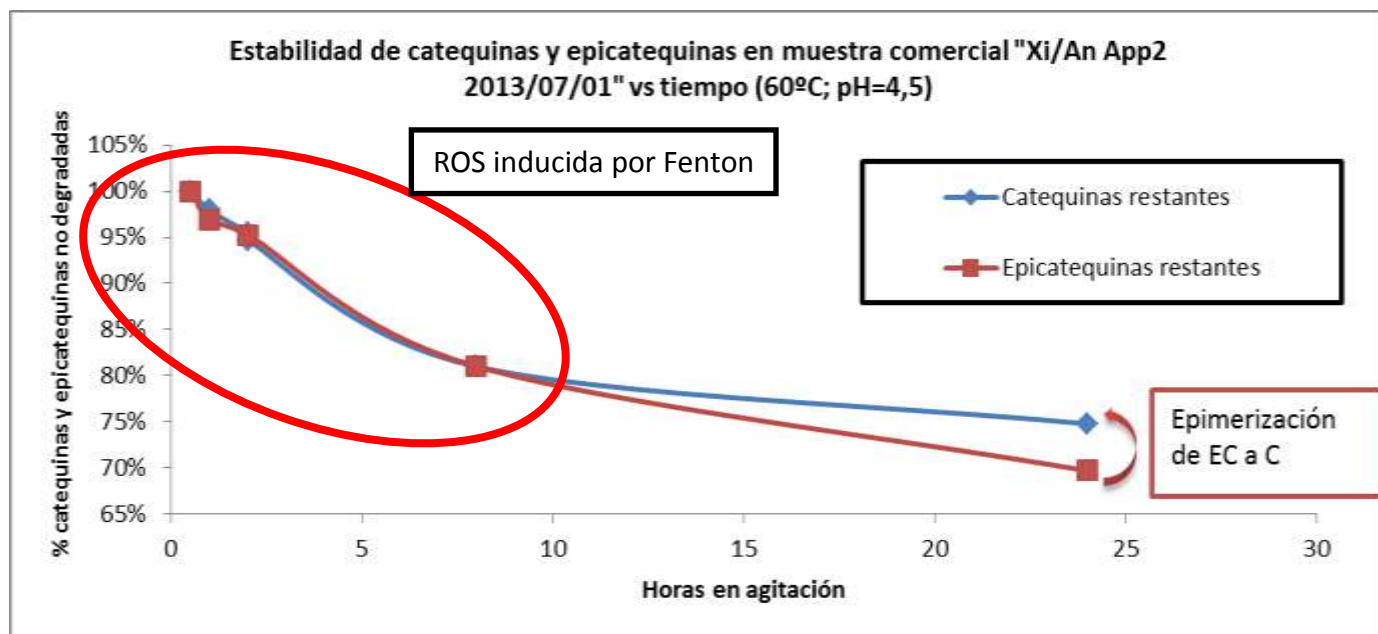
	PF EAG	Catequinas	Epicatequinas
Pureza inicial (líquido)	16,1%	2,5%	1,2%
Pureza tras columna (líquido)	78,5%	14,2%	7,4%
Pureza en producto seco (sólido)	62,2%	10,7%	6,34%

En la purificación de extractos acuosos, al eliminar gran parte del residuo seco (impurezas), se aumenta mucho la pureza tanto de polifenoles totales como de los monómeros, pero especialmente notable es el aumento en la pureza de estos últimos, ya que, de inicio, en el extracto acuoso, existe una alta proporción de catequinas y epicatequinas respecto de los Polifenoles Totales (**Tabla 12**).

Sin embargo, se puede ver que existe una gran caída de las Catequinas y Polifenoles en la transición líquido-sólido, durante la concentración y secado mediante Rotavapor a 51°C y desecador en estufa de vacío a 70°C. Por eso planteamos dos tipos de pruebas de estabilidad:

- Prueba de estabilidad de catequina en muestra líquida
- Prueba de estabilidad de catequina en muestra sólida

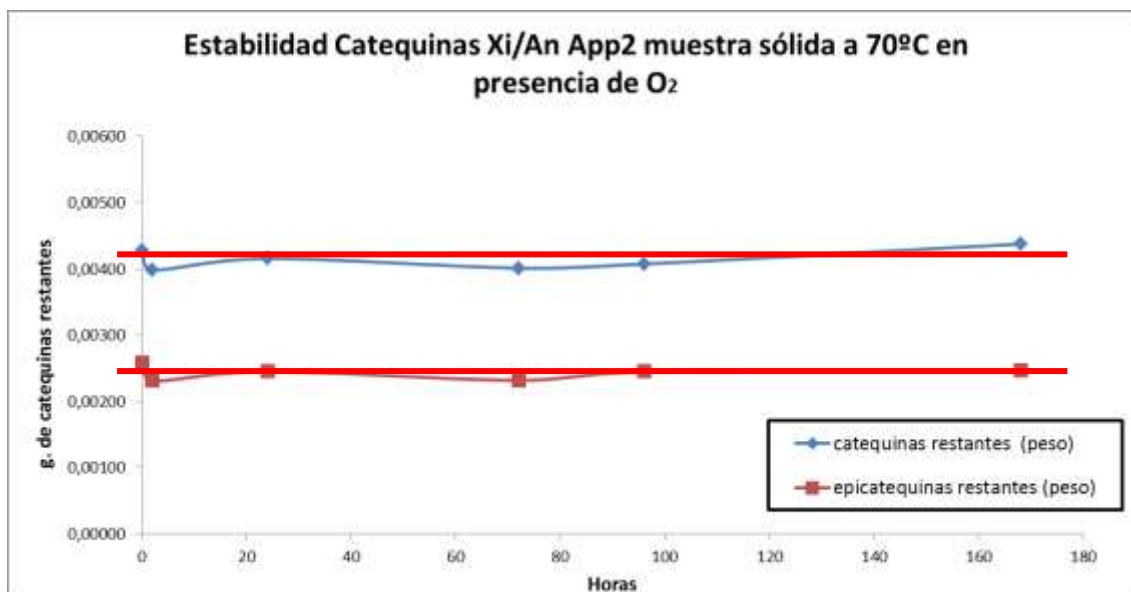
5.3.3. Ensayos de estabilidad de catequina en sólido y líquido



Gráfica 13. Estabilidad de monómeros polifenólicos de una muestra comercial en medio acuoso a pH=4,5. (60°C; 24 horas).

La **Gráfica 13** muestra los datos de estabilidad de una muestra comercial con un contenido determinado en catequina y epicatequina, para pH=4,5 y 60°C de temperatura. Se aprecian dos zonas o tendencias en la gráfica: una caída inicial muy rápida que parece corresponder a una cinética de consumo de un sustrato: el oxígeno molecular (O_2) disuelto en el medio líquido, en presencia de iones metálicos, puede conducir a la aparición de especies radicalarias del oxígeno (generación de ROS) [55] [56]. Las ROS interaccionarán con las catequinas y epicatequinas por su actividad antioxidante, provocando el consumo de estas [57] [35]. La segunda parte de la gráfica corresponde a la cinética de inestabilidad térmica intrínseca de las catequinas, como ya vimos en la **Gráfica 5** y **Gráfica 7**. Existe polimerización de catequinas, aunque se ve compensada por la epimerización del isómero cis- a la forma trans-.

Sin embargo, el tiempo de concentración en rotavapor no se prolonga durante horas, por lo que no justifica una caída tan grande en los datos de pureza de la **Tabla 12** durante el proceso de concentración y secado.



Gráfica 14. Estabilidad de monómeros polifenólicos de una muestra comercial en forma sólida a 70°C y en presencia de O₂

La **Gráfica 14** muestra que las mismas catequinas de la muestra comercial, en forma sólida y presencia de oxígeno y calor (70°C) se muestran muy estables. Parece que las catequinas no interactúan con el oxígeno molecular del aire, y sólo presentan actividad antioxidante en presencia de especies radicalarias del oxígeno, cuando están en medio líquido (en presencia de especies metálicas que catalicen la aparición de ROS) [58].

Una posible explicación para la caída de la pureza de los polifenoles desde un 78% hasta un 62% es que tenga lugar durante la fase de concentración por modificación del pH. Se ha realizado una primera estimación y se ha comprobado que durante el proceso de concentración el pH cae desde 4,5 hasta 3,3 [59].

5.4. Comparativa de extractos y actividad antioxidante

Finalmente, resulta interesante comparar los datos del cromatograma para la extracción acuosa con el de la extracción hidroalcohólica (25°C; pH=1; Ratio 1:5; 4 horas de extracción), **Figura 10**.

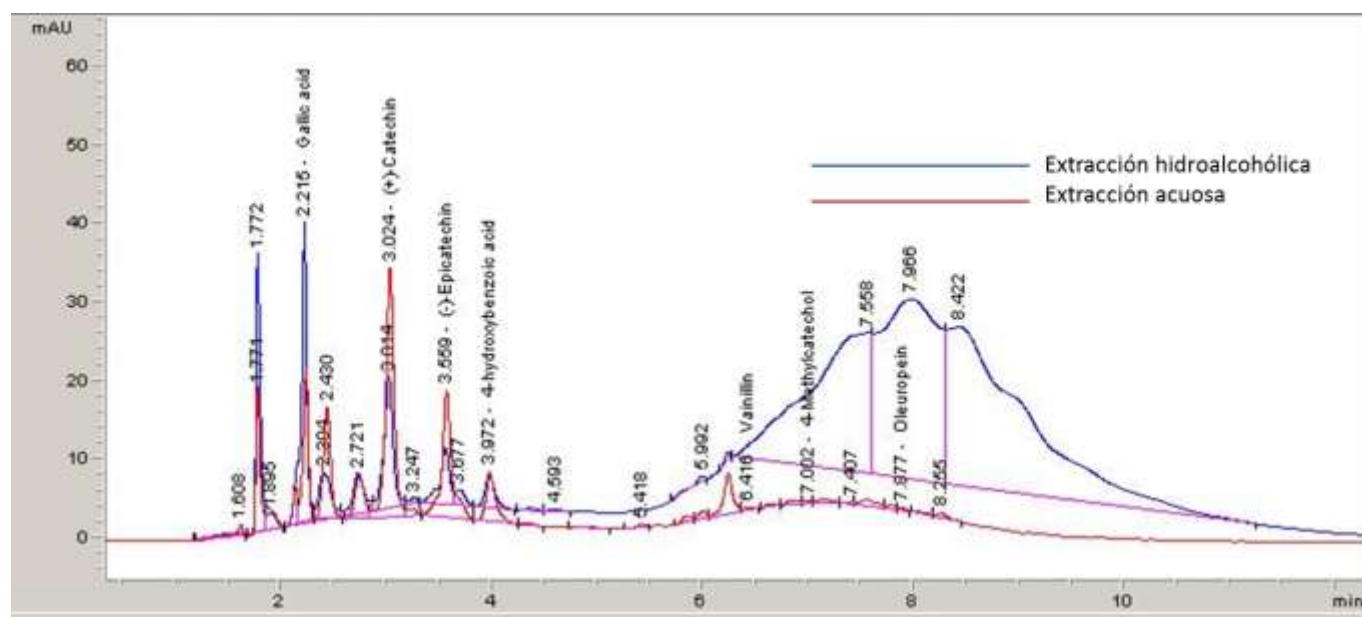


Figura 10. Cromatogramas correspondientes a los extractos purificados procedentes de la extracción acuosa propuesta, y de la extracción hidroalcohólica según receta elaborada por Deretil Vitatech.

Ambos muestran los característicos picos de Ácido Gálico, Catequina, Epicatequina y otros compuestos de bajo peso molecular, pero difieren en la señal correspondiente a los Polifenoles de tipo OligoProantoCianidinas (OPC). La ausencia de este conjunto de señales en forma de “montaña” o “promontorio” en el cromatograma para la extracción acuosa, indica lo que podemos confirmar con los datos de rendimientos de extracción de Polifenoles Totales EAG: un bajo rendimiento para Polifenoles Totales, pero con una alta proporción en polifenoles monoméricos, catequina y epicatequina, lo que ha ayudado a obtener un mejor resultado de pureza final para estos compuestos, los que consideramos con mayor poder antioxidante (**Tabla 12**). Esto queda confirmado con los datos de actividad antioxidante del método DPPH: la muestra rica en monómeros tiene un porcentaje de inhibición de radicales libres un 21% superior al extracto hidroalcohólico, de manera que cuanto más rica es la muestra en catequinas y epicatequinas, mejor es el porcentaje de inhibición de radicales libres, y mayor es su poder antioxidante.

6. CONCLUSIONES

Con todo el estudio realizado para la extracción y purificación de polifenoles de la harina de pepita de uva, hemos podido desarrollar una metodología para el proceso de extracción en agua, una receta de extracción: (1) Cargar 100g. de agua a temperatura ambiente y añadir 10g. de harina de pepita de uva. Desplazar el aire con N₂. (2) Calentar la suspensión anterior hasta reflujo y mantener a esta temperatura durante 30min. (3) Enfriar la suspensión hasta temperatura ambiente. (4) Una vez enfriado, centrifugar a 7.000 rpm durante 10min. Tras separar el líquido, lavar el sedimento con 30g. de agua (la harina de pepita de uva retiene hasta 3 veces su peso en agua). Volver a centrifugar en las mismas condiciones y juntar ambos sobrenadantes y analizar RS, Folin y HPLC.

La posterior etapa de purificación de los extractos acuosos mediante fermentación con *S. cerevisiae* no ha conseguido ser del todo favorable: hemos logrado mejorar los datos de pureza de las especies de interés para unos tiempos cortos de fermentación (24horas), pero el incremento ha sido insuficiente para el objetivo de la purificación. En cambio, la adsorción en columnas con resinas adsorbente sí se ha mostrado como un método capaz para dicha etapa de purificación, al incrementar la pureza de un 16% a un 78% en polifenoles totales (EAG), de un 2,5% a un 14,2% en catequina, y de un 1,2% a un 7,4% en epicatequina. Sin embargo, se requirió del uso de otro disolvente distinto del agua para la elución de los polifenoles en la columna, concretamente, Etanol, por lo que el producto obtenido no será catalogado como “*solvent free*”.

El producto final obtenido es un sólido en forma de cristales de color rojo. En este estado, el producto se muestra muy estable frente a temperaturas elevadas y presencia de oxígeno ambiental. En cambio, en estado líquido, su estabilidad está más condicionada por la temperatura, el pH y el oxígeno disuelto, entre otros, por lo que la transición líquido-sólido supone un punto crítico del proceso al que prestar mayor atención, a fin de evitar una excesiva degradación de catequinas y polifenoles.

Finalmente, y para concluir, el producto sólido obtenido tras la extracción en agua, y posterior purificación, a partir de la harina de pepita de uva, ha presentado un

perfil polifenólico rico en especies monoméricas (catequina y epicatequina, especialmente), como puede apreciarse en el cromatograma de la **Figura 10**, y muy pobre en OPC (especies oligoméricas y de mayor peso molecular), lo cual contrasta con el perfil obtenido para un proceso de extracción hidroalcohólico, más rico en OPC. La existencia de una mayor proporción de monómeros respecto del total de especies polifenólicas en la extracción en agua, justifica un mayor poder antioxidante de este producto, siendo, de hecho, un 21% superior en actividad inhibitoria de radicales libres que el obtenido de la extracción hidroalcohólica, evidenciándose así, que son estas especies monoméricas las que presentan un mayor poder antioxidante, dando lugar a un producto de mayor valor añadido.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Hicks, J. J., Torres-Ramos, Y. D., Sierra-Vargas, M. P. (2006). Estrés Oxidante. Concepto y clasificación. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 14, pp.223-226.
- [2] Izquierdo, A. C., Lang, C. G. R., Jiménez, C. A. C., Jiménez, M. S. C., Liera, J. E. G., Denis, B. E. R., Salinas, K. A. (2009). Estrés oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 3, pp.1-38.
- [3] Beecher, G. R. (2004). Proanthocyanidins: Biological Activities Associated with Human Health. *Pharmaceutical Biology*, 42, pp.2-20.
- [4] Maydata, A. G. (2002). Vino, polifenoles y protección a la salud. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, 16, pp.134-141.
- [5] Quiñones, M., Miguel, M., Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27, pp.76-89.
- [6] Sancho, M., Mach, N. (2015). Efecto de los polifenoles del vino sobre la prevención del cáncer. *Nutrición Hospitalaria*, 31, pp.535-551.
- [7] Garrido, J., Borges, F. (2013). Wine and grape polyphenols - A chemical perspective. *Food Research International*, 54, pp.1844-1858.
- [8] Shi, J., Yu, J., Pohorly, J. E., Kakuda, Y. (2003). Polyphenolics in grape seeds - Biochemistry and Funcionalidad. *Journal of Medicinal Food*, 6, pp.291-299.
- [9] Hardie, W. J., O'Brien, T. P., Jaudzemis, V. G. (1996). Morphology, anatomy and development of the pericarp after anthesis in grape (*Vitis vinifera* L.). *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 2, pp.97-142.
- [10] Santos-Buelga, C., Francia-Aricha, E. M., Escribano-Bailón, M. T. (1995). Comparative flavan-3-ol composition of seeds from different grape varieties. *Food Chemistry*, 53, pp.197-201.
- [11] Prozil, S. O., Evtuguin, D. V., Cruz Lopes, L. P. (2012). Chemical composition of grape stalks of *Vitis vinifera* L. from red grape pomaces. *Industrial Crops and Products*, 35, pp.178-184.
- [12] Sousa, E. C., Uchôa-Thomaz, A. M. A., Carioca, J. O. B., Morais, S. M., Lima, A., Martins, C. G., Alexandrino, C. D., Ferreira, P. A. T., Rodrigues, A. L. M., Rodrigues, S. P., Silva, J. N., Rodrigues, L. L. (2014). Chemical composition and bioactive compounds of grape pomace (*Vitis vinifera* L.), Benitaka variety, grown in the semiarid region of Northeast Brazil. *Food Science and Technology*, 34, pp.135-142.
- [13] Gođevac, D., Tešević, V., Veličković, M., Vujisić, L., Vajs, V., Milosavljević, S. (2010). Polyphenolic compounds in seeds from some grape cultivars grown in Serbia. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 75, pp.1641-1652.
- [14] Shi, J., Yu, J., Pohorly, J., Young, J. C., Bryan, M., Wu, Y. (2003). Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution. *Food, Agriculture & Environment*, 1, pp.42-47.
- [15] Sharma, V., Zhang, C., Pasinetti, G. M., Dixon, R. A. (2011). Gang, D. The Biological Activity of Phytochemicals. *Recent Advances in Phytochemistry*, pp.33-46. Springer-Verlag, New York, NY.
- [16] Deretil Vitatech. (2013). Informe JFPU008 - Receta extracción hidroalcohólica pepita de uva.
- [17] Kuhnert, S., Lehmann, L., Winterhalter, P. (2015). Rapid characterisation of grape seed extracts by a novel HPLC method on a diol stationary phase. *Journal of Functional Foods*, 15, pp.225-232.

- [18] Kaveti, B., Ying, P. T. S., Parkunan, S., Ganesan, S., Baig, M. (2013). *In vitro* evaluation of antioxidant activity and total phenolic content of methanolic extract of *Piper betel*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 4, pp.4537-4541.
- [19] Deretil Vitatech. (2015). Informe ARPU001 - Purificación de los polifenoles de la harina de pepita de uva por resinas adsorbentes.
- [20] *Directiva 95/2/CE (1995) del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de febrero de 1995 relativa a aditivos alimentarios distintos de los colorantes y edulcorantes.*
- [21] Ignat, I., Volf, I., Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126, pp.1821-1835.
- [22] Jiang, G., Fang, G., Li, L., Shi, Z., Zhang, Z. (2014). Study of Antioxidant ACTivity of Catalized Hydrogen Degradation Product of Polymeric Proanthocyanidins (LPPC) from *Larix gmelinii* Bark. *BioResources*, 9, pp.662-672.
- [23] Cuevas-Valenzuela, J., González-Rojas, Á., Wisniak, J., Apelblat, A., Pérez-Correa, J. R. (2014). Solubility of (+)-catechin in water and water-ethanol mixtures within the temperature range 277,6–331,2 K: Fundamental data to design polyphenol extraction processes. *Fluid Phase Equilibria*, 382, pp.279-285.
- [24] Courbat, P., Valenza, A. (1975). Medicaments Containing epicatechin-Z-sulfonic acids and salts thereof. US 3,888,990, 10-Jun-1975.
- [25] Srinivas, K., King, J. W., Howard, L. R., Monrad, J. K. (2010). Solubility of Gallic Acid, Catechin, and Protocatechuic Acid in Subcritical Water from (298,75 to 415,85) K. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 55, pp.3101-3108.
- [26] Li, N., Taylor, L. S., Ferruzzi, M. G., Mauer, L. J. (2012). Kinetic Study of Catechin Stability: Effects of pH, Concentration, and Temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, pp.12531-12539.
- [27] Siebert, K. J., Carrasco, A., Lynn, P. Y. (1996). Formation of Protein-Polyphenol Haze in Beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, pp.1997-2005.
- [28] Ferruzzi, M. G., Bordenave, N., Hamaker, B. R. (2012). Does flavor impact function? Potential consequences of polyphenol–protein interactions in delivery and bioactivity of flavan-3-ols from foods. *Physiology & Behavior*, 107, pp.591-597.
- [29] Jakobek, L. (2015). Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chemistry*, 175, pp.556-567.
- [30] Deretil Vitatech. (2015). Informe ARPU - Estabilidad de Catequinas.
- [31] Ferreira, D., Coleman, C. M. (2011). Towards the Synthesis of Proanthocyanidins: Half a Century of Innovation. *Planta Med*, 77, pp.1071-1085.
- [32] Ohmori, K., Ushimaru, N., Suzuki, K. (2004). Oligomeric catechins: An enabling synthetic strategy by orthogonal activation and C(8) protection. *PNAS*, 101, pp.12002-12007.
- [33] Zhu, Q. Y., Zhang, A., Tsang, D., Huang, Y., Chen, Z. (1997). Stability of Green Tea Catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, pp.4624-4628.
- [34] Zhu, Q. Y., Holt, R. R., Lazarus, S. A., Ensunsa, J. L., Hammerstone, J. F., Schmitz, H. H., Keen, C. L. (2002). Stability of the Flavan-3-ols Epicatechin and Catechin and Related Dimeric Procyanidins Derived from Cocoa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, pp.1700-1705.
- [35] Ananingsih, V. K., Sharma, A., Zhou, W. (2013). Green tea catechins during food processing and storage: A review on stability and detection. *Food Research International*, 50, pp.469-479.
- [36] Saadeh, R., Al-Jabari, M., Abdoh, A., Al-Bawab, A. (2009). Stability Study of Green Tea Natural Extract in Aqueous Solutions and its Chemical Kinetics. *Dirasat, Pure Sciences*, 36,

pp.62-75.

- [37] Balla, J., Kiss, T., Jameson, R. F. (1992). Copper(II) - Catalyzed Oxidation of Catechol by Molecular Oxygen in Aqueous Solution. *Inorganic Chemistry*, 31, pp.58-62.
- [38] Bucić-Kojić, A., Sovová, H., Planinić, M., Tomas, S. (2013). Temperature-dependent kinetics of grape seed phenolic compounds extraction: Experiment and model. *Food Chemistry*, 136, pp.1136-1140.
- [39] Wang, R., Zhou, W., Wen, R-A. H. (2006). Kinetic Study of the Thermal Stability of Tea Catechins in Aqueous Systems Using a Microwave Reactor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, pp.5924-5932.
- [40] Goodarznia, I., Govar, A. A. (2009). Superheated Water Extraction of Catechins from Green Tea Leaves: Modeling and Simulation. *Chemistry and Chemical Engineering*, 16, pp.99-107.
- [41] Shrikhande, A. J., Race, E. J., Wightman, J. D., Sambueso, R. D. (2003). Process for extraction, purification and enrichment of polyphenolic substances from whole grapes, grapes seeds and grape pomace. US 6,544,581 B1, 8-Apr-2003.
- [42] Volf, I., Ignat, I., Neamtu, M., Popa, V. I. (2014). Thermal stability, antioxidant activity, and photo-oxidation of natural polyphenols. *Chemical Papers*, 68, pp.121-129.
- [43] Ito, R., Yamamoto, A., Kodoma, S., Kato, K., Yoshimura, Y., Matsunaga, A., Nakazawa, H. (2003). A study on the change of enantiomeric purity of catechins in green tea infusion. *Food Chemistry*, 83, pp.563-568.
- [44] Kiatgrajai, P., Wellons, J. D., Gollob, L., White, J. D. (1982). Kinetics of Epimerization of (+)-Catechin and Its Rearrangement to Catechinic Acid. *Journal of Organic Chemistry*, 47, pp.2910-2912.
- [45] Kofink, M., Papagiannopoulos, M., Galensa, R. (2007). (-)-Catechin in Cocoa and Chocolate: Occurrence and Analysis of an Atypical Flavan-3-ol Enantiomer. *Molecules*, 12, pp.1274-1288.
- [46] Wang, H., Helliwell, K. (2000). Epimerisation of catechins in green tea infusions. *Food Chemistry*, 70, pp.337-344.
- [47] Su, Y. L., Leung, L. K., Huang, Y., Chen, Z. (2003). Stability of tea theaflavins and catechins. *Food Chemistry*, 83, pp.189-195.
- [48] Bazinet, L., Araya-Farias, M., Doyen, A., Trudel, D., Têtu, B. (2010). Effect of process unit operations and long-term storage on catechin contents in EGCG-enriched tea drink. *Food Research International*, 43, pp.1692-1701.
- [49] Eydurán, S. P., Akin, M., Ercisli, S., Eydurán, E., Maghradze, D. (2015). Sugars, organic acids, and phenolic compounds of ancient grape cultivars (*Vitis vinifera* L.) from Iğdir province of Eastern Turkey. *Biological Research*, 48, pp.1-8.
- [50] Kliewer, M. (1966). Sugars and Organic Acids of *Vitis Vinifera*. *Plant Physiology*, 41, pp.923-931.
- [51] El-Hawary, S., El-Fouly, K., El-Gohary, H. M., Meselhy, K. M., Slem, A., Talaat, Z. (2012). Phytochemical and Biological Investigation of *Vitis vinifera* L. (Flame cultivar), Family Vitaceae Cultivated in Egypt. *Nature and Science*, 10, pp.48-59.
- [52] Gogoi, P., Dutta, N. N., Rao, P. G. (2010). Adsorption of catechin from aqueous solutions on polymeric resins and activated carbon. *Indian Journal of Chemical Technology*, 17, pp.337-345.
- [53] Chandrasekhar, J., Madhusudhan, M. C., Raghavarao, K. S. M. S. (2012). Extraction of anthocyanins from red cabbage and purification using adsorption. *Food and Bioproducts Processing*, 90, pp.615-623.

- [54] Gupta, A. (2012). Extraction, Purification, Identification and Estimation of Catechins from *Camellia sinensis* (Doctoral Thesis). Beant College of Engineering & Technology, Institute of Himalayan Bioresource and Technology Palampur, Himachal Pradesh University, India. pp.60-63.
- [55] Sang, S., Lee, M., Hou, Z., Ho, C., Yang, C. S. (2005). Stability of Tea Polyphenol (-)-Epigallocatechin-3-gallate and Formation of Dimers and Epimers under Common Experimental Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, pp.9478-9484.
- [56] Watanabe, Y., Okayasu, T., Idenoue, K., Adachi, S. (2009). Degradation Kinetics of Catechin in Aqueous Solution in the Presence of Ascorbic Acid or Octanoyl Ascorbate. *Japan Journal of Food Engineering*, 10, pp.117-124.
- [57] Mochizuki, M., Yamazaki, S., Kano, K., Ikeda, T. (2002). Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1569, pp.35-44.
- [58] Bark, K., Yeom, J., Yang, J., Yang, I., Park, C., Park, H. (2011). Spectroscopic Studies on the Oxidation of Catechin in Aqueous Solution. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 32, pp.3443-3447.
- [59] Zimeri, J., Tong, C. H. (2008). Degradation Kinetics of (-)-Epigallocatechin Gallate as a Function of pH and Dissolved Oxygen in a Liquid Model System. *Journal of Food Science*, 64, pp.753-758.