

Extracción ultrasónica de fenoles y flavonoides totales en el mesocarpio de *Carica papaya* L.

Ultrasonic extraction of totals polyphenols and flavonoids in mesocarp tissue of papaya fruit (*Carica papaya* L.)

J. Raga¹, G. Ettiene², L. Sandoval³, E. Pérez-Pérez⁴, J. Casas⁵ y S. Méndez⁵

¹Laboratorio de Tecnología de los Alimentos. Facultad de Ingeniería. Universidad del Zulia ²Departamento de Química. Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia. ³Instituto de Investigaciones Agronómicas, Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia. ⁴Centro Socialista de Investigación y Desarrollo Frutícola y Apícola-Corpozulia. ⁵Licenciados en Química. Facultad de Ciencias. Universidad del Zulia. Venezuela.

Resumen

El consumo de frutas posee efectos benéficos para la salud de los consumidores debido a la presencia de fitoquímicos. La caracterización fitoquímica de lechosa permite explotar su potencial funcional. Para ello, se optimizó un método de extracción ultrasónica para la determinación de polifenoles (método de Folin-Ciocalteu) y flavonoides (método colorimétrico con tricloruro de aluminio) en el mesocarpio de la lechosa. Los resultados demuestran que el sistema de extracción acetona: agua: ácido acético (70:28:2%v/v/v) + etanol: acetona (70:30% v/v) resultó más eficiente para la extracción de los fitoquímicos, obteniéndose concentraciones de 174,66mg AG.100g⁻¹ pulpa fresca y 20,29mg CAT.100g⁻¹ pulpa fresca, con DER <3%, mostrando una alta precisión, para bajos volúmenes de solventes en la cuantificación simultáneamente de fenoles y flavonoides totales.

Palabras clave: *Carica papaya* L, polifenoles, flavonoides, fitoquímicos, compuestos bioactivos, extracción ultrasónica.

Abstract

Fruit consumption has beneficial effects on consumer health due to the presence of phytochemicals. The phytochemical characterization of the papaya fruit allows exploiting their functional potential. For this, an ultrasonic extraction method was optimized for determining the polyphenols (Folin-Ciocalteu method)

and flavonoids (colorimetric method with aluminum trichloride) in the mesocarp of the papaya fruit. The results show that the extraction system acetone: water: acetic acid (70:28:2%v/v/v) + ethanol: acetone (70:30%v/v) was more efficient for extraction of phytochemicals, yielding concentrations of 174.66 mg AG.100g⁻¹ fresh pulp and 20.29 mg CAT.100g⁻¹ fresh pulp, with RSD <3%, which proves high precision, which is used in low volumes of solvents and can simultaneously quantify total phenols and flavonoids.

Key words: *Carica papaya* L., polyphenols, flavonoids, phytochemicals, bioactive compounds, ultrasonic extraction.

Introducción

El consumo de frutas posee efectos benéficos sobre la salud de los consumidores debido a la presencia de fitoquímicos. Los polifenoles y flavonoides son compuestos bioactivos que pertenecen a los fitoquímicos y son reconocidos por exhibir actividad antioxidante, lo cual protege las células del estrés oxidativo causado por los radicales libres. La lechosa (*Carica papaya* L.) es una de las frutas más populares y demandadas de Venezuela, es una buena fuente de antioxidantes naturales como carotenoides, vitaminas A, C y E (Li *et al.* 2011). Los métodos de extracción con solventes orgánicos constituyen los procedimientos más empleados para la extracción de fitoquímicos. Con el fin de minimizar el volumen de solventes y aumentar la eficiencia de extracción en matrices complejas, se ha incorporado la energía ultrasónica, la cual, acelera los procesos osmóticos y de difusión de los analitos desde las matrices sólidas a las fases líquidas de extracción (Tadeo *et al.*, 2010).

La sociedad actual está experimentando un cambio en el concepto de alimento y en su forma de alimentarse. Además de las propiedades nutritivas y sensoriales de los alimentos se

Introduction

The consumption of fruits has beneficial effects on the health of consumers due to the presence of phyto-chemicals. The polyphenols and flavonoids are bioactive compounds that belong to the phyto-chemical and are known by exhibiting antioxidant activity, which protect the cells against oxidative stress caused by free radicals. Papaya (*Carica papaya* L.) is one of the most popular and demanding fruits in Venezuela, is a good source of natural antioxidants such as carotenoids, vitamins A, C and E (Li *et al.* 2011). The extraction methods with organic solvents constitute the most used procedures for extracting the phytochemicals. With the aim of minimizing the volume of solvents and increasing the extraction efficiency in complex matrixes, the ultrasonic energy has been incorporated, which accelerates the osmotic processes and diffusion of analytes from the solid matrixes to the liquid extraction phases (Tadeo *et al.*, 2010).

The current society is experiencing a change in the concept of the food and the way people eat. Besides the nutritional and sensorial properties of the food, people is recognizing and demanding the

está reconociendo y exigiendo la presencia de sustancias con propiedades funcionales. En este sentido, se propuso como objetivo optimizar un método de extracción ultrasónica para determinar simultáneamente fenoles y flavonoides totales con el fin de lograr la caracterización fitoquímica de este frutal. Esto permitirá dar a conocer un rubro promisorio que destaca por su bajo costo, alta disponibilidad, atractivo organoléptico, nutritivo y funcional.

Materiales y métodos

Estándares y reactivos

Como estándares se empleó ácido gálico monohidratado (99,50% de pureza) para la cuantificación del contenido de fenoles y catequina (98,00% de pureza) para flavonoides totales.

En la extracción se emplearon como solventes: acetona (99,80% de pureza Reidel-de Haën), acetato de etilo (98,05% E.M. Science), metanol (99,80% de pureza Lichrosolv), etanol (99,80% de pureza Reidel-de Haën) ácido acético (glacial 99,70% de pureza Fisher Scientific).

Tratamiento de la muestra

Las muestras de lechosa fueron obtenidas del mercado local, se seleccionaron aquellas con madurez de consumo (75% de desarrollo del color amarillo), sin daño mecánico y fitosanitario. Los frutos se lavaron con agua destilada y se desinfectaron con hipoclorito de sodio (0,1%v/v) por 5 min (Materano *et al.*, 2004). Posteriormente, los frutos se enjuagaron con agua destilada, se les eliminó el exocarpio, semillas y placenta con ayuda de un cuchillo de acero inoxidable recubierto con cerámica. El mesocarpio fue

presence of substances with functional properties. In this sense, the aim of this research is to optimize an ultrasonic extraction method to determine simultaneously the phenols and total flavonoids with the objective of achieving the phytochemical characterization of this fruit. This would allow knowing a promissory product that outstands by its low cost, high availability, organoleptic, nutritive and functional attractive.

Materials and methods

Standards and reactive

Monohydrated gallic acid (99.50 of pureness) was employed as standards for quantifying the contents of phenols and catechins (98.00% of pureness) for the total flavonoids.

In the extractions were employed as solvents: acetone (99.80% of Reidel-de Haën pureness), ethyl acetate (98.05% E.M.Science), methanol (99.80% of Lichrosolv pureness), ethanol (99.80% of Reidel-de Haën pureness), acetic acid (glacial 99.70% of pureness, Fisher Scientific).

Papaya samples were obtained from the local market, and were selected those already ripened (75% of development of yellow color), without any mechanic or phytosanitary damage. The fruits were washed with distilled water and disinfected with sodium hypochlorite (0.1% v/v) for 5 min (Materano *et al.*, 2004). Later, the fruits were soaked with distilled water and the exocarpy, seeds and placenta were eliminated using a stainless steel knife covered with ceramic. The mesocarpy was homogenized in a food processor (Oster).

homogeneizado en un procesador de alimentos (Oster).

Extracción de los compuestos fitoquímicos

Los solventes comúnmente empleados para la extracción de polifenoles en muestras vegetales son: acetona, metanol, etanol en medios acuosos (García-Salas *et al.*, 2010). En algunos casos, los solventes son potenciados con adición de solventes polares apróticos (dimetilsulfóxido, tetrahidrofurano) y ácidos (ácido clorhídrico, acético) (Ye *et al.*, 2011).

Para la extracción de los fitoquímicos una alícuota (1,5g) del mesocarpio homogeneizado fue sometida a extracción ultrasónica (35KHz) con 6mL de la solución extractora A [Acetona: agua: ácido acético (70:28:2% v/v/v)] por 10min., posteriormente, se filtró sobre lana de vidrio y el sólido remanente fue extraído con 5mL de la solución extractora A por el mismo tiempo. Seguidamente, se aplicó el mismo proceso con la solución extractora B [etanol: acetona (70:30% v/v)]. Finalmente, la lana de vidrio fue lavada con 2 mL de la mezcla A:B (50:50% v/v) y los extractos fueron enrasados hasta 25 mL con esta misma mezcla.

Determinación del contenido de polifenoles

La determinación de polifenoles se basó en el método reportado por Floegel *et al.* (2011), fundamentado en el método descrito por Singleton y Rossi (1965) con algunas modificaciones. Para ello, una alícuota del extracto (0,4 mL) se añadió a un tubo de ensayo que contenía 1,8 mL de agua, seguidamente, se añadió 0,2 mL del reactivo de Folin- Ciocalteu. Después

Extraction of the phytochemical compounds

The solvents commonly employed for extracting the polyphenols in vegetal samples are: acetones, metanol, ethanol in aqueous mean (García-Salas *et al.*, 2010). In some cases, the solvents were potentiated adding polar solvents (Dimethylsulphoxide, tetrahydrofuran) and acids (hydrochloric acid, acetic) (Ye *et al.*, 2011).

For extracting the phytochemicals, an aliquot (1.5 g) of the homogenized mesocarp was submitted to the ultrasonic extraction (35KHz) with 6 mL of the extractor A solution [Acetone:water:acetic acid (70:28:2% v/v/v)] for 10 min; subsequently, it filtered on glass wool and the remaining solid was extracted with 5 mL of the A extractor solution for the same time. Later, the same process was applied with the B extractor solution [ethanol:acetone (70:30% v/v)]. Finally, the glass wool was washed with 2 mL of the A:B mix (50:50% v/v) and the extracted were marked until 25 mL with the same mix.

Determination of the polyphenol content

The determination of polyphenols was based on the method reported by Floegel *et al.* (2011), substantiated in the method described by Singleton and Rossi (1965) with some modifications. For that, an aliquot of the extract (0.4 mL) was added to an assay tube with 1.8 mL of water; later, 0.2 mL of the Folin-Ciocalteu reactive was added. After 5 min, 2 mL of Na₂CO₃ (7% m/v), 0.6 mL of water were added; the mix was agitated and stored in the dark at an environment temperature

de 5 min, se agregó 2 mL de Na_2CO_3 (7% m/v), 0,6 mL de agua; la mezcla se agitó y almacenó en oscuridad a temperatura ambiente por 1,5 h. La absorbancia de la muestra se midió en un espectrofotómetro UV-VIS (Thermo Scientific serie Genesis) a una longitud de onda de 750 nm. La concentración de polifenoles se calculó a través de la curva estándar de ácido gálico preparada en la mezcla de las soluciones extractoras, como blanco se sustituyó el patrón por la mezcla de las soluciones extractoras.

Determinación del contenido de flavonoides totales

El contenido de Flavonoides se determinó de acuerdo al método colorimétrico reportado por Floegel *et al.*, (2011). Una alícuota del extracto (1 mL) se transfirió a un tubo de ensayo el cual contenía 2,7 mL H_2O . A tiempo cero, se agregó 0,15 mL de NaNO_2 (5% m/v). Después de 5 min, se añadió 0,15 mL de AlCl_3 (10% m/v). A los 6 min, se agregó 1 mL de NaOH 1 M. Inmediatamente, la absorbancia se midió a una longitud de onda de 510 nm. La concentración de flavonoides totales en la muestra se calculó a través de la curva estándar de catequina preparada en la mezcla de las soluciones extractoras., como blanco se sustituyó el patrón por la mezcla de las soluciones extractoras. La precisión analítica de las determinaciones se evaluó a través de las desviaciones estándares relativas (DER) para un total de tres repeticiones por muestra.

Diseño estadístico

El ensayo se realizó con un diseño experimental totalmente al azar con 5 tratamientos (sistemas solventes) y 3 repeticiones por tratamiento. Los datos

for 1.5 h. The absorbance of the sample was measured in a UV-VIS spectrophotometer (Thermo Scientific serie Genesis) at a wave longitude of 750 nm.

The concentration of polyphenols was calculated with the standard curve of gallic acid prepared in the mix of extractor solutions, and as white, the pattern was substituted by the mix of extractor solutions.

Content determination of the total flavonoids

The flavonoid content was determined according to the colorimetric method reported by Floegel *et al.*, (2011). An aliquot of the extract (1 mL) was transferred to an assay tube which had 2.7 mL H_2O . In zero time, 0.15 mL of NaNO_2 (5% m/v) was added. After 5 min, 0.15 mL of AlCl_3 (10% m/v) was added. Within 6 min., 1 mL of NaOH 1M was added.

Immediately, the absorbance was measured at a wave longitude of 510 nm. The concentration of total flavonoids in the sample was measured through the standard curve of catechin prepared in the mix of extractor solutions, for the white, the pattern was substituted by the mix of the extractor solutions. The analytical accuracy of the determinations was evaluated with the relative standard deviations (RSD) for a total of three replications per sample.

Statistical design

The essay was done with a completely randomized design with 5 treatments (solvent systems) and 3 replications per treatment. The data obtained was statistically processed with the statistical program SAS, 9.01 (Statistical Analysis System, 1999),

obtenidos se procesaron estadísticamente con el programa estadístico SAS, versión 9.01 (Statistical Analysis System, 1999) utilizando el procedimiento PROC GLM para los análisis de varianza y la prueba de separación de media se realizó con la instrucción LSMEANS, mediante el método de Tukey.

Resultados y discusión

Estudios previos de sistemas de solventes (García-Salas *et al.*, 2010; Peng-Min *et al.*, 2011; Contreras-Calderón *et al.*, 2011) permitieron proponer diversos solventes como potenciales sistemas para la extracción simultánea de fenoles y flavonoides totales. Los mejores sistemas de solventes evaluados fueron acetona: agua: ácido acético (70:28:2%v/v/v) para polifenoles y etanol: acetona (70:30%v/v) para flavonoides, razón por la cual se evaluó el efecto combinado de estos para la determinación simultánea de fenoles y flavonoides totales.

Inicialmente, se evaluó la extracción ultrasónica durante 20 min con 10 mL de cada mezcla de solventes, es decir, el proceso de extracción duró 40min. En la figura 1 se observa que el sistema formado por las mezclas acetona: agua: ácido acético (70:28:2%v/v/v) + etanol: acetona (70:30%v/v) permite la mayor extracción de polifenoles al ser comparado con el sistema constituido únicamente por acetona: agua: ácido acético (70:28:2%v/v/v), lo que implica que la incorporación del sistema etanol: acetona refuerza la eficiencia del sistema de extracción.

Así mismo, se evaluó el efecto de emplear los solventes puros (etanol y

using the PROC GLM procedure for the variance analysis, and the mean separation tests was done using LSMEANS, with Tukey test.

Results and discussion

Prior researches of solvent systems (García-Salas *et al.*, 2010; Peng-Min *et al.*, 2011; Contreras-Calderón *et al.*, 2011) allowed proposing different solvents as potential systems for the simultaneous extraction of phenols and total flavonoids. The best solvent systems evaluated were acetone:water:acetic acid (70:28:2%v/v/v) for polyphenols and ethanol:acetone (70:30%v/v) for flavonoids, reason for which was evaluated the combined effect of these for the simultaneous determination of phenols and total flavonoids.

Initially, the ultrasonic extraction was evaluated for 20 min with 10mL of each solvent mix, that is, the extraction process lasted 40 min. In figure 1 is observed that the system formed by the mixes acetone:water:acetic acid (70:28:2%v/v/v) + ethanol:acetone (70:30%v/v) allows the biggest extraction of polyphenols when compared to the system only constituted by acetone:water:acetic acid (70:28:2%v/v/v), which implies that the incorporation of the system ethanol:acetone straightens the efficiency of the extraction system.

Likewise, it was evaluated the effect of employing the pure solvents (ethanol and acetone) instead of the mix ethanol:acetone, observing an increment in the recovery of phenols. Many researches suggest the use of

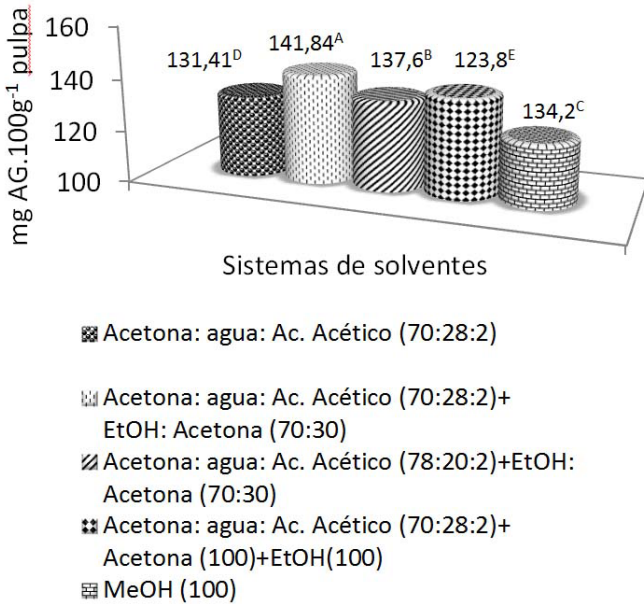


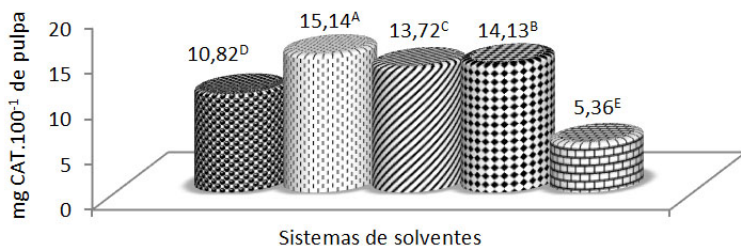
Figura 1. Contenido de fenoles totales en el mesocarpio de *Carica papaya* L al aplicar 20min de ultrasonido con cada mezcla de solvente. Medias con la misma letra no difiere significativamente (Tukey).

Figure 1. Content of total phenols in the mesocarp of *Carica papaya* L when applying 20 min of ultrasound with each solvent mix. Means with the same letter do not differ significantly (Tukey).

acetona) en lugar de la mezcla etanol: acetona, observándose, un aumento en la recuperación de fenoles. Muchas investigaciones se sugiere el uso de metanol puro o acuoso, acidificado o no acidificado, para la extracción de fenoles y flavonoides totales de una gran variedad de frutas (Contreras-Calderón *et al.*, 2011). Sin embargo, en este trabajo el empleo de metanol arrojó una baja recuperación de los analitos, al ser empleado este como único solvente de extracción.

Por otro lado, en la determinación de flavonoides totales (figura 2) destacó el sistema constituido por

pure or aqueous methanol, acidified or non-acidified for the extraction of phenols and total flavonoids of a great variety of fruits (Contreras-Calderón *et al.*, 2011). However, in the current research, the employ of ethanol showed a low recovery of analytes, being employed as the only extraction solvent. On the other hand, in the determination of total flavonoids (Figure 2), highlighted the system constituted by acetone:water:acetic acid (70:28:2% v/v/v) + ethanol:acetone (70:30% v/v), as well as in the determination of total phenols. On the other side, the system constituted by



▣ Acetona: agua: Ac. Acético (70:28:2)

▤ Acetona: agua: Ac. Acético (70:28:2)+ EtOH:
Acetona (70:30)

▥ Acetona: agua: Ac. Acético (78:20:2)+EtOH: Acetona
(70:30)

▧ Acetona: agua: Ac. Acético (70:28:2)+ Acetona
(100)+EtOH(100)

▨ MeOH (100)

Figura 2. Contenido de flavonoides totales en el mesocarpio de *Carica papaya* L. al aplicar 20 min de extracción ultrasónica con cada mezcla de solvente. Medias con la misma letra no difiere significativamente (Tukey).

Figure 2. Content of total flavonoids in the mesocarp of *Carica papaya* L. when applying 20 min of ultrasonic extraction with each mix of solvent. Means with the same letter do not differ significantly (Tukey).

acetona: agua: ácido acético (70:28:2% v/v/v) + etanol: acetona (70:30%v/v), al igual que en la determinación de fenoles totales. Por su parte, el sistema constituido únicamente por metanol es el ineficiente para la extracción de flavonoides totales.

Los resultados anteriores sugieren que el sistema compuesto por acetona: agua: ácido acético (70:28:2% v/v/v) + etanol: acetona (70:30%v/v) es el sistema más eficiente para la determinación simultánea de fenoles y flavonoides totales. Por tal motivo, se evaluó el empleo de dos extracciones

methanol is uneficcient for extracting total flavonoids.

The previous results suggest that the system composed by acetone:water:acetic acid (70:28:2% v/v/v) + ethanol:acetone (70:30% v/v) is the most efficient system for the simultaneous determination of phenols and total flavonoids. For this reason, it was evaluated the use of two simultaneous extractions for 10 min with each solvent mix. This allowed increasing the efficiency of the phytochemical extraction since it does not allow that the extraction solvent

simultáneas durante 10min con cada mezcla de solventes. Esto permitió aumentar la eficiencia de la extracción de fitoquímicos debido a que se impide que el solvente de extracción se sature, permitiendo que el equilibrio se desplace hacia la máxima extracción de los fitoquímicos. Obteniéndose concentraciones de 174,66 mg AG.100g⁻¹ pulpa y 20,29 mg CAT.100g⁻¹ pulpa, con DER <3%.

Finalmente, se evaluó la adición de acetato de etilo al sistema de solventes y se obtuvo una mejora en la recuperación de los fenoles totales pero no permite la determinación de flavonoides totales debido a la formación de una suspensión. Por tal razón, se descartó el empleo de este solvente para la extracción simultánea de los fitoquímicos.

Conclusiones

El sistema acetona: agua: ácido acético (70:28:2%v/v/v) + etanol: acetona (70:30%v/v) con dos etapas sucesivas de 10 minutos con cada mezcla de solventes, resultó eficiente para la extracción de los fitoquímicos.

La incorporación de acetato de etilo como última etapa de extracción, mejoró la extracción de los polifenoles pero no permitió determinar flavonoides totales, debido a la presencia de precipitado.

Literatura citada

Contreras-Calderón J., L. Calderón-Jaimes, E. Guerra-Hernández, B. García-Villanova. 2011. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Research International*. 44:2047-2053.

gets saturated, allowing that the equilibrium goes to the maximum extraction of phytochemicals. Obtaining concentrations of 174.66 mg AG.100g⁻¹ pulp and 20.29 mg CAT.100g⁻¹ pulp, with RSD <3%.

Finally, it was evaluated the addition of ethyl acetate to the solvent system and an improvement in the recovery of the total phenols was obtained, but it does not allow the determination of the total flavonoids due to the formation of a suspension. For this reason, the use of this solvent for the simultaneous extraction of phytochemicals was rejected.

Conclusions

The system acetone: water: acetic acid (70:28:2% v/v/v) + ethanol: acetone (70:30% v/v) with two successive phases of 10 minutes with each mix of solvents was efficient for extracting the phytochemicals.

The incorporation of ethyl acetate as the last extraction phase improved the extraction of polyphenols but it did not allow determining the total flavonoids, due to the presence of the precipitated.

End of english version

Floegel A., D. Kim, S. Chung, S. Koo y O. Chun. 2011. Comparison of ABTS/ DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*. 24:1043-1048.

García-Salas P., A. Morales-Soto, A. Segura-Carretero y A. Fernández-Gutiérrez. 2010. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules*. 15:8813-8826.

- Materano W., J. Zambrano, A. Valera, I. Quintero, R. Alvarez y M. Maffei. 2004. Efecto del escaldado en lechosa (*Carica papaya L.*) con mínimo procesamiento. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 21 Supl. 1: 343-350.
- Peng-Min L., D. Guo-Rong y M. Feng-Wang. 2011. Phenolics concentration and antioxidant capacity of different fruit tissues of astringent versus non-astringent persimmons. *Scientia Horticulturae*. 129:710-714.
- Singleton V. y J. Rossi. 1965. Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of enology and viticulture*. 16:144-158.
- Tadeo, J., C. Sánchez-Brunete, B. Albero y A. García-Valcárcel. 2010. Application of ultrasound-assisted extraction to the determination of contaminants in food and soil samples. *Review. J. Chromatogr. A*. 1217:2415-2440.
- Ye Xing-Qian, Jian-Chu Chen, Dong-Hong Liu, Ping Jiang, John Shi, Sophia Xue, Dan Wu, Jian-Guo Xu, Yukio Kakuda. 2011. Identification of bioactive composition and antioxidant activity in young mandarin fruits. *Food Chemistry*. 124: 1561–1566.