

EXTRACCION Y CUANTIFICACION DE LOS POLIFENOLES DE LA PULPA DE CAFE¹

L. Amparo García A.,² A. Jeanette Vélez R.² y Martha P. de Rozo³

Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia,
Bogotá, Colombia

RESUMEN

Se cuantificaron los polifenoles totales en extractos de pulpa de café, utilizando el método de Folin-Ciocalteu, e incorporándose en esta técnica el uso del polímero polivinilpirrolidona (PVP), a fin de eliminar las interferencias. Los polifenoles condensados se determinaron aplicando el procedimiento de la vainillina acidificada, y empleando como patrones, ácido clorogénico para la prueba de Folin-Ciocalteu, y catequina para la de vainillina. Luego se trazó una curva de calibración en el solvente respectivo, para cada uno de los extractos.

Los solventes empleados para extraer la pulpa fueron metanol puro; metanol-agua, 50:50; hidróxido de amonio al 30/o, e hidróxido de calcio al 10/o, ensayándose dos tiempos de extracción para cada uno de ellos (10 minutos y una hora). No se encontraron diferencias en lo que respecta a la cantidad de polifenoles extraídos entre los dos tiempos sometidos a ensayo.

Los solventes alcalinos NH_4OH (30/o) y $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (10/o) extrajeron la mayor cantidad de polifenoles totales en el término de 10 minutos. Sin embargo, en ese mismo tiempo, el NH_4OH (30/o) fue más eficaz en cuanto a extraer polifenoles condensados.

Los resultados que aquí se notifican sugieren que el tratamiento de la pulpa de café con solventes alcalinos puede beneficiar el valor nutritivo de la pulpa de café.

Manuscrito modificado recibido: 20-8-85.

1 Este trabajo, que dirigió la Dra. de Rozo, se basa en una Tesis previo a optar al título de Químico, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Apartado Aéreo 14490, Bogotá, Colombia.

El artículo constituye el último de la serie, habiéndose publicado los dos primeros en *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, Vol. 35(2): 287 y 297, 1985, respectivamente.

2 Estudiantes del Departamento de Química de la citada Facultad.

3 Profesora Asociada, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.

INTRODUCCION

Desde hace varios años se ha venido investigando la utilización de la pulpa de café en la elaboración de raciones para alimentación animal, debido a su potencial como fuente de nutrientes, y a pesar de que se ha observado que al ser incluidos en las raciones, producen ciertos efectos negativos (1). Estos han sido atribuidos principalmente a su alto contenido de potasio, fibra, cafeína y polifenoles (2).

En el trabajo tema de este artículo, se trató la pulpa de café con diferentes solventes (metanol, metanol-agua, 50:50, hidróxido de amonio, 30/o e hidróxido de calcio, 10/o), con el fin de determinar la cantidad de polifenoles totales y polifenoles condensados extraídos por cada uno de ellos. Estos solventes han sido usados por otros investigadores para reducir el contenido de polifenoles de la pulpa de café y del sorgo, eliminando así parte del efecto antinutricional.

El método de Folin-Ciocalteu que se usó para determinar polifenoles totales, se basa en la reducción del ácido fosfotungstomolibdico por los polifenoles en solución alcalina, produciendo una coloración azul fuerte (3). Cabe señalar que dicha técnica es más sensible que la de Folin-Denis (4).

No obstante, ambos métodos requieren el uso de un gran número de sustancias que interfieren, tales como nicotina, proteínas, ácido ascórbico, sulfuros, glucosa y aminoácidos (5, 6). Con el fin de cuantificar estas interferencias se aplicó el método de la ligación de fenoles a la polivinilpirrolidona (PVP) (5, 7). La PVP tiene una estructura similar a la del complejo urea-formaldehído, aunque una de sus principales características es su insolubilidad en agua. La condición más importante de la reacción fenol-PVP es el pH; dicha ligación es óptima a un pH de 3.5. La PVP liga los fenoles, dejando libres otra clase de compuestos que también reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu pero que no tienen la capacidad de formar complejos insolubles con PVP.

Los polifenoles condensados se determinaron por el método de la vainillina acidificada. Este, según se sabe, se basa en la especificidad de dicho compuesto para reaccionar en condiciones ácidas con polifenoles condensados (catequina, epicatequina y en general, flavonoides que tengan un enlace simple entre el carbono 2 y 3 y un grupo hidroxilo orientado a la posición meta) (8).

MATERIALES Y METODOS

Se usó pulpa de café de la variedad "Caturra", cultivada en Colombia. La pulpa se secó al sol, se pulverizó en un molino de cuchillas, y se pasó por un tamiz de 60 mallas. El polvo obtenido en esta forma, se guardó en bolsas plásticas oscuras a fin de protegerlo de la luz.

Para extraer los polifenoles se utilizaron reactivos analíticos, y como solventes: metanol puro; metanol-agua (50:50); hidróxido de amonio (30/o), e hidróxido de calcio (10/o).

La relación muestra-solvente fue de 1 g de pulpa de café a 100 ml de solvente, y el extracto se obtuvo mediante agitación mecánica y a temperatura ambiente. Como ya se indicó, se sometieron a ensayo tiempos de

extracción de 10 minutos y 1 hora, respectivamente.

Para cuantificar los polifenoles contenidos en los extractos de pulpa de café se utilizaron los métodos de Folin-Ciocalteu (3), ligación de fenoles a polivinilpirrolidona (PVP) (5, 7), y vainillina acidificada (8). Con los dos primeros métodos se determinó el contenido de polifenoles totales en las muestras. El cambio en la absorbancia, después de añadir PVP a los extractos, corresponde a la concentración real de polifenoles totales. Todas las determinaciones se hicieron por duplicado y se promediaron los dos datos. Para las curvas de calibración se utilizaron como patrones, ácido clorogénico para Folin-Ciocalteu, y catequina para vainillina, disolviendo cada patrón en el solvente utilizado en la extracción.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla 1 se consignan las concentraciones de polifenoles totales y polifenoles condensados en extractos de pulpa de café determinadas por los métodos de Folin-Ciocalteu y vainillina acidificada, respectivamente, usando tiempos de extracción de 10 minutos y 1 hora.

TABLA 1

CUANTIFICACION DE POLIFENOLES PARA DOS TIEMPOS DE EXTRACCION
(10 minutos y 1 hora)

Solvente	10 minutos		1 hora	
	Polifenoles \pm DE		Polifenoles \pm DE	
	mg/g (base seca)		mg/g (base seca)	
	Totales	Condensados	Totales	Condensados
Metanol puro	6.5 \pm 0.14	5.5 \pm 0.10	8.3 \pm 0.14	6.0 \pm 0.15
Metanol-agua (50:50)	23.5 \pm 1.90	7.5 \pm 0.12	29.0 \pm 2.80	7.0 \pm 0.21
Hidróxido de amonio (30/o)	42.5 \pm 3.10	25.6 \pm 0.20	40.0 \pm 1.10	23.5 \pm 0.20
Hidróxido de calcio (10/o)	49.5 \pm 1.40	15.8 \pm 0.11	43.5 \pm 2.10	13.6 \pm 0.13

DE = Desviación estándar.

De los solventes utilizados, los alcalinos NH_4OH (30/o) y Ca(OH)_2 (10/o) extrajeron la mayor cantidad de polifenoles totales en los dos tiempos puestos a prueba. Con estos solventes se logró extraer 42.5 y 49.5 mg/g, respectivamente, en un tiempo de 10 minutos. Sin embargo, el hidróxido de amonio fue más eficiente en cuanto a la extracción de polifenoles condensados, obteniéndose 25.6 mg/g en 10 minutos de extracción.

Aun cuando Price y colaboradores ya habían demostrado, en sorgo, la eficiencia del hidróxido de amonio diluido (9), y Dueñas y de Tovar en pulpa de café (10), hasta el momento de llevar a cabo este trabajo no se había determinado la eficiencia de dicho solvente para extraer polifenoles condensados de pulpa de café. Además, la cantidad de polifenoles totales en el extracto amoniacal encontrada en este trabajo fue mayor (42.5 mg/g) que la informada por Dueñas y de Tovar (31.6 mg/g) (10), debido a que

se usó el método de Folin-Ciocalteu que es más sensible que el de Folin-Denis.

La cantidad de polifenoles extraídos por los solventes básicos fue mayor en un tiempo de 10 minutos que en el término de una hora. Es posible que ello se haya debido a la oxidación de los polifenoles al prolongar el tiempo de extracción.

La extracción de la pulpa de café por solventes alcalinos se tradujo en una reducción sustancial en el contenido de polifenoles totales y polifenoles condensados. Se estima que la disminución del contenido de polifenoles condensados en la pulpa de café es especialmente importante desde el punto de vista nutricional, ya que a los polifenoles en cuestión se les ha atribuido un efecto adverso más agudo cuando son ingeridos por el animal (10).

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento a los Dres. Camilo Rozo y Elizabeth López de Leal, por su asistencia permanente y valiosa colaboración durante la realización de este trabajo.

Al Fondo Colombiano de Investigaciones Científicas "Colciencias" agradecen, asimismo, su significativo aporte financiero.

Finalmente, expresan su agradecimiento a la Sección de Bioquímica del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, al igual que a todas aquellas personas que en una forma u otra colaboraron en el desarrollo de este trabajo investigativo.

SUMMARY

EXTRACTION AND QUANTIFICATION OF THE POLYPHENOLS OF COFFEE PULP

The polyphenol content of coffee pulp extracts was determined using the Folin-Ciocalteu method. The use of polyvinylpyrrolidone (PVP) was introduced in order to eliminate interferences. Condensed polyphenols in the extracts were determined by the method of acidified vanillin. Chlorogenic acid and catechin were used as standards for Folin-Ciocalteu and Vanillin methods, respectively, and a calibration curve was constructed for each solvent.

The solvents used were methanol, methanol-water (50:50), ammonium hydroxide (30/o) and calcium hydroxide (10/o), using times of extraction of 10 minutes and 1 hour. No differences were found in the amount of polyphenols extracted by the different solvents at the two extraction times.

After 10 minutes, the alkaline solvents NH_4OH (30/o) and $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (10/o), extracted more polyphenols than the other two solvents. Nevertheless, ammonium hydroxide (30/o) was more efficient in extracting condensed polyphenols.

The results herein presented suggest that treating coffee pulp with mild alkaline solvents may improve its nutritive value.

BIBLIOGRAFIA

1. Bressani, R. Posibles usos de los subproductos de los granos de café. En: **Pulpa de Café: Composición, Tecnología y Utilización**. J. E. Braham y R. Bressani (Eds.). Ottawa, Canada, International Development Research Centre, 1978, p. 31-43.
2. Bressani, R., E. Estrada & R. Jarquín. Pulpa y pergamino de café. I. Composición química y contenido de aminoácidos de la proteína de la pulpa. **Turrialba**, **22**:299-304, 1972.
3. Slinkard, K. & V. L. Singleton. Total phenol analysis. Automation and comparison with manual methods. **Am. J. Enol. Vitic.**, **28**:49-55, 1977.
4. Singleton, V. L. & J. A. Rossi. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. **Am. J. Enol. Vitic.**, **16**:144-158, 1965.
5. Andersen, R. A. & J. R. Todd. Estimation of total tobacco plant phenols by their bonding to polyvinylpyrrolidone. **Tobacco Sci.**, **12**:107-111, 1968.
6. Shanderl, S. H. Tannins. In: **Methods of Food Analysis**. M. A. Joslyn (Ed.). London, Academic Press, 1970, p. 709.
7. Rozo, C. **Effect of Extended Storage on the Degree of Thermal Processing During Cooking, Cell Wall Components, and Polyphenolic Compounds of Red Kidney Beans (*Phaseolus vulgaris*)**. Ph. D. Thesis, Cornell University, Ithaca, New York, 1982.
8. Broadhurst, R. B. & W. T. Jones. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. **J. Sci. Food Agr.**, **29**:788-794, 1978.
9. Price, M. L., L. G. Butler, J. C. Rogler & W. R. Featherston. Overcoming the nutritionally harmful effects of tannins in sorghum grains by treatment with inexpensive chemicals. **J. Agric. Food Chem.**, **27**:441-445, 1979.
10. Dueñas, J. A. & J. E. De Tovar. **Ensayos para Eliminar los Polifenoles de la Pulpa de Café Mediante Extracción con Solventes y Ensayos Biológicos del Mejor Tratamiento**. Tesis de grado, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia, 1979.