



Identificación del Trabajo	
Área:	Ingeniería de Procesos, Biotecnología y Tecnología de Alimentos
Categoría:	Alumnos/ Graduado
Regional:	Rosario

## Optimización del contenido de polifenoles totales en extractos de harina de quínoa (*Chenopodium quínoa Willd*) previamente desaponificada.

**Marina COPANI, Virginia NUÑEZ, Kevin OLIVIERI, Florencia TAMBURELLI.**

Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de los Alimentos (CIDTA) (Zeballos 1341, Rosario), Facultad Regional Rosario, UTN.

E-mail de autores: [mcopani@frro.utn.edu.ar](mailto:mcopani@frro.utn.edu.ar), [kolivieri@frro.edu.ar](mailto:kolivieri@frro.edu.ar), [ftamburelli@frro.edu.ar](mailto:ftamburelli@frro.edu.ar), [vnunez@frro.utn.edu.ar](mailto:vnunez@frro.utn.edu.ar)

Este trabajo ha sido realizado bajo la dirección del Ing. Lucero, Héctor y de la Ing. Luisetti, Julia, en el marco del proyecto “Desarrollo experimental y modelado matemático de procesos para la obtención de harina y extractos concentrados de quínoa (*Chenopodium quinoa*), evaluación del tiempo de vida útil y su capacidad antioxidante y antimicrobiana.”. (01/01/2017 – 31/12/2019). Código del Proyecto: ALUTIRO0004524TC

### Resumen

En el presente trabajo, se propone la optimización de la extracción de los compuestos fenólicos de la quínoa sobre la base de un diseño experimental de 3 variables a 3 niveles, para lo cual se escogió un diseño central compuesto centrado en las caras, a partir del método superficie-respuesta. Se ha utilizado una harina de quínoa, cuyos granos fueron previamente desaponificados y secados a tres temperaturas diferentes: 40, 60 y 80 °C. Para evaluar el contenido de polifenoles totales, se trabajó con distintas soluciones hidroalcohólicas de 30, 50 y 70% de etanol (al 96%) y con las siguientes relaciones líquido-sólido (L/S): 20:1, 30:1, 40:1.

**Palabras Claves:** quínoa, secado, extracciones, optimización

### 1. Introducción

La quínoa es una planta anual encontrada en la región andina de Sudamérica, cultivada desde Colombia hasta Argentina y Chile, siendo los principales productores Bolivia, Perú y Ecuador (Miranda y col., 2010). Además de los macronutrientes, los estudios en quínoa están enfocados en sus compuestos bioactivos de naturaleza hidrofílica como los compuestos fenólicos, los flavonoides, la actividad antioxidante y su potencial beneficio para la salud (Valencia et al., 2017). Dentro de los antioxidantes naturales encontrados en la quínoa (*Chenopodium quínoa Willd*) se destaca la importancia de los compuestos fenólicos, incluyendo los ácidos fenólicos, flavonoides y taninos, que ejercen una importante acción preventiva y protectora contra el cáncer, alergias, procesos inflamatorios y enfermedades cardiovasculares (Dini et al., 2010). Debido a su contenido de antioxidantes, reviste particular interés su extracción/separación de la matriz vegetal original, con la preservación de sus propiedades, a fin de su obtención con fines medicinales o de conservación de los alimentos.

El objetivo principal de este trabajo, basado en la metodología de superficie de respuesta, fue la optimización de las condiciones operativas para la extracción, considerando las siguientes variables del proceso: temperatura de secado del grano (T),

relación Líquido-Sólido (L/S) y concentración de etanol (% Et) en el contenido de compuestos fenólicos totales.

## **2. Técnicas experimentales**

### *2.1. Materias primas*

La quínoa (*Chenopodium quínoa* Willd - Quinoa Real) fue provista por Leonor Carrazana que tiene sus cultivos en Yavi, Jujuy.

### *2.2. Obtención de extractos hidroalcohólicos*

Para la preparación de los extractos, se trabajó con quínoa previamente desaponificada; los granos fueron secados (Estufa Neo Line con circulación de aire) a tres temperaturas: 40, 60 y 80°C, luego fueron molidos y tamizados (molino IKA con refrigeración y tamiz malla n°40). Se utilizaron diferentes relaciones L/S entre el solvente (mL) y la harina pesada (g) (Balanza analítica Scaltec SVA 32): 20:1, 30:1, 40:1 y como solvente fueron empleadas mezclas hidroalcohólicas de concentraciones: 30, 50, 70 %, v/v de etanol (al 96%) en agua (Alcohol Etílico Biopack). Se ha descrito que las mezclas de etanol-agua son más eficaces para la extracción de compuestos fenólicos, en comparación al agua o etanol utilizados como solventes puros (Yilmaz y Toledo, 2006).

Se empleó un agitador de vaivén (Boeco Germany Orbital Shaker OS-20) para la extracción, y la misma se realizó durante 1 hora y a temperatura ambiente. Los extractos se filtraron y se preservaron dentro de frascos color caramelo a una temperatura de 4°C en heladera hasta su posterior uso.

### *2.3. Reactivos utilizados*

Los siguientes reactivos químicos fueron provistos por Sigma comercial Co. (St. Louis, USA): ácido gálico, carbonato de sodio, reactivo de Folin-Ciocalteu. Todos los reactivos químicos y solventes usados son de grado reactivo analítico.

### *2.4. Determinaciones analíticas de principios activos*

#### *2.4.1. Determinación del contenido de polifenoles totales (CPT)*

El contenido de CPT se determinó de acuerdo con el método de Folin-Ciocalteu (FC), descrito por Singleton y col., (1999). Los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm. El mecanismo de reacción es una redox, por lo que además puede considerarse también, como un método de medida de la actividad antioxidante total.

La oxidación de los polifenoles presentes en la muestra, causa la aparición de una coloración azulada que presenta un máximo de absorción a 765 nm, y que se cuantifica por espectrofotometría en base a una curva patrón de ácido gálico.

#### *2.4.2 Realización de la curva de calibrado:*

Se tomaron 1, 2, 5, 10, 20 y 25 mL de la solución patrón de ácido gálico, se colocaron en un matraz aforado de 25 mL y se completó a volumen con agua destilada.

Las soluciones obtenidas fueron 20, 40, 100, 200, 400, 500 mg/L de ácido gálico. De dichas soluciones se recolectó 1 mL de cada una y se colocó por separado cada

muestra en un matraz de 25 mL, agregando posteriormente 10 mL de agua destilada y 1 mL de licor de FC agitando en cada matraz, dejando reposar durante 2 minutos la solución obtenida. Más tarde, se agregaron 2 mL de carbonato de sodio al 20% p/v, se completó a volumen con agua destilada (sin agitar) y se dejó reposar dos horas a temperatura ambiente y en ausencia de luz.

La preparación del blanco es análoga al procedimiento anterior pero se reemplazaron en este los mililitros de muestra por agua destilada.

Finalmente se realizaron las lecturas de las absorbancias a 765 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV 1800 y se trazó la curva de calibrado.

Los resultados se expresaron como mg ácido gálico equivalente (AGE) por litro de solución.

Para el análisis de las muestras se procedió de la manera mencionada anteriormente, reemplazando el ácido gálico por los extractos obtenidos a partir de las muestras de relación L/S 20:1, 30:1, 40:1 (mL/g) con las soluciones extractivas de diferentes concentraciones hidroalcohólicas: 30, 50, 70 %, v/v de etanol (al 96%) en agua.

Posteriormente a la lectura de los resultados obtenidos de la espectrofotometría, se calcularon los valores de concentración de las muestras analizadas a partir de la siguiente relación:

$$\frac{\text{mgAGE}}{L} = (\text{Abs muestra} - 0,02797)/0,00352 \quad (1)$$

Donde mg AGE son miligramos de ácido gálico equivalentes y Abs<sub>muestra</sub> es la absorbancia de la muestra.

## 2.5 Diseño experimental y análisis estadístico

La optimización de la extracción de los compuestos fenólicos se realizó sobre la base de un diseño experimental de 3 variables a 3 niveles, para lo cual se escogió un diseño central compuesto centrado en las caras. La Tabla I, muestra los valores codificados de los tres niveles (variables) utilizados en el diseño experimental y su correspondiente valor real para los factores de entrada. Se necesitaron realizar 18 experiencias distribuidas en 8, 4 y 6 puntos, los cuales serán detallados y desarrollados en la sección 3. Resultados.

La interacción lineal y los coeficientes cuadráticos se evaluaron mediante ANOVA ( $p < 0.05$ ). Se determinaron los valores de F-test y probabilidad (p) para analizar la contribución estadística significativa de todos los términos. El ajuste del modelo se verificó mediante el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y la significancia de los términos del modelo se estableció con un nivel de confianza del 95 %. Las condiciones del proceso se optimizaron a través de los gráficos de superficie de respuesta deseados. El análisis se realizó utilizando la versión de prueba gratuita del software Minitab 18 (Minitab, Pennsylvania, EE.UU).

**Tabla I.** Relación entre valores codificados y reales de las variables.

	T (° C)	%Et	L/S
Nivel -1	40	30	20
Nivel 0	60	50	30
Nivel +1	80	70	40

### 3. Resultados

En el análisis estadístico (ANOVA), las tres variables estudiadas presentan un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) en el contenido de polifenoles totales. Como se observa en la Tabla II, se requirieron 18 experiencias, agrupadas en 8 réplicas para testear el modelo a dos niveles (-1,1) para los 3 factores ( $2^k$ ,  $k=3$ ); 4 en el punto central para evaluar el error puro y 6 restantes para testear los valores centrales de las caras del plan (puntos en estrella).

**Tabla II.** Plan de experiencias utilizado, mostrando los valores reales y codificados de las variables.

N° Experiencia	X <sub>1</sub> : T°C	X <sub>2</sub> : % Et	X <sub>3</sub> : L/S	Diseño factorial 2 <sup>k</sup>									CPT (mg AGE/100gms)
				X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>1</sub> . X <sub>2</sub>	X <sub>1</sub> . X <sub>3</sub>	X <sub>2</sub> . X <sub>3</sub>	X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	
1	40	30	20	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	235,002
2	80	30	20	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	209,562
3	40	70	20	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	1	200,333
4	80	70	20	1	1	-1	1	-1	-1	1	1	1	197,233
5	40	30	40	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	229,471
6	80	30	40	1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	224,79
7	40	70	40	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	203,562
8	80	70	40	1	1	1	1	1	1	1	1	1	201,246
9	60	50	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	239,54
10	60	50	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	230,756
11	60	50	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	250,185
12	60	50	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	238,209
13	40	50	30	-1	0	0	0	0	0	1	0	0	225,594
14	80	50	30	1	0	0	0	0	0	1	0	0	223,314
15	60	30	30	0	-1	0	0	0	0	0	1	0	239,939
16	60	70	30	0	1	0	0	0	0	0	1	0	214,537
17	60	50	20	0	0	-1	0	0	0	0	0	1	209,425
18	60	50	40	0	0	1	0	0	0	0	0	1	222,548

Los resultados obtenidos a través del método de ANOVA con mayor influencia en la evaluación de CPT (mg AGE/100 ms) fueron: la temperatura (T°C), el porcentaje de concentración de mezcla hidroalcolica (%Et), la relación liquido/ sólido (L/S) y ciertas interacciones cuadráticas de temperatura, relación L/S, temperatura de secado – % de etanol y temperatura de secado – relación L/S. Los mismos se presentan a continuación en la Tabla III.

**Tabla III.** Resultados codificados a través del método de ANOVA.

Término	Efecto	Coef	coef.	Valor T	Valor p	VIF
Constante		234,53	2,81	83,38	0,000	
T(°C)	-7,56	-3,78	2,33	-1,62	0,136	1,00
% Et	-24,37	-12,19	2,33	-5,22	0,000	1,00
L/S	6,01	3,01	2,33	1,29	0,227	1,00
T(°C)*T(°C)	-14,16	-7,08	4,19	-1,69	0,122	1,43
L/S *L/S	-31,1	-15,55	4,19	-3,71	0,004	1,43
T(°C)*%Et	6,18	3,09	2,61	1,18	0,264	1,00
T°C *L/S	5,39	2,69	2,61	1,03	0,327	1,00

Se observó que la variable de mayor influencia en el rendimiento de extracción de CPT fue la composición del solvente y en menor medida la relación L/S. El software utilizado para el análisis estadístico generó la ecuación polinómica que muestra los efectos de cada factor y sus interacciones sobre la respuesta evaluada, con un nivel de confianza de 95%. Eliminando los términos no significativos ( $p < 0,05$ ), se obtuvo la correspondiente ecuación (2) modelo para la variable CPT (mg AGE/100 g b.s.):

$$CPT = 2776 + 28,6 T(^{\circ}C) - 26,8\%Et + 220,5 \frac{L}{S} - 0,443T(^{\circ}C) * T(^{\circ}C) - 3,89 \frac{L}{S} * \frac{L}{S} + 0,193T(^{\circ}C) * Et + 0,337T(^{\circ}C) * \frac{L}{S} \quad (2)$$

El  $R^2$  fue 87.12%, lo que indica que no menos del 87.12% de la variación total de las respuestas fue explicada por el modelo.

En la Figura 1, se muestra en una misma gráfica los valores de CPT experimentales y los teóricos predichos por el modelo, los cuales se corresponden con la Tabla IV. Puede observarse el grado de coincidencia entre los mismos para cada una de las experiencias.

**Tabla IV.** Valores de CPT experimentales y teóricos.

N° Experiencia	Experimental	Teórica
	mg AGE/100 g ms	mg AGE/100 g ms
1	235,002	230,884
2	209,562	211,988
3	200,333	200,356
4	197,233	193,812
5	229,471	231,484
6	224,79	223,388
7	203,562	200,956
8	201,246	205,212
9	239,54	234,89
10	230,756	234,89
11	250,185	234,89
12	238,209	234,89
13	225,594	231,47
14	223,314	224,15
15	239,939	247,066
16	214,537	222,714
17	209,425	216,34
18	222,548	222,34

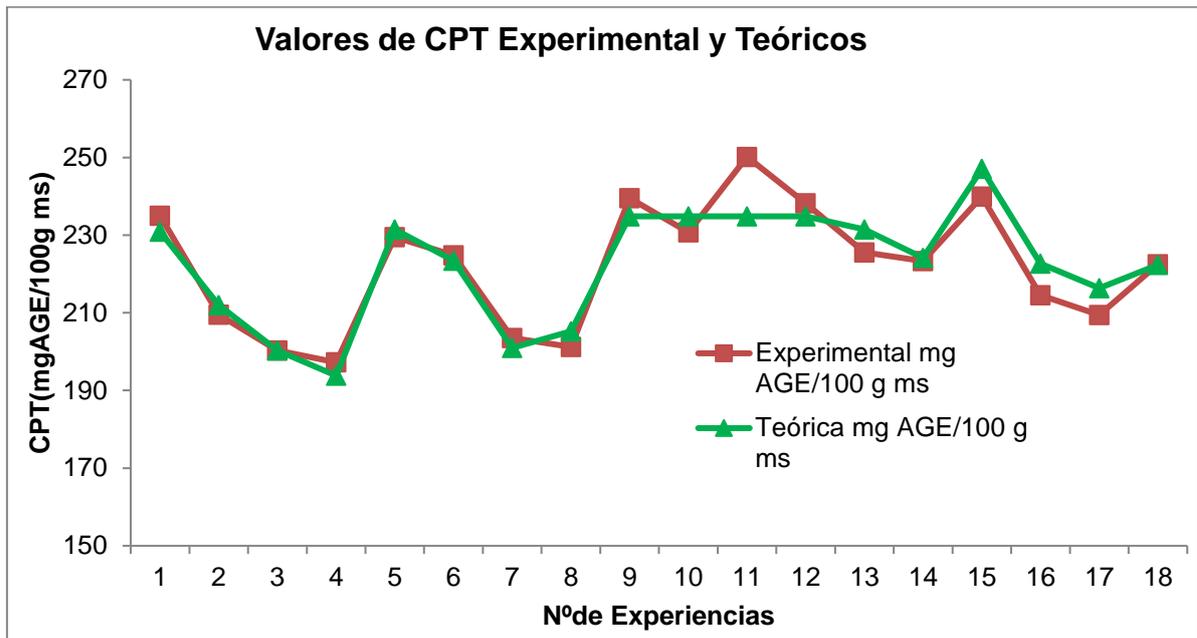


Figura 1. Comparación de los valores experimentales y teóricos de CPT.

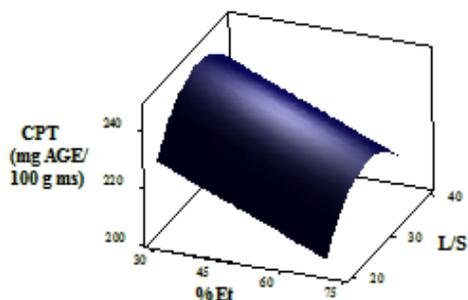
Para determinar los niveles óptimos se diseñaron gráficos de superficie de respuesta a partir de los valores expuestos en la Tabla V, los cuales pueden observarse en la Figura 2. Manteniendo la relación L/S constante, para cada temperatura de secado, se obtuvo que a menor concentración de etanol en el solvente es mayor el CPT.

Tabla V. Diseño superficie-respuesta.

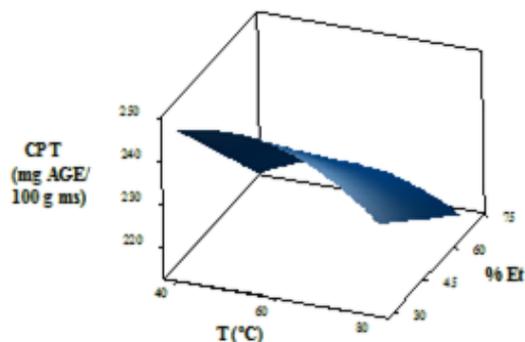
X <sub>1</sub> : T(°C)	X <sub>2</sub> : % Et	X <sub>3</sub> : L/S	CPT (mg AGE/100g ms)	
40	30	20	235,002	
<b>80</b>	<b>30</b>	<b>20</b>	<b>209,562</b>	
40	70	20	200,333	
80	70	20	197,233	8 EXPERIENCIAS
40	30	40	229,471	2 <sup>3</sup>
80	30	40	224,79	
40	70	40	203,562	
80	70	40	201,246	
60	50	30	239,54	
60	50	30	230,756	4 PUNTOS
60	50	30	250,185	CENTRALES
60	50	30	238,209	
40	50	30	225,594	
80	50	30	223,314	
60	30	30	239,939	6 PUNTOS
60	70	30	214,537	AXIALES
60	50	20	209,425	
60	50	40	222,548	

En las siguientes gráficas tridimensionales, se observa cómo se mencionó anteriormente la interacción de CPT con las variables T (°C), %Et y L/S.

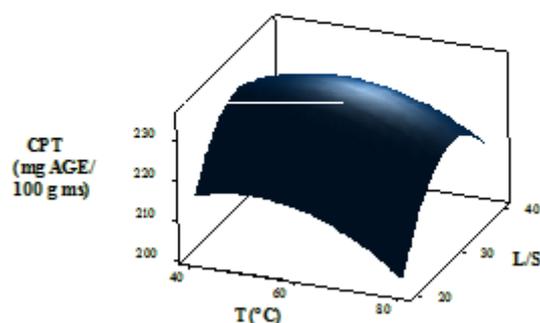
**Gráfica de superficie de CPT, L/S - % Et**



**Gráfica de superficie de CPT, % Et - T (°C)**



**Gráfica de superficie de CPT, L/S - T (°C)**



**Figura 2.** Gráficas de superficie de CPT (mg EAG/100 g ms).

#### 4. Discusión

Al fijar el porcentaje de etanol en el solvente, el CPT aumenta cuando la temperatura de secado es de 60°C y la relación L/S es de 30:1. Por último, manteniendo constante la temperatura, para todas las relaciones L/S estudiadas, al disminuir la concentración de etanol en el solvente, aumenta el contenido de polifenoles totales en la extracción.

Estos resultados indican que si se desea obtener extractos con elevado contenido de polifenoles, se debe utilizar en el pretratamiento de la muestra una temperatura de secado de 60°C y una relación L/S 30:1. Esto no condice con la bibliografía: estudios de otros autores muestran que la extracción de éstos compuestos a partir de matrices vegetales se ve favorecida cuando es mayor la concentración de etanol empleada en el solvente (Silva y col., 2007).

#### 5. Conclusiones

Se observa que la temperatura óptima de secado es a 60 °C y a medida que disminuye la concentración de las soluciones hidroalcohólicas aumenta el contenido de polifenoles.

En próximos trabajos, se propone continuar la investigación trabajando a partir de harina desgrasada ya que el contenido lipídico de la quínoa puede resultar una interferencia en la técnica de determinación de polifenoles totales.

### **Reconocimientos**

Los autores de este trabajo agradecen al Ing. Héctor Lucero y la Ing. Julia Luisetti, por la dirección y la realización de este proyecto y a la Universidad Tecnológica Nacional – Facultad Regional Rosario (UTN-FRRO) por el apoyo financiero provisto.

### **Bibliografía**

- Carciochi, R. A. (2014). Obtención de ingredientes alimenticios con capacidad antioxidante mejorada por aplicación de distintos procesos a semillas de quínoa (*Chenopodium quinoa*). Ciudad autónoma de Buenos Aires.
- Dini, I., Tenore, G.C., Dini, A. (2010). Antioxidant compound contents and antioxidant activity before and after cooking in sweet and bitter *Chenopodium quinoa* seeds. *LWT-Food Science and Technology*, 43, 447-451.
- Miranda, M., Vega-Gálvez, A., López, J., Parada, G., Sanders, M., Aranda, M. (2010). Impact of air-drying temperature on nutritional properties, total phenolic content and antioxidant capacity of quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd). 32, 258–263
- Silva, E.M., Rogez, H., Larondelle, Y. (2007). Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 55, 381-387.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299: 152-178.
- Valencia, Z., Cámara, F., Ccapa, K., Catacora, P., Quispe, F. (2017). Compuestos bioactivos y actividad antioxidante de Semillas de quinua peruana (*Chenopodium quinoa* W.) *Rev. Soc. Químerú*, 83(1), 16- 29.
- Yilmaz, Y., Toledo, R.T. (2006). Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry by products and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 41-4.