



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Lugar de trabajo: Facultad de Ingeniería - UNCPBA -

**OBTENCIÓN DE INGREDIENTES ALIMENTICIOS CON CAPACIDAD
ANTIOXIDANTE MEJORADA POR APLICACIÓN DE DISTINTOS
PROCESOS A SEMILLAS DE QUINOA (*Chenopodium quinoa*)**

Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Bromatología

Lic. Ramiro Ariel Carciochi

Director de tesis: Dr. Guillermo Daniel Manrique

Consejero de estudios: Dra. Nora Slobodianik

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2014.

Obtención de ingredientes alimenticios con capacidad antioxidante mejorada por aplicación de distintos procesos a semillas de quinoa (*Chenopodium quinoa*)

Resumen

En los últimos años ha aumentado el interés en especies vegetales no gramíneas, consideradas agronómicamente como pseudocereales, cuyas semillas pueden ser utilizadas de manera similar a los granos de cereales. Tal interés se fundamenta en las excelentes propiedades nutricionales de estas especies y en su contenido de fitoquímicos con potenciales propiedades funcionales. En este contexto, existe una tendencia a nivel mundial en diseñar nuevos productos alimenticios utilizando granos ancestrales, ya sea suplementando o sustituyendo granos de cereales tradicionales. Dentro de estas especies, la quinoa (*Chenopodium quinoa*) es un cultivo con importantes propiedades nutritivas con un buen aporte de fitoquímicos antioxidantes tales como compuestos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonoides), tocoferoles, entre otros, compuestos que han demostrado tener capacidad antioxidante con un potencial efecto beneficioso para la salud.

En este contexto, en el presente trabajo se obtuvieron materias primas alimentarias a partir del grano de quinoa, cuya capacidad antioxidante resultó modificada luego de la aplicación de procesos tecnológicos y/o bioprocesos seleccionados. El objetivo final fue elaborar un producto alimenticio utilizando como ingrediente en su formulación aquella materia prima derivada de granos de quinoa procesados que resultó con el mayor aumento en la capacidad antioxidante respecto al ingrediente equivalente derivado de granos sin procesar.

En primera instancia se evaluaron y optimizaron las condiciones operativas de extracción de los compuestos fenólicos con capacidad antioxidante presentes en semillas de quinoa. Posteriormente, se evaluó el efecto de la aplicación de diferentes procesos como medios para mejorar la capacidad antioxidante de las semillas, incluyendo germinación, tratamiento térmico con calor seco, irradiación con luz UV-C y las siguientes combinaciones de los mismos: germinación seguida de tratamiento térmico y germinación seguida de irradiación con luz UV-C. Las propiedades antioxidantes de los ingredientes obtenidos luego de la aplicación de los diferentes procesos fueron monitoreadas mediante la determinación de los niveles de diferentes compuestos con actividad antioxidantes seleccionados en cada caso, incluyendo ácidos fenólicos, flavonoides, ácido ascórbico, tocoferoles, betalaínas y productos de la reacción de Maillard, como así también

mediante la evaluación de la capacidad antioxidante utilizando los ensayos de inhibición de radicales DPPH, decoloración del β -caroteno y poder reductor de los extractos. Finalmente, se seleccionó el ingrediente derivado de semillas de quinoa en el que se consiguió el máximo nivel de actividad antioxidante luego de la aplicación de un proceso, el que fue luego utilizado en la formulación de un producto alimenticio libre de gluten. En dicho producto se analizaron composición centesimal, capacidad antioxidante y grado de aceptabilidad general, y los resultados fueron contrastados con los correspondientes a los obtenidos con el producto equivalente elaborado sin el ingrediente derivado de granos tratados.

Los resultados obtenidos mostraron que las condiciones óptimas para extraer los compuestos fenólicos con actividad antioxidante incluyeron el uso de una mezcla de etanol:agua (80:20, v/v) como solvente a una temperatura de 60 °C durante 1 hora, resultando inconveniente el uso de ultrasonido. Bajo estas condiciones se realizaron los extractos a partir de los ingredientes obtenidos luego de la aplicación de los distintos procesos ya mencionados a las semillas de quinoa. En cada caso, los procesos aplicados modificaron el perfil de compuestos con capacidad antioxidante influyendo sobre los niveles de capacidad antioxidante neta. Se estudió además, la contribución de los distintos componentes analizados a la actividad antioxidante resultante en cada caso. El máximo incremento en la capacidad antioxidante de la matriz se consiguió luego de germinar los granos durante 72 h y posterior tratamiento térmico con calor seco a 145 °C durante 30 minutos. Luego de someter los granos a este proceso combinado bajo dichas condiciones, se obtuvo una harina que fue utilizada como ingrediente que sustituyó en un 30 % el componente base de la formulación de un producto alimenticio libre de gluten, el cual resultó con un perfil nutricional y actividad antioxidante mejorados en relación al producto elaborado sin dicha sustitución.

Del análisis de los resultados del presente estudio es posible establecer que la aplicación de procesos tecnológicos y/o bioprocesos seleccionados bajo condiciones experimentales controladas se presenta como una estrategia viable y eficiente para mejorar las propiedades antioxidantes de semillas como la quinoa, resultando así la posibilidad de contar con ingredientes derivados que por su contenido de compuestos con actividad antioxidante, pueden ser aptos para elaborar alimentos con potenciales propiedades funcionales y de mayor vida útil.

“¿Qué tal si empezamos a ejercer el jamás proclamado derecho de soñar? ¿Qué tal si deliramos, por un ratito? El mundo, que está patas arriba, se pone sobre sus pies:

el aire estará limpio de los venenos de las máquinas y no tendrá más contaminación que la que emana de las humanas pasiones;

la gente no será manejada por el automóvil, ni será programada por la computadora, ni será comprada por el supermercado, ni será contemplada por el televisor;

el televisor dejará de ser el miembro más importante de la familia, y será tratado como la plancha o el lavarropas;

los economistas no llamarán nivel de vida al nivel de consumo, ni llamarán calidad de vida a la cantidad de cosas;

la solemnidad se dejará de creer que es una virtud, y nadie tomará en serio a nadie que no sea capaz de tomarse el pelo;

el mundo ya no estará en guerra contra los pobres, sino contra la pobreza, y la industria militar no tendrá más remedio que declararse en quiebra;

nadie morirá de hambre, porque nadie morirá de indigestión;

la educación no será el privilegio de quienes puedan pagarla;

la justicia y la libertad, hermanas siamesas condenadas a vivir separadas, volverán a juntarse, bien pegaditas, espalda contra espalda” [...]

Eduardo Galeano. Patas arriba. La escuela del mundo al revés.

Agradecimientos

Me gustaría agradecer en primer lugar al Dr. Guillermo Manrique por haberme brindado la oportunidad de crecer como persona y como profesional, por haber confiado en mí, transmitirme sus conocimientos en investigación, sus consejos y fundamentalmente brindarme su amistad y apoyo constante para transitar lo que fue este largo camino.

Gracias también al Dr. Krasimir Dimitrov por el esmero y dedicación puesto en la investigación y por su apoyo durante mi estadía en el laboratorio ProBioGEM dentro de l'Université de Lille-1, Francia.

A la Dra. Nora Slobodianick, por su excelente predisposición y calidez para asesorarme en las cuestiones referentes al Doctorado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA.

A las autoridades de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA) y del Laboratorio ProBioGEM de l'Université de Lille-1 por haberme brindado la posibilidad de desarrollar el presente trabajo en sus instituciones. De la misma manera a las instituciones que financiaron la realización del presente trabajo: la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA) y programa Eurotango II (Erasmus Mundus – Action 2).

A las personas que integran el Departamento de Ingeniería Química por compartir conmigo el trabajo diario, especialmente a Inés, Irene, Marcela y Carmen por los buenos momentos compartidos, por brindarme su amistad, su confianza y sus consejos durante todo este tiempo.

Quiero expresar un profundo agradecimiento a mis amigos del alma que me acompañan desde hace tiempo y es un gusto enorme poder estar rodeado de personas así. En primera instancia a Leandro <Le Docteur Galván> por estar SIEMPRE presente, a Guille, Leo, Toto y Coccocho por los momentos compartidos. A todas las personas que conocí en el transcurso de mi doctorado y nos hicimos cómplices para estar presentes de alguna manera: Seba <el tanguero> durante mi semestre en Buenos Aires, Arsen <mon compagnon de voyage en Europe>, David, Matías, Toni y Hugues.

Finalmente quiero agradecer a mi hermosa familia, la que me acompaña desde siempre en todo lo que me propongo, la que a la distancia estuvo más presente que nunca. A mis padres por brindarme amor y apoyo incondicional, mostrándome siempre los valores y el ejemplo del trabajo. A mis hermanos, cuñadas y especialmente a mi ahijada Matilde, con quienes comparto los momentos más felices.

A Alix, mi compañera de vida, por su gran amor, compañía y paciencia, por acompañarme en este camino que transitamos juntos.

A todos, de corazón... GRACIAS !!!

A mis padres, Cristina y José

Lista de abreviaturas

AA	actividad antioxidante
AAPH	2,2'-azobis (2-amidinopropano) clorhidrato
ABTS ⁺	radical 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazol-6-sulfonato)
ANOVA	Análisis de varianza
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
AOCS	American Oil Chemists' Society
b.s.	base seca
BHA	butilhidroxianisol
BHT	butilhidroxitolueno
CCFD	diseño central compuesto centrado en las caras (<i>central composite face-centered design</i>)
CFI	compuestos fluorescentes intermedios
CFT	compuestos fenólicos totales
CUPRAC	<i>Cupric Reducing Antioxidant Capacity</i>
d	diámetro
DPPH	radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
EAG	equivalentes de ácido gálico
EAM	error absoluto medio
EQ	equivalentes de quercetina
FOSHU	alimentos para usos específicos de salud (<i>Foods for specified health use</i>)
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
FT	flavonoides totales
g	gramo
GP	galato de propilo
h	hora

HO·	radical hidroxilo
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
Ivg	índice de velocidad de germinación
kg	kilogramo
kHz	kilohertz
kJ	kilojoule
L	litro
LDL	lipoproteína de baja densidad (<i>Low density lipoprotein</i>)
LOO·	radical lipídico peroxilo
M	molar
m ²	metro cuadrado
MD	molécula diana
mg	miligramo
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
MPa	Megapascal
RM	reacción de Maillard
MSR	metodología de superficie de respuesta
mV	milivolt
nm	nanómetro
NO·	óxido nítrico
O ₂ ^{•-}	anión superóxido
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>
PR	poder reductor
PRM	productos de la reacción de Maillard

r	coeficiente de correlación de Pearson
R ²	coeficiente de determinación
ROO·	radical peroxilo
rpm	revoluciones por minuto
seg	segundo
TAH	transferencia de átomos de hidrógeno
TBHQ	<i>ter</i> -butil hidroquinona
TE	transferencia de electrones
TEAC	capacidad antioxidante en equivalentes Trolox
TRAP	<i>Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter</i>
US	ultrasonido
UV	luz ultravioleta
W	watt
°C	grado centígrado
μL	microlitro
λ _{Em}	longitud de onda de emisión
λ _{Ex}	longitud de onda de excitación
PAL	fenilalanina amonio liasa
CHS	chalcona sintasa

Índice

Capítulo I. INTRODUCCION	1
I.1. <i>Alimentos funcionales</i>	2
I.2. <i>Compuestos antioxidantes</i>	5
I.2.1. Clasificación de los antioxidantes	5
I.2.1.1. Clasificación según el tipo de acción	5
I.2.1.2. Clasificación según origen	6
I.2.2. Actividad biológica de los compuestos antioxidantes naturales	7
I.2.3. Principales compuestos antioxidantes de origen vegetal.....	8
I.2.3.1. Tocoferoles y tocotrienoles.....	9
I.2.3.2. Ácido ascórbico	10
I.2.3.3. Carotenoides	12
I.2.3.4. Compuestos fenólicos	13
I.2.3.4.1. Ácidos fenólicos	15
I.2.3.4.2. Estilbenos	16
I.2.3.4.3. Flavonoides	17
I.2.3.4.4. Lignanós	21
I.2.3.4.5. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos.....	21
I.3. <i>La quinoa</i>	24
I.3.1. Características generales. Ventajas del cultivo	25
I.3.2. Usos	27
I.3.3. Aspectos nutricionales.....	28
I.3.3.1. Factores antinutricionales	29
I.3.4. Compuestos fenólicos en el grano de quinoa.....	31
I.4. <i>Extracción de biomoléculas con capacidad antioxidante a partir de fuentes vegetales</i>	32
I.4.1. Principio y mecanismo de la extracción sólido-líquido.....	32
I.4.2. Métodos de extracción sólido-líquido	33
I.4.2.1. Métodos clásicos	34
I.4.2.2. Métodos alternativos	34
I.4.2.2.1. Extracción asistida por ultrasonido (EAU).....	34
I.4.2.2.2. Extracción asistida por microondas (EAM)	35
I.4.2.2.3. Extracción con fluidos supercríticos (EFS).....	36
I.4.3. Parámetros que influyen en la extracción sólido-líquido	37
I.4.3.1. Naturaleza del solvente.....	37
I.4.3.2. Tamaño de partícula.....	38
I.4.3.3. Temperatura.....	39
I.4.3.4. Agitación.....	39
I.4.3.5. pH de extracción.....	40
I.4.3.6. Relación sólido/solvente	40
I.4.3.7. Tiempo de extracción	40
I.5. <i>Actividad antioxidante</i>	41
I.5.1. Métodos para evaluar la actividad antioxidante in vitro	42
I.5.1.1. Ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (TAH)	42

1.5.2.2. Ensayos basados en la transferencia de electrones (TE)	43
1.5.2 Factores que influyen sobre la actividad antioxidante de los extractos	45
1.5.2.1. Variedad, planta y estado de madurez.....	45
1.5.2.2. Composición del extracto	45
1.5.2.3. Condiciones de almacenamiento de los extractos	46
1.5.2.4. Accesibilidad a las zonas activas de oxidación	46
1.6. <i>Procesos seleccionados con potencial aplicación en la mejora de propiedades de alimentos</i>	47
1.6.1. Consideraciones generales de los procesos	47
1.6.1.1. Germinación	47
1.6.1.2 Tratamiento térmico	51
1.6.1.3. Irradiación con luz ultravioleta (UV).....	54
1.6.2. Efectos de los procesos seleccionados sobre las propiedades antioxidantes en alimentos	56
1.6.2.1. Aplicación de los procesos seleccionados como estrategias para mejorar las propiedades antioxidantes del grano de quinoa.....	59
1.7. <i>Consideraciones finales</i>	62
1.8. HIPÓTESIS DE TRABAJO	64
1.9. OBJETIVO GENERAL.....	64
1.9.1. Objetivos particulares	64
Capítulo II. MATERIALES Y MÉTODOS	65
II. 1. <i>MATERIALES</i>	66
II.1.1 Material vegetal.....	66
II.1.2 Reactivos.....	66
II. 2. <i>MÉTODOS</i>	66
II.2.1. Composición centesimal	66
II.2.1.1. Determinación del contenido de humedad	66
II.2.1.2. Determinación del contenido de proteínas.....	67
II.2.1.3. Determinación de grasas totales.....	68
II.2.1.4. Determinación del contenido de cenizas	68
II.2.1.5. Determinación de fibra dietaria total.....	69
II.2.2. Metodología relativa al proceso de extracción de compuestos fenólicos.....	70
II.2.2.1. Pretratamiento de las muestras.....	70
II.2.2.2. Extracción sólido-líquido sin y con asistencia de ultrasonido	71
II.2.2.3. Diseño experimental y análisis estadístico	72
II.2.2.4. Evaluación del desempeño de la extracción sólido-líquido.....	74
II.2.2.4.1. Rendimiento total	75
II.2.2.4.2. Rendimiento en compuestos fenólicos totales.....	75
II.2.2.4.3. Pureza del extracto en compuestos fenólicos	75
II.2.2.5. Procedimiento de extracción	75
II.2.3. Metodología relativa a la caracterización de los extractos	76
II.2.3.1. Determinación de la materia seca en los extractos	76
II.2.3.2. Determinación de compuestos fenólicos totales (CFT).....	76
II.2.3.3. Determinación de compuestos flavonoides totales (FT).....	77
II.2.3.4. Determinación de betalaínas totales	78

II.2.3.5. Determinación de la actividad antioxidante	79
II.2.3.5.1. Método del 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH).....	79
II.2.3.5.2. Método de la decoloración del β -caroteno	80
II.2.3.5.3 Método del poder reductor	81
II.2.3.6. Determinación cualicuantitativa de compuestos fenólicos	82
II.2.3.7. Determinación de tocoferoles.....	83
II.2.3.8. Determinación de ácido ascórbico	84
II.2.3.9. Extracción y cuantificación de los productos de la reacción de Maillard (PRM)	86
II.2.3.9.1. Compuestos fluorescentes intermedios (CFI)	86
II.2.3.9.2. Compuestos finales de la reacción de Maillard (melanoidinas)	88
II.2.4. Metodología relativa a los procesos aplicados a la semilla de quinoa	89
II.2.4.1. Germinación	89
II.2.4.1.1. Estudio preliminar de germinación	89
II.2.4.1.2. Proceso de germinación y análisis de los materiales obtenidos	90
II.2.4.1.3. Análisis estadístico	92
II.2.4.2. Tratamiento térmico	92
II.2.4.2.1. Procesado térmico de semillas de quinoa	92
II.2.4.2.2. Procesado térmico de harina de quinoa germinada	93
II.2.4.2.3. Análisis de los materiales obtenidos luego del procesamiento	93
II.2.4.2.4. Análisis estadístico	94
II.2.4.3. Irradiación con luz UV-C	94
II.2.4.3.2. Procedimiento de irradiación UV-C	94
II.2.4.3.3. Medición de las dosis de radiación UV	95
II.2.4.3.4. Estudios preliminares de irradiación sobre semillas y brotes	98
II.2.4.3.4.1. Irradiación de semillas remojadas	98
II.2.4.3.4.2. Irradiación de brotes	99
II.2.4.3.5. Irradiación UV-C durante la germinación y preparación de las muestras	100
II.2.4.3.6. Análisis estadístico	101
II.2.5. Propuesta de elaboración de un alimento enriquecido en compuestos antioxidantes	102
II.2.5.1. Elaboración de tapas de alfajores	102
II.2.5.2. Preparación de las muestras	103
II.2.5.3. Análisis estadístico	103

Capítulo III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN **105**

II.1. <i>Análisis composicional del grano de quinoa</i>	106
III.2. <i>Extracción de compuestos fenólicos del grano de quinoa</i>	108
III.2.1. Ensayos de extracción preliminares: efecto de los parámetros operacionales.....	109
III.2.1.1. Efecto de la temperatura	109
III.2.1.2. Efecto de la relación sólido/solvente	111
III.2.1.3. Efecto del solvente	112
III.2.1.4. Efecto del tamaño de partícula	114
III.2.1.5. Efecto de la potencia de ultrasonido.....	115
III.2.1.6. Conclusiones.....	117
III.2.2. Optimización de la extracción de compuestos fenólicos antioxidantes a partir de semillas de quinoa	117

III.2.2.1. Efecto de los parámetros seleccionados sobre los rendimientos de CFT y FT	118
III.2.2.2. Efecto de los parámetros seleccionados sobre la actividad antioxidante.....	129
III.2.2.3. Correlación entre actividad antioxidante y rendimientos de CFT y FT	134
III.2.2.4. Efecto de los parámetros seleccionados sobre el rendimiento y la pureza de los extractos	136
III.2.2.5. Selección de las condiciones óptimas de extracción	140
III.2.2.6. Análisis cromatográfico de los extractos.....	141
III.2.2.7. Conclusiones.....	142
III.3. <i>Efecto de la germinación sobre las propiedades antioxidantes del grano de quinoa</i>	144
III.3.1. Determinación de las condiciones de germinación	144
III.3.2. Efecto de la germinación sobre la composición centesimal de la quinoa	151
III.3.3. Efecto de la germinación sobre el contenido de compuestos fenólicos de la quinoa	152
III.3.4. Efecto del proceso de germinación sobre la actividad antioxidante	159
III.3.5. Efecto de la germinación sobre el contenido de ácido ascórbico	162
III.3.6. Efecto de la germinación sobre el contenido de tocoferoles	165
III.3.7. Análisis multivariado de los resultados del tratamiento de germinación aplicado a semillas de quinoa.....	168
III.3.8. Conclusiones	170
III.4. <i>Proceso térmico</i>	171
III.4.1. Procesado térmico de semillas de quinoa	171
III.4.1.1. Efecto del tratamiento térmico sobre el contenido de compuestos fenólicos	172
III.4.1.2. Efecto del tratamiento térmico sobre los productos de la reacción de Maillard (PRM)	181
III.4.1.2.1 Compuestos fluorescentes intermedios (CFI)	182
III.4.1.2.2 Compuestos finales de la reacción de Maillard (melanoidinas)	183
III.4.1.3. Efecto del tratamiento térmico sobre el poder reductor	184
III.4.1.4. Efecto del tratamiento térmico sobre la actividad antioxidante	185
III.4.1.5. Análisis multivariado de los resultados del tratamiento térmico aplicado a semillas de quinoa.....	188
III.4.2. Procesado térmico de harina de quinoa germinada.....	190
III.4.2.1. Análisis multivariado de los resultados del tratamiento térmico aplicado a harina de quinoa germinada	195
III.4.3. Conclusiones	197
III.5. <i>Irradiación con luz UV</i>	199
III.5.1. Estudios preliminares de irradiación sobre semillas y brotes.....	199
III.5.2. Irradiación UV-C durante la germinación de semillas de quinoa.....	202
III.5.2.1. Efecto sobre el contenido de CFT, FT y betalaínas totales	203
III.5.2.3. Efecto sobre la actividad antioxidante	208
III.5.3. Integración de los resultados de irradiación UV-C durante la germinación de semillas de quinoa	209
III.5.4. Conclusiones	210
III.6. <i>Comparación de los procesos aplicados</i>	211
III.7. <i>Elaboración de tapas de alfajores de almidón de maíz enriquecidas en compuestos antioxidantes</i> . 212	
III.7.1. Caracterización composicional de los productos formulados	213
III.7.2. Contenido de CFT, FT, AA y melanoidinas en el producto elaborado.....	216

III.7.3. Conclusiones	219
Capítulo IV. CONCLUSIONES GENERALES	220
Capítulo V. REFERENCIAS	224

Capítulo I. INTRODUCCION

I.1. Alimentos funcionales

El concepto de alimentos funcionales surge en Japón en la década de los ochenta, donde las autoridades sanitarias advirtieron que los gastos de salud generados por la mayor esperanza de vida de la población podían controlarse garantizando una mejor calidad de vida. Surge así el concepto de "Alimentos para usos específicos de salud" (*Foods for specified health use* o FOSHU) que hace referencia a alimentos formulados con ingredientes tales, que además de su aporte nutricional contribuyen con componentes bioactivos que desempeñan roles específicos en la fisiología humana, reduciendo el riesgo de contraer enfermedades (Arai, 1996). Así, la ciencia de la nutrición ha evolucionado a partir de premisas clásicas, que buscan evitar las deficiencias de nutrientes y asegurar un aporte nutricional básico en la dieta, a conceptos de nutrición "positiva" u "óptima", basados en investigaciones actuales que se centran específicamente en la identificación de compuestos biológicamente activos presentes en los alimentos que puedan mejorar las condiciones físicas y mentales, así como reducir el riesgo de contraer enfermedades (Ashwell, 2005). Se ha descubierto que muchos alimentos tradicionales, como frutas, verduras, granos enteros y leche contienen componentes que pueden resultar beneficiosos para la salud. Además de éstos, se desarrollan en forma creciente nuevos alimentos que añaden o incrementan estos componentes beneficiosos por las ventajas que su incorporación en la dieta suponen para la salud psicofísica.

Si bien no existe una definición ni legislación mundialmente consensuada para catalogar este tipo de alimentos, aquellas generadas por organismos expertos coinciden en que para ser considerado funcional, un alimento (natural o procesado) debe contener algún componente (sea o no un nutriente) que beneficie una o un número limitado de funcionalidades en el organismo, proporcionando salud (entendida como reducción del riesgo de contraer una enfermedad) y/o

bienestar psicofísico, además de sus efectos nutritivos intrínsecos (Ashwell, 2005; Hasler y Brown, 2009). Dicho componente puede o no tener valor nutritivo y estar presente en proporciones de macro o microcomponente. Así, la fibra alimentaria y los compuestos que intervienen en el metabolismo secundario de plantas (fitoquímicos) son ejemplos de macro y microcomponentes sin valor nutritivo intrínseco, respectivamente, mientras que ciertos minerales y vitaminas son microcomponentes con valor nutritivo, que presentes en proporciones adecuadas en la dieta, se han relacionado con la reducción en la incidencia de determinadas patologías (Roberfroid, 2000).

Desde un punto de vista práctico, un alimento funcional puede ser:

- Un alimento natural en el que el nivel de uno de sus componentes ha sido incrementado mediante condiciones especiales de cultivo.
- Un alimento al que se le ha añadido un componente para que produzca efectos positivos en la salud (por ejemplo, bacterias probióticas de efecto benéfico probado sobre la salud intestinal).
- Un alimento del cual se ha eliminado un componente para que produzca un menor efecto adverso sobre la salud (por ejemplo, la disminución de ácidos grasos saturados o de sodio).
- Un alimento en el que la naturaleza de uno o más de sus componentes ha sido modificada químicamente con el fin de mejorar la salud (por ejemplo, los hidrolizados proteicos adicionados en los preparados para lactantes para reducir el riesgo de alergenicidad).
- Un alimento en el que la biodisponibilidad de uno o más de sus componentes ha sido aumentada para mejorar la asimilación de un componente beneficioso.
- Cualquier combinación de las posibilidades anteriores.

De esta manera, algunos alimentos funcionales se han diseñado para satisfacer ciertas funciones del organismo, apuntando a diferentes áreas de la fisiología humana, entre ellas:

- Defensa contra el estrés oxidativo: Los sistemas redox y antioxidantes del organismo requieren una ingesta balanceada de (pro) vitaminas antioxidantes como así también de

componentes alimentarios no vitamínicos, tales como polifenoles y otros antioxidantes naturales de origen vegetal. Las actividades redox y la protección antioxidante son importantes para las células y tejidos y su desequilibrio se asocia con la aparición de diversas enfermedades (Espin y Tomás-Barberán, 2005).

- **Funciones gastrointestinales:** Estas funciones incluyen aquellas que están asociadas a la microflora bacteriana en el colon, a la modulación en la actividad endocrina del tracto gastrointestinal, al control de la biodisponibilidad de nutrientes (en particular de minerales) y al control del tiempo de tránsito (Cummings y col., 2004).
- **Metabolismo de macronutrientes:** Este punto hace referencia particularmente a la modulación hormonal del metabolismo de carbohidratos, aminoácidos y ácidos grasos con el objetivo de reducir el riesgo de efectos patológicos asociados con la resistencia a la insulina y enfermedades cardiovasculares. (Riccardi, 2004; Mensink y col., 2003)
- **Desarrollo normal del feto:** El alimento de la madre y del feto son objetivos en algunos alimentos funcionales, por ejemplo la importancia del ácido fólico en la dieta de mujeres embarazadas (Recio y López Fandiño, 2005).
- **Salud ósea y osteoporosis:** Es un área de mejora de alimentación adecuada con el fin de alcanzar un contenido de calcio óptimo en los huesos (Prentice y col., 2003).
- **Salud mental y rendimiento:** Muchos compuestos tienen influencia en estos aspectos. Así por ejemplo algunos carbohidratos pueden afectar los niveles de serotonina o bien la cafeína mantiene el estado de alerta, ya que es un competidor antagonista de los receptores de adenosina (Westenhoefer y col., 2004).

Una de las áreas más promisorias para el desarrollo de alimentos funcionales se fundamenta en la posibilidad de modular los sistemas redox y antioxidante del organismo (Roberfroid, 2000). Por esta razón, en la actualidad muchos alimentos funcionales tienen como finalidad incrementar el aporte de antioxidantes naturales en la dieta. En este contexto, la adición de extractos vegetales ricos en compuestos fenólicos ha sido propuesta como una estrategia factible para el desarrollo de alimentos funcionales con una actividad antioxidante incrementada (Larrosa y col., 2002). De hecho, en el campo del desarrollo de nuevos ingredientes se está produciendo un aumento en la

producción de este tipo de extractos vegetales en los cuales los compuestos bioactivos son aislados y concentrados para su uso como suplementos y/o para la formulación de alimentos funcionales (Pszczola, 2003).

I.2. Compuestos antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias capaces de prevenir o retardar las oxidaciones catalíticas de sustratos oxidables y el enranciamiento natural o inducido por acción de diversos agentes, tales como aire, luz, calor, metales, etc. (Madrid y Cenzano, 2000). Estas propiedades explican el gran interés en su utilización como aditivos en la industria alimentaria, aunque también en la industria cosmética y farmacéutica.

I.2.1. Clasificación de los antioxidantes

Dos de los criterios más utilizados para clasificar los compuestos antioxidantes son: según el tipo de acción y según origen de los mismos.

I.2.1.1. Clasificación según el tipo de acción

Mediante esta clasificación convencional los antioxidantes se han dividido básicamente en dos grupos; los antioxidantes primarios o *chain-breaking* y los antioxidantes secundarios o preventivos. Así, las moléculas capaces de captar radicales libres durante la iniciación o propagación del proceso de oxidación, son consideradas antioxidantes primarios, mientras que aquellas que no están implicadas en la captura directa de radicales libres, se consideran antioxidantes secundarios. Éstos últimos pueden quelar iones metálicos (catalizadores de reacciones que generan radicales libres), secuestrar oxígeno, transformar hidroperóxidos en especies no radicalarias, absorber la radiación UV o desactivar el oxígeno singlete (Pokorny, 2007).

I.2.1.2. Clasificación según origen

De acuerdo a este criterio, los antioxidantes pueden ser: i) sintéticos: cuando son obtenidos por vías químicas *in vitro* o, ii) naturales: cuando se extraen de fuentes naturales. Entre los antioxidantes sintéticos se encuentran aquellos que son análogos a los naturales (ácido cítrico, ácido ascórbico, tocoferoles, carotenos, etc.), como también otros que no tienen análogos en el medio natural. En la industria se utilizan actualmente tanto unos como otros aunque sólo unos pocos antioxidantes sintéticos se emplean en los alimentos, ya que es necesario comprobar la ausencia de toxicidad y actividad carcinogénica de sus formas oxidadas y de sus productos de reacción con los constituyentes de los alimentos. El butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), galato de propilo (GP) y *ter*-butil hidroquinona (TBHQ) son los antioxidantes sintéticos más frecuentemente empleados para la conservación de alimentos. Los tocoferoles también se emplean como antioxidantes alimentarios, disminuyendo su efectividad en el orden $\alpha > \beta > \gamma > \delta$.

Aunque los mecanismos de acción de antioxidantes sintéticos y naturales pueden ser los mismos, existe una tendencia a evitar o minimizar el uso de sustancias sintéticas como aditivos alimentarios debido, por un lado, a la creciente concientización de los consumidores respecto a cuestiones de seguridad y toxicidad alimentaria, en particular a la existencia de cierta controversia basada en estudios sobre los posibles efectos tóxicos del BHA y BHT (Thompson y Moldeus, 1988; Safer y Al-Nughamish, 1999). Por otro lado, los antioxidantes sintéticos poseen una menor solubilidad en agua y en emulsiones (las cuales son muy frecuentes en sistemas alimentarios), en comparación con los antioxidantes naturales que poseen un amplio intervalo de solubilidades (Frankel, 1998; Wanasundara y Shahidi, 1998; Sherwin, 1990), razón por la cual se limita su aplicabilidad.

Como consecuencia, dado que los antioxidantes de origen natural constituyen *a priori* una alternativa más saludable y segura que los antioxidantes sintéticos, en los últimos años muchos estudios se han dedicado a identificar sustancias naturales con capacidad antioxidante, con el fin de reducir al mínimo el consumo de antioxidantes sintéticos. Sin embargo, la inocuidad para la salud de los compuestos naturales no debería darse por supuesta, siendo necesario el estudio de los posibles efectos tóxicos de las sustancias naturales aisladas y añadidas como sustancias puras a los alimentos (Pokorny y Parkányiová, 2004).

1.2.2. Actividad biológica de los compuestos antioxidantes naturales

Un número de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno se generan de forma natural durante el metabolismo celular. Estas especies se caracterizan por presentar un electrón desapareado en su orbital externo, lo que les otorga una configuración altamente inestable, tal es el caso del anión radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo ($HO\cdot$), radical peroxilo ($ROO\cdot$), óxido nítrico ($NO\cdot$), entre otros (Prior y Cao, 2000). Estos radicales libres tienden a reaccionar rápidamente con otros compuestos del entorno en el que se encuentran, tratando de capturar sus electrones con el fin de adquirir estabilidad. En general, los radicales libres reactivos atacan preferentemente moléculas que poseen electrones accesibles, las que se convierten a su vez, en nuevos radicales libres, dándose origen así a una reacción en cadena. Una vez iniciado este proceso, puede desencadenarse una cascada de reacciones, como la que tiene lugar durante la peroxidación lipídica, que resulta en la desestabilización y desintegración de las membranas celulares y/o la oxidación de otros componentes celulares como proteínas y ADN (Halliwell y col., 1995). Numerosos estudios epidemiológicos han relacionado el daño oxidativo generado con el incremento del riesgo de aparición de diversas enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer y enfermedades neurodegenerativas (Ames, 1983; Adom y Liu, 2002).

En particular, los beneficios ligados al consumo de frutas, hortalizas y granos, se han puesto de manifiesto por diferentes estudios epidemiológicos, sugiriendo que las propiedades beneficiosas para la salud que ejercen estos alimentos superan las que cabrían esperar debido al aporte de sus nutrientes, vitaminas y minerales, por lo que se ha planteado la hipótesis que estas propiedades beneficiosas adicionales se deben a los diversos compuestos bioactivos que contienen estos alimentos. Estos fitoquímicos naturales actúan como antioxidantes al inhibir o retrasar la oxidación de otras moléculas mediante la inhibición de la propagación de la reacción de oxidación, como es el caso de los compuestos fenólicos y otros antioxidantes incorporados en la dieta como el ácido ascórbico, los tocoferoles y los carotenoides (Lee y col., 2004; Kaur y Kapoor, 2001; Shi y col., 2001). En particular, los compuestos fenólicos han recibido especial atención debido a que, además de su actividad antioxidante, se ha demostrado que ejercen otras actividades fisiológicas, tales como acción antibacterial, antiinflamatoria, antialérgica, hepatoprotectora, antitrombótica, antiviral, anticarcinogénica y vasodilatadora (Cao y col., 1997; Middleton y col., 2000). Estas evidencias han conducido a que se correlacione la actividad antioxidante de estos alimentos vegetales con sus propiedades beneficiosas para la salud. Como resultado, en los últimos veinte años se ha producido un aumento considerable en el número de artículos científicos publicados sobre actividad antioxidante de distintos alimentos, efectos del procesamiento y conservación, y su relación con la incidencia de patologías asociadas al estrés oxidativo (Bravo 1998; Kaur y Kapoor, 2001; Yao y col., 2004; Huang y col., 2010; Del Rio y col., 2013; Mushtaq y Wani, 2013; Tang y col., 2014).

1.2.3. Principales compuestos antioxidantes de origen vegetal

Los antioxidantes naturales pueden ser de origen animal o vegetal. Los antioxidantes de origen animal son principalmente proteínas o aminoácidos (Ericsson, 2002). Las plantas, por su parte, ofrecen una amplia gama de compuestos de alto y bajo peso molecular con propiedades

antioxidantes, entre los que se destacan los tocoferoles, el ácido ascórbico, los carotenoides y los compuestos fenólicos (Lee y col., 2004; Ericsson, 2002; Hagerman y col., 1998).

Cada especie vegetal posee una composición de fitoquímicos característica, con diversas estructuras presentes, capaces de ofrecer diferentes tipos y grados de protección. En particular, los granos y sus productos derivados contienen fitoquímicos únicos que complementan los de las frutas y verduras cuando se consumen juntos. Por ejemplo, algunas clases de compuestos fenólicos encontradas en los granos no están presentes en cantidades significativas en algunas frutas y vegetales, como es el caso del ácido ferúlico (Naczki y Shahidi, 2006).

A continuación se presentan los principales compuestos o familias de compuestos antioxidantes de origen vegetal y sus mecanismos de acción antioxidante. Se dará especial atención al grupo de los compuestos fenólicos, debido a que la mayoría de los compuestos antioxidantes naturales estudiados con aplicaciones en la industria alimentaria pertenecen a este grupo.

1.2.3.1. Tocoferoles y tocotrienoles

Son compuestos sintetizados por las plantas y considerados como los antioxidantes liposolubles más abundantes, protegiendo la porción lipídica de las células, especialmente las membranas celulares. Los tocoferoles consisten en un anillo de cromano con un hidroxilo en la posición 6 y una cadena lateral saturada. Los tocotrienoles tienen la misma estructura pero se diferencian por la presencia de tres dobles enlaces en posición 3', 7' y 11' de la cadena lateral hidrofóbica (Figura 1.1). Según el número y posición de los grupos metilo unidos a las posiciones 5, 7, y 8 del anillo aromático, se diferencian los isómeros α , β , γ y δ -tocoferol y tocotrienol. Todos estos compuestos tienen actividad de vitamina E, siendo el α -tocoferol es el más abundante y el de mayor actividad biológica de todos los isómeros. (Wennermark y col., 1994; Gregory, 1996).

Los tocoferoles son constituyentes naturales de las membranas biológicas mientras que los tocotrienoles han sido identificados en tejidos de algunos vegetales como repollo, brócoli, granos de cereales y nueces (Piironen y col., 1986). Los mecanismos antioxidantes de los tocoferoles incluyen la transferencia de un átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo de la posición 6 del anillo cromano, y el secuestro de oxígeno singlete y otras especies reactivas al reaccionar con radicales lipídicos peroxilo ($\text{LOO}\cdot$) y producir una tocoferil-quinona estable como producto final. Mediante su actividad antioxidante, los tocoferoles han sido asociados con la reducción de enfermedades cardiovasculares al interferir con la oxidación del LDL (Stampfer y col., 1993), retrasar la enfermedad de Alzheimer y prevenir algunos tipos de cáncer (Meydani, 2000).

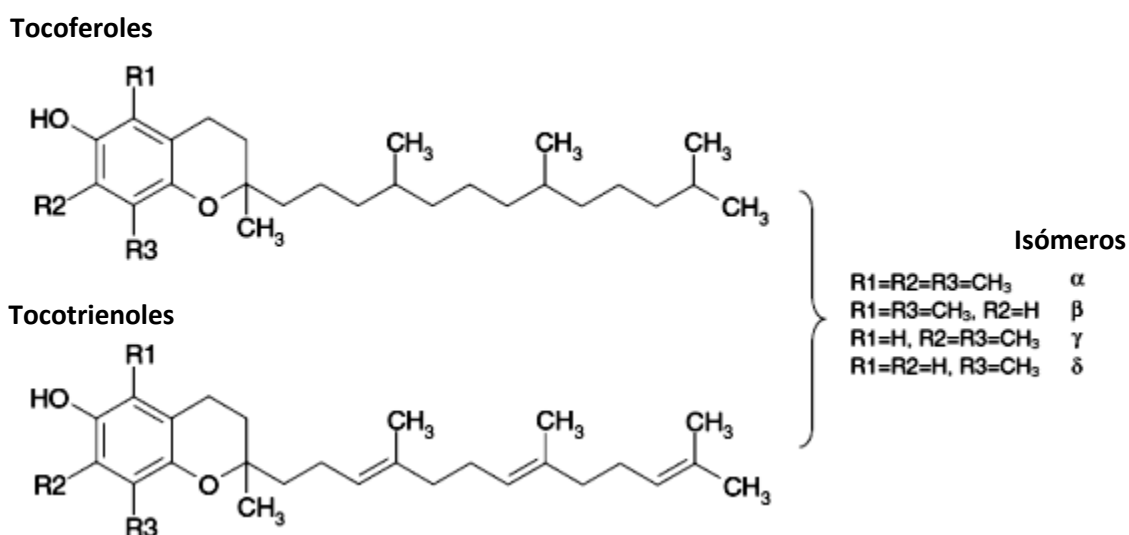


Figura 1.1. Estructuras químicas de tocoferoles y tocotrienoles.

I.2.3.2. Ácido ascórbico

La vitamina C, o ácido L-ascórbico, es un antioxidante hidrosoluble con estructura de lactona de 6 carbonos y un grupo 2,3-enediol. La actividad antioxidante es causada por la facilidad de pérdida de los electrones de dicho grupo, siendo así muy efectivo en sistemas biológicos. Cuando cede el primer átomo de hidrógeno y un electrón, se transforma en ácido semi-dehidroascórbico y luego

en ácido dehidroascórbico al ceder el segundo átomo de hidrógeno (Figura 1.2). El ácido dehidroascórbico posee actividad de vitamina C (Lee y col., 2004).

Los mecanismos antioxidantes del ácido ascórbico se basan en la donación de un átomo de hidrógeno a los radicales lipídicos, secuestro del oxígeno singlete y eliminación del oxígeno molecular. El ácido ascórbico es un excelente dador de electrones debido al bajo potencial de reducción estándar (282 mV), la generación del ácido semi-dehidroascórbico relativamente estable y la fácil transformación del ácido dehidroascórbico a ácido ascórbico (Rumsey y col., 1999).

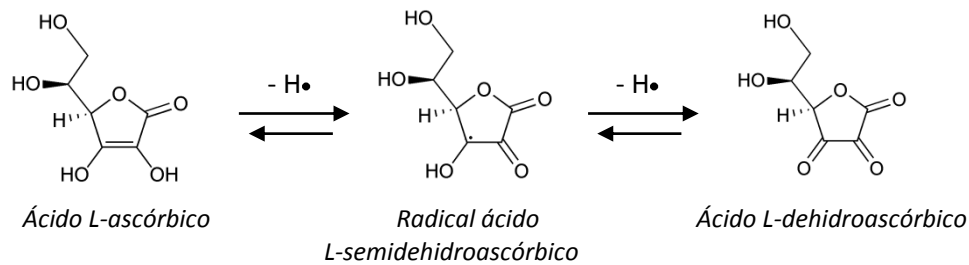


Figura 1.2. Oxidación secuencial del ácido L-ascórbico.

Un mecanismo de sinergismo antioxidante bien conocido del ácido ascórbico es la regeneración de radicales tocoferoxilo a tocoferoles. El ácido ascórbico puede donar un átomo de hidrógeno a un radical tocoferoxilo a razón de 2×10^5 M/s debido a la diferencia de potencial de reducción que existe entre éstos (282 mV y 480 mV, respectivamente). El grupo fenol del tocoferol se localiza cerca de la interfase existente entre una membrana biológica y la fase acuosa del medio exterior, desde donde el ácido ascórbico puede acceder fácilmente al sitio activo antioxidante de los tocoferoles para regenerarlos (Buettner y Jurkiewicz, 1996).

I.2.3.3. Carotenoides

Los carotenoides comprenden un grupo de moléculas tetraterpenoides. La estructura básica de los carotenoides consiste en unidades isoprenoides unidas ya sea, cabeza con cola o cola con cola. Hay principalmente 2 tipos de carotenoides: carotenos y xantofilas. Los carotenos son carotenoides hidrocarbonados y las xantofilas contienen oxígeno en su molécula, formando parte de grupos hidroxilo, metoxilo, carboxilo, ceto o epoxi. El licopeno y β -caroteno son carotenos típicos, mientras que la luteína y la astaxantina son xantofilas típicas (Figura 1.3). Las estructuras de los carotenoides pueden ser acíclicas, monocíclicas o bicíclicas. Por ejemplo, el licopeno es acíclico, el γ -caroteno es monocíclico y tanto el α como el β -caroteno son carotenoides bicíclicos (deMan, 1999). Los carotenoides presentes en los tejidos de plantas poseen sus dobles enlaces conjugados y, por lo general, se encuentran en la forma *trans*.

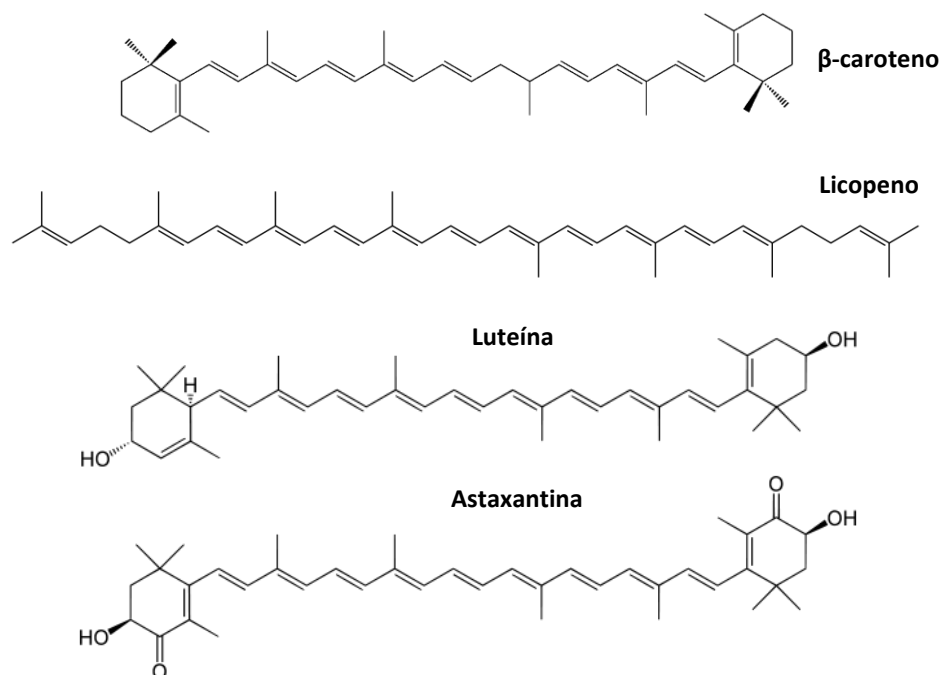


Figura 1.3. Estructuras de algunos carotenoides prevalentes.

Respecto a la actividad antioxidante de los carotenoides, ésta dependerá de los potenciales redox de los radicales libres y de la estructura química del carotenoide implicado, siendo posible que

éste transfiera a los radicales tanto átomos de hidrógeno como electrones (Edge y col., 1997). Por otra parte se ha observado que los carotenoides son inhibidores muy eficientes de oxígeno singlete en los sistemas biológicos y que la tasa de secuestro de oxígeno singlete depende del número de dobles enlaces conjugados y del tipo y número de grupos funcionales localizados en la estructura de anillo de las moléculas (Beutner y col., 2000).

Numerosos estudios han demostrado el potencial antioxidante de los carotenoides para la prevención de enfermedades relacionadas con el envejecimiento iniciadas por radicales libres, tales como aterosclerosis, cataratas, degeneración macular y esclerosis múltiple. El licopeno, principal carotenoide del tomate y productos derivados, tiene varios efectos sobre la salud, incluyendo la disminución del desarrollo de ciertos tipos de cáncer, como cáncer de colon, próstata, rectal, estómago, entre otros (Giovannucci, 1999). El licopeno y β -caroteno han mostrado inhibir la formación de productos oxidados de colesterol LDL, los cuales se asocian con la enfermedad cardíaca coronaria (Weisburger, 1999). El β -caroteno está implicado en la protección de la piel contra los efectos deletéreos de la luz solar (Lee y col., 2004).

I.2.3.4. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos constituyen un amplio grupo de metabolitos secundarios sintetizados por las plantas durante su desarrollo normal y en respuesta a condiciones de estrés causada por agentes bióticos (patógenos, herbívoros, etc.) y abióticos (radiación ultravioleta, sequía, etc.) (Naczki y Shahidi, 2006). Químicamente son estructuras formadas por un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo, siendo frecuente encontrarlos naturalmente conjugados con uno o más residuos de azúcar, aunque en ocasiones pueden encontrarse unidos a otros ácidos, aminas, lípidos y a otros compuestos fenólicos (Bravo y Saura-Calixto, 1998).

El perfil de compuestos fenólicos en las plantas es muy diverso, dependiendo de la especie vegetal, la variedad, la parte de la planta considerada (semilla, fruto, tallo, hojas, etc.), las condiciones agroclimáticas de cultivo, el grado de maduración, como así también de aspectos tecnológicos relacionados con el procesamiento y almacenamiento, entre otros. (Naczki y Shahidi, 2006).

Se han llegado a identificar más de 8.000 compuestos fenólicos con estructura muy variada, por lo que su clasificación es una tarea compleja. Una de las más utilizadas es la propuesta por Harborne, (1989) que clasifica estos compuestos en grupos basados en el número de carbonos en la molécula (Tabla 1.1.). De esta manera, los compuestos fenólicos comprenden desde moléculas simples, como los ácidos benzoicos hasta polímeros complejos como los taninos condensados. Cada una de las familias agrupa un número de compuestos más o menos variado, siendo el grupo de los flavonoides uno de los más estudiados. A continuación se describen brevemente los grupos de compuestos fenólicos de mayor importancia en alimentos.

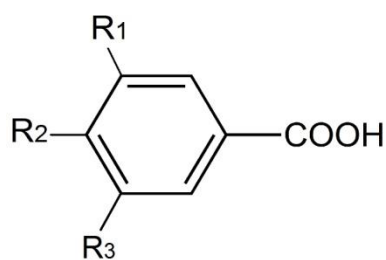
Tabla 1.1. Clasificación de los compuestos fenólicos

Estructura	Clase
C_6	Fenoles simples
C_6-C_1	Ácidos fenólicos
C_6-C_2	Acetofenonas, ácidos fenilacéticos
C_6-C_3	Ácidos cinámicos, cumarinas, isocumarinas
C_6-C_4	Naftoquinonas
$C_6-C_1-C_6$	Xantonas
$C_6-C_2-C_6$	Estilbenos, antraquinonas
$C_6-C_3-C_6$	Flavonoides, isoflavonoides
$(C_6-C_3)_2$	Lignanós
$(C_6-C_3-C_6)_2$	Biflavonoides
$(C_6-C_3)_n$	Ligninas
$(C_6-C_3-C_6)_n$	Taninos condensados

Adaptado de Harborne, (1989).

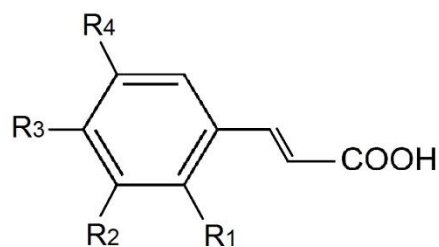
1.2.3.4.1. Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos son abundantes en los alimentos. Los más frecuentes son el ácido cafeico, y en menor medida el ácido ferúlico, que se encuentra asociado a la fibra dietética mediante la formación de enlaces éster con componentes de la hemicelulosa. El ácido cafeico también se encuentra esterificado, principalmente con el ácido quínico, dando lugar al ácido clorogénico, que está presente en el café y en muchas frutas y verduras (Scalbert y Williamson, 2000). Se pueden diferenciar dos grupos principales de ácidos fenólicos: los derivados del ácido benzoico y los derivados del ácido cinámico. Sus estructuras básicas y sus derivados más comunes encontrados en la naturaleza se muestran en la Figura 1.4.



Ácidos benzoicos

Ácido	R1	R2	R3
Gálico	OH	OH	OH
Protocatéquico	H	OH	OH
Vanílicico	H	OH	OCH ₃
Siríngico	OCH ₃	OH	OCH ₃



Ácido cinámicos

Ácido	R1	R2	R3	R4
Ferúlico	H	H	OH	OCH ₃
<i>p</i> -Cumárico	H	H	OH	H
Cafeico	H	H	OH	OH
Sináptico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃

Figura 1.4. Estructura química de los principales ácidos fenólicos.

Los ácidos benzoicos o derivados del ácido hidroxibenzoico, tienen una estructura básica C6-C1. Los principales son los ácidos gálico, salicílico, *p*-hidroxibenzoico, protocatéquico, vanílicico y siríngico. Generalmente se presentan de forma conjugada en los vegetales, aunque pueden ser detectados en forma libre en algunas frutas o luego de su liberación como consecuencia del

procesado. El ácido gálico se puede encontrar conjugado como tal o frecuentemente en su forma dimérica (ácido elágico). Ambos son componentes esenciales de los taninos hidrolizables, como por ejemplo los elagitaninos de la frutilla, frambuesa y zarzamora. Generalmente estos ácidos no representan compuestos de gran interés nutricional, ya que sus contenidos en plantas comestibles son bajos, a excepción de las frutas rojas, como se ha mencionado (Manach y col., 2004).

Los ácidos cinámicos o derivados del ácido hidroxicinámico, están ampliamente distribuidos en muchos alimentos vegetales y bebidas. Entre ellos, las frutas rojas constituyen una fuente significativa de estos compuestos. Salvo en el caso de alimentos procesados, raramente se encuentran como ácidos libres y generalmente están esterificados con ácido quínico, tartárico o glucosa. Tienen una estructura básica C_6-C_3 , siendo los más comunes los ácidos cafeico, ferúlico, sinápico y *p*-cumárico. Uno de los conjugados más frecuentes en frutas es el ácido clorogénico, que resulta de la esterificación de los ácidos cafeico y quínico. Así, el ácido cafeico, libre o esterificado, constituye el ácido fenólico más abundante en muchas frutas, mientras que el ácido ferúlico es el más abundante en granos de cereales (Manach y col., 2004; Lempereur y col., 1997).

1.2.3.4.2. Estilbenos

Los estilbenos tienen un esqueleto básico de 14 carbonos ($C_6-C_2-C_6$) y su distribución en los alimentos vegetales no es muy amplia (Scalbert y Williamson, 2000). Su principal representante es el resveratrol (3, 5, 4'-trihidroxiestilbeno) presente en uvas, frutos rojos y maní, por lo que estos alimentos y sus derivados son generalmente la principal fuente de estilbenos en la dieta. Este compuesto ha ganado popularidad en los últimos años debido a que numerosos estudios han demostrado los efectos anticancerígenos y su efecto inhibidor de las reacciones que incrementan el riesgo de enfermedades coronarias (Manach y col., 2004; Hsieh y col., 2005; Garvin y col., 2006; Atten y col., 2005).

1.2.3.4.3. Flavonoides

Los flavonoides constituyen el grupo de compuestos fenólicos más diverso y ampliamente distribuido en plantas. Su estructura general básica (Figura 1.5a) consta de dos grupos fenilo (A y B) unidos por un puente de tres carbonos que forma un anillo heterocíclico oxigenado (anillo C), conformándose así un esqueleto carbonado $C_6-C_3-C_6$ (Manach y col., 2004). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 3 al 8, y en el anillo B desde el 2' al 6'. El número y la posición de los grupos hidroxilo y la subsiguiente adición de anillos aromáticos determinarán muchas de sus propiedades. En función de los grados de oxidación e insaturación del anillo heterocíclico se pueden diferenciar varias clases de flavonoides y, dentro de cada clase, se pueden establecer diferencias en base a la naturaleza y número de los sustituyentes unidos a los anillos (Robards y col., 1999). De esta manera, la familia de los flavonoides se subdivide en flavonas, isoflavonas, flavonoles, flavanoles, flavanonas y antocianidinas. La Figura 1.5b presenta la estructura molecular general de las distintas clases de flavonoides y los respectivos derivados que se encuentran con mayor frecuencia en la naturaleza.

La mayoría de los tejidos vegetales pueden sintetizar flavonoides, los cuales se encuentran generalmente en forma de glicósidos solubles en agua, tanto en hojas como frutos presentes en la dieta humana. Las agliconas de los flavonoles y flavonas no se encuentran en el vegetal fresco, pero pueden presentarse como consecuencia del procesado. Los azúcares predominantemente se unen al núcleo del flavonoide mediante enlace β -glicosídico, preferentemente en la posición 3, aunque las uniones se pueden producir en otras posiciones. Se han identificado más de 80 azúcares diferentes unidos a los flavonoides, pudiendo ser monosacáridos, disacáridos, trisacáridos e incluso tetrasacáridos (Hollman y Arts, 2000). Dentro de los azúcares más comunes están la glucosa, galactosa, ramnosa, arabinosa, xilosa y ácido glucurónico (Manach y col., 2004).

Por un lado, los flavonoles se caracterizan por poseer un grupo ceto en C4 y una insaturación entre C2 y C3. Poseen además un grupo hidroxilo adicional en C3. Conforman el grupo más ubicuo de flavonoides presente en alimentos, siendo la quercetina el compuesto más común. Las principales fuentes de flavonoles son las verduras y las frutas, aunque el té y el vino son también alimentos ricos en flavonoles. Es importante destacar que la biosíntesis de flavonoles se estimula por la luz, por lo que estos compuestos se localizan principalmente en los tejidos aéreos de la planta. Así, se ha observado que la distribución y concentración de flavonoles puede ser distinta incluso en frutos procedentes de la misma planta, en función del grado de exposición al sol al que se hayan encontrado los mismos (Cortell y Kennedy, 2006).

Por otro lado, el grupo de las flavonas se caracteriza por poseer un grupo ceto en C4 y una insaturación entre C2 y C3. Constituyen los flavonoides menos abundantes en alimentos, siendo los principales representantes los glucósidos de luteolina y apigenina. Se encuentran en cantidades importantes en perejil y apio, mientras que la piel de cítricos contiene grandes cantidades de flavonas polimetoxiladas (Manach y col., 2004).

A su vez, el grupo de las flavanonas pueden considerarse formado por compuestos análogos a las flavonas con el anillo C saturado. Generalmente están glicosiladas con un disacárido en C7. Constituyen un grupo minoritario en alimentos, encontrándose en altas concentraciones principalmente en frutas cítricas, aunque también se encuentran en tomate y ciertas plantas aromáticas como la menta. Las principales agliconas son naringenina (pomelo), hesperetina (naranja) y eriodictiol (limón). Debido a que las flavanonas se localizan en las partes sólidas de cítricos, en particular en el tejido blanco esponjoso del albedo y en las membranas que envuelven los segmentos. Así, la fruta entera puede contener hasta cinco veces más flavanonas que su jugo (Tomás Barberán y Clifford, 2000).

Por su parte, las isoflavonas constituyen un grupo de flavonoides que poseen un anillo bencénico lateral en posición C3, con una estructura semejante a la de los estrógenos. Además poseen grupos hidroxilos en C7 y C4, al igual que ocurre en la estructura molecular de la hormona estriol (uno de los tres estrógenos mayoritarios junto al estradiol y la estrona). En realidad, las isoflavonas se pueden unir a receptores de estrógenos, y por ello se clasifican como fitoestrógenos. Se pueden presentar como agliconas o a menudo conjugadas con glucosa, las que al ser termolábiles pueden hidrolizarse durante el procesamiento industrial y conservación. Se presentan casi exclusivamente en plantas leguminosas, siendo la soja y sus derivados las principales fuentes de isoflavonas (Coward y col., 1998).

Por otra parte, las antocianidinas conforman el grupo más importantes de pigmentos vegetales hidrosolubles (Mazza y col., 2004). Se encuentran principalmente como glicósidos con los tres anillos de su estructura conjugados. La glicosilación ocurre principalmente en la posición 3 del anillo C o en las posiciones 5 y 7 del anillo A. También es posible la glicosilación de las posiciones 3', 4' y 5' del anillo B, aunque con menor frecuencia. Las antocianidinas están ampliamente distribuidas en la dieta humana encontrándose en ciertas variedades de cereales, vino tinto y algunos vegetales, aunque son más abundantes en frutas, particularmente frutas rojas.

Finalmente, los flavanoles poseen el anillo C saturado y un grupo hidroxilo en C3. A diferencia de otros grupos de flavonoides, los flavanoles encontrados en los alimentos no están glicosilados y los más representativos son de tipo flavan-3-ol, pudiendo aparecer como monómeros (catequinas), oligómeros (procianidinas), o bien como polímeros (proantocianidinas o taninos condensados). La epicatequina y la catequina son los compuestos mayoritarios en frutas. Las catequinas también se encuentran en el vino y chocolate, que son las fuentes mayoritarias. En cambio, la galocatequina, epigalocatequina y galato de epigalocatequina aparecen principalmente en el té (Arts y col., 2000).

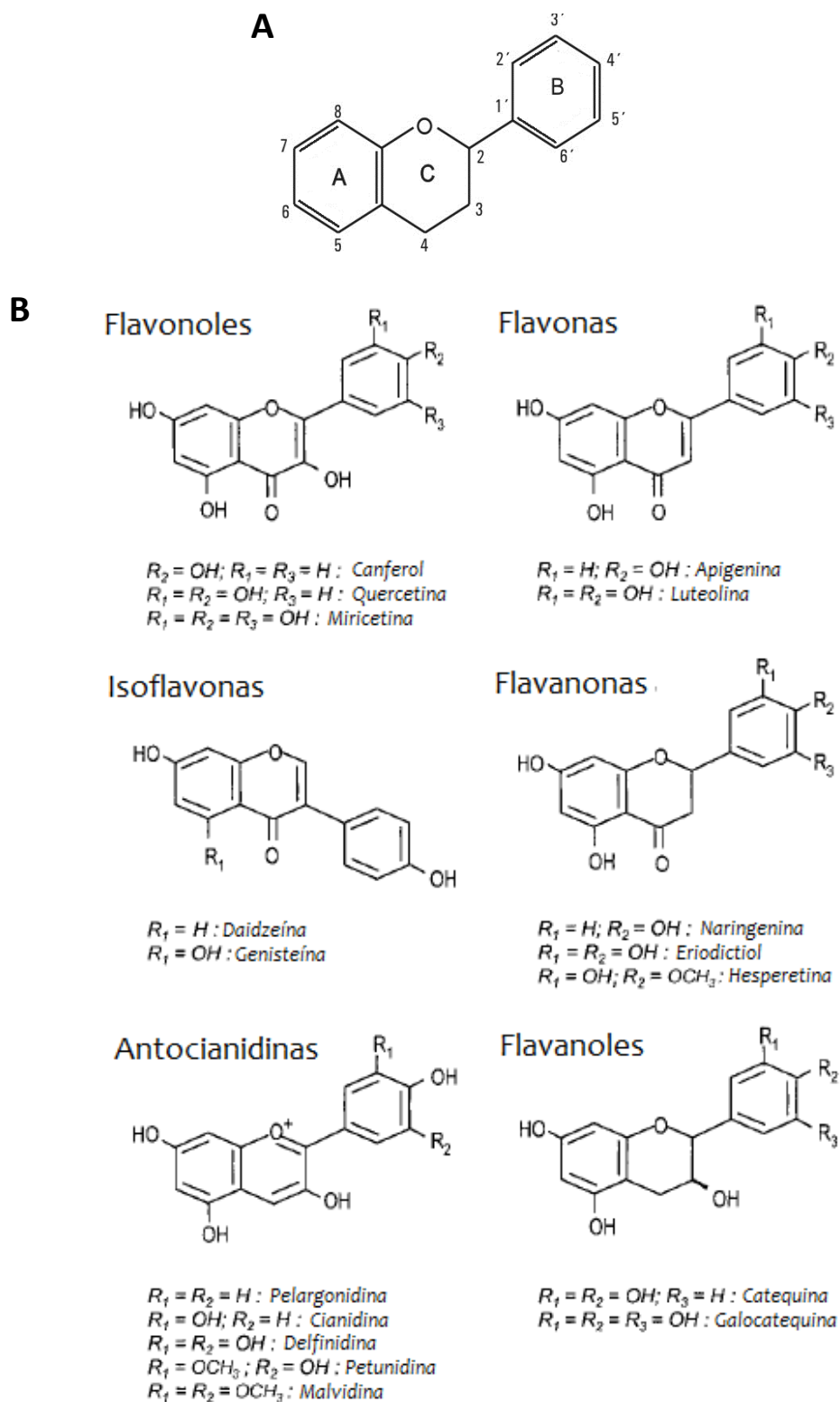


Figura 1.5. a) Estructura química básica de los flavonoides. b) Estructuras básicas de distintos tipos de flavonoides y ejemplos de compuestos representativos.

1.2.3.4.4. Lignanos

Los lignanos son producidos por dimerización oxidativa de dos unidades de fenilpropano, y en la naturaleza se encuentran principalmente en estado libre, mientras que sus derivados glicosilados no son frecuentes. La principal fuente alimentaria es la semilla de lino, que contiene hasta 3,7 g/kg en peso seco de secoisolariciresinol y pequeñas cantidades de matairesinol (Adlercreutz y Mazur, 1997). El interés por estos compuestos se debe a que la microflora intestinal de los mamíferos biotransforma los lignanos a enterodiol y enterolactona, compuestos que presentan actividad estrogénica débil y para los que se ha sugerido un efecto protector contra ciertos tipos de cáncer (Wang, 2002). Otras fuentes alimentarias que aportan menores cantidades de lignanos en la dieta son las algas, lentejas, algunos cereales (cebada, centeno y trigo), ciertas verduras (ajo, espárragos, zanahoria) y frutas (peras, ciruelas) (Thompson y col., 1991).

1.2.3.4.5. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos

Los mecanismos de acción antioxidante de los compuestos fenólicos son diversos. Cada compuesto fenólico actuará por uno o más mecanismos, según sus propiedades características. De manera general, los compuestos fenólicos pueden actuar como antioxidantes mediante dos mecanismos principales: la neutralización de radicales libres y la quelación de metales (Rice-Evans y col., 1996).

En la neutralización de radicales libres, los compuestos fenólicos actúan como donantes de hidrógeno o electrones debido a su bajo potencial redox, lo que los hace termodinámicamente capaces de reducir radicales libres altamente oxidantes como el radical superóxido, peroxilo, alcoxilo e hidroxilo en reacciones de terminación que interrumpen las reacciones de oxidación en cadena (Pietta, 2000). En la Figura 1.6 se ilustra este mecanismo, donde FI es un flavonoide y FI-O• el radical aroxilo generado menos reactivo, ya que se estabiliza por resonancia con los electrones

π del anillo aromático. A su vez, este radical aroxilo puede reaccionar con un segundo radical, adquiriendo una estructura de quinona estable.

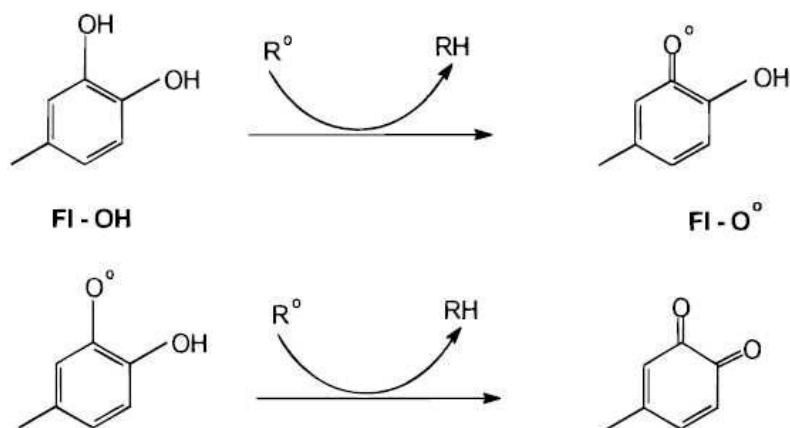


Figura 1.6. Actividad neutralizante de radicales libres mediante donación de protones y posterior estabilización de la molécula de flavonoide (FI).

Diferentes características estructurales parecen estar involucradas en la acción antioxidante de los compuestos fenólicos por este mecanismo. Por un lado, la presencia de un grupo catecol (*o*-3',4'-dihidroxilo) en el anillo B, el cual tiene las mejores propiedades donantes de electrones y por otro lado, la presencia en el anillo C del doble enlace entre C2 y C3 conjugado con el grupo oxo en C4, el cual es responsable de la deslocalización electrónica, contribuyendo así a incrementar la estabilidad del radical aroxilo.

Otros aspectos a considerar que pueden modificar la actividad antioxidante son: el número de grupos hidroxilo en el anillo B y la presencia de sustituyentes en la posición 3 del anillo C. Como ejemplo del primer caso se puede citar a la miricetina, la cual en comparación con el canferol posee dos grupos hidroxilos adicionales, otorgándole una mayor capacidad antioxidante. En el segundo caso, si la posición 3 del anillo C está glicosilada, tendrá una estructura menos efectiva que su correspondiente glicósido. Si en cambio el sustituyente es un grupo hidroxilo, la actividad antioxidante se verá incrementada, mientras que grupos hidroxilo o metoxilo adicionales en las

posiciones 3, 5 y 7 de los anillos A y C parecen ser menos importantes. De esta manera, los flavonoles y las flavonas que contienen un grupo catecol en el anillo B son muy activos, siendo los flavonoles más potentes que las correspondientes flavonas, debido a la presencia del grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo C (Rice-Evans y col., 1996).

Otro mecanismo de actividad antioxidante de ciertos compuestos fenólicos tiene que ver con su propiedad de quelar iones metálicos como hierro o cobre, que al unirse a ellos reducen la capacidad de éstos para generar radicales libres mediante reacciones redox (Hudson y Lewis, 1983; Rice-Evans y col., 1997). Los sitios de unión propuestos para el secuestro de iones metálicos son el grupo catecol en el anillo B y los sitios comprendidos entre el grupo 4-oxo y los grupos hidroxilo en posición 3 y/o 5 (Figura 1.7). Sin embargo, van Acker y col. (1996), postularon que la mayor contribución a la quelación de metales se debe al grupo catecol, al observar una mayor quelación del cobre por la quercetina en comparación con la del canferol.

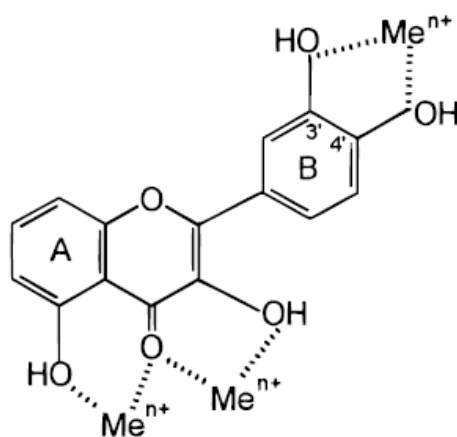


Figura 1.7. Sitios de unión de iones metálicos (Me^{n+}) en la molécula de polifenol (Pietta, 2000).

Otra vía mediante la cual los polifenoles pueden exhibir capacidad antioxidante parece estar relacionada con su capacidad para inhibir ciertas enzimas implicadas en la generación de especies reactivas del oxígeno. Como evidencia se ha descrito que ciertos flavonoides pueden inhibir la

xantina oxidasa, ciclooxigenasa, lipoxigenasa, glutatión S-transferasa, succinoxidasa mitocondrial y NADH oxidasa (Hanasaki y col., 1994; Brown y col., 1998; Cos y col., 1998).

Un aspecto importante a tener en cuenta es la dependencia de la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos con su solubilidad relativa en fase acuosa o lipídica. Los flavonoides y los ácidos cinámicos poseen coeficientes de partición intermedios, que dependen en gran medida de su estructura química y de los sustituyentes presentes (grupos hidroxilo, metoxilo, azúcares, etc.). Generalmente, los compuestos hidrofóbicos entran en las células más rápido que los hidrofílicos por procesos de difusión simple. Una vez en el organismo, los compuestos fenólicos más hidrofóbicos tendrán su destino en ambientes lipídicos y los más hidrofílicos permanecerán en medios prevalentemente acuosos (Parr y Bolwell, 2000). Así, la unión de azúcares hace a los compuestos fenólicos más hidrosolubles pero disminuye su actividad antioxidante (Rice-Evans y col., 1997). Por ello, los compuestos fenólicos con más afinidad por los ambientes lipídicos del organismo podrían tener una mayor relevancia en la prevención de enfermedades. De hecho, los compuestos fenólicos de carácter liposoluble y capaces de unirse a lípidos previenen la oxidación de las LDL *ex vivo* de forma directa y/o mediante la preservación de otros antioxidantes liposolubles como el α -tocoferol (Zhu y col., 2000).

I.3. La quinoa

La quinoa (*Chenopodium quinoa*) es considerada un pseudocereal al igual que el amaranto (*Amaranthus spp*) y el trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*). Se trata de especies dicotiledóneas que no están botánicamente relacionadas con los verdaderos cereales (especies monocotiledóneas), aunque sus semillas son consumidas como granos de manera similar a los cereales. Estas especies han atraído un gran interés en años recientes, debido en parte al

excelente perfil nutricional que poseen, siendo fuentes importantes de energía por su contenido en almidón, además de proveer proteínas de buena calidad, fibra dietaria y lípidos ricos en ácidos grasos insaturados. Además, contienen adecuados niveles de vitaminas y minerales y cantidades significativas de otros componentes bioactivos como saponinas, fitoesteroles, escualeno, fagopiritoles y polifenoles. Otra particularidad interesante de mencionar es que estas semillas no contienen proteínas formadoras de gluten y debido a esta característica están surgiendo actualmente como alternativas para dietas libres de este componente (Alvarez-Jubete y col., 2010).

I.3.1. Características generales. Ventajas del cultivo

La quinoa 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 (Abugoch-James, 2009; Miranda y col., 2010). La coloración de la planta es variable con los genotipos y etapas fenológicas, desde el verde hasta el rojo, pasando por el púrpura oscuro, amarillo, anaranjado, granate y demás gamas que se pueden diferenciar (Figura 1.8). Por formar parte de la familia *Amaranthaceae*, la coloración que pueden adquirir tanto plantas como semillas de quinoa se debe a las betalaínas, pigmentos de estructura y biosíntesis diferente a las antocianinas (Repo-Carrasco-Valencia y col., 2010; Gandía-Herrero y García-Carmona, 2013). Una característica destacable que presenta la planta de quinoa es la plasticidad para adaptarse a diferentes condiciones ambientales, ya que existen variedades que se cultivan al nivel del mar y otras en alturas cercanas a los 4000 metros. Además, la gran variabilidad genética existente permite a los diferentes cultivares tolerar los diferentes factores abióticos adversos como son sequía, altitud, temperaturas extremas y suelos pobres y salinos (Brady y col., 2007). La habilidad de la planta de producir granos de alto contenido proteico bajo condiciones ecológicas extremas,

la hace muy importante para la diversificación de los sistemas agrícolas futuros. De esta manera, ha sido introducida en Europa, América del Norte, Asia y África, con muy buenos resultados, lo que demuestra el potencial de la quinoa como cultivo industrial y alimentario (Bhargava y col., 2006; Abugoch-James, 2009) que podría contribuir a paliar la escasez de alimentos en países en vías de desarrollo (Brady y col., 2007).

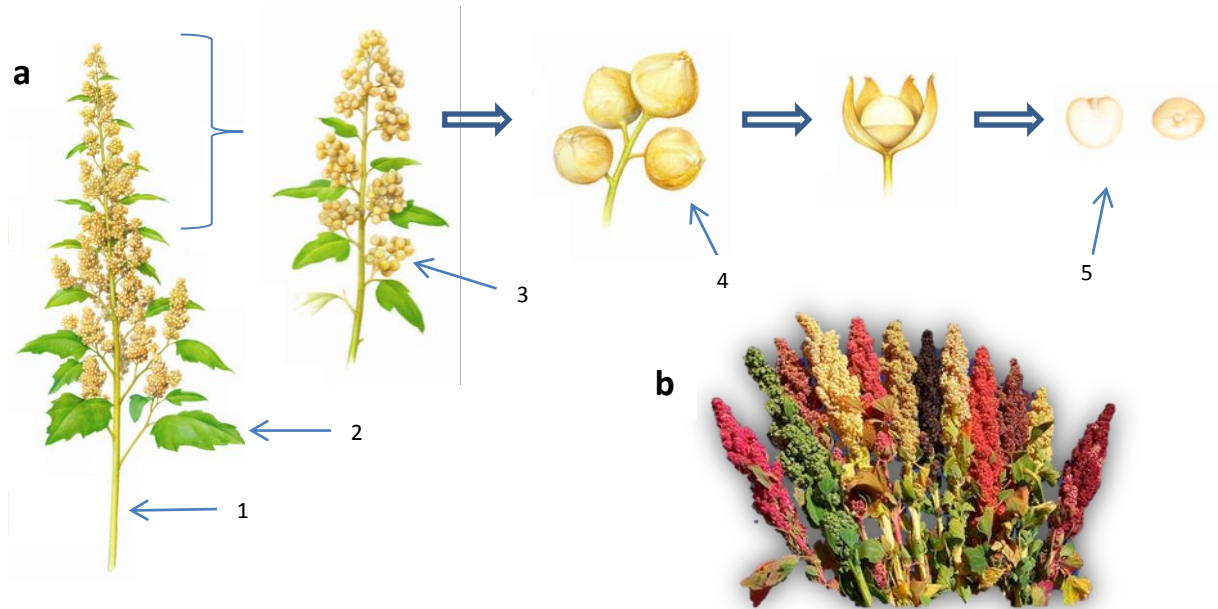


Figura 1.8. a) Planta de quinoa y sus partes: (1) tallo, (2) hoja, (3) inflorescencia, (4) fruto, (5) vista superior y lateral de la semilla. b) Coloraciones que pueden adquirir las inflorescencias.

El nombre quinoa se aplica tanto a la planta como a la semilla o grano, el cual constituye el fruto maduro sin el perigonio. Es de forma lenticular, elipsoidal o esferoidal y su color es usualmente amarillo pálido pero puede variar desde rosa hasta negro de acuerdo a la variedad. El tamaño del grano es pequeño, pudiendo medir desde 1,5 hasta 4 mm de diámetro. De acuerdo a la estructura, Prego y col. (1998) han diferenciado en el grano tres partes bien definidas desde el exterior al interior: episperma, embrión y perisperma (Figura 1.9). El episperma, está constituido por cuatro capas que rodean al embrión y perisperma. La capa exterior (pericarpio) es rica en saponinas que

le confieren sabor amargo al grano. El embrión, formado por dos cotiledones y la radícula, envuelve al perisperma como un anillo. Este constituye alrededor del 30% del volumen total de la semilla y concentra el mayor contenido de grasa y proteína del grano. El perisperma es el principal tejido de almacenamiento y está constituido mayormente por gránulos de almidón. Sus células son grandes, de forma poligonal y representa aproximadamente el 60% del volumen de la semilla.

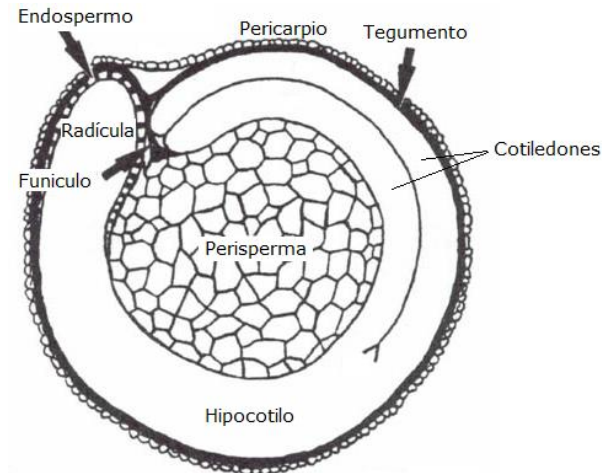


Figura 1.9. Esquema de la sección longitudinal media del grano. Adaptado de Prego y col. (1998).

1.3.2. Usos

La quinoa tiene múltiples usos y se pueden emplear casi todas sus partes. Su principal uso es la alimentación humana, donde se utilizan las semillas enteras (previa eliminación de las saponinas) o procesadas de diferentes maneras. El grano entero se agrega a sopas, ensaladas, o como reemplazo del arroz. Puede ser molido para obtener una harina que se emplea en la elaboración de diversos panificados en combinación con harina de trigo (pan, galletitas, tortas, etc.) y también alimentos para bebés. Otras formas en las que se puede consumir incluyen hojuelas, sémola o polvo instantáneo, pudiendo ser un ingrediente para preparar una enorme cantidad de recetas tanto tradicionales como innovadoras. Además, las semillas pueden ser germinadas (brotes para ensaladas), tostadas o infladas para elaborar alimentos para desayuno y *snacks* (Repo-Carrasco y

col., 2003). También se ha utilizado en la formulación de bebidas alcohólicas luego del malteado y fermentación (Bhargava y col., 2006). Muchas de las aplicaciones de la quinoa son posibles gracias a que ha demostrado tener buenas propiedades de gelificación, capacidad de absorción de agua, capacidad emulsificante y estabilizante (Abugoch-James, 2009).

Por otro lado, las hojas y plántulas tiernas se utilizan como reemplazo de las hortalizas de hoja (acelga, espinaca, repollo, etc.), pudiendo utilizarse hasta la fase fenológica de inicio de formación de la panoja y ramificación, respectivamente (Bhargava y col., 2006).

En alimentación animal se utiliza la planta completa en estado fresco o ensilado. También en forma de *pellets*. Con las partes de la planta que quedan después de la cosecha, finamente picada o molida se elaboran concentrados y suplementos alimenticios para animales. Los granos también se usan para la crianza de aves en general (Mujica y col., 2001).

Industrialmente, la quinoa puede utilizarse como materia prima para extraer alcohol industrial, saponinas, quinoína, ácido quinoico, cartón (a partir de la celulosa), almidón, harina, aceite, etc. (Bhargava y col., 2006).

1.3.3. Aspectos nutricionales

El grano de quinoa es un alimento nutricionalmente muy interesante, dada su composición en macronutrientes en comparación a la de otros cereales (base seca). En particular, se destaca principalmente por su alto contenido proteico, el cual varía desde 12 a 23 %, con un valor medio de 16,3 %. En comparación con los granos de cereales tradicionales, este valor resulta mayor que el de cebada (11 %), arroz (7,5 %) o maíz (13,4 %), y comparable al del trigo (15,4 %) (Abugoch y col., 2008). Un aspecto notable de las proteínas de la quinoa es su calidad nutricional, la que viene dada por su composición aminoacídica, presentando todos los aminoácidos esenciales con un adecuado balance, con mayores contenidos de lisina (5,1-6,4 %) y metionina (0,4-1 %) que los cereales tradicionales (Bhargava y col., 2006; Vega-Gálvez y col., 2010).

Por su parte, el contenido lipídico medio en las semillas de quinoa se encuentra en el rango de 5,0-7,2 % (Valcárcel-Yamani y Caetano, 2012), el cual es mayor que el del maíz (3-4 %) (Vega-Gálvez y col., 2010). El hecho de que algunas variedades de quinoa hayan mostrado concentraciones de lípidos cercanas a 9,7 % ha llevado a que algunos autores la consideren como un potencial cultivo oleaginoso (Koziol, 1992; Bhargava y col., 2006). Esta fracción lipídica es rica en ácidos grasos insaturados (86 %), destacándose la presencia de grandes cantidades de ácidos grasos esenciales como el linoleico (48,2-56 g/100 g) y linolénico (3,8-8,3 g/100 g) (Valcárcel-Yamani y Caetano, 2012). A pesar de su alto contenido de grasa y grado de insaturación, se ha señalado un alto grado de estabilidad de los lípidos de la quinoa frente a la oxidación. Esta propiedad ha sido atribuida al alto contenido de vitamina E (α -tocoferol) presente en el aceite extraído de granos de quinoa (Koziol, 1992).

Además, las semillas de quinoa son ricas en fibra dietaria (Ando y col., 2002) y minerales, particularmente calcio, magnesio, fósforo, hierro, cobre y zinc (Koziol, 1992; Konishi y col., 2004). Un aspecto a destacar es que la semilla de quinoa no contiene proteínas formadoras de gluten, por lo que puede ser consumida por personas celíacas o alérgicas al trigo (Alvarez-Jubete y col., 2010).

I.3.3.1. Factores antinutricionales

La presencia de factores antinutricionales es de suma importancia en relación con el valor nutritivo de los alimentos, ya que éstos pueden ejercer un efecto negativo en la biodisponibilidad de macro y micronutrientes en animales monogástricos. En particular, en semillas de quinoa se han detectado algunos compuestos antinutricionales, como son el ácido fítico, ciertos inhibidores de proteasas y las saponinas. Respecto al ácido fítico, Koziol, (1992) reportó valores entre 10,5 y 13,5 mg/g de ácido fítico para cinco variedades de quinoa, el que se encontró concentrado en las

capas exteriores del grano y en el endospermo. Por su parte, las concentraciones de inhibidores de proteasas detectadas en las semillas de quinoa han sido inferiores a 50 mg/kg (Ahamed y col., 1998). Teniendo en cuenta estos valores, se ha encontrado que el contenido de inhibidores de tripsina en quinoa es mucho menor en relación a los consumidos normalmente por la ingesta de otros granos, por lo que no representa un problema serio (Ahamed y col., 1998).

Las saponinas son consideradas el principal factor antinutricional asociado a la quinoa, aunque también tienen algunas propiedades biológicas interesantes (Sparg y col., 2004). Las saponinas son glicósidos triterpenoides que se encuentran en la cubierta exterior del grano y son las responsables del sabor amargo/astringente característico que impide su consumo directo. De hecho, los diferentes ecotipos de quinoa pueden ser clasificados de acuerdo a la concentración de saponinas, diferenciándose variedades “dulces”, cuando el contenido en saponinas libres es $< 0,11$ % (peso fresco) y “amargas” cuando este valor es superior (Soliz-Guerrero y col., 2002). Según Bacigalupo y Tapia, (1990), el contenido de saponinas es el factor limitante más serio del consumo del grano de quinoa, donde resultados de pruebas sensoriales determinaron que el nivel máximo aceptable de saponinas para consumo humano se encuentra entre 0,06 y 0,12 %. Las saponinas son capaces de producir espuma estable en soluciones acuosas y producir hemólisis en las células sanguíneas, por lo que son eliminadas por lavado o fricción de los granos antes de ser consumidos. El procedimiento más utilizado es el llamado desaponificado tradicional o por vía húmeda, en el cual se realizan lavados del grano con cambios sucesivos del agua y fricción de los granos hasta eliminar las capas superficiales. Esta labor, demanda un proceso de secado adicional, para evitar la proliferación de mohos, bacterias y otros microorganismos en el grano húmedo y también la germinación de los granos (Repo-Carrasco y col., 2003). Los métodos secos (escarificación o descascarado abrasivo) utilizan maquinaria para pulir la superficie de los granos y de esta manera eliminar las saponinas. Este método es más económico que el lavado pero tiene la desventaja que

no elimina totalmente las saponinas y si se lo realiza muy intensamente, se corre el riesgo de perder algunos nutrientes, como las proteínas presentes en las capas exteriores del grano. Por lo tanto el método más recomendado es un método combinado, comenzando con un pulido rápido y luego un lavado breve (Repo-Carrasco y col., 2003). Una vez que las saponinas han sido eliminadas, la quinoa se comercializa para consumo.

Por otro lado, las saponinas de la quinoa también podrían tener algún valor desde un punto de vista nutricional o farmacológico. Por ejemplo, se ha observado que éstas pueden disminuir el colesterol plasmático (Oakenfull y Sidhu, 1990) o incrementar la permeabilidad de las membranas, pudiéndose utilizar entonces para aumentar la absorción de nutrientes a nivel intestinal o incluso la asimilación de fármacos (Gee y col., 1993). Otras aplicaciones incluyen su uso como materia prima para la producción de hormonas (Blunden y col., 1975) y adyuvantes inmunológicos (Kensil y col., 2004), como así también se ha detectado que las saponinas de quinoa poseen actividad antifúngica (Stuardo y San Martín, 2008).

1.3.4. Compuestos fenólicos en el grano de quinoa

Además del aporte de nutrientes tales como almidón, proteínas, lípidos, vitaminas y minerales, las semillas de quinoa proveen ciertos compuestos de estructura fenólica con potenciales beneficios para la salud (Abugoch-James, 2009; Pasko y col., 2009; Vega-Gálvez y col., 2010; Miranda y col., 2010; Tang y col., 2015). Los principales compuestos fenólicos de las semillas de quinoa pertenecen a los grupos de los ácidos fenólicos y flavonoides.

Dentro de los ácidos fenólicos se encuentran tanto derivados del ácido benzoico, tales como los ácidos *p*-hidroxibenzoico, 3-4-dihidroxibenzoico, vanillico y protocatéquico y derivados del ácido cinámico, entre ellos los ácidos *p*-cumárico, cafeico, ferúlico e isoferúlico (Alvarez-Jubete y col., 2010; Repo-Carrasco y col., 2010; Hirose y col., 2010; Tang y col., 2015).

Por otro lado, las semillas de quinoa son una fuente abundante de flavonoides, principalmente glicósidos de los flavonoles quercetina y canferol (Hirose y col., 2010; Dini y col., 2004), aunque también se ha detectado epicatequina y glicósidos de miricetina e isorhamnetina en algunas variedades. (Tang y col., 2015; Repo-Carrasco y col., 2010). En un extracto etanólico de semillas de quinoa, Zhu y col., (2001) aislaron seis flavonoles glicosilados derivados de las agliconas quercetina y canferol con residuos azúcarados de L-ramnosa, D-apiosa y D-galactosa.

I.4. Extracción de biomoléculas con capacidad antioxidante a partir de fuentes vegetales

Debido a su eficacia y facilidad de aplicación, la extracción sólido-líquido es la técnica más utilizada para la recuperación de moléculas bioactivas a partir de fuentes vegetales. Se aplica extensamente tanto en la industria alimentaria como en la obtención de compuestos de interés farmacéutico.

I.4.1. Principio y mecanismo de la extracción sólido-líquido

La extracción sólido-líquido es una operación física de transferencia de materia entre una fase sólida, que contiene la sustancia a extraer y una fase líquida, el solvente de extracción (Leybros y Frémeaux, 1990). Tras el contacto heterogéneo entre el disolvente y el sólido, las sustancias que tienen afinidad por el solvente se solubilizan y pasan de la fase sólida a la fase líquida, así durante la extracción, los contenidos de dichas sustancias disminuyen en la fase sólida y aumentan en la fase líquida. La transferencia de materia se realiza por difusión molecular y por convección. La extracción es un proceso no estacionario que se detiene cuando se establece el equilibrio entre las dos fases (Dibert y Cros, 1989).

Generalmente, la extracción no es muy selectiva y además del soluto de interés se solubilizan conjuntamente otras sustancias a partir de la fase sólida. De esta manera se obtendrá una solución, que se denomina extracto, y por otro lado el residuo sólido que después de la extracción

contiene muy poco o nada de soluto. En general, el material vegetal se trata previamente con el fin de que la extracción resulte más eficiente. El secado, la molienda y la fragmentación son procesos utilizados a menudo como operaciones de pretratamiento. A veces se realizan además, pretratamientos enzimáticos para facilitar la disolución de las moléculas de interés en el solvente, por ejemplo, el uso de pectinasas y celulasas con el fin de romper las paredes celulares y promover la extracción de polifenoles (Bonilla y col., 1999).

Durante la extracción se pueden distinguir varias etapas sucesivas:

- Penetración del solvente en la matriz sólida
- Disolución del soluto en el solvente
- Difusión del soluto hacia el exterior de la matriz sólida
- Separación del soluto de la matriz sólida y transferencia al seno de la fase líquida (por difusión o convección)

La duración de la extracción sólido-líquido se determinará por la etapa más lenta que controla la velocidad de la operación, que generalmente es la etapa de difusión desde la matriz vegetal.

1.4.2. Métodos de extracción sólido-líquido

Existen varias técnicas para la extracción de biomoléculas a partir de fuentes vegetales. Las técnicas de extracción realizadas a presión atmosférica, con o sin agitación y/o temperatura utilizadas desde hace tiempo se consideran como métodos clásicos o convencionales. Dentro de las técnicas de extracción de uso más reciente se destacan aquellas que utilizan presión (solventes presurizados o fluidos supercríticos), como así también las que incorporan tecnologías que permiten intensificar la extracción (como por ejemplo ultrasonido o microondas).

I.4.2.1. Métodos clásicos

Dentro de éstos, en primer lugar se puede nombrar a la maceración como el método más simple de extracción sólido-líquido. Consiste en poner en contacto el material vegetal con el solvente con o sin agitación, por lo general a temperatura ambiente. La extracción suele ser larga y a menudo de bajo rendimiento, utilizándose generalmente para la extracción de moléculas termosensibles (Leybros y Frémeaux, 1990). Otro método conocido es la extracción Soxhlet que según algunos autores, es la técnica que permite mejores rendimientos entre las convencionales ya que la muestra está en contacto continuo con solvente puro (libre de solutos extraídos) y además no es necesario filtrar luego de la extracción. Como desventajas se pueden mencionar el tiempo de extracción y la gran cantidad de solvente consumido, además de que el uso de temperatura puede destruir las moléculas de interés. Otra desventaja importante es que la extracción Soxhlet no es apropiada cuando es conveniente utilizar mezclas de solventes para lograr una extracción más eficiente y selectiva (Luque de Castro y García-Ayuso, 1998).

I.4.2.2. Métodos alternativos

Actualmente existe una demanda creciente de nuevas técnicas de extracción que permitan reducir los tiempos de proceso, el consumo de energía y el uso de solventes orgánicos con el fin de minimizar la contaminación al medio ambiente. Estas operaciones se consideran “extracciones verdes” o también sostenibles o sustentables. Como ejemplos se pueden mencionar a la extracción asistida por ultrasonido o por microondas y a la extracción mediante fluidos supercríticos.

I.4.2.2.1. Extracción asistida por ultrasonido (EAU)

La extracción mediada por sonicación resulta un método simple, eficaz y de bajo costo. Esta técnica utiliza ondas sonoras con una frecuencia superior a 20 kHz. La vibración se propaga en el medio transportando energía mecánica en forma de rápidas variaciones de presión. El medio de

propagación de la onda ultrasónica se somete a una sucesión de compresiones y descompresiones, provocando la formación de burbujas (Poux y col., 2010). El ultrasonido provoca grandes modificaciones de la temperatura y la presión dentro de las burbujas hasta que las mismas alcanzan una dimensión crítica, produciéndose su implosión. Este proceso de compresión-rarefacción y el colapso de las burbujas se denomina "cavitación" (Mason y Paniwnyk, 1996).

Los efectos mecánicos del ultrasonido inducen una mayor penetración del solvente en las matrices vegetales y mejoran la transferencia de masa. También pueden causar ruptura de las paredes celulares, facilitando la liberación del contenido celular. Por lo tanto la aplicación de la extracción ultrasónica acelera la extracción a partir de fuentes vegetales y en algunos casos también aumenta los rendimientos (Vinatoru, 2001; Poux y col., 2010; Vilku y col., 2008).

La EAU permite trabajar con diferentes tipos de solventes y mezclas de los mismos, consumiendo cantidades de energía significativamente menores en relación a los métodos clásicos con rendimientos comparables (Poux y col., 2010). Esta técnica permite la extracción de compuestos termosensibles al ser altamente eficaz a temperaturas relativamente bajas. Además, la EAU se considera una técnica de extracción operativamente simple, siendo posible su ejecución utilizando un baño ultrasónico de laboratorio. Básicamente, la muestra molida se mezcla con el solvente apropiado y se coloca en un baño de ultrasonido, en el que es posible ajustar la frecuencia, la potencia, la temperatura de trabajo y el tiempo de extracción (Romdhane y Gourdon, 2002). Por todo lo expuesto, la EAU se considera una técnica que se adapta muy bien a la extracción de compuestos fenólicos, siendo ampliamente utilizada con las más diversas matrices vegetales (Chemat y col., 2011; Vinatoru, 2001; Khan y col., 2010; Sun y col., 2011).

1.4.2.2. Extracción asistida por microondas (EAM)

En esta técnica de extracción alternativa, la matriz sólida se sumerge en un solvente calentado por microondas (Poux y col., 2010). Las microondas son ondas electromagnéticas de frecuencias entre

300 MHz y 300 GHz. Su aplicación permite calentar el solvente de manera rápida y utilizando poca energía. En general, las muestras se homogeneizan y se mezclan con un solvente y la suspensión se irradia a más de 2000 MHz por un corto período de tiempo. El calentamiento se repite generalmente varias veces, con tiempos de enfriamiento alternados para evitar la ebullición. La eficacia de esta técnica se acerca a la de la extracción Soxhlet, con la ventaja de realizarse más rápido (Pan y col., 2003; Poux y col., 2010). Como desventajas de la misma, se pueden citar la necesidad de controlar el tiempo total de calentamiento, la falta de homogeneidad en el calentamiento por las microondas y su limitación para ser utilizada en la extracción de compuestos sensibles al calor (Poux y col., 2010).

1.4.2.2.3. Extracción con fluidos supercríticos (EFS)

La extracción por fluidos supercríticos utiliza como solvente, fluidos en estado supercrítico (con temperatura y presión superiores a las críticas), cuyas propiedades son intermedias entre las de un gas y un líquido (Taylor, 1996). En este estado, las tasas de transferencia de masa son mayores debido a los altos coeficientes de difusión y bajos valores de viscosidad, en comparación con los solventes líquidos convencionales (Díaz- Reinoso y col., 2006; Herrero y col., 2010). El poder disolvente del fluido se puede variar cambiando la densidad del solvente o modificando la presión y la temperatura. La amplia variación de solubilidad de las moléculas de interés y de otras moléculas extractables de la fuente vegetal, permite encontrar las condiciones para obtener altas selectividades. A pesar de estas propiedades favorables para la extracción de moléculas bioactivas, su principal inconveniente es el elevado costo de esta tecnología (Poux y col., 2010). El fluido supercrítico más comúnmente utilizado es el CO₂ debido a que se trata de un solvente abundante, de bajo costo, inerte, inodoro, no tóxico y con valores de temperatura y presión críticos relativamente bajos y fáciles de conseguir en la práctica (31,1 °C y 7,3 MPa, respectivamente) (Díaz- Reinoso y col., 2006). La gran limitación del uso de CO₂ como solvente es su no polaridad,

por lo que no resulta adecuado para la extracción de compuestos polares. El agua en estado supercrítico también ha sido utilizada para extraer compuestos polares, sin embargo, el punto crítico del agua se presenta bajo condiciones de temperatura y presión relativamente altas (374 °C y 22,1 MPa, respectivamente), por lo que no puede utilizarse para extraer compuestos termolábiles (Lang y Wai, 2001).

1.4.3. Parámetros que influyen en la extracción sólido-líquido

Para llevar a cabo una extracción bajo condiciones óptimas, se deben tener en cuenta varios parámetros que influyen sobre la eficacia y selectividad del proceso.

1.4.3.1. Naturaleza del solvente

El rendimiento y la actividad antioxidante de un extracto obtenido a partir de una matriz dada dependen, en parte, de la naturaleza del solvente utilizado en el proceso extractivo. Esto se debe a que en dicha matriz se pueden encontrar compuestos fenólicos antioxidantes con estructuras químicas muy diversas, que van desde moléculas sencillas a compuestos altamente condensados. Por otra parte, estos compuestos pueden estar o no asociados con otras moléculas, tales como glúcidos o proteínas. Esta variabilidad en la naturaleza química de los componentes condiciona la solubilidad de los mismos, y por ende la naturaleza del extracto obtenido, de acuerdo al solvente utilizado (Marinova y Yanishlieva, 1997).

Así, queda claro que la naturaleza del solvente es muy importante en la extracción selectiva de moléculas de interés. Además, si se elige un solvente de baja viscosidad se facilita el proceso de imbibición de la matriz sólida, así como la transferencia de materia al seno de la fase líquida. Si por otro lado, el solvente posee una temperatura de ebullición baja, permitirá concentrar o, eventualmente, secar el extracto, utilizando menos energía. También, siempre es preferible utilizar solventes no inflamables ni explosivos. Otro factor a tener en cuenta en la selección del

solvente es la potencial aplicación de los extractos que se desea obtener. Así, si se prevé que dichos extractos van a ser utilizados en la industria alimentaria, el uso de solventes no tóxicos es imperativo. En particular, el agua reúne una serie de condiciones que frecuentemente la hacen apta como solvente para la extracción de biomoléculas de naturaleza fenólica a partir de fuentes vegetales, tales como su alta constante dieléctrica (que facilita la disolución de moléculas de media a elevada polaridad), fácil disponibilidad, costo, inocuidad, aceptabilidad desde el punto de vista ecológico, etc. Dado que se ha mencionado que las mezclas de solventes extraen de manera más eficiente determinadas sustancias de interés en relación a los solventes puros (Yilmaz y Toledo, 2006; Pinelo y col., 2005), varias mezclas acuosas de solventes como metanol, etanol, propanol, acetona, acetato de etilo se han utilizado ampliamente en la extracción de compuestos fenólicos (Madhujith y Shahidi, 2006; Wang y col., 2011; Dent y col., 2013; Boeing y col., 2014). En particular, las mezclas agua-etanol son los solventes más utilizados para la obtención de extractos fenólicos antioxidantes, dado su eficiencia, selectividad, bajo costo, baja toxicidad, facilidad de eliminación, etc. (Liyana-Pathirana y Shahidi, 2005; Silva y col., 2007; Wang y col., 2008; Zhang y col., 2011; Gong y col., 2012). Al modificar las proporciones de agua y etanol, varía la polaridad del solvente y como consecuencia se consigue cambiar la naturaleza del extracto obtenido, en función de la solubilidad de los diferentes compuestos fenólicos presentes en la matriz vegetal (Galvan d'Alessandro y col., 2012).

I.4.3.2. Tamaño de partícula

Para facilitar la extracción, a menudo el material vegetal se corta o se muele. La reducción del tamaño de partícula aumenta la superficie de intercambio y la rapidez de extracción (Bucic-Kojic y col., 2007). La difusión interna es también más rápida en el caso de partículas finas. Sin embargo, las partículas de tamaño muy fino plantean problemas tecnológicos como por ejemplo, la formación de un lecho de sólidos que provoca una disminución de la permeabilidad al solvente,

estableciendo sectores con corrientes preferenciales y sectores del lecho donde el solvente no circula (Mafart y Béliard, 1992). Las partículas muy finas también son más difíciles de separar del extracto líquido después de la extracción.

I.4.3.3. Temperatura

El aumento de la temperatura durante la extracción aumenta la solubilidad y difusividad en la solución, al tiempo que reduce su viscosidad. El calor también facilita la extracción, ya que aumenta la permeabilidad de las paredes celulares. Sin embargo esto puede causar una disminución en la selectividad de la extracción (Mafart y Béliart, 1992).

Por otro lado, una temperatura excesiva puede causar la desnaturalización de las moléculas a extraer. La alta temperatura durante el secado y/o extracción afecta la estabilidad de algunos compuestos fenólicos debido a reacciones de degradación química y/o enzimática, pérdida por volatilización y/o por descomposición térmica. Larrauri y col., (1997) encontraron que la temperatura es el parámetro de extracción que afecta en mayor medida las propiedades de los polifenoles. Por otro lado, varios estudios han demostrado la destrucción térmica de ciertas antocianinas a temperaturas elevadas (Fischer y col., 2013; Kechinski y col., 2010).

I.4.3.4. Agitación

La agitación mecánica de las partículas en el solvente permite mantenerlos en continua suspensión y homogeneizar el medio, con un efecto positivo en la operación, ya que reduce la resistencia a la transferencia de solutos en la interfase sólido-líquido y aumentar el coeficiente de transferencia. Si la agitación es muy intensa y/o mantenida por un largo período, puede favorecer choques entre las diferentes partículas y permitir de esta manera la ruptura de células que liberarán su contenido en el medio (Dibert, 1989; Leybros y Frémeaux, 1990).

I.4.3.5. pH de extracción

La polaridad de muchos compuestos varía con el pH del solvente. En consecuencia, su solubilidad también dependerá de la acidez/basicidad del solvente. Además, la extracción a diferentes valores de pH puede permitir una extracción selectiva de diferentes grupos de sustancias. (Mafart y Béliart, 1992).

I.4.3.6. Relación sólido/solvente

Si bien a menor relación sólido/solvente, mayor rendimiento de extracción, la cantidad máxima conveniente de solvente en la práctica está limitada por las consecuencias relacionadas con la concomitante dilución que se produce de los sustratos de interés al utilizar mayores volúmenes de solvente, en particular las referidas a la obtención de un extracto concentrado o seco (Mafart y Béliart, 1992). Por otro lado, el rendimiento del extracto en compuestos de interés está directamente relacionado con la cantidad de material sólido de partida, por lo que la relación óptima de sólido/líquido a emplear en la extracción resultará del compromiso de éstas consideraciones.

I.4.3.7. Tiempo de extracción

El tiempo de contacto entre las dos fases es también un parámetro muy importante a controlar en una extracción. Este parámetro está estrechamente relacionado con la cinética de la extracción. La comprensión de la cinética permitirá detener la extracción en el momento en que se logre el rendimiento deseado y de esta manera se logra economizar energía y mano de obra (Mafart y Béliart, 1992; Wettasinghe y Shahidi, 1999).

I.5. Actividad antioxidante

La evaluación de la actividad antioxidante de un alimento puede abordarse de distintas maneras. Es común utilizar ensayos de actividad antioxidante total *in vitro* mediante distintas pruebas químicas, cuyos resultados no pueden ser directamente extrapolados a la situación que ocurre bajo condiciones fisiológicas. Otra serie de pruebas, verifican la efectividad de protección de un antioxidante *ex vivo*, induciendo un daño oxidativo en cultivos celulares. Por último, los ensayos que abordan la evaluación de la actividad antioxidante *in vivo*, tras la suplementación de dietas de animales o humanos, permiten la determinación de ciertos biomarcadores de daño oxidativo, y/o del estado antioxidante total de los individuos (Collins 2005).

La diversidad química de los compuestos antioxidantes (que incluye glicósidos e isómeros) en una matriz compleja hace difícil separar y cuantificar los mismos de manera aislada. Por otro lado, el análisis de compuestos bioactivos individuales conduce a pérdida de información sobre los efectos sinérgicos que pueden existir entre dichos compuestos y otras sustancias con capacidad antioxidante que estén presentes en la matriz analizada. Dado que en la mayoría de los casos estos procesos dan lugar a una actividad antioxidante total mayor que la correspondiente a la suma de las actividades de los antioxidantes individuales, la medición del nivel de actividad antioxidante total en extractos de plantas y alimentos brinda una aproximación más real del efecto potencial que podría ejercer *in vivo* un alimento rico en sustancias antioxidantes (Liu, 2003).

Así, se han propuesto numerosos métodos para evaluar la actividad antioxidante total *in vitro*, los cuales se han aplicado a diferentes muestras biológicas y alimentos. Estos métodos se basan generalmente en la captación o secuestro de radicales libres generados en la mezcla de reacción ($O_2^{\bullet-}$, HO^{\bullet} , ROO^{\bullet} , etc.) o radicales extraños al organismo humano (como el DPPH $^{\bullet}$ y ABTS $^{\bullet+}$), mientras que otros están basados en la reducción de iones metálicos tales como el Fe^{3+} o el Cu^{2+}

(Sánchez -Moreno, 2002; Schlesier y col., 2002; Prior y col., 2005). Los diferentes métodos se distinguen por el agente oxidante y sustrato utilizados, la técnica instrumental y las potenciales interacciones de la muestra con el medio de reacción (Pérez y col., 2000, Wang y col., 2004). Los resultados obtenidos se expresan generalmente en forma de índices o valores equivalentes, por ejemplo es común utilizar el valor TEAC (Capacidad Antioxidante en Equivalentes Trolox). El trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) es un análogo hidrosoluble de la vitamina E, utilizado como estándar antioxidante.

1.5.1. Métodos para evaluar la actividad antioxidante in vitro

Una clasificación general de los ensayos antioxidantes se basa en el tipo de reacción involucrada, diferenciando los ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (TAH), de aquellos basados en la transferencia de electrones (TE).

1.5.1.1. Ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (TAH)

Este tipo de ensayos evalúa la capacidad que tiene una muestra particular para proteger una molécula diana (usualmente monitoreada mediante absorción UV-visible o espectroscopía de fluorescencia) expuesta a una fuente de radicales libres. Usualmente se emplea el 2,2'-azobis(2-amidinopropano) clorhidrato (AAPH, también abreviado ABAP) como fuente de radicales peroxilo, los cuales son estabilizados por la donación de un átomo de hidrógeno proveniente de los antioxidantes presentes en la muestra. La incubación del AAPH con una molécula diana particular (MD) conduce a un cambio en la absorción UV-visible o de intensidad en la fluorescencia de la MD. Por lo tanto, la incubación conjunta de la MD, el AAPH y los antioxidantes puros o sus mezclas complejas produce generalmente la inhibición del consumo de la MD. De esta manera, estas metodologías monitorean reacciones competitivas y la cuantificación se obtiene a partir de curvas de cinéticas de reacción (López-Alarcón y Denicola, 2013). Los ensayos basados en TAH incluyen

métodos ampliamente utilizados como ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) que utiliza como MD los compuestos fluorescentes beta-ficoeritrina o fluoresceína y el método TRAP (*Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter*) que se basa en la absorción de oxígeno asociado al proceso de peroxidación del plasma humano (Huang y col., 2005). Entre otros métodos que integran este grupo se pueden mencionar también el método de la decoloración de la crocina y el ensayo de la decoloración del β -caroteno (Huang y col., 2005; Prior y col., 2005).

I.5.2.2. Ensayos basados en la transferencia de electrones (TE)

Los ensayos basados en la TE involucran una reacción redox donde los antioxidantes reaccionan con un compuesto fluorescente o coloreado (agente oxidante) en lugar del radical peroxilo, en los que se monitorea la capacidad del antioxidante para reducir al compuesto oxidante, que cambia de color cuando se reduce. El grado de cambio de color del agente oxidante (usualmente una disminución en la intensidad de absorción a una longitud de onda determinada) se correlaciona con la concentración de antioxidantes en la muestra. En este tipo de ensayos generalmente se fija un tiempo para que se produzca la reacción redox, midiendo durante este período la conversión termodinámica (oxidación) y el valor de capacidad antioxidante obtenido se expresa generalmente en equivalentes Trolox (Sanchez-Moreno y col., 1998). Dentro de los ensayos basados en TE se incluyen los métodos basados en el secuestro de radicales libres DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) y ABTS•⁺ [2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazol-6-sulfonato)], los cuales son dos tipos de radicales libres estables y coloreados que han sido ampliamente utilizados para medir capacidad antioxidante (Miller y col., 1993; Brand-Williams y col., 1995). Una diferencia entre ambos es que el DPPH• se comercializa como radical, mientras que ABTS•⁺ debe ser generado a partir de la oxidación del ABTS por oxidantes (Henríquez y col., 2002).

Otros ensayos basados en la TE son aquellos basados en la reducción de iones metálicos como son los métodos FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), CUPRAC (*Cupric Reducing Antioxidant Capacity*) y el método de la ferriciadina/Azul de Prusia, los cuales utilizan diferentes reactivos redox cromogénicos con diferentes potenciales estándar (Benzie y Strain, 1996; Berker y col., 2010). El fundamento de estos métodos se basa en que los complejos de los cromóforos utilizados con la forma reducida de los iones metálicos presentan bandas características de absorción visible con intensidad máxima a una determinada longitud de onda. Así, la capacidad de una muestra para reducir los complejos metálicos en un tiempo de incubación fijo genera la banda de absorción visible correspondiente que se utiliza para expresar el valor de poder reductor. Otro método ampliamente utilizado y que también está basado en la TE es el ensayo de fenoles totales utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu (Singleton y col., 1999). El reactivo de Folin-Ciocalteu consiste en una solución de ácido fosfomolibdico y ácido fosfowolfrámico que oxida los compuestos fenólicos a fenolatos en medio alcalino. La oxidación de los fenoles presentes en la muestra causa la aparición de una coloración azul que presenta un máximo de absorción a 765 nm y que puede cuantificarse espectrofotométricamente en base a una curva patrón de ácido gálico. Consiste de un método simple, preciso y ampliamente usado en el estudio de las propiedades antioxidantes de extractos vegetales, al tratarse de un parámetro que generalmente muestra una estrecha correlación con diferentes métodos de medida de la actividad antioxidante (Schlesier y col., 2002; Sun y col., 2002). Así, cuando se evalúan las propiedades antioxidantes de estos extractos, el análisis de fenoles totales constituye un método complementario al análisis cromatográfico de los principales grupos de compuestos fenólicos que caracterizan a cada alimento vegetal, a la vez que proporciona información valiosa a la hora de seleccionar aquellos con mayor potencial antioxidante.

1.5.2 Factores que influyen sobre la actividad antioxidante de los extractos

Existen diferentes factores que pueden afectar la capacidad antioxidante de los extractos naturales. Dichos factores pueden ser intrínsecos al material de estudio o inherentes al propio proceso de extracción y al período de almacenamiento posterior de los extractos.

1.5.2.1. Variedad, planta y estado de madurez

La composición y el contenido total de compuestos fenólicos y en consecuencia, la actividad antioxidante, son diferentes para las diferentes variedades de plantas, y a su vez son diferentes para las diferentes partes de una misma planta. Por ejemplo, se observó variación en la composición fenólica entre los extractos de hojas, corteza y madera de pinos (Kähkönen y col., 1999). También se han observado diferencias en el contenido de polifenoles de acuerdo a la fase de maduración de cada órgano de la planta, como entre las hojas nuevas y viejas de diversos vegetales (Sawa y col., 1999). Finalmente factores como zona de cultivo, condiciones climáticas, almacenamiento, etc. condicionan el contenido de compuestos con actividad antioxidante presentes en plantas (Naczki y Shahidi, 2006; Li y col., 2012).

1.5.2.2. Composición del extracto

Como regla general, la actividad antioxidante de un extracto se incrementa con el aumento en el contenido de compuestos fenólicos, aunque se encuentran en la bibliografía resultados contradictorios. Por un lado, varios autores han descrito una correlación directa entre el contenido fenólico y la actividad antioxidante (Andarwulan y col., 1999; Tsaliki y col., 1999) en distintas matrices vegetales. Por otro lado, otros autores no han logrado encontrar tal correlación (Bocco y col., 1998; Kähkönen y col., 1999), y han atribuido la actividad antioxidante resultante a la presencia de otras sustancias de naturaleza no fenólica en los extractos. Varios factores pueden

justificar estos resultados. Así como ya fue mencionado, a partir de un matriz dada, la composición del extracto puede variar con las condiciones de extracción, principalmente con la naturaleza del solvente utilizado, una vez que su polaridad determinará la fracción de compuestos fenólicos que serán extraídos (Galván d'Alessandro y col., 2012), como así también hará posible en distinto grado, la extracción conjunta de otros componentes que pueden intervenir en el balance redox. En este último caso, deben considerarse los potenciales efectos sinérgicos y/o inhibitorios que pueden ejercer dichos compuestos sobre la capacidad antioxidante neta del extracto. (Hassimotto y col., 2005; Wang y col., 2011).

I.5.2.3. Condiciones de almacenamiento de los extractos

La temperatura y la luz son dos factores que afectan la capacidad antioxidante de los extractos durante su almacenamiento. Extractos obtenidos a partir de un mismo material presenta distinta estabilidad dependiendo del solvente empleado en la extracción de los compuestos fenólicos. Por ejemplo, los extractos metanólicos de subproductos del chocolate son más estables a la temperatura (50 °C) que los extractos obtenidos utilizando cloroformo o dicloroetano como solventes (Azizah y col., 1999). Por otro lado, se comprobó que la exposición a la luz de extractos de cáscara de papa degradó completamente en una semana el ácido clorogénico presente, mientras que el ácido cafeico desapareció por completo luego de 20 días bajo dicha exposición (Rodríguez de Sotillo y col., 1994)

I.5.2.4. Accesibilidad a las zonas activas de oxidación

La actividad antioxidante de un compuesto no depende únicamente de sus propiedades químicas, también se debe considerar su accesibilidad a la zona donde se produce la oxidación (Frankel, 1998). La distribución de los antioxidantes en un sistema muestra que los compuestos hidrofílicos son más eficaces en medios apolares, tales como los aceites, debido a que se sitúan en la interfase

activa aire/aceite, que es justamente la zona en donde los lípidos son más susceptibles a la oxidación (ya que presentan mayor contacto con el oxígeno). Los antioxidantes lipofílicos, por su parte, son menos activos inhibiendo la rancidez de los aceites, ya que se diluyen en la fase oleosa. Sin embargo, en las emulsiones aceite en agua, los antioxidantes lipofílicos son más eficaces que los hidrofílicos, pues éstos se concentran en la interfase aceite/agua, donde tiene lugar la interacción entre los promotores de la oxidación (iones metálicos, peróxido de hidrógeno, etc.) y el sustrato lipídico. Los antioxidantes hidrofílicos en cambio, se sitúan en el seno de la fase acuosa en estos sistemas. Este comportamiento diferencial de los antioxidantes en emulsiones y en sistemas homogéneos no polares se denomina “paradoja polar” (Frankel y col., 1994).

I.6. Procesos seleccionados con potencial aplicación en la mejora de propiedades de alimentos

I.6.1. Consideraciones generales de los procesos

I.6.1.1. Germinación

La germinación de semillas produce cambios radicales en la composición de metabolitos primarios y secundarios como consecuencia de la compleja red metabólica que se activa durante este período. Dada la importancia de las semillas en la dieta, la aplicación de la germinación ha sido planteada como una alternativa para mejorar tanto el valor nutritivo como las propiedades saludables de semillas de numerosas especies (Lintschinger y col., 1997). El proceso de germinación puede abarcar diferentes periodos y se define como aquel que comienza con la imbibición de agua por parte de la semilla seca y que concluye con la formación de una plántula capaz de desarrollarse de manera independiente de la semilla. Las señales visibles que indican el inicio y la finalización de la germinación son la emergencia de la radícula y el desprendimiento de los restos de las cubiertas seminales de los cotiledones, respectivamente. Durante la germinación

se lleva a cabo una diversidad de procesos sincronizados en los que los procesos anabólicos y catabólicos son simultáneos (Bewley, 1997). Para que la germinación tenga lugar, es necesario que se den una serie de condiciones ambientales favorables como son: un sustrato húmedo, suficiente disponibilidad de oxígeno que permita la respiración aerobia y una temperatura adecuada para los distintos procesos metabólicos y para el desarrollo de la plántula. Este proceso de germinación comprende tres fases sucesivas que se superponen parcialmente y que se representan en la Figura 1.10 (García-Agustín y Primo-Millo, 1993; Barceló y col., 2001).

Fase I o de hidratación: es el periodo durante el cual la semilla embebe agua, provocando el hinchamiento de la misma (aumento de su peso fresco). Se produce la hidratación enzimática, reactivándose numerosos sistemas metabólicos que conducen a la síntesis de ATP, proteínas y comienzo de la actividad respiratoria.

Fase II o de germinación: una vez que el agua atraviesa los envoltorios seminales y llega al embrión en cantidad suficiente, éste se activa y comienzan los procesos metabólicos necesarios para su crecimiento y transformación en una planta autónoma. En esta fase, la toma de agua y de oxígeno se reduce considerablemente, llegando incluso a detenerse.

Fase III o de crecimiento: se asocia a la emergencia de la radícula (cambio morfológico visible), movilización de las reservas y desarrollo de la plántula. Durante este periodo vuelve a incrementarse la actividad respiratoria y la absorción de agua, debido a que parte de las proteínas y los carbohidratos almacenados son hidrolizados a compuestos de menor peso molecular, los cuales son transportados al eje embrionario en crecimiento.

La duración de cada fase depende de ciertas propiedades intrínsecas de cada semilla, como su tamaño, contenido en compuestos hidratables y la permeabilidad de las cubiertas al agua y al oxígeno. Pero en estas fases, también intervienen condiciones del medio de germinación, como el nivel de humedad, la temperatura, pH, luz, etc.

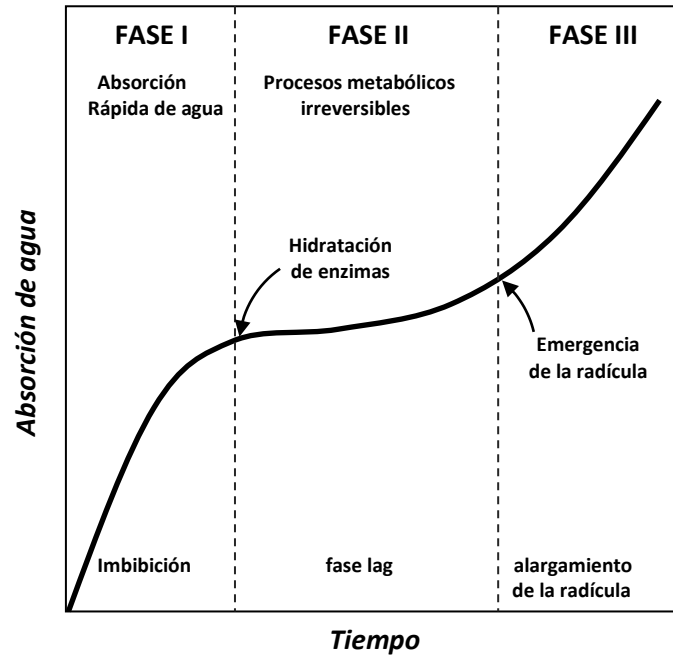


Figura 1.10. Fases de la germinación de semillas medida a través de la absorción de agua (Adaptado de Bewley, 1997).

Entre los factores externos que influyen en la germinación se puede citar la disponibilidad de agua, ya que ésta juega múltiples papeles en los distintos procesos de la vida vegetal y controla el nivel de la actividad metabólica de las plantas, por lo que su pérdida afecta notablemente la naturaleza de las reacciones físicas y bioquímicas (Crowe y col., 1992). La cantidad de agua presente en una semilla madura apenas alcanza entre 10-15%, por lo que su contenido debe aumentar para comenzar las reacciones metabólicas. La rapidez en la imbibición está determinada por procesos físicos de difusión donde tiene importancia las propiedades de la semilla (tamaño, permeabilidad de la cubierta, contenido de sustancias hidratables, etc.). Es importante controlar la tasa de imbibición inicial de agua, ya que si es muy alta puede ser dañina para la semilla. Sin embargo, en la mayoría de los casos, la rapidez en la entrada de agua viene controlada por la cubierta seminal, la cual evita una imbibición excesivamente rápida que pudiera dañar irreversiblemente a las

membranas de las células superficiales. En este sentido, el proceso de imbibición está ligado a la humedad del sustrato donde germinará y la temperatura (Bradford, 1995).

La temperatura es tal vez el factor ambiental de mayor influencia en los procesos fisiológicos y bioquímicos de las plantas, condicionando por tanto su crecimiento y desarrollo. Dependiendo de la época del año en que la planta cumple su ciclo y la ubicación geográfica donde se desarrolle, las semillas pueden germinar en un rango de temperatura entre los 0 °C hasta los 45 °C. Por lo tanto, la sensibilidad de las especies difiere y no necesariamente una mayor temperatura se corresponde con un incremento en la germinación. Las semillas de cada especie pueden germinar dentro de un intervalo de temperaturas, sin embargo existe un valor óptimo donde se obtiene el mayor porcentaje de germinación en menor tiempo, y por arriba o debajo del cual la germinación se lleva a cabo pero más lentamente (Bewley, 1997).

Otro de los factores que puede influir en la germinación de las semillas es la luz, ya que es uno de los recursos más importantes para la vida de las plantas. Éstas poseen un sofisticado conjunto de fotorreceptores que les permiten percibir la luz y utilizarla eficientemente para distintos fines (Neff y col., 2000). Durante la germinación de las semillas, existen especies que sólo germinan bajo luz continua, mientras que otras sólo germinan en la oscuridad y otro grupo de semillas son indiferentes a la presencia de luz u oscuridad (Colbach y col., 2002).

Respecto de la concentración de oxígeno (O₂), éste tiene efectos complejos en la germinación de las semillas. La mayoría de las semillas requiere O₂ para germinar, pero este requerimiento depende en gran parte de la especie, ya que es el embrión el que lo necesita, siendo las cubiertas que lo recubren (debido a su estructura, grosor y/o propiedades bioquímicas de sus tejidos), las que reducen su entrada y determinan la sensibilidad de la semilla a este gas (Corbineau y Côme, 1995).

Otro de los factores es el pH del medio. La mayoría de los suelos se encuentran en un rango de pH que va desde 4,5 para suelos muy ácidos hasta 8,5 para suelos alcalinos. Las semillas de muchas especies germinan en altos porcentajes en un rango amplio de valores de pH, mientras que otras sólo alcanzan niveles elevados a un pH determinado (Ne'eman y col., 1999). Esto se debe a que incrementos o disminuciones en los valores de pH fuerza a las plantas a enfrentar problemas como la toxicidad por metales pesados, exceso de bicarbonatos, carencia de micronutrientes o baja disponibilidad de minerales.

I.6.1.2 Tratamiento térmico

El tratamiento térmico aplicado a los alimentos es uno de los procesos más utilizados tanto en la industria alimentaria como en el hogar. Algunos alimentos se procesan térmicamente durante la preparación antes de ser consumidos, o con el fin de ampliar su vida útil y/o mejorar aspectos organolépticos. Particularmente en los granos, el procesamiento térmico consiste generalmente en someterlos a la acción directa de calor seco y dependiendo de la temperatura y tiempo de proceso se producirá el secado o tostado de los mismos. Dichas condiciones se establecen de acuerdo al grado de humedad y tamaño del grano (Bates, 1994). Como consecuencia del procesado se produce en los mismos una serie de cambios físico-químicos que también son dependientes de la intensidad y duración del mismo. El cambio físicos más notable que se produce durante el tostado es la deshidratación de las semillas, donde se desarrollan características texturales de crocancia (Alamprese y col., 2009). Dentro de las reacciones químicas, se destaca la reacción de Maillard (RM), la que ha sido reconocida como la principal ruta implicada en las propiedades organolépticas de los alimentos tratados térmicamente, las cuales definirán la aceptabilidad de los mismos por parte de los consumidores (van Boekel, 2006; Cerny, 2008).

La RM fue descrita por primera vez en 1912 por el químico francés Louis Camille Maillard, sin embargo, fue John Hodge quien en 1953 propuso por primera vez un esquema de las etapas de esta compleja reacción (Hodge, 1953). La RM se inicia con una reacción de condensación entre un grupo amino libre y un grupo carbonilo. Posteriormente, y mediante una serie de reacciones complejas da lugar a los denominados, de manera genérica, productos de la reacción de Maillard (PRM). En un análisis más detallado, la RM puede dividirse en tres etapas: inicial, intermedia y final. La etapa inicial involucra la condensación entre un grupo amino libre de un aminoácido, péptido o proteína y el grupo carbonilo de azúcares reductores, de lípidos oxidados o de compuestos fenólicos oxidados (grupos o-quinona) para formar una base de Schiff, la cual se reordena posteriormente formando los llamados compuestos de Amadori. En la etapa avanzada, los productos de Amadori se descomponen dependiendo del pH, la actividad de agua, la presencia de metales divalentes o la temperatura, dando lugar a la formación de diferentes compuestos intermedios. La etapa final engloba un gran número de reacciones que incluyen ciclaciones, deshidrataciones, reorganizaciones y condensaciones que conducen a la conversión de los precursores de bajo peso molecular (furfurales, productos de fisión y reductonas) en melanoidinas, polímeros coloreados de elevado peso molecular que contienen nitrógeno (Ames, 2001). Se considera que las melanoidinas se originan por reacciones de condensación de grupos aldol y por polimerizaciones entre grupos aldehído y amino, cuya estructura está poco definida pero se ha postulado que ésta varía dependiendo de las condiciones en las que haya tenido lugar la reacción, así como del tipo de alimento implicado (Morales y col., 2012).

Así, desde un punto de vista tecnológico, la reacción de Maillard resulta de gran interés en la industria alimentaria, ya que sus productos aportan color, aroma y sabor a los alimentos procesados térmicamente. Sin embargo, desde un punto de vista fisiopatológico existe poco consenso de acuerdo a los efectos sobre la salud derivados de la ingesta de PRM en la dieta.

Algunos trabajos de investigación han descrito ciertos mecanismos por los cuales los PRM pueden causar daño en los tejidos. Estos incluyen: modificación de la función proteica debido a alteraciones en su estructura/conformación, cambios en los tejidos debido a entrecruzamientos inter/intramoleculares, promoción de la formación de radicales libres e inducción de la respuesta inflamatoria luego de unirse a receptores de la membrana celular (Delgado-Andrade, 2013). Bajo estos mecanismos se han relacionado ciertos PRM con el progreso y desarrollo de varios trastornos degenerativos, principalmente complicaciones relacionadas con la diabetes (Tessier, 2010; Morgan y col., 2002; Hofmann y col., 2002) y enfermedades cardiovasculares (Bucala y col., 1994; Xu y col., 2003; Birlouez-Aragón y col., 2010), aunque también se mencionan enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer o Parkinson (Li y col., 2012; Dalfo y col., 2005) y patologías relacionadas con huesos y cartílagos (Takahasi y col., 1997; Hein y col., 2006).

Aunque muchos estudios se han enfocado en el potencial efecto perjudicial por parte de los PRM, la evidencia de actividades biológicas benéficas también ha despertado el interés de ciertas investigaciones en las que se describen los mecanismos de acción y los compuestos particulares responsables de estos efectos positivos sobre la salud. De todos los PRM formados durante el procesado térmico de alimentos, varios autores coinciden que aquellos que se asocian en mayor medida con efectos biológicos positivos son los obtenidos en etapas finales de la reacción, es decir, las melanoidinas. Así, varios estudios han destacado el potencial antioxidante de las mismas (Manzocco y col., 2001; Natella y col., 2002; Valls-Bellés y col., 2004; Rufián-Henares y Morales, 2007), mientras que otros estudios les atribuyen actividad prebiótica (Borrelli y Fogliano, 2005), antiinflamatoria (Vitaglione y col., 2010), antialérgica (Gruber y col., 2004), antimicrobiana (Rufián-Henares y de la Cueva, 2009), anticancerígena (Vitaglione y col., 2012), antihipertensiva (Rufián-Henares y Morales, 2007), antimutagénica (Yen y col., 1992) y detoxificante (Morales y col., 2012).

En este contexto, es difícil establecer conclusiones firmes acerca de las consecuencias fisiológicas derivadas de la ingesta de PRM, debido a la diversidad de compuestos formados en las diferentes matrices alimentarias. En general se considera que en los alimentos procesados térmicamente coexisten PRM con potenciales efectos benéficos y perjudiciales, por lo que la mejor estrategia para limitar los efectos negativos y preservar las acciones positivas de los PRM ingeridos con la dieta parece ser manteniendo una dieta equilibrada y variada, no sólo en el tipo de alimento consumido, sino también en la forma que es procesado.

I.6.1.3. Irradiación con luz ultravioleta (UV)

La radiación UV comprende la región del espectro electromagnético entre 200 y 400 nm de longitud de onda. Una subdivisión comúnmente utilizada en la literatura divide la región UV en tres subregiones (Shama, 2007):

- Radiación ultravioleta de onda larga (UV-A): entre 320-400 nm
- Radiación ultravioleta de onda media (UV-B): entre 280-320 nm
- Radiación ultravioleta de onda corta (UV-C): entre 200-280 nm

En la industria alimentaria, la radiación UV se utiliza principalmente dado su efecto germicida para la desinfección de los ambientes donde se procesan o elaboran alimentos, en la desinfección de agua y de superficies de empaque. Con el mismo objetivo se ha evaluado la posibilidad de extender su uso para tratamientos directos sobre los alimentos frescos y procesados. De esta manera en los últimos años, el tratamiento con radiación UV se propuso como un método para reducir las pérdidas postcosecha de frutas y hortalizas ocasionadas por el ataque de microorganismos, a la vez que se observó que retrasa la maduración excesiva y la senescencia de este tipo de productos durante el almacenamiento (Shama y Alderson, 2005; Shama, 2007).

El efecto de la radiación UV sobre los organismos vivos es más acentuado a medida que disminuye la longitud de onda. De esta manera la radiación UV-C resulta la más dañina, debido a que es absorbida por proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, provocando alteraciones funcionales de estas macromoléculas en las células. Además, se ha mencionado que induce una sobreproducción de radicales libres que conducen al desarrollo de estrés oxidativo que provoca, finalmente, disminución de la viabilidad y/o la muerte celular (Danon y Gallois, 1998; Jansen, 2002; Zacchini y de Agazio, 2004; Schreiner y col., 2012). Este mecanismo explica la acción germicida de altas dosis de radiación UV-C, la que se utiliza comúnmente para la eliminación de muchos tipos de microorganismos tales como bacterias, levaduras, algas y mohos (Bolton, 2001).

Por otro lado, se observó que bajas dosis de radiación UV-B o UV-C (0,5 – 9.0 kJ/m²) pueden desencadenar respuestas de aclimatación sobre ciertas plantas (Lavola y col., 2003; Zu y col., 2011), donde los radicales libres generados juegan un rol clave en los procesos de señalización involucrados en dicho proceso (Dat y col., 2000). Las respuestas a la aclimatación bajo las condiciones de radiación incluyen la activación de sistemas de defensa enzimáticos y no enzimáticos que ayudan a la planta a protegerse contra la misma y a reparar el daño que causa (Loyall y col., 2000; Jansen, 2002; Lavola y col., 2003; Katerova y col., 2009; Rai y col., 2011). Particularmente, varios autores han comprobado incrementos en la producción de metabolitos secundarios en plantas irradiadas a dosis relativamente bajas de luz UV-B o UV-C, entre los que se incluyen ciertos compuestos fenólicos (Kreft y col., 2002; Antognoni y col., 2007; Nadeau y col., 2012; Schreiner y col., 2012). Como las vías de producción de metabolitos secundarios están interrelacionadas, el hecho de que algunos de estos compuestos aumenten y otros disminuyan no es sorprendente, siendo prevalente la biosíntesis de aquellos compuestos que poseen mayor actividad antiradicalaria o propiedades de protección contra la radiación UV (Jansen y col., 2008).

1.6.2. Efectos de los procesos seleccionados sobre las propiedades antioxidantes en alimentos

Las frutas, hortalizas y granos son productos que se consumen tanto frescos como procesados. En este último caso, se incluyen tanto procesos llevados a cabo por la industria alimentaria, como aquellos que se practican a nivel doméstico, previo a su consumo. En cualquier caso, el fin último es ampliar la vida útil y/o modificar las propiedades organolépticas del producto. Durante el procesamiento, la composición nutricional del alimento puede verse alterada, como así también el contenido, biodisponibilidad y actividad (incluyendo capacidad antioxidante) de compuestos bioactivos presentes en el mismo (Nicoli y col., 1999; Podsdek y col., 2008; Wootton-Beard, 2011). En algunos casos los productos procesados tienen valores nutricionales menores que sus respectivos productos frescos, debido principalmente a la pérdida de nutrientes y fitoquímicos que se produce durante su procesamiento (Podsdek 2007, Podsdek y col., 2008). En otros casos, el proceso aplicado conserva atributos sensoriales y previene las oxidaciones enzimáticas, conservando la capacidad antioxidante original, tal como ocurre en el escaldado de vegetales (Mazzeo y col., 2011). En términos generales, las consecuencias del procesamiento sobre la actividad antioxidante neta de los alimentos, resultan de la ocurrencia consecutiva o simultánea de diversos eventos (Nicoli y col., 1999). Como resultado, no es posible predecir de manera general, los cambios que un determinado compuesto antioxidante presente en un alimento puede experimentar bajo diferentes condiciones de un proceso. Dichos cambios dependerán, en parte, de la matriz considerada, de las condiciones experimentales y duración del tratamiento y de factores externos, como la concentración de oxígeno y la presencia de luz (Wen y col., 2010). A continuación se enumeran algunas de las posibles consecuencias que el procesado puede inducir sobre las propiedades antioxidantes intrínsecas de los alimentos:

- Sin efecto

En algunos casos, el procesamiento de un alimento no provoca un cambio significativo en el contenido y la actividad de los antioxidantes naturalmente presentes en el mismo. Este es el caso, por ejemplo, del efecto de tratamientos térmicos intensos o prolongados sobre ciertos carotenoides, como licopeno y β -caroteno, compuestos que resultaron ser altamente termoestables luego someter zanahorias, batatas o jugo de tomate a procesos de esterilización o cocción (Mayer-Miebach y col., 2005; Wildman, 2007; Vásquez-Caicedo y col., 2007).

- Pérdida de antioxidantes naturales

En la mayoría de los casos, la elaboración de alimentos a nivel industrial, o incluso la preparación de los mismos en el hogar, puede conducir a una pérdida significativa de antioxidantes naturales. Por ejemplo, varios estudios han demostrado la inestabilidad del ácido ascórbico en varias matrices alimentarias luego de la aplicación de procesos tales como escaldado, cocción, pasteurización, esterilización, deshidratación y congelación (van den Broeck y col., 1998; Sikora y col., 2008; Marfil y col., 2008). También, se han registrado pérdidas de compuestos fenólicos y de tocoferoles en alimentos sometidos a procesos térmicos, tales como escaldado, pasteurización, cocción y fritura, en los que intervinieron efectos combinados de la luz, la presencia de oxígeno y alta temperatura (Patras y col., 2010; Hoffmann-Ribani y col., 2009; Corsini y col., 2009). Otra causa del descenso en la actividad antioxidante en alimentos vegetales tratados térmicamente es el consumo del ácido ascórbico y de ciertos polifenoles en la reacción de Maillard, la que se vio propiciada bajo las condiciones del tratamiento (Manzocco y col., 2001; Sikorski y col., 2007). Otras operaciones tales como pelado, corte y rebanado indujeron una disminución enzimática de ciertos antioxidantes naturales tales como el ácido ascórbico o los polifenoles en frutas y verduras (McCarthy y Mattheus, 1994; Brown y col., 2006).

- Mejora de las propiedades antioxidantes de compuestos antioxidantes

A pesar de que las oxidaciones químicas/enzimáticas causan una disminución progresiva en las propiedades antioxidantes de los alimentos durante el almacenamiento, ciertos autores han observado un efecto contrario (Manzocco y col., 1999; Cheng y col., 2006). Por ejemplo, en el vino tinto se ha observado que los compuestos fenólicos que presentan un estado de oxidación intermedio incrementan su habilidad de transferir electrones y/o donar átomos de hidrógeno, lo que se traduce en una mayor eficiencia en la inhibición de radicales libres en comparación con uno no oxidado (Manzocco y col., 1999; Nicoli y col., 1999).

- Formación de nuevos compuestos con actividad antioxidante

Este es el caso de los productos de la reacción de Maillard (PRM) formados como consecuencia de un tratamiento térmico intenso o almacenamiento prolongado, los cuales han sido evaluados en diferentes alimentos y sistemas modelo, demostrado poseer propiedades antioxidantes significativas (Yilmaz y Toledo, 2005; Acar y col., 2009; Kim y Lee, 2009).

- Formación de nuevos compuestos con actividad pro-oxidante

Se ha mencionado que ciertos PRM formados luego de tratamientos térmicos a baja temperatura o de corta duración poseen propiedades pro-oxidantes que contribuirían a disminuir la capacidad antioxidante inicial, como ha sido observado en muestras de jugo de tomate sometidas a calentamiento (95 °C) durante diferentes tiempos (Anese y col., 1999; Kaur y Kapoor, 2001).

- Interacción entre los diferentes componentes de los alimentos

Este es el caso que se presenta cuando se producen reacciones redox en el seno de una matriz alimentaria, ya sea entre diferentes antioxidantes naturales (tal como la regeneración de los radicales tocoferoxilo a tocoferoles por intervención del ácido ascórbico) (Buettner y Jurkiewicz, 1996; Laguerre y col., 2007) o entre los compuestos antioxidantes y productos de la oxidación lipídica (Nicoli y col., 1997). Estos eventos tienen lugar principalmente cuando se ponen en contacto diferentes matrices alimentarias (por ejemplo una fase acuosa y una fase lipídica)

mediante el mezclado o batido, donde el procesamiento favorece o incrementa estas reacciones (Nicoli y col., 1999).

Bajo estas consideraciones, la Tabla 1. 2. presenta un resumen de las consecuencias que puede acarrear la aplicación de diversos procesos sobre el perfil de compuestos y/o propiedades antioxidantes en los alimentos.

Tabla 1.2. Efecto neto y causas generales del procesamiento de los alimentos sobre sus propiedades antioxidantes

Sin cambios aparentes	<ul style="list-style-type: none"> • La concentración de antioxidantes naturales no es afectada significativamente • La pérdida de antioxidantes naturales es contrarrestada por la formación simultánea de nuevos compuestos con actividad antioxidante
Aumento	<ul style="list-style-type: none"> • Se acentúan las propiedades antioxidantes de ciertos compuestos naturales • Existe síntesis de nuevos compuestos con actividad antioxidante
Disminución	<ul style="list-style-type: none"> • Se produce pérdida de antioxidantes naturales • Hay formación de nuevos compuestos con actividad pro-oxidante

1.6.2.1. Aplicación de los procesos seleccionados como estrategias para mejorar las propiedades antioxidantes del grano de quinoa

Los procesos que se aplicaron a las semillas de quinoa en el presente estudio fueron seleccionados en base a datos publicados que dan cuenta de un efecto positivo del procesamiento sobre la actividad antioxidante en matrices similares. Así mismo, se consideró como criterio de elección de los procesos, la viabilidad de aplicación del material final obtenido en la preparación de alimentos. En este sentido, diversas investigaciones han abordado el estudio de las modificaciones en las propiedades antioxidantes luego de la aplicación de diversos procesos tecnológicos a diferentes

matrices alimentarias. Por ejemplo, el procesado térmico de baja intensidad (100 - 120°C) mostró incrementos en la actividad antioxidante neta del maíz directamente relacionados con la temperatura de calentamiento (Dewanto y col., 2002). Los autores atribuyeron este hecho al aumento progresivo en el contenido de compuestos fenólicos totales libres, a la vez que se observó una disminución en los niveles de ácido ascórbico durante el proceso. En otra investigación, se analizó el efecto del tiempo de aplicación de un proceso térmico a 100 °C durante 9 días sobre las propiedades antioxidantes del grano de trigo, resultando en aumentos progresivos en el contenido de ácidos fenólicos y en la actividad antioxidante de las harinas obtenidas (Cheng y col., 2006). En este caso los autores atribuyeron el hecho a la liberación de compuestos fenólicos que se encontraban previamente conjugados por efecto del tratamiento térmico.

Acar y col. (2009) demostraron que un tratamiento de tostado a 150 °C aplicado durante diferentes tiempos a varios tipos de semillas, frutas secas y leguminosas ejerció un efecto positivo o negativo sobre la actividad antioxidante neta, de acuerdo al tipo matriz considerada. Los autores postularon que el efecto observado del tostado sobre la actividad antioxidante resultó del balance que se produjo en cada caso entre el proceso de degradación de compuestos antioxidantes naturales y la formación de PRM con capacidad antioxidante. Así, además de las condiciones de tostado, la cantidad de sustratos de la reacción de Maillard presentes en cada matriz resultó determinante de la actividad antioxidante medida luego del procesamiento. A pesar que la degradación de antioxidantes naturales fue el fenómeno prevalente como consecuencia del tostado, en el caso de materiales ricos en almidón, se observó que dicho proceso condujo a un desarrollo progresivo de la capacidad antioxidante relacionada con la formación de PRM.

Por otro lado, otras investigaciones han descripto el efecto de la aplicación de distintos bioprocesos en las propiedades antioxidantes de diversos materiales vegetales. Así por ejemplo,

en el caso del lupino (*Lupinus angustifolius* y *Lupinus albus*), tanto el proceso de germinación de las semillas como el de fermentación natural e inducida de la harina mejoraron el valor nutritivo de esta legumbre, produciendo además, un aumento de la capacidad antioxidante total (Fernández-Orozco y col., 2006; Fernández-Orozco y col., 2008).

También, la irradiación con luz UV, aplicada principalmente como tratamiento para reducir las pérdidas poscosecha de frutas y hortalizas (Shama, 2007) ha demostrado ejercer un efecto promotor de la biosíntesis de estilbenos en uva (*Vitis vinifera*) y arándano (*Vaccinium myrtillus*) (Wang y col., 2009; Cantos y col., 2000). Así, este proceso permitió en ambos casos, incrementar considerablemente el contenido en resveratrol y de otros estilbenos derivados en dichas frutas, resultando factible su aplicación para obtener ingredientes o materias primas con propiedades antioxidantes mejoradas para la elaboración de nuevos alimentos. Si bien el efecto de la aplicación de radiación UV sobre las propiedades antioxidantes de semillas o brotes ha sido menos estudiada, algunas investigaciones han demostrado incrementos en la actividad antioxidante luego de aplicar este proceso a semillas de soja (*Glycine max*), habas (*Vicia faba*), o trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*) (Boveris y col., 2001; Shetty y col., 2002; Tsurunaga y col., 2013).

Las referencias bibliográficas citadas previamente son representativas de los numerosos trabajos que sirvieron de base para la selección de los procesos que fueron aplicados al grano de quinoa en el presente estudio con el fin de obtener materias primas con propiedades antioxidantes mejoradas con respecto al grano sin tratar. Es de esperar que dichas mejoras sean consecuencia de un cambio en el perfil cuali-cuantitativo de compuestos con actividad antioxidante luego del tratamiento, ya sea por el aumento de compuestos antioxidantes naturales y/o la síntesis de nuevos componentes con capacidad antioxidante presentes en la matriz.

1.7. Consideraciones finales

La revisión bibliográfica realizada en este capítulo, como marco referencial conocido a la fecha en relación a la temática que se aborda en este estudio, permitió establecer las bases sobre las cuales se sustentan la hipótesis y objetivos posteriormente planteados para la presente tesis.

Una de las estrategias más promisorias para el desarrollo de alimentos funcionales se fundamenta en la posibilidad de modular los sistemas redox y antioxidante del organismo. Así, los compuestos antioxidantes naturales presentes en la dieta adquieren gran importancia al permitir reforzar las defensas antioxidantes endógenas, restableciendo el balance oxidativo celular cuando la acción de las primeras se torna insuficiente frente a la presencia y ubicuidad de agentes oxidantes deletéreos. Los alimentos de origen vegetal son fuente de fitoquímicos antioxidantes, tales como ácido ascórbico, tocoferoles, carotenoides y compuestos fenólicos. Dentro de las posibles fuentes vegetales, se ha establecido que los granos y sus productos derivados contienen fitoquímicos únicos que complementan los aportados por frutas y verduras cuando se consumen como parte de una dieta normal. En particular, las semillas de quinoa, además de presentar un elevado valor nutricional, representan una fuente de compuestos fenólicos. Particularmente éstos compuestos se destacan por presentar diversas actividades biológicas, además de la actividad antioxidante mencionada, dando lugar a potenciales aplicaciones en la industria alimentaria. En este sentido una manera de incrementar los antioxidantes presentes en la dieta, es incorporando alimentos que han sido enriquecidos con compuestos fenólicos, utilizando extractos obtenidos de fuentes vegetales seleccionadas mediante un proceso de extracción selectivo. Otra estrategia factible es la aplicación de ciertos procesos a dichas especies vegetales con el fin de inducir cambios en su perfil de compuestos antioxidantes que conduzcan a un incremento neto en la capacidad antioxidante total. De esta manera lo que se obtiene es, por un lado aumentar la vida útil del alimento mediante una alternativa a la utilización de antioxidantes sintéticos, como así también la

posibilidad de contar con un extracto y/o ingrediente para la formulación de nuevos alimentos con potenciales propiedades funcionales.

1.8. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Los procesos tecnológicos aplicados a semillas modifican su contenido y perfil de sustancias antioxidantes. La aplicación de uno o más procesos, bajo un conjunto seleccionado de condiciones experimentales, genera un producto con mayor capacidad antioxidante.

1.9. OBJETIVO GENERAL

Obtener materias primas a partir de semillas de quinoa, con contenido de componentes bioactivos antioxidantes aumentado mediante la aplicación de procesos, que puedan ser utilizadas en la elaboración de nuevos productos alimenticios con potenciales propiedades funcionales.

1.9.1. *Objetivos particulares*

- Optimizar los parámetros de mayor influencia en la extracción de los compuestos fenólicos a partir de semillas de quinoa, evaluando la conveniencia de la utilización de ultrasonido.
- Evaluar la aplicación de los procesos de germinación, tratamiento térmico, irradiación con luz UV-C y combinaciones de los mismos (germinado con tratamiento térmico y germinado con irradiación UV-C), como estrategias tecnológicas para obtener ingredientes a partir de semillas de quinoa, que resulten enriquecidos en compuestos antioxidantes, seleccionando en cada caso, aquellas condiciones experimentales que demuestren ser las óptimas a tal fin.
- Analizar las posibles contribuciones de componentes, tales como ácidos fenólicos, flavonoides, ácido ascórbico, tocoferoles, productos de la reacción de Maillard, etc. a la capacidad antioxidante de los productos obtenidos luego de cada proceso aplicado.
- Elaborar y evaluar un producto alimenticio utilizando uno de los ingredientes obtenidos luego de la aplicación de los procesos mencionados a semillas de quinoa, el que será seleccionado por su aporte de componentes antioxidantes a dicho producto.

Capítulo II. MATERIALES Y MÉTODOS

II. 1. MATERIALES

II.1.1 Material vegetal

Las semillas de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd., variedad Real) utilizadas en la presente tesis fueron obtenidas de la firma comercial Dietética Científica SACIFI (Argentina), las cuales se comercializan bajo la marca Yin Yang. Se adquirió un lote de 5 kg de semillas cosecha 2011 aptas para consumo (libres de saponinas). Las mismas fueron fraccionadas en bolsas plásticas y almacenadas en un contenedor plástico hermético que se mantuvo en cámara a una temperatura de 5 °C, hasta su uso.

II.1.2 Reactivos

Los reactivos de uso específico utilizados en las diferentes técnicas descritas en este capítulo, así como los estándares y solventes utilizados en las metodologías por HPLC fueron adquiridos de las empresas Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, EE.UU.) y Merck (Darmstadt, Alemania). Los reactivos y solventes de uso general fueron de calidad p.a. y de procedencia nacional.

II. 2. MÉTODOS

II.2.1. Composición centesimal

Las muestras para realizar los ensayos de composición centesimal fueron obtenidas por molienda de las semillas de quinoa, utilizando un molinillo de café de cuchilla horizontal (modelo KSM 2, Braun, México) durante 30 segundos. A partir de la harina resultante se realizaron, por triplicado, las determinaciones que se mencionan a continuación.

II.2.1.1. Determinación del contenido de humedad

El contenido de humedad se determinó gravimétricamente según la técnica de la AOAC (1990) para harinas de cereales. Para ello se distribuyó uniformemente 2 g de harina en cápsulas de

aluminio previamente taradas, las cuales fueron secadas en estufa con circulación forzada de aire (modelo SR5070, FAC, Argentina) durante 1 h a 130 °C. La muestra se llevó a temperatura ambiente en un desecador antes de determinar su peso. El contenido de humedad se expresó como porcentaje en base seca según la ecuación:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P_h - P_s}{P_s} \times 100 \quad (\text{Ec. II.1})$$

donde:

Ph: peso húmedo de la muestra (g)

Ps: peso seco de la muestra (g)

II.2.1.2. Determinación del contenido de proteínas

El contenido de proteína se determinó utilizando el método de Kjeldahl (AOAC, 1990), empleando un equipo de digestión y destilación automáticos (B-316, Büchi, Suiza). Primero se realizó una digestión de la muestra con ácido sulfúrico concentrado y caliente en presencia de sulfato de cobre como catalizador y sulfato de potasio para aumentar el punto de ebullición del ácido. Posteriormente la muestra digerida se neutralizó con hidróxido de sodio al 30 % y el amoníaco liberado se destiló sobre un exceso de solución de ácido bórico y se determinó por titulación con ácido clorhídrico 0,1 N. Paralelamente se realizó un blanco de reactivos. Para calcular el contenido proteico de la muestra se multiplicó el contenido de nitrógeno presente por 6,25.

$$\% \text{ Proteínas} = \frac{V_1 - V_B \times N_{\text{HCl}}}{P_m} \times 1,4 \times 6,25 \quad (\text{Ec. II.2})$$

donde:

V₁: volumen de HCl consumido en la titulación de la muestra (mL)

V_B: volumen de HCl consumido en la titulación del blanco (mL)

P_m : peso seco de la muestra (g)

N_{HCl} : Normalidad del ácido clorhídrico utilizado en la titulación

II.2.1.3. Determinación de grasas totales

Se realizó en un equipo Soxhlet utilizando *n*-hexano (grado analítico, CAS N°110–54–3) como solvente, siguiendo la norma IUPAC 1.122 (IUPAC, 1992). Para ello, se dispusieron aproximadamente 10 g de harina de quinoa en cartuchos de papel Whatman N° 3. El proceso se efectuó durante 8 h a ciclos de reflujo continuo con una temperatura de 80 °C. Pasado ese tiempo, el solvente fue removido del aceite utilizando un rotavapor (R-114, Büchi, Flawil, Suiza) a 40 °C y presión reducida. El contenido de grasa fue determinado gravimétricamente y se expresó como porcentaje en peso sobre base seca según la ecuación:

$$\% \text{ Grasa} = \frac{P_{b+g} - P_b}{P_m} \times 100 \quad (\text{Ec. II.3})$$

donde:

P_{b+g} : peso del balón + grasa (g)

P_b : peso del balón (g)

P_m : peso seco de la muestra (g)

II.2.1.4. Determinación del contenido de cenizas

La determinación de cenizas se basó en la técnica AOCS (1998). Aproximadamente 2 g de harina de quinoa se colocaron en un crisol de porcelana, el que se calentó sobre tela metálica con mechero hasta residuo carbonoso para posteriormente llevarlo a mufla a 550 °C hasta obtener un residuo blanquecino, libre de partículas carbonosas. El contenido de cenizas se expresó como porcentaje en peso sobre base seca según la ecuación:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{P_{mc}}{P_m} \times 100 \quad (\text{Ec. II.4})$$

donde:

P_{mc} : peso de la muestra calcinada (g)

P_m : peso seco de la muestra (g)

II.2.1.5. Determinación de fibra dietaria total

El contenido de fibra dietaria total (FDT) se determinó utilizando el método enzimático gravimétrico descrito según Prosky y col., (1988). La muestra de harina (2 g) fue tratada con α -amilasa termoestable a 100 °C y luego digerida enzimáticamente con proteasa y amiloglucosidasa para eliminar las proteínas y el almidón. Posteriormente, se adicionó etanol al 95% y la mezcla se reposó durante 1 h para asegurar la precipitación de la FDT. El precipitado fue filtrado y lavado en pasos sucesivos con etanol al 78%, etanol al 95% y acetona, posteriormente fue secado y pesado (w_1). A partir de estos residuos se determinó el contenido de cenizas por calcinación de la muestra a 550 °C (w_2), y se calculó el contenido de proteínas por el método de Kjeldahl (w_3).

El contenido de FDT se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ FDT} = \frac{(w_1 - w_2 - w_3)}{P} \times 100 \quad (\text{Ec. II.5})$$

donde:

w_1 : peso del precipitado filtrado seco (g)

w_2 : peso correspondiente a cenizas (g)

w_3 : peso correspondiente a proteínas (g)

P: peso de la muestra, expresado en base seca (g)

II.2.2. Metodología relativa al proceso de extracción de compuestos fenólicos

Dentro de los antioxidantes naturales encontrados en las semillas de quinoa se destaca la importancia de los compuestos fenólicos, cuya aplicación en la formulación de potenciales alimentos funcionales, hace interesante su extracción de manera selectiva. Con el fin de optimizar la extracción de compuestos fenólicos de la quinoa, las actividades llevadas a cabo se desarrollaron en dos etapas de experiencias sucesivas. En primera instancia se evaluaron los efectos de los principales parámetros operacionales (naturaleza del solvente, temperatura, tamaño de partícula, tiempo, etc.) utilizando un parámetro como variable mientras el resto de los parámetros adquirieron valores fijos, con el fin de identificar aquellos que tienen mayor influencia sobre el proceso de extracción. Dentro de estos parámetros, se evaluó también la utilización de la asistencia de ultrasonido, ya que ha demostrado ser eficaz en la extracción de compuestos fenólicos a partir de diversas matrices vegetales. Posteriormente, se optimizó el proceso de extracción utilizando un diseño experimental y metodología de superficie de respuesta que incluyó como variables aquellos parámetros de mayor influencia sobre el dicho proceso.

II.2.2.1. Pretratamiento de las muestras

Previo a las experiencias de extracción las semillas de quinoa fueron secadas en estufa (modelo SD755, ORL, Argentina) a 40°C durante 48 hs y luego fueron molidas en molinillo de laboratorio (A-10, IKA Werke, Alemania). Las partículas obtenidas fueron posteriormente tamizadas utilizando un equipo vibrador provisto con un juego de tamices (modelo LR2006, Zonytest, Argentina). Así, se obtuvieron tres fracciones de diferente diámetro (d): $d < 0,5$ mm; $0,5 < d < 0,71$ mm; y $d > 0,71$ mm, resultando la primera la fracción la más abundante.

II.2.2.2. Extracción sólido-líquido sin y con asistencia de ultrasonido

El conjunto de experiencias de extracción se realizó en un reactor de vidrio de 1 L de capacidad, equipado de un generador de ultrasonido de potencia regulable (Nexus P198-R, SinapTec, Lezennes, Francia), al cual se le acopló un agitador de paletas axiales conectado a un motor de velocidad regulable. El encamisado del reactor permitió controlar la temperatura de las extracciones por circulación de agua desde un baño termostático externo (Figura 2.1)

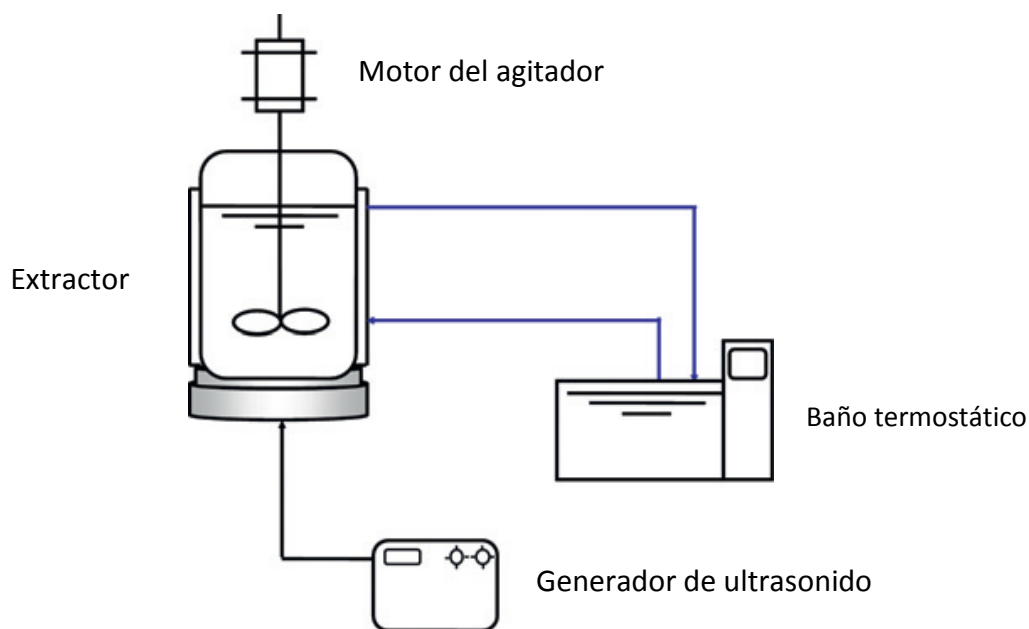


Figura 2.1. Representación esquemática del reactor termostatzado asistido por ultrasonido utilizado en la extracción.

Para todas las experiencias de extracción, la velocidad de agitación se fijó en 120 rpm, ya que dicha velocidad permitió mantener en suspensión las partículas en el volumen de solvente utilizado. El generador de ultrasonido trabajó en una frecuencia fija de 30,8 kHz y, de acuerdo a las experiencias, la potencia de ultrasonido se reguló entre 0 y 100 W, la temperatura de extracción entre 20 y 60 °C, el tiempo de extracción entre 5 y 120 min, la relación sólido/solvente en 1/10, 1/20 o 1/40, los solventes utilizados fueron agua, etanol o mezclas de etanol-agua. El volumen de

solvente utilizado en todas las experiencias se fijó en 400 mL. Los extractos líquidos obtenidos luego de cada condición de extracción se centrifugaron durante 10 min a 10677 xg (centrífuga Eppendorf 5804R, Hamburgo, Alemania) para eliminar las partículas sólidas en suspensión. Luego se retiró el sobrenadante, el cual se transvasó y almacenó a -20 °C hasta su uso.

II.2.2.3. Diseño experimental y análisis estadístico

De acuerdo a los resultados de la primera etapa de experiencias, los parámetros a optimizar fueron: temperatura, composición del solvente (diferentes mezclas de etanol-agua) y potencia de ultrasonido, ya que fueron los de mayor influencia sobre el proceso de extracción. La velocidad de agitación, la granulometría de la muestra, el tiempo de extracción y la relación sólido/solvente se establecieron como parámetros fijos. Se definieron de esta manera tres variables de entrada (X) y seis respuestas a evaluar luego de realizar las extracciones (Y) (Figura 2.2).

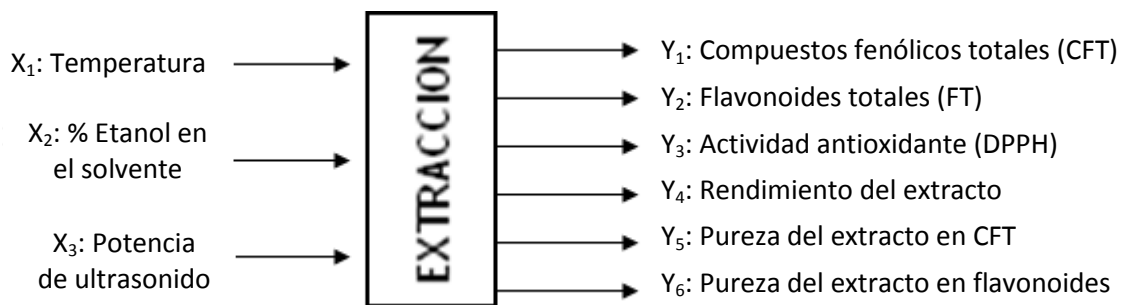


Figura 2.2. Factores de entrada y respuestas a estudiar en el proceso de extracción.

La optimización la extracción de los compuestos fenólicos de la quinoa 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 (en inglés CCFD, *central composite face-centered design*). Los parámetros y sus niveles fueron: temperatura de extracción (20, 40, 60 °C), concentración de etanol en el solvente (0, 40, 80 %, v/v) y potencia de ultrasonido (0, 50, 100 W.) La Tabla 2.1 muestra los valores codificados de los tres niveles (variables) utilizados en el diseño experimental

y su correspondiente valor real para los factores de entrada. Como respuestas se tomaron: el contenido de compuestos fenólicos totales (mg EAG/100g materia seca), contenido de flavonoides totales (mg EQ/100g materia seca), actividad antioxidante (% inhibición DPPH), rendimiento total del extracto (g de extracto seco) y pureza del extracto en CFT y en flavonoides (g/100g materia seca).

Tabla 2.1. Correspondencia valores codificados/valores reales del dominio experimental evaluado.

	X ₁ : Temperatura (°C)	X ₂ : Solvente (% etanol)	X ₃ : Potencia de Ultrasonido (W)
Nivel -1	20	0	0
Nivel 0	40	40	50
Nivel +1	60	80	100

Se requirieron por lo tanto de 18 experiencias, agrupadas en 8 para testear el modelo a dos niveles (-1,1) para los 3 factores (2^k , $k=3$); 4 réplicas en el punto central para evaluar el error puro y 6 ensayos restantes para testear los valores centrales de las caras del plan (puntos en estrella). La Tabla 2.2 presenta el plan de experiencias utilizado, mostrando los valores reales y codificados de las variables y sus interacciones.

Para predecir el valor de cada una de las respuestas estudiadas se utilizó un polinomio de segundo orden (Ec. II.7) que incluyó todos los términos de interacción entre las variables:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^3 b_i x_i + \sum_{i=1}^3 b_{ii} x_i^2 + \sum_{i \neq j=1}^3 b_{ij} x_i x_j \quad (\text{Ec. II.7})$$

donde Y representa la variable respuesta, b_0 es una constante, b_i , b_{ii} , b_{ij} son los coeficientes lineales, cuadráticos y de interacción y x_i , x_j son los niveles de las variables independientes. Los resultados fueron analizados estadísticamente utilizando el programa *Design Expert* (versión

8.0.7.1, Stat-Ease Inc., Minnesota, EE.UU.) y los coeficientes se interpretaron usando el test F. Para establecer las condiciones óptimas de extracción se realizaron tres pasos estadísticos principales: análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95 %, análisis de regresión y gráficos de superficie de respuesta, variando dos de las variables dentro de los rangos experimentales y manteniendo la otra variable constante (en el punto central).

Tabla 2.2. Plan de experiencias e interacciones entre variables.

Nº Exp	X1: Temp (°C)	X2: Solvente (% etanol)	X3: Ultrasonido (W)	X1	X2	X3	X1.X2	X1.X3	X2.X3	X1 ²	X2 ²	X3 ²
1	20	0	0	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1
2	60	0	0	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1
3	20	80	0	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	1
4	60	80	0	1	1	-1	1	-1	-1	1	1	1
5	20	0	100	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1
6	60	0	100	1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1
7	20	80	100	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1
8	60	80	100	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	40	40	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	40	40	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	40	40	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	40	40	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	20	40	50	-1	0	0	0	0	0	1	0	0
14	60	40	50	1	0	0	0	0	0	1	0	0
15	40	0	50	0	-1	0	0	0	0	0	1	0
16	40	80	50	0	1	0	0	0	0	0	1	0
17	40	40	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	1
18	40	40	100	0	0	1	0	0	0	0	0	1

II.2.2.4. Evaluación del desempeño de la extracción sólido-líquido

Una extracción ideal se caracteriza por un rendimiento máximo de extracto, una alta selectividad y una concentración máxima de la molécula de interés en el extracto. Sin embargo, algunos de estos factores pueden ser antagonistas, como por ejemplo el rendimiento y la concentración, que dan

una idea de la pureza del extracto. Como algunos de estos conceptos se han evaluado como respuestas del diseño experimental, es importante definirlos previamente:

II.2.2.4.1. Rendimiento total

El rendimiento es un parámetro que tiene en cuenta la eficiencia de la operación. Se define como la cantidad de extracto seco (g) en relación con la cantidad inicial de material vegetal (g). Esta materia seca representa el conjunto de moléculas extraídas a partir de las semillas de quinoa y se expresa como porcentaje en base seca.

II.2.2.4.2. Rendimiento en compuestos fenólicos totales

De manera similar, este parámetro se define como la cantidad de compuestos fenólicos totales (g) respecto de la cantidad inicial de material vegetal (g) y se expresa como porcentaje en base seca.

II.2.2.4.3. Pureza del extracto en compuestos fenólicos

Este parámetro caracteriza la selectividad de la extracción y se define como la cantidad de sustancia de interés extraída respecto a la cantidad de extracto seco total. En forma práctica es el cociente entre los parámetros definidos anteriormente, se expresa de manera porcentual y corresponde al contenido de compuestos fenólicos en el extracto seco.

II.2.2.5. Procedimiento de extracción

Se pesaron aproximadamente 2 g de harina de quinoa en un tubo plástico de 50 mL con tapa rosca y se agregaron 20 mL de etanol 80 %. La mezcla se homogeneizó y se mantuvo en agitación por 30 min (160 rpm, 60 °C) en incubadora termostatzada con agitador orbital (MaxQ 8000, Thermo Scientific Inc., Massachusetts, EE.UU.). Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 10677 xg durante 10 min (centrífuga Eppendorf 5804, Hamburgo, Alemania) y el sobrenadante fue retirado y almacenado. A partir del residuo sólido se realizó una segunda extracción bajo las mismas

condiciones. Finalmente los sobrenadantes fueron reunidos, filtrados (membrana de nylon de 0,45 μm , Gamafil, Argentina) y almacenados a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

II.2.3. Metodología relativa a la caracterización de los extractos

II.2.3.1. Determinación de la materia seca en los extractos

El rendimiento total de sólidos se obtuvo por medio de una termobalanza automática (modelo XM60, Precisa, Poissy, Francia). Para ello se depositó 5 g de extracto en una bandeja de aluminio y se expuso a una temperatura de $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la evaporación completa de la muestra líquida. Los resultados se expresaron como porcentaje de materia seca, a través de la siguiente ecuación:

$$R_t \text{ \% m. s.} = \frac{P_{es}}{P_m} \times 100 \quad (\text{Ec. II.8})$$

donde:

R_t : rendimiento total (% m.s.)

P_{es} : peso de extracto seco obtenido (g)

P_m : peso seco de la muestra (g)

II.2.3.2. Determinación de compuestos fenólicos totales (CFT)

La cuantificación de CFT se realizó utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu (solución de ácido fosfomolibdico y ácido fosfowolfrámico) que oxida los compuestos polifenólicos a fenolatos en medio alcalino, formando un complejo de molibdeno-tungsteno de color azul. La determinación se realizó siguiendo el protocolo propuesto por Singleton y col., (1999): se mezclaron 100 μL de muestra con 1,5 mL de agua destilada, luego se agregaron 100 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu y 300 μL de solución de carbonato de sodio saturada. La mezcla se homogeneizó y se dejó reposar 2 h en oscuridad hasta la medición de la absorbancia a 765 nm en espectrofotómetro UVmini 1240 (Shimadzu, Francia). Los resultados fueron expresados como EAG por 100 g de semillas (b.s.),

utilizando una curva de calibración obtenida a partir de soluciones estándar de ácido gálico (Figura 2.3).

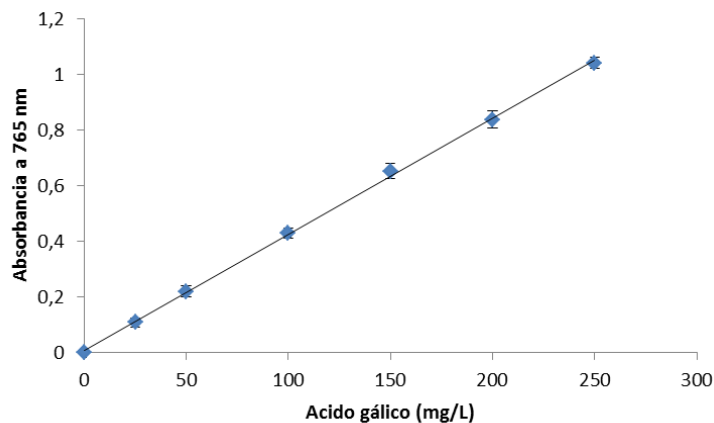


Figura 2.3. Curva de calibración para la determinación de compuestos fenólicos totales (n=3).

$$y=0,0042x + 0,0083 \quad (R^2: 0,9993).$$

II.2.3.3. Determinación de compuestos flavonoides totales (FT)

El contenido de FT se determinó de acuerdo al método descrito por Dini y col. (2010). El fundamento del método consiste en la formación de un complejo flavonoide-aluminio de color rosado que absorbe a una longitud de onda de 510 nm cuando se encuentra en medio alcalino. En este caso se mezclaron 0,25 mL de extracto con 2 mL de agua destilada y 0,15 mL de una solución de nitrito de sodio al 5 %. Luego de 5 min se agregó 0,15 mL de una solución de cloruro de aluminio al 10% y se mezcló. Luego de 6 min se agregó a la mezcla 1 mL de una solución de hidróxido de sodio 1 M. Inmediatamente la solución se diluyó con 1,2 mL de agua destilada y la absorbancia de la mezcla final se determinó a 510 nm contra un blanco de reactivos en espectrofotómetro UVmini 1240 (Shimadzu, Francia). El contenido de flavonoides totales en los extractos se expresó como EQ cada 100 g de semillas (b.s.) utilizando una curva de calibración obtenida a partir de soluciones estándar de quercetina (Figura 2.4).

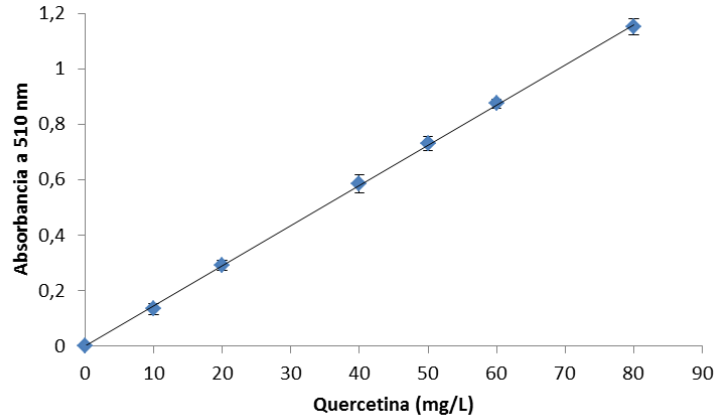


Figura 2.4. Curva de calibración para la determinación de compuestos flavonoides totales (n=3).

$$y=0,0145x - 0,0009 \quad (R^2: 0,9997).$$

II.2.3.4. Determinación de betalaínas totales

La determinación de betalaínas totales (BT) se realizó según la descripción de Castellanos-Santiago y Yahia (2008), la cual permite estimar los contenidos de los dos subgrupos que componen las betalaínas: betacianinas (pigmentos de coloración rojiza-violeta) y betaxantinas (pigmentos amarillo-anaranjados), mediante la medición directa de la absorbancia de los extractos a 538 y 483 nm, respectivamente. Para la conversión de las unidades de absorbancia en unidades de concentración se utilizó la expresión:

$$B = \frac{A \cdot P_m \cdot d \cdot 10^3}{\varepsilon \cdot l} \quad (\text{Ec. II.9})$$

donde:

B: contenido de betacianinas o betaxantinas (mg/L)

A = absorbancia (538 nm para betacianinas o 483 nm para betaxantinas)

P_m : peso molecular (betanina: 550 g/mol, indicaxantina: 308 g/mol)

d: factor de dilución

ε : coeficiente de extinción molar (betanina: 60 000 L/mol cm, Indicaxantina: 48 000 L/mol cm)

l: longitud del camino óptico (1 cm)

10^3 : factor de conversión de g a mg

Los resultados de betalaínas totales (betacianinas + betaxantinas) se expresaron como mg de betalaína por 100 g muestra (b.s.).

II.2.3.5. Determinación de la actividad antioxidante

II.2.3.5.1. Método del 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)

Este ensayo evalúa la capacidad que tiene un posible antioxidante para neutralizar un radical. El compuesto DPPH es un radical estable que presenta una intensa coloración violeta y absorbe a 517 nm. En el ensayo se determina la concentración inicial de DPPH y la concentración resultante una vez que se ha añadido el posible antioxidante, de forma que una reducción del valor de absorbancia a 517 nm se traduce en una disminución de la concentración de DPPH debido a la cesión de electrones por parte de la especie antioxidante. Los resultados obtenidos se expresan generalmente en forma de índices o valores equivalentes, como el porcentaje de inhibición de la concentración inicial de radical DPPH o también es común utilizar el valor TEAC (Capacidad Antioxidante en Equivalentes Trolox).

El ensayo se realizó siguiendo el protocolo descrito por Brand-Williams y col., (1995). Se hicieron reaccionar 50 μ L de la muestra con 1950 μ l de una solución de DPPH 100 μ M preparada en metanol. La mezcla se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego se registró el valor de absorbancia a 517 nm en espectrofotómetro (UVmini 1240, Shimadzu, Francia). La actividad antioxidante de las muestras se calculó a partir de la disminución de la absorbancia y los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de radicales DPPH, mediante la siguiente ecuación (Liyana-Pathirana y Shahidi, 2007):

$$\% \text{ Inhibición de radicales DPPH} = [(Abs_{(t=0)} - Abs_{(t=30)}) / Abs_{(t=0)}] \times 100 \quad (\text{Ec. II.10})$$

donde:

$Abs_{(t=0)}$: absorbancia inicial de la solución metanólica de DPPH a $t = 0$ min

$Abs_{(t=30)}$: absorbancia de la solución de DPPH + muestra a $t = 30$ min

En ciertos casos los resultados obtenidos se expresaron también como equivalentes de Trolox (ET) en $\mu\text{mol}/100\text{g}$ de muestra en base seca, para realizar comparaciones con los resultados obtenidos por otros autores.

II.2.3.5.2. Método de la decoloración del β -caroteno

Este método se basa en la pérdida del color de β -caroteno, debido a su reacción con los radicales formados por la oxidación inducida del ácido linoleico en una emulsión. La tasa de decoloración del β -caroteno puede verse disminuida en presencia de antioxidantes. El procedimiento experimental se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Suja y col., (2005), de la siguiente manera: se disolvieron 0,2 mg de β -caroteno, 20 mg de ácido linoleico y 200 mg de Tween 20 en 1 mL de cloroformo y luego el disolvente fue evaporado en rotavapor (R-114, Büchi, Suiza) bajo vacío. El residuo seco se resuspendió con 50 mL de agua destilada y se agitó vigorosamente para formar una emulsión. Para analizar la capacidad antioxidante se transvasaron 4,8 mL de la emulsión resultante a un tubo de ensayo al que se añadió 0,2 mL de extracto. Una solución de 0,2 mL de etanol 80 % y 4,8 mL de la emulsión se utilizó como control. Posteriormente los tubos se mantuvieron en baño de agua durante 2 h a 50°C . Pasado el tiempo de incubación, se midió la absorbancia a 470 nm en espectrofotómetro UVmini 1240 (Shimadzu, Francia) y se calculó el porcentaje de inhibición de la oxidación del β -caroteno utilizando la siguiente expresión:

$$\% \text{ Inhibición de la oxidación del } \beta\text{-caroteno} = [(A_{M(120)} - A_{C(120)}) / A_{C(0)} - A_{C(120)}] \times 100 \quad (\text{Ec.II.11})$$

donde:

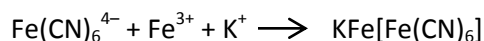
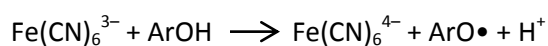
$A_{M(120)}$: absorbancia de la muestra a $t = 120$ min

$A_{C(120)}$: absorbancia del control a $t = 120$ min

$A_{C(0)}$: absorbancia del control a $t = 0$

II.2.3.5.3 Método del poder reductor

El poder reductor de los extractos se determinó de acuerdo al método propuesto por Oyaizu (1986) modificado por Lin y Li, (2010). Para ello se mezclaron 0,25 mL del extracto con 0,25 mL de una solución buffer fosfato 0,2 M (pH 6,6) y 0,25 mL de una solución de ferricianuro de potasio al 1%. Posteriormente la mezcla se incubó a 50 °C durante 20 min en baño termostático y pasado ese tiempo se adicionaron 0,25 mL de ácido tricloroacético al 10% para detener la reacción. Finalmente, se añadieron 0,4 mL de agua destilada y 0,1 mL de cloruro férrico al 0,1 %. Después de 10 min se midió la absorbancia a 700 nm, debido a la formación del complejo ferrocianuro férrico (llamado comúnmente azul de Prusia), de acuerdo a la siguiente reacción:



Se utilizó el valor de absorbancia obtenido en cada caso para calcular la concentración de poder reductor equivalente de una solución de ácido gálico ($\mu\text{g/mL}$), utilizando una curva de calibración estándar de ácido gálico (Figura 2.5).

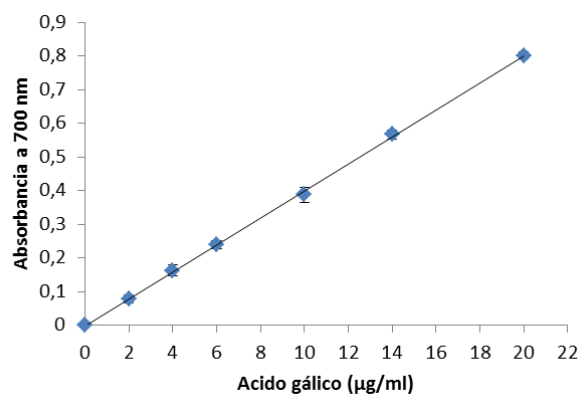


Figura 2.5. Curva de calibración para expresar los valores de absorbancia del poder reductor de los extractos en equivalentes de ácido gálico ($\mu\text{g/mL}$, $n=3$). $y=0,0401x - 0,0009$ ($R^2: 0,9996$).

II.2.3.6. Determinación cualicuantitativa de compuestos fenólicos

La identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos mayoritarios presentes en los extractos se llevó a cabo utilizando cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa con detección UV de arreglo de diodos, mediante una adaptación del método descrito por Ross y col., (2009). La descripción del equipo y condiciones de trabajo se especifican en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Condiciones operativas empleadas para la determinación de ácidos fenólicos y flavonoides por cromatografía líquida de alta resolución

Cromatógrafo	HPLC Waters 600 (Mildford, Massachusetts, EE.UU.)
Columna	Gemini C6-Phenyl, 250x4,6 mm, 3 μm de tamaño de partícula (Phenomenex, Torrance, California, EE.UU.)
Detector	Arreglo de diodos (Waters 2996, Mildford, Massachusetts, EE.UU.) λ ác. fenólicos: 280 nm; λ flavonoides: 370 nm
Fase móvil	A: Solución acuosa de ácido fórmico 0,1% (v/v) B: Metanol con ácido fórmico 0,1% (v/v)
Gradiente	Elución isocrática con 10% B, 0-10 min; gradiente lineal 10%B a 35%B, 10-40 min; elución isocrática 35%B, 40-45 min; gradiente lineal 35%B a 100%B, 45-60 min; elución isocrática 100%B, 60-65 min; gradiente lineal 100%B a 10%B, 65-67 min.
Velocidad de flujo	0,6 mL/min
Volumen de inyección	20 μL

En cada caso, se tomaron 10 mL del extracto y se evaporó a sequedad en rotavapor (R-114, Büchi, Suiza) (40 °C y presión reducida). Posteriormente, el residuo fue resuspendido en 0,5 mL de una mezcla metanol: agua (50:50) y filtrado (membrana de nylon de 0,45 μm , Gamafil, Argentina) para su posterior inyección en el cromatógrafo. La identificación de los diferentes ácidos fenólicos y flavonoides de los extractos se realizó por comparación de los tiempos de retención y espectros UV de los compuestos desconocidos con estándares. Todos los compuestos fueron cuantificados

como agliconas mediante el método de estándar externo, y los valores se expresaron en mg/100 g semillas (b.s.).

II.2.3.7. Determinación de tocoferoles

La identificación y cuantificación de tocoferoles se llevó a cabo utilizando cromatografía líquida de alta resolución con detección de fluorescencia sobre la fracción lipídica obtenida mediante la extracción con solvente (*n*-hexano, Soxhlet, 80 °C, 8 h) siguiendo la metodología descrita en las normas IUPAC 2.432 (1992) y AOCS Ce8-89 (1998). La descripción del equipo y condiciones de trabajo se especifican en la Tabla 2.4. Las muestras se prepararon en el momento de ser analizadas. Se pesaron aproximadamente 0,5 g de aceite en un matraz aforado de 5 mL y se disolvieron con hexano de calidad HPLC en baño ultrasónico previa inyección en el cromatógrafo. La identificación de los picos correspondientes a los compuestos: α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol y δ -tocoferol se realizó en función de los tiempos de retención relativos con los patrones correspondientes. La concentración de cada tocoferol se determinó por el método de estándar externo, expresando dicho valor en mg de tocoferol/100g muestra b.s., teniendo en cuenta los rendimientos de extracción de aceite obtenido a partir de las semillas de quinoa. Para ello se utilizaron curvas de calibración construidas con estándares. A modo de ejemplo, la Figura 2.6 corresponde a la curva obtenida para α -tocoferol.

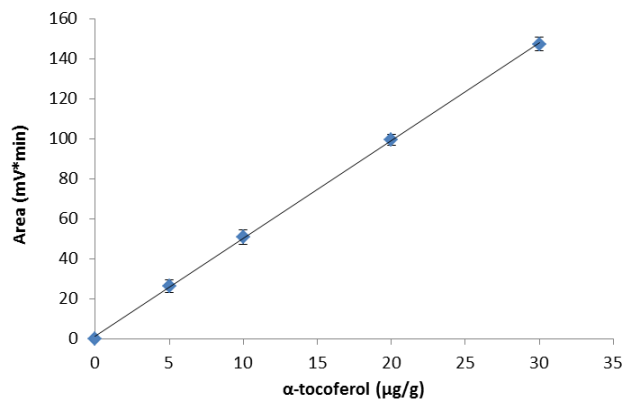


Figura 2.6. Curva de calibración de α -tocoferol mediante HPLC (n=3).

$$y=4,8961x + 0,993 \quad (R^2: 0,9998).$$

Tabla 2.4. Condiciones operativas empleadas en la determinación de tocoferoles por cromatografía líquida de alta resolución

Cromatógrafo	HPLC Hewlett Packard Serie 1050 (Palo Alto, California, EE.UU.)
Columna	Lichrosorb Si 60; 250 x 4,6 mm, 5 µm de tamaño de partícula (Phenomenex, Torrance, California, EE.UU.)
Detector	Fluorescencia (Agilent 1100, Santa Clara, California, EE.UU.) λ excitación: 290 nm; λ de emisión: 330 nm
Fase móvil	Isopropanol:hexano, 0,5:99,5 (v/v), en modo isocrático.
Velocidad de flujo	1,5 mL/min
Volumen de inyección	20 µL

De acuerdo a las concentraciones obtenidas de cada isómero de tocoferol, se estimó además la actividad de vitamina E en las muestras. Ésta se expresó en equivalentes de α-tocoferol (α-TE) cada 100g de muestra b.s., de acuerdo con la siguiente expresión (Fernández-Orozco y col., 2009):

$$\alpha\text{-TE}/100\text{g} = [\alpha\text{-toc (mg/100g)} \times 1,0] + [\beta\text{-toc (mg/100g)} \times 0,5] + [\gamma\text{-toc (mg/100g)} \times 0,1] + [\delta\text{-toc (mg/100g)} \times 0,03] \quad (\text{Ec. II.12})$$

II.2.3.8. Determinación de ácido ascórbico

La determinación de ácido ascórbico presente en los extractos se llevó a cabo utilizando cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa con detección UV, mediante una adaptación del método descrito por Kafkas y col., (2006). La descripción del equipo y condiciones de trabajo se especifican en la Tabla 2.5. Las condiciones de pretratamiento de la muestra fueron adaptadas en función de la matriz de estudio analizada en el presente trabajo.

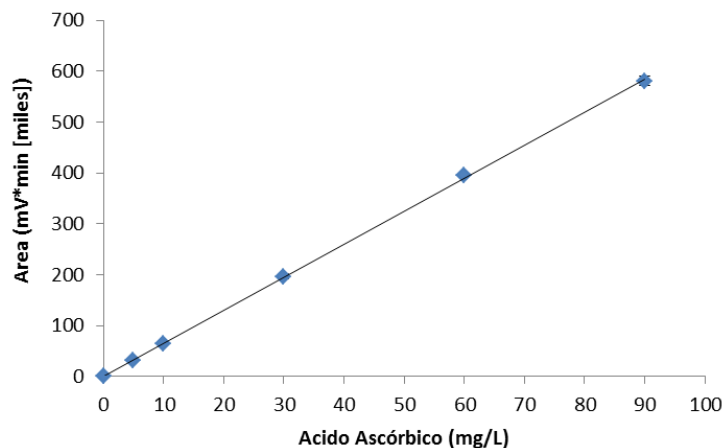


Figura 2.7. Curva de calibración de ácido ascórbico (n=3). $y=6489,3x + 513,94$ ($R^2: 0,9998$).

Tabla 2.5. Condiciones operativas empleadas en la determinación de ácido ascórbico por cromatografía líquida de alta resolución

Cromatógrafo	HPLC Hewlett Packard Serie 1050 (Palo Alto, California, EE.UU.)
Columna	Lichrocart C-18; 25 x 0,4 cm, 5 μ m de tamaño de partícula (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania)
Detector	UV (Hewlett Packard Serie 1050 (Palo Alto, California, EE.UU.) $\lambda = 245$ nm
Fase móvil	Solución acuosa de ácido <i>meta</i> -fosfórico 0,8 % (v/v), en modo isocrático
Velocidad de flujo	1,0 mL/min
Volumen de inyección	20 μ L

Para la extracción del ácido ascórbico, las semillas o brotes congelados (-18 °C) fueron molidos en mortero. A continuación, se pesaron en cada caso aproximadamente 15 g de muestra en un tubo plástico con tapa rosca de 50 mL, y se agregaron 25 mL de una solución acuosa de ácido *meta*-fosfórico al 10 %. La mezcla se homogenizó durante 5 min en agitador orbital (modelo M-23, Viking, Argentina) a 120 rpm y se centrifugó a 10677 xg durante 5 min (centrífuga Eppendorf 5804, Hamburgo, Alemania). Luego se tomaron 10 mL del sobrenadante y se filtraron (membrana

de nylon de 0,45 μm , Gamafil, Argentina) previo a la inyección en el cromatógrafo. La identificación del pico correspondiente al ácido ascórbico se realizó en función del tiempo de retención relativo en comparación con el patrón correspondiente. La concentración de ácido ascórbico en las muestras se determinó por el método de estándar externo, y dicho valor se expresó en mg de ácido ascórbico/ 100g de muestra. La Figura 2.7 corresponde a la curva de calibración obtenida utilizando soluciones acuosas de un estándar de ácido ascórbico preparadas en ácido *meta*-fosfórico al 0,8 %

II.2.3.9. Extracción y cuantificación de los productos de la reacción de Maillard (PRM)

El contenido de PRM se determinó en el caso de muestras obtenidas a partir de semillas de quinoa sometidas a procesamiento térmico. Se estimaron aquellos PRM que poseen potencial actividad antioxidante, es decir aquellos formados en etapas avanzadas y finales de la reacción de Maillard. Para la extracción de los PRM se siguió el método descrito por Michalska y col. (2008). Para ello, a 0,1 g de la muestra de harina tostada se le adicionó 2 mL de una solución acuosa (6 %, p/v) de dodecilsulfato sódico (SDS). La mezcla se mantuvo en agitación 30 min en agitador orbital (M-23, Vicking, Argentina) y posteriormente se centrifugó a 10677 xg durante 10 minutos (centrífuga Eppendorf 5804, Hamburgo, Alemania). El sobrenadante obtenido se diluyó a un volumen final de 10 mL con agua destilada y se filtró utilizando filtros de nylon de 0,45 μm (Agilent Technologies). El extracto filtrado se utilizó para las determinaciones de los diferentes PRM.

II.2.3.9.1. Compuestos fluorescentes intermedios (CFI)

En etapas avanzadas de la reacción de Maillard se forman compuestos fluorescentes que se miden a la máxima emisión de fluorescencia cuando son excitados a una longitud de onda de 340-370 nm (Morales y van Boekel, 1997). El contenido de CFI se determinó por fluorescencia siguiendo el método descrito por Michalska y col. (2008). Los espectros de emisión de fluorescencia se

obtuvieron utilizando un espectrofluorómetro (modelo LS 50B, Perkin Elmer, Massachusetts, EE.UU.) con un ancho de banda de excitación de 2 nm. Las lecturas fueron llevadas a cabo en celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. En base a los datos espectrales, para las lecturas de los CFI se seleccionó una longitud de onda de excitación, $\lambda_{Ex} = 353$ nm y de emisión, $\lambda_{Em} = 438$ nm. Para la cuantificación de los CFI se realizó una curva de calibración utilizando como estándar una solución de sulfato de quinina preparada en H_2SO_4 0,2 M (Figura 2.8). Los valores CFI de las muestras se expresaron en μg equivalentes de quinina por gramo de muestra seca de acuerdo a la siguiente expresión (Matiacevich y Buera, 2006):

$$UF = \frac{UFx - b \cdot d \cdot v}{m \cdot p} \quad (\text{Ec. II.13})$$

donde:

UF: intensidad de fluorescencia medida en μg de quinina/g m.s.

UFx: medida de intensidad de fluorescencia obtenida para cada muestra

d: factor de dilución

b: ordenada al origen de la curva de calibración realizada con sulfato de quinina

m: pendiente de la curva de calibración

v: volumen de extracción

p: peso seco de la muestra utilizada en la extracción

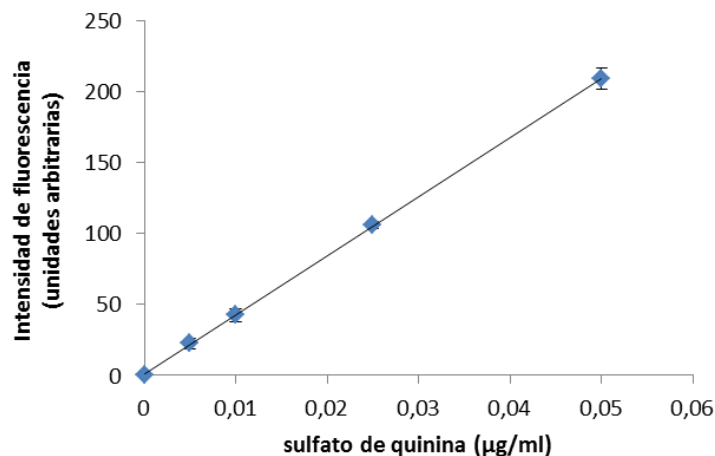


Figura 2.8. Curva de calibración de sulfato de quinina para la cuantificación de los CFI de las muestras de quinoa tostadas (n=3). $y=4170,2x + 0,8356$ ($R^2: 0,9999$).

II.2.3.9.2. Compuestos finales de la reacción de Maillard (melanoidinas)

Los productos finales de la reacción de Maillard son melanoidinas, las cuales son las responsables del desarrollo de color pardo en los alimentos sometidos a tratamiento térmico (Morales, 2005). La formación de melanoidinas fue estimada mediante el valor de absorbancia a 420 nm (Morales, 2005; Ramirez-Jimenez y col., 2001; Michalska y col., 2008). El ensayo se llevó a cabo utilizando un espectrofotómetro UVmini 1240 (Shimadzu, Francia) empleando cubetas plásticas de 1 cm de paso óptico. Las determinaciones fueron hechas por triplicado. Los resultados de las determinaciones fueron expresados como el promedio \pm D.E. de unidades arbitrarias de absorbancia.

II.2.4. Metodología relativa a los procesos aplicados a la semilla de quinoa

II.2.4.1. Germinación

II.2.4.1.1. Estudio preliminar de germinación

Para determinar las condiciones de germinación más adecuadas para las semillas de quinoa, se realizaron una serie de experiencias previas controlando los principales factores extrínsecos que influyen en la germinación: temperatura y humedad del grano (Jacobsen y col., 1999). Para ello se elaboró un diseño experimental factorial de 3^2 , considerando como factores la temperatura de germinación (X_1) y el tiempo de remojo (X_2). Los tres niveles para cada una de estas variables fueron: 10, 20 y 30 °C y 0, 6 y 12 h, para X_1 y X_2 , respectivamente. Estos niveles se seleccionaron de acuerdo a condiciones informadas en la bibliografía para la misma matriz de estudio (Jacobsen y col., 1999; Bois y col., 2006; Alvarez-Jubete y col., 2010). Para llevar a cabo las experiencias se tomaron tres lotes de 100 semillas homogéneas en tamaño y aspecto para cada una de las temperaturas ensayadas, las cuales (cuando correspondió) se remojaron previamente en agua destilada estéril durante 6 o 12 h de acuerdo a la experiencia. Posteriormente las semillas se distribuyeron de manera uniforme en bandejas plásticas (30 x 20 cm) entre dos capas de papel de filtro saturado de agua destilada estéril y se colocaron en estufa de incubación (serie BF, Delta Labo, Francia) a temperatura constante de acuerdo a cada ensayo (10, 20 y 30 °C), bajo oscuridad. Como variables de respuesta se seleccionaron el porcentaje de semillas germinadas y el índice de velocidad de germinación (Ivg) durante un período de cinco días. Para el primer caso se consideró como semilla germinada aquella en la que se hizo visible la radícula y para el segundo caso se efectuó un recuento diario de las semillas germinadas, realizando el cálculo en base a la expresión:

$$\text{Ivg} = (a/1 + b/2 + c/3 \dots + z/n) \quad (\text{Ec. II.14})$$

donde a, b, c, . . . z, es el número de semillas que germinan cada día y n es el número de días que dura el experimento (Jain y Saha, 1971; Chilo y col., 2009).

Con los valores de respuestas obtenidos para cada combinación temperatura/humedad se determinó una categoría para cada respuesta. Para el porcentaje de semillas germinadas se evaluó la germinabilidad utilizando las categorías propuestas por Devesa y col. (1998). Estas son: germinabilidad nula (0 %), baja ($0 < \% < 30$), moderada ($30 \leq \% \leq 70$), alta ($70 < \% < 100$) y máxima (100 %). Respecto del índice de velocidad de germinación, se utilizaron las categorías propuestas por Cabello y col. (1998): velocidad lenta ($0 \leq lvg < 5$), mediana ($5 \leq lvg \leq 11.11$), rápida ($11.11 < lvg \leq 33.33$) y muy rápida ($33.33 < lvg \leq 100$).

II.2.4.1.2. Proceso de germinación y análisis de los materiales obtenidos

De acuerdo a los resultados de los ensayos preliminares de germinación, se seleccionaron las condiciones que permitieron obtener la mayor cantidad de brotes en menor tiempo.

Previo al proceso de germinación, las semillas fueron esterilizadas superficialmente mediante remojo en una solución de hipoclorito de sodio al 2,5 % durante 5 min, para evitar la proliferación microbiana. Luego las semillas fueron enjuagadas con agua destilada estéril hasta pH neutro. Posteriormente las semillas se colocaron en placas de Petri plásticas de 15 cm de diámetro (25 g por placa, formando una sola capa), entre discos de papel secante (1 mm de espesor) previamente saturado de agua y se cubrió con una capa de gasa hidrófila saturada de agua, con el fin de mantener constante el suministro de humedad. Las placas fueron incubadas a 20 °C (80 – 90 % de humedad relativa) en oscuridad en cámara con circulación de aire (serie BF, Delta Labo, Avignon, Francia) durante tres días (Figura 2.9), el cual es el tiempo en el que los brotes pierden las cubiertas seminales generando una plántula capaz de desarrollarse por sí misma.



Figura 2.9. Cámara de incubación con semillas de quinoa germinadas durante 24, 48 y 72 h.

Para evaluar el impacto de la germinación sobre la actividad antioxidante de las semillas de quinoa se tomaron muestras entre 0 y 72 h, a intervalos de 24 h, correspondientes a los días 1, 2, y 3 de germinación, los cuales se compararon con un control de semillas sin germinar. Los brotes obtenidos en cada estadio de germinación se secaron a 40 °C en estufa con circulación de aire forzado (modelo FD 23, Binder, Alemania) hasta peso constante y luego se molieron usando un molinillo de laboratorio (Yellow line A 10, IKA-Werke, Staufen, Alemania). Las partículas resultantes fueron tamizadas para obtener una fracción de partículas inferior a 0,5 mm, a partir de las cuales se realizaron los extractos correspondientes. En los extractos obtenidos para cada estadio de germinación se determinaron los contenidos de compuestos fenólicos y flavonoides totales y se analizó cualicuantitativamente el perfil de compuestos fenólicos individuales. Además, se evaluó la actividad antioxidante por el método de DPPH y de decoloración del β -caroteno. También se determinó en cada estadio de germinación los contenidos de ácido ascórbico y tocoferoles.

II.2.4.1.3. Análisis estadístico

Los resultados experimentales se obtuvieron por triplicado a partir de ensayos individuales y se presentan como promedio \pm D.E. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa InfoStat (2011) (grupo InfoStat, Argentina), mediante el cual se realizó el análisis de la varian za con comparación de medias de los tratamientos mediante la prueba de Tuckey ($p < 0,05$). Con el mismo software se llevaron a cabo también los análisis de regresión y de componentes principales. En los ensayos preliminares de germinación se utilizó además el programa *Design Expert* (versión 8.0.7.1, Stat-Ease Inc., Minneapolis, EE.UU) para la construcción de los gráficos de superficie de respuesta de las variables analizadas.

II.2.4.2. Tratamiento térmico

En el presente trabajo, los ensayos de tratamiento térmico se realizaron en dos series independientes. Por un lado, se evaluó el efecto sobre el nivel de compuestos con capacidad antioxidante y actividad antioxidante de las semillas de quinoa y por otro lado se evaluó el efecto sobre la harina de brotes germinados en el tercer día de germinación, combinando de esta manera dos de los procesos aplicados.

II.2.4.2.1. Procesado térmico de semillas de quinoa

Para abordar esta parte del estudio se seleccionó un rango amplio de temperaturas y tiempos, tomando como referencias las condiciones encontradas en la bibliografía para diferentes granos de consumo (Jeong y col., 2004; Acar y col., 2009). Para llevar a cabo las experiencias se tomaron porciones de 20 g de semillas de quinoa, las cuales se distribuyeron uniformemente en placas de aluminio (7 cm de diámetro) y se colocaron en estufa eléctrica (modelo SD755, ORL, Argentina) a

temperatura de 100 °C, 130 °C, 160°C y 190 °C durante 15, 30, 60, 90 y 120 min. Luego del tratamiento térmico aplicado, las semillas se colocaron en desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente para luego molerlas (molinillo KSM 2, Braun, México), tamizarlas y de esta manera obtener la fracción de harina de quinoa tostada con partículas inferiores a 0,5 mm. Paralelamente se realizó la determinación de humedad de las muestras tratadas para expresar los resultados en base seca, siguiendo las normas AOAC (según punto II.2.1.1). Para cada combinación tiempo/temperatura ensayada se realizaron tres ensayos independientes.

II.2.4.2.2. Procesado térmico de harina de quinoa germinada

En esta serie de ensayos se aplicó un proceso combinado de germinación de las semillas con posterior tratamiento térmico de la harina resultante de los brotes deshidratados. Para ello, muestras de harina de quinoa germinada durante 3 días (según las condiciones descritas en el apartado II.2.4.1.2) fueron colocadas en cápsulas de aluminio de 7 cm de diámetro (20 g por cápsula) y luego sometidas en cada ensayo a temperaturas de 100 °C, 145°C y 190 °C durante 30 min en estufa eléctrica (modelo SD755, ORL, Argentina), respectivamente. Se realizaron tres ensayos independientes para cada temperatura ensayada.

II.2.4.2.3. Análisis de los materiales obtenidos luego del procesamiento

A partir de la harina obtenida bajo las diferentes condiciones experimentales de tratamiento térmico luego de germinación, se realizaron los extractos etanólicos correspondientes (apartado II.2.2.5). En cada uno de los extractos se determinaron los contenidos de compuestos fenólicos y flavonoides totales y se analizó cualicuantitativamente el perfil de compuestos fenólicos individuales. Además, se evaluó la actividad antioxidante por el método de DPPH y el poder reductor. Para evaluar la contribución de los PRM a la actividad antioxidante total, se realizaron

extractos acuosos a partir de la harina tostada en cada caso y se analizó el contenido de compuestos fluorescentes intermediarios (CFI) y formados en etapas avanzadas de la reacción, mientras que como productos finales de la reacción se determinó la formación de melanoidinas.

II.2.4.2.4. Análisis estadístico

Los resultados experimentales se realizaron por triplicado y se presentan como promedio \pm D.E. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa InfoStat (2011) (grupo InfoStat, Argentina), mediante el cual se realizó el análisis de la varianza con comparación de medias de los tratamientos mediante la prueba de Tuckey ($p < 0,05$). Con el mismo software se llevaron a cabo también los análisis de regresión y de componentes principales.

II.2.4.3. Irradiación con luz UV-C

Teniendo en cuenta la posible inducción de la biosíntesis y acumulación de metabolitos secundarios con capacidad antioxidante que puede ejercer la luz UV en tejidos vegetales, en el presente trabajo de tesis se evaluó la influencia de diferentes dosis de radiación UV-C sobre semillas y brotes de quinoa en diferentes estadios de germinación.

II.2.4.3.2. Procedimiento de irradiación UV-C

El proceso de irradiación se llevó a cabo dentro de una cámara oscura (40 cm de alto x 70 cm de largo x 30 cm de ancho) en cuyo interior se dispuso una lámpara germicida con máxima emisión a 254 nm, de 6W y 55V (modelo ENF-260C, Spectroline, EE.UU.) sobre un soporte en posición horizontal de altura regulable. Las muestras a irradiar se colocaron a 10 cm de distancia por debajo de la fuente de luz (Figura 2.10). Antes de realizar las irradiaciones de las muestras las lámparas se dejaron encendidas durante 15 min para su estabilización, según recomendaciones del fabricante.

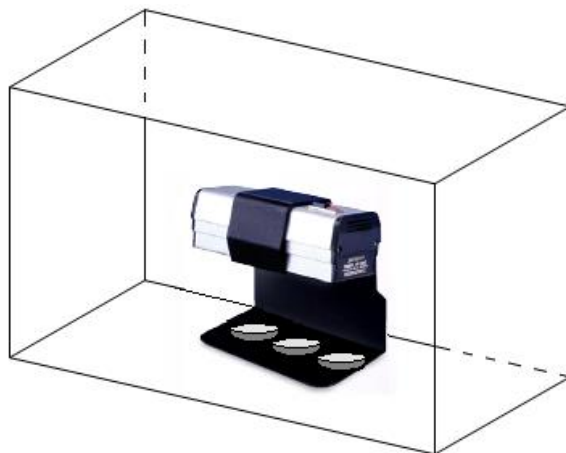


Figura 2.10. Representación esquemática de la cámara de irradiación UV-C.

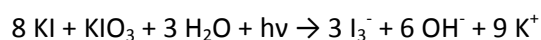
II.2.4.3.3. Medición de las dosis de radiación UV

Cuando se desea conocer la energía de irradiación recibida por un elemento generalmente se mide la irradiancia y la fluencia. La irradiancia expresa densidad de potencia y se define como la potencia incidente por unidad de superficie, cuyas unidades en el Sistema Internacional son W/m^2 . La energía de radiación total que incide por unidad de superficie se denomina fluencia o dosis de radiación y se calcula como el producto de la irradiancia y el tiempo de exposición a la radiación (expresado en segundos). El término dosis de radiación es ampliamente utilizado en la literatura y es el que se utilizará en el presente trabajo para indicar la cantidad de energía radiante total administrada a las muestras por unidad de superficie, cuyas unidades se expresarán en kilojoules por metro cuadrado (kJ/m^2).

Para medir las dosis de radiación UV administradas pueden utilizarse diferentes métodos. El más simple se basa en la medición con un radiómetro, el cual permite seleccionar la parte del espectro de emisión que se desea medir e incluye un detector fotosensible que permite transformar la energía incidente en una medida de voltaje o corriente (Shama, 2007). Otra de las alternativas es la medición por actinometría. Esta técnica se basa en la medición de la luz UV incidente a través de

una reacción fotoquímica, para la cual la cantidad de moléculas de producto formado por número de fotones absorbidos (rendimiento cuántico) es bien conocida. La medición del rendimiento químico después de la exposición a la luz permite conocer el flujo de fotones incidentes (Bolton, 2001).

Para determinar las dosis de radiación UV-C, en el presente trabajo se utilizó el par actinométrico yoduro/yodato de potasio, según el método descrito por Rahn, (1997). Para ello, se preparó una solución de una mezcla de yoduro de potasio (0,6 M) y yodato de potasio (0,1 M) en buffer borato (0,01 M, pH 9,25). De esta solución se tomaron alícuotas de 50 mL que fueron colocadas en placas de Petri de vidrio de 9 cm de diámetro. Posteriormente, las mismas se ubicaron bajo la luz UV-C dentro de la cámara, exponiéndolas a la radiación durante diferentes tiempos (0 a 10 min). La reacción producida bajo la exposición a la luz UV-C se detalla a continuación:



La cantidad de triyoduro formado se determinó espectrofotométricamente (espectrofotómetro UV-7804 C, Viswagen Biotech Pvt. Ltd., India) a una longitud de onda de 352 nm ($\epsilon_{352} = 26400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Conocidos los moles de triyoduro formados, se calculó el número de einsteins de fotones absorbidos por la muestra, dividiendo el número de moles de producto formado en el rendimiento, el cual a su vez es función de la temperatura y de la concentración inicial de yoduro de potasio, según la siguiente ecuación:

$$\Phi = 0,75 [1 + 0,02 (T - 20,7)] [1 + 0,23 (C - 0,577)]$$

donde: Φ es el rendimiento cuántico, C es la concentración molar inicial de yoduro de potasio, y T es la temperatura (°C) a la cual se llevó a cabo la reacción.

La concentración inicial de yoduro de potasio se determinó midiendo la absorbancia de la solución sin irradiar a 300 nm ($\epsilon_{300} = 1,061 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Para convertir el número de fotones incidentes en energía incidente (joule), se multiplicó el número de fotones por la energía de cada fotón. Asumiendo que todos los fotones absorbidos tenían una longitud de onda de 254 nm, este factor resultó $4,72 \times 10^5 \text{ J/einstein}$ de fotones. Finalmente, la dosis de UV-C se expresó en J/m^2 , dividiendo la energía expresada en joules por el área expuesta a la fuente de irradiación. Para cada tiempo de exposición, las mediciones se realizaron por triplicado. La formación de triyoduro se incrementó linealmente con el tiempo de exposición a la radiación UV-C, cuyo valor de fluencia obtenido de la pendiente de la regresión lineal de la gráfica dosis vs tiempo fue de $7,4 \text{ W/m}^2$. En la Figura 2.11 se muestran las dosis de radiación UV-C obtenidas a diferentes tiempos de irradiación (0-10 min) mediante la técnica actinométrica, utilizando el par yoduro/yodato. Para las dosis utilizadas en tiempos superiores se calculó dicho valor multiplicando el valor de tasa de fluencia obtenido por el tiempo de irradiación (segundos).

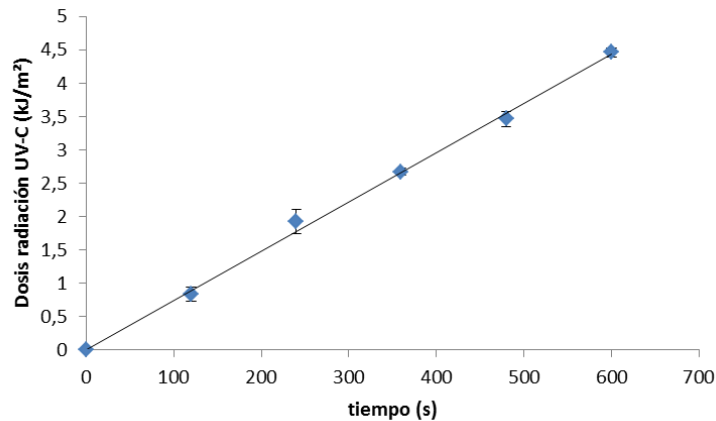


Figura 2.11. Dosis de radiación UV-C determinadas mediante actinometría a diferentes tiempos de irradiación ($n=3$). $y=0,0074x$ ($R^2: 0,9976$).

II.2.4.3.4. Estudios preliminares de irradiación sobre semillas y brotes

Los ensayos preliminares de irradiación se realizaron sobre semillas remojadas y sobre brotes de estadíos avanzados de germinación, en referencia a trabajos realizados con otras matrices vegetales. Así, algunos autores realizaron un remojo previo de las semillas antes de someterlas al proceso de irradiación UV y posteriormente llevaron a cabo la germinación de las semillas irradiadas en oscuridad por tiempos determinados (Shetty y col., 2002; Guajardo-Flores y col., 2014). Otros autores realizaron la germinación de las semillas y luego irradiaron los brotes obtenidos con una única exposición a la luz UV. Luego del proceso de irradiación, mantuvieron las condiciones de germinación durante un tiempo inferior a las 24 h para que las plántulas desarrollen la respuesta al factor que induce el estrés (Boveris y col., 2001; Tsurunaga y col., 2013; Dinelli y col., 2007).

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados, en el presente trabajo se realizó una serie de experiencias preliminares donde se evaluó un rango amplio de dosis de radiación UV-C sobre semillas de quinoa remojadas y sobre brotes de estadíos avanzados de germinación. El propósito de estas experiencias fue (i) identificar la dosis que producía un mayor efecto en la acumulación de compuestos secundarios antioxidantes y (ii) evaluar posibles diferencias entre ambas formas de irradiación.

II.2.4.3.4.1. Irradiación de semillas remojadas

Previo al proceso de irradiación, las semillas fueron esterilizadas superficialmente mediante remojo en una solución de hipoclorito de sodio al 2,5 % durante 5 min, para evitar la proliferación microbiana. Luego fueron enjuagadas con agua destilada y se dejaron en remojo durante 2 h en agitación (agitador orbital Vicking, modelo M-23, Argentina). Posteriormente las semillas se escurrieron y distribuyeron en placas de Petri (25 g por placa) las cuales tenían en la base un disco

de papel secante saturado con agua. La irradiación de las muestras se llevó a cabo ubicando las mismas a una distancia de 10 cm debajo de la fuente de luz UV, tomando la precaución de ubicar las placas de Petri en un área definida, para que cada muestra reciba una dosis uniforme de radiación. Se evaluó un rango amplio de tiempos, 5, 15, 30, 60, 90 y 180 min, que según las condiciones de fluencia de la fuente de luz corresponden a dosis de exposición 2,2 kJ/m², 6,7 kJ/m², 13,3 kJ/m², 26,7 kJ/m², 40,1 kJ/m² y 80 kJ/m². Posteriormente, las placas de semillas irradiadas se colocaron en cámara de germinación en oscuridad (20 °C, 80 % de humedad relativa) durante 3 días junto con un grupo de placas que se utilizaron como control del proceso (semillas sin irradiar).

II.2.4.3.4.2. Irradiación de brotes

Para llevar a cabo esta experiencia se obtuvieron brotes de 3 días de la forma que se detalló en el apartado II.2.4.1.2. Posteriormente, los brotes se irradiaron bajo las mismas condiciones y durante los mismos tiempos de radiación que el punto anterior, de modo que ambos métodos resulten comparables. Luego del proceso de irradiación, las muestras se incubaron durante 24 h adicionales en las mismas condiciones de germinación. Un conjunto de placas con brotes sin irradiar se mantuvo durante los cuatro días que duró la experiencia en la cámara de germinación como ensayo control.

En ambos métodos, y para cada tiempo de radiación, los ensayos se realizaron por triplicado. Los brotes que se obtuvieron en cada caso fueron secados a 40 °C en estufa con circulación de aire forzado (modelo SR5070, FAC, Argentina) hasta peso constante y posteriormente molidos usando un molinillo de laboratorio (modelo KSM 2, Braun, México). Las partículas resultantes fueron tamizadas para obtener una fracción de partículas inferior a 0,5 mm, a partir de las cuales se realizaron los extractos correspondientes (según apartado II.2.2.5). A partir de los extractos

obtenidos se determinó el contenido de compuestos fenólicos totales y la actividad antioxidante mediante el método de inhibición del radical DPPH.

II.2.4.3.5. Irradiación UV-C durante la germinación y preparación de las muestras

De acuerdo a los resultados de ensayos previos de irradiación, se definió un diseño experimental que permitió evaluar el efecto de una dosis de radiación UV en cada estadio de germinación y realizar un seguimiento del nivel de compuestos fenólicos y actividad antioxidante durante tiempos posteriores de incubación.

Para llevar a cabo esta experiencia se esterilizaron superficialmente las semillas mediante remojo en una solución de hipoclorito de sodio al 2,5 % durante 5 min, luego se enjuagaron varias veces con agua destilada y se dejaron sumergidas durante 2 h en agua destilada estéril. Las semillas fueron a continuación escurridas y se distribuyeron en placas de Petri (25 g por placa). La irradiación de las muestras se llevó a cabo según el plan de experiencias que se muestra en la Tabla 2.6. En cada caso, el tiempo de irradiación UV-C fue de 60 min, que corresponde a una dosis de exposición de $26,7 \text{ kJ/m}^2$. Luego de aplicar la dosis de radiación en cada estadio de germinado (indicado con el símbolo **0**), las muestras se colocaron en cámara de germinación (20 °C, 80 % HR, en oscuridad) donde continuaron con la germinación al menos durante 24 h adicionales.

Tabla 2.6. Plan de experiencias utilizado en el proceso de irradiación.

Muestra	Estadíos de germinación				
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
Control	CD ₀	CD ₁	CD ₂	CD ₃	CD ₄
I₀	0	I ₀ D ₁	I ₀ D ₂	I ₀ D ₃	I ₀ D ₄
I₁		0	I ₁ D ₂	I ₁ D ₃	I ₁ D ₄
I₂			0	I ₂ D ₃	I ₂ D ₄
I₃				0	I ₃ D ₄

Como muestras control para cada día ensayado, se utilizaron placas de Petri con semillas que no sufrieron el proceso de irradiación. Así, CD_0 es la muestra control en el tiempo cero (luego del remojado), CD_1 es la muestra control en el primer día de germinación, etc. En el caso de las muestras irradiadas, I_0D_1 es la muestra que se irradió en el tiempo cero y se retiró el día 1, etc.

De esta manera, cada muestra irradiada se puede comparar respecto del control en el mismo día y respecto del resto de los estadios de germinación, para un mismo tiempo de irradiación.

Luego del proceso de irradiación, cada muestra fue secada hasta peso constante a 40 °C en estufa con circulación de aire forzado (modelo SR5070, FAC, Argentina) y molida. A partir de las partículas resultantes se realizaron los extractos correspondientes (según apartado II.2.2.5), los cuales fueron utilizados para determinar el contenido de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales, betalainas totales y la actividad antioxidante mediante el método de inhibición del radical DPPH.

II.2.4.3.6. Análisis estadístico

Los resultados experimentales se realizaron por triplicado y se presentan como promedio \pm D.E. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa InfoStat (2011) (grupo InfoStat, Argentina), mediante el cual se realizó el análisis de la varianza con comparación de medias de los tratamientos mediante la prueba de Tuckey ($p < 0,05$). Con el mismo software se llevaron a cabo también los análisis de regresión y de componentes principales.

II.2.5. Propuesta de elaboración de un alimento enriquecido en compuestos antioxidantes

El enriquecimiento de alimentos con compuestos bioactivos, ya sea en la forma de preparados aislados o mediante la incorporación de ingredientes ricos en tales compuestos, es una práctica cada vez más frecuente en los laboratorios de desarrollo de nuevos productos en la industria alimentaria. En concordancia con esta tendencia y atendiendo al último objetivo del presente trabajo de tesis, se llevó a cabo la elaboración de un producto alimenticio incorporando en su formulación el ingrediente obtenido que alcanzó la mayor actividad antioxidante *in vitro* luego de la aplicación de los distintos procesos ensayados sobre las semillas de quinoa. Aprovechando la característica inherente a la semilla de quinoa de ser un ingrediente libre de proteínas formadoras de gluten, se propuso elaborar un producto que no incorpore harinas con dichas proteínas, de tal manera que pueda también ser consumido por personas celíacas o alérgicas al gluten. Así, se desarrollaron tapas de alfajores utilizando como ingrediente base almidones de especies vegetales libres de gluten.

II.2.5.1. Elaboración de tapas de alfajores

A partir de una receta de tapas de alfajores de almidón de maíz, se realizaron ensayos en los que se reemplazó, respectivamente, 10, 20 y 30 % del mismo por la harina de quinoa obtenida luego de combinar los procesos de germinación y tostado (Tabla 2.7). La mezcla de los ingredientes se realizó utilizando los primeros 15 min del programa de amasado de un horno de pan (marca ATMA, modelo HP4030E, China). Posteriormente, la masa se retiró del recipiente de amasado y se estiró mediante un palo de amasar sobre una tabla de madera con guías laterales de 1 cm de altura. Con un cortapastas, se cortaron discos de 5 cm diámetro que se colocaron sobre placa de horno revestida con papel manteca y se hornearon a 180 °C durante 20 min en estufa eléctrica

(modelo SD755, ORL, Argentina). Luego del horneado, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se guardaron en recipientes herméticos hasta la realización de los correspondientes extractos.

Tabla 2.7. Ingredientes de las diferentes formulaciones de tapas de alfajores elaboradas.

Ingrediente	Control	IQ-10%	IQ-20%	IQ-30%
Almidón de maíz	200 g	180 g	160 g	140 g
Ingrediente quinoa	----	20 g	40 g	60 g
Azúcar blanco	70 g	70 g	70 g	70 g
Manteca	80 g	80 g	80 g	80 g
Yema de huevo	50 g	50 g	50 g	50 g
Polvo de hornear	1,5 g	1,5 g	1,5 g	1,5 g
Esencia de vainilla	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL

II.2.5.2. Preparación de las muestras

Muestras de cada una de las formulaciones elaboradas fueron molturadas manualmente utilizando un mortero, para luego llevar a cabo el análisis composicional de las mismas. Por otro lado, se realizaron los extractos etanólicos correspondientes a cada formulación (según apartado II.2.2.5). En cada uno de los extractos, se determinó el contenido de compuestos fenólicos y de flavonoides totales y la actividad antioxidante por el método de DPPH. Para analizar la contribución de los productos de la reacción de Maillard (PRM) a la actividad antioxidante total se estimó el contenido de melanoidinas como productos finales de la reacción.

II.2.5.3. Análisis estadístico

Los resultados experimentales se realizaron por triplicado y se presentan como promedio \pm D.E. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa InfoStat (2011) (grupo InfoStat,

Argentina), mediante el cual se realizó el análisis de la varianza con comparación de medias de los tratamientos mediante la prueba de Tuckey ($p < 0,05$). Con el mismo software se llevaron a cabo también los análisis de regresión y de componentes principales.

Capítulo III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

II.1. Análisis composicional del grano de quinoa

Los resultados obtenidos del análisis composicional del grano de quinoa utilizado en el presente trabajo se presentan en la Tabla 3.1. Estos valores permiten caracterizar composicionalmente la variedad particular de quinoa objeto del presente estudio, ya que dichos valores dependen no sólo de la variedad, sino también de factores agroecológicos, prácticas postcosecha, condiciones y tiempo de almacenamiento, etc. (Abugoch-James, 2009; Valcárcel y col., 2012). En la misma tabla se muestran, además, los valores composicionales publicados en bibliografía para la misma especie y los correspondientes al grano de amaranto (otro pseudocereal) junto con los principales cereales de consumo humano. Como pudo observarse, la composición de las semillas de quinoa utilizadas en este estudio, presentó valores que se encuentran dentro de los rangos citados en la bibliografía para cada componente.

Los carbohidratos representaron el componente más abundante del grano de quinoa, ya que su perispermo (51-64% del peso del grano) se compone principalmente de almidón (Koziol, 1992; Bhargava y col., 2006).

Por su lado, se destaca en el mismo el contenido proteico, que oscila entre 12,9 % y 16,5 % (b.s.) dependiendo de la variedad (Koziol, 1992; Repo-Carrasco y col., 2003; Alvarez-Jubete y col., 2009). Este contenido es similar al del grano de amaranto y superior al promedio informado para el resto de los cereales tradicionales, aunque comparado con ciertas leguminosas como porotos (*Phaseolus vulgaris*) (28%) o soja (*Glycine max*) (36%), resulta relativamente menor (Koziol, 1992). En este punto, vale señalar la alta calidad proteica de las semillas de quinoa, la que se refleja en su excelente balance aminoacídico, con concentraciones de lisina superiores a las encontradas en cereales, y de cisteína y metionina mayores a las presentes en legumbres (Ruales y Nair, 1992; Wright y col., 2002).

Tabla 3.1. Composición centesimal de las semillas de quinoa y comparación con el amaranto y los principales cereales de consumo.

Componente	Contenido (% , b.s.)				
	Quinoa ¹	Amaranto ²	Trigo ³	Maíz ³	Arroz ³
Proteínas	14,70 ± 0,30 (12,9 ^a – 16,5 ^b)	14,60	10,5	11,1	7,8
Grasas totales	5,92 ± 0,38 (5,2 ^c – 9,7 ^a)	8,81	2,6	4,9	0,4
Fibra dietaria total	14,94 ± 1,12 (13,6 ^e – 16,0 ^e)	11,14	12,6 ^g	13,4 ^g	1,3 ^g
Cenizas	3,36 ± 0,07 (2,7 ^c – 3,8 ^b)	3,25	1,8	1,7	0,7
Carbohidratos*	61,08 ± 1,27 (61,2 ^d – 72,6 ^f)	62,20	72,5	68,9	89,8

Valores expresados como promedio ± D.E. (n=3).

*Calculados por diferencia.

¹ El rango entre paréntesis representa los valores encontrados en la literatura, expresados en %, base seca.

² Valcárcel y col., (2012).

³ Repo-Carrasco y col., (2003).

^a Ando y col., (2002).

^b Koziol, (1992).

^c Alvarez-Jubete y col., (2009).

^d Chauhan y col., (1992).

^e Repo-Carrasco y col., (2011).

^f Ruales y Nair, (1993).

^g Dhingra y col., (2012).

Por otro lado, el contenido lipídico en las semillas de quinoa puede variar desde 5,2 hasta 9,7%, resultando en un valor promedio (5,92%) inferior al del grano de amaranto (8,81%) aunque superior al de los cereales tradicionales, siendo incluso mayor que en el maíz (4,9%) (Ruales y Nair, 1993). Del contenido total de materia grasa de la quinoa, más del 50 % está constituido por los ácidos grasos poliinsaturados esenciales linoleico (omega 6) y linolénico (omega 3), lo que genera una buena relación insaturados/saturados (4,9-6,2) (Koziol, 1992; Repo-Carrasco y col., 2003). Dada la alta calidad de su aceite y el hecho de que algunas variedades de quinoa tengan un

contenido graso de hasta 9,7 %, algunos autores han considerado que este cultivo tiene un potencial uso como oleaginosa (Bhargava y col., 2006). Sin embargo, este contenido es mucho menor comparado, por ejemplo, a semillas de soja (19%) o girasol (47%) (Valcárcel y col., 2012).

Por otra parte, el contenido de fibra dietaria total presente en la quinoa resulta mayor comparado al de maíz, trigo y amaranto y este valor es 11,5 veces mayor al correspondiente del arroz blanco.

Finalmente, el contenido de cenizas en las semillas de quinoa es similar al grano de amaranto y aproximadamente dos veces mayor que el valor promedio para trigo y maíz y casi cinco veces el valor promedio del arroz blanco. Los granos de quinoa contienen grandes cantidades de calcio, magnesio, hierro y zinc en comparación a las semillas de cereales tradicionales (Repo-Carrasco y col., 2003). Se ha mencionado que las variaciones en el contenido de minerales dentro de una especie se debe a la influencia de las condiciones medioambientales durante el desarrollo de la planta y maduración de la semilla, especialmente a la disponibilidad mineral del suelo (Alvarez-Jubete y col., 2009).

III.2. Extracción de compuestos fenólicos del grano de quinoa

Las actividades llevadas a cabo con el fin de optimizar la extracción de compuestos fenólicos de la quinoa, que incluyeron la evaluación de la asistencia de ultrasonido en la operación, se desarrollaron en dos etapas experimentales sucesivas, atendiendo a los objetivos específicos de cada una.

1) Ensayos de extracción preliminares, en los que se estudiaron los efectos de los principales parámetros operacionales con el fin de establecer aquellos que tienen mayor influencia sobre el proceso de extracción.

2) Optimización de los parámetros de mayor influencia sobre el proceso de extracción para maximizar el contenido de compuestos fenólicos antioxidantes en los extractos obtenidos a partir de granos de quinoa.

III.2.1. Ensayos de extracción preliminares: efecto de los parámetros operacionales

En esta serie de experiencias, cada parámetro se evaluó de manera independiente, modificando una variable por vez, mientras el resto de los factores se mantuvieron constantes. De esta manera, no se consideraron las interacciones que pudieran existir entre los parámetros analizados, aspecto que se consideró en las experiencias de optimización posteriores. Las variables experimentales analizadas fueron: temperatura de extracción: 20, 40 y 60 (°C); relación sólido/solvente: 1/10, 1/20 y 1/40 (g/mL); composición del solvente: 0, 40, 80 y 95 (%v/v etanol/agua); tamaño de partícula: $d < 0,5$, $0,5 < d < 0,71$, $d > 0,71$ (mm) y potencia de ultrasonido: 0, 50 y 100 (W). Para cada uno de los parámetros mencionados anteriormente, se analizó la cinética de extracción mediante la toma de muestras a 5, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos, respectivamente. La velocidad de agitación orbital en todos los casos se fijó en 120 rpm, la que garantizó una suspensión adecuada de las partículas sólidas en el medio. La incidencia de los parámetros estudiados sobre el proceso de extracción se evaluó en términos del contenido de compuestos fenólicos totales (II.2.3.2.) y del rendimiento de compuestos fenólicos totales en los extractos (II.2.2.4.2.).

III.2.1.1. Efecto de la temperatura

La temperatura de extracción es un parámetro importante a optimizar con el fin de minimizar los costos energéticos del proceso. En la Figura 3.1 se presentan las cinéticas de extracción de compuestos fenólicos obtenidas para las tres temperaturas ensayadas. En esta experiencia se

utilizó etanol acuoso 40% (v/v) como solvente y partículas de harina de quinoa con $d < 0,5$ mm en una relación sólido/solvente de 1/20. Los resultados muestran que los rendimientos de extracción decrecieron en el orden: $60\text{ }^{\circ}\text{C} < 40\text{ }^{\circ}\text{C} < 20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

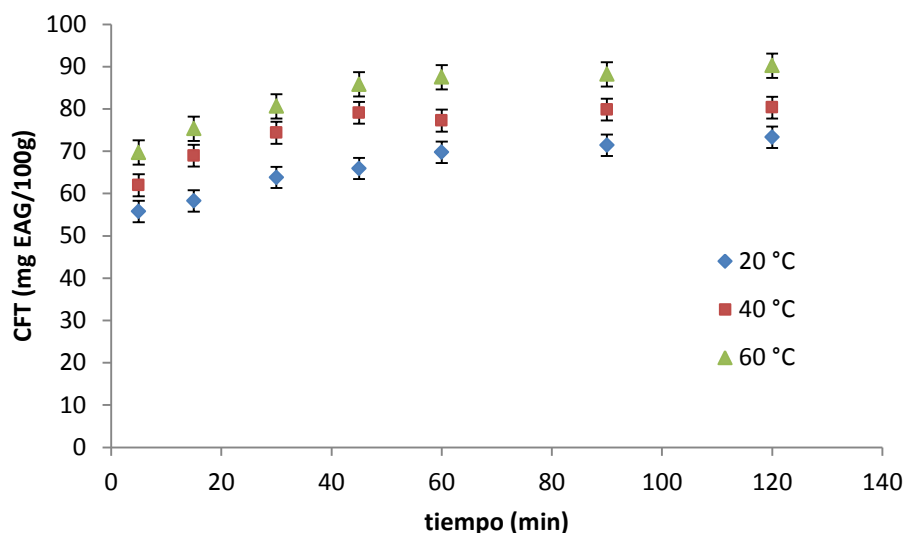


Figura 3.1. Influencia de la temperatura sobre la cinética de extracción de CFT de quinoa ($d < 0,5$ mm), utilizando etanol 40% como solvente.

Numerosos estudios han demostrado que un incremento de la temperatura tiene un efecto positivo en la extracción de compuestos fenólicos a partir de diversas fuentes vegetales (Bucic-Kojic y col., 2007; Harbourne y col., 2009; Spigno y col., 2007). Este efecto positivo de la temperatura en el proceso de extracción se podría explicar por la mayor solubilidad que los compuestos de la matriz experimentan en el solvente a medida que la temperatura aumenta, además de producirse un aumento de la difusividad de las moléculas extraídas, que conduce a su vez, a un incremento en la transferencia de masa (Silva y col., 2007). Un aumento de la temperatura de extracción podría modificar también la estructura de la matriz vegetal, facilitando el proceso de extracción (Prasad y col., 2009).

Por otro lado, se observó que para cada temperatura en particular, el valor de CFT aumentó progresivamente con el tiempo hasta un determinado punto, a partir del cual dicho valor se mantuvo prácticamente constante. Esto se podría explicar dado el tamaño de partícula utilizado en la experiencia ($d < 0,5$ mm). Al tratarse de una partícula muy pequeña, la superficie de contacto entre el solvente y las partículas es grande y la difusión de las moléculas hacia el exterior es más rápida que si se tratase de partículas de mayor diámetro.

III.2.1.2. Efecto de la relación sólido/solvente

El efecto de la relación sólido/solvente se estudió a 60 °C con etanol 40 % v/v como solvente y partículas de la matriz de extracción de $d < 0,5$ mm. En todos los casos, se utilizó un volumen fijo de solvente de 400 mL y para cada ensayo en particular se agregó una masa de material vegetal de 40 , 20 y 10 g, dando lugar a las relaciones sólido/solvente $1/10$, $1/20$ y $1/40$, respectivamente. Los resultados presentados en la Figura 3.2 muestran que los valores de CFT fueron mayores en la medida que la relación sólido/solvente aumentó. Sin embargo, el rendimiento en compuestos fenólicos (cantidad de CFT/cantidad de material vegetal) para la relación $1/10$ ($3,43$ %) resultó significativamente menor comparado a los rendimientos obtenidos para las relaciones $1/20$ y $1/40$, que a su vez fueron muy similares entre sí ($4,61$ % y $4,41$ %, respectivamente). En consecuencia, tanto la relación $1/20$ como $1/40$ se pueden considerar apropiadas para obtener rendimientos máximos, sin embargo para estudiar los efectos de otros parámetros sobre la extracción de CFT de quinoa se eligió la relación $1/20$, debido a que con la misma se requiere de menor cantidad de material vegetal para llevar a cabo las experiencias. Además, si se considerara incrementar la escala de la extracción, la relación $1/20$ consumirá menores cantidades de solvente, al tiempo que se obtendría un extracto más concentrado.

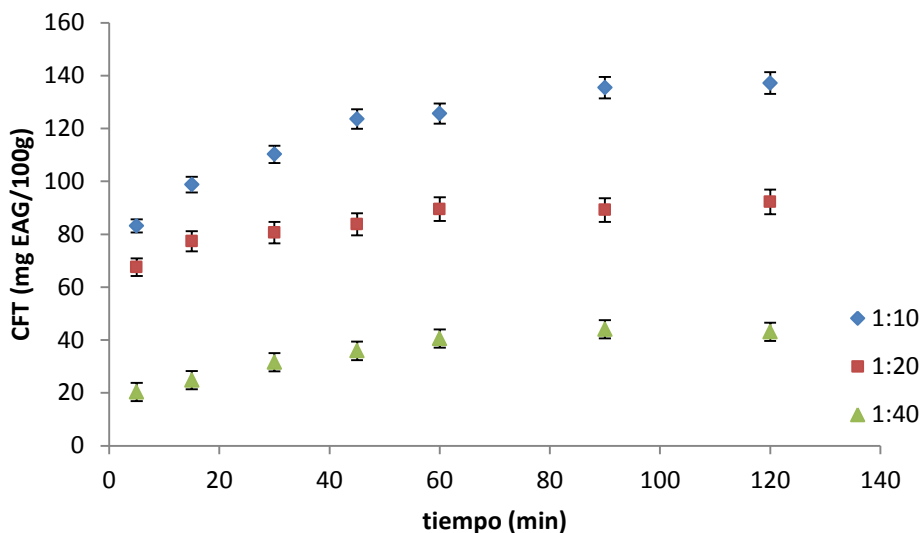


Figura 3.2. Efecto de la relación sólido/solvente sobre la cinética de extracción de CFT de quinoa (d < 0,5 mm), utilizando etanol 40% a 60 °C.

Sun y col., (2011) confirmaron un aumento en el rendimiento de extracción de cinco isoflavonas cuando la relación sólido/solvente utilizada decreció de 1/5 a 1/15 (g/mL). Considerando que la transferencia neta de materia entre el sólido y el solvente se detiene cuando se establece el equilibrio entre ambas fases (Dibert y Cros, 1989), una explicación probable de este fenómeno es que el uso de mayores volúmenes de solvente permite incrementar el tiempo de extracción, incrementando por lo tanto el contenido de compuestos extraídos (Xia y col., 2011). Además se ha mencionado que el uso de mayores volúmenes de solvente acelera la difusión de los compuestos, que podría ser favorable para aumentar el rendimiento de los extractos en compuestos fenólicos (Liu y col., 2010).

III.2.1.3. Efecto del solvente

Dada la gran diversidad de estructuras químicas que presentan los compuestos fenólicos, que incluyen ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas, etc., las polaridades de sus moléculas varían desde marcadamente polares a no polares. Por este motivo, se han utilizado para su extracción

diferentes solventes de polaridades muy diversas, tales como hexano, acetato de etilo, acetona, metanol, etanol, agua o sus mezclas (Liyana-Pathirana y Shahidi, 2005; Deneb y col., 2010; Spigno y col., 2007; Bazykina y col., 2002). En particular, 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; Pinelo y col., 2005). Además, y en vista de la potencial aplicación de los extractos vegetales en la industria alimentaria, es que resulta conveniente utilizar solventes no tóxicos, por lo que tanto el etanol como el agua resultan de elección al tratarse de solventes aceptados para su uso en la industria alimentaria, y que además son abundantes, de bajo costo y de fácil adquisición. Por otra parte, existe un interés cada vez más acentuado en encontrar métodos de extracción eficientes, que provoquen el mínimo daño al medio ambiente y que hagan uso de los menores volúmenes posibles de solventes de bajos niveles de toxicidad (Wang y col., 2004; Durling y col., 2007). Tomando en cuenta estas consideraciones se seleccionó etanol y agua como solventes de extracción, utilizando mezclas de los mismos en diferentes proporciones. Con el fin de obtener los mayores rendimientos de extracción, se torna importante optimizar la relación de mezcla de dichos solventes. La Figura 3.3 muestra la cinética de extracción de los CFT a partir de harina de quinoa ($d < 0,5$ mm), utilizando agua y mezclas acuosas con diferentes proporciones de etanol, a 60 °C y manteniendo una relación sólido/solvente de 1/20. Los resultados muestran que el contenido de CFT resultante en cada caso fue dependiente de la concentración de etanol utilizada en el solvente. Así, el rendimiento en CFT se incrementó en la medida que la proporción de etanol aumentó de 0 % a 80 %, mientras que disminuyó al aumentar dicha proporción a 95%. Esto puede atribuirse a los cambios que experimenta la polaridad del solvente acuoso cuando en éste se altera la proporción de etanol presente. En este sentido, dicha polaridad condicionará tanto el tipo como la cantidad de compuestos fenólicos individuales extraíbles desde la matriz que serán efectivamente

solubilizados por el solvente, modificándose de esta manera el rendimiento neto de CFT (Galvan d'Alessandro y col., 2012). Adicionalmente, se ha informado que altas concentraciones de etanol puede causar desnaturalización proteica en la matriz de estudio, perjudicando la solubilidad de los compuestos fenólicos, y por ende influenciando la eficiencia de la extracción (Yang y col., 2009)

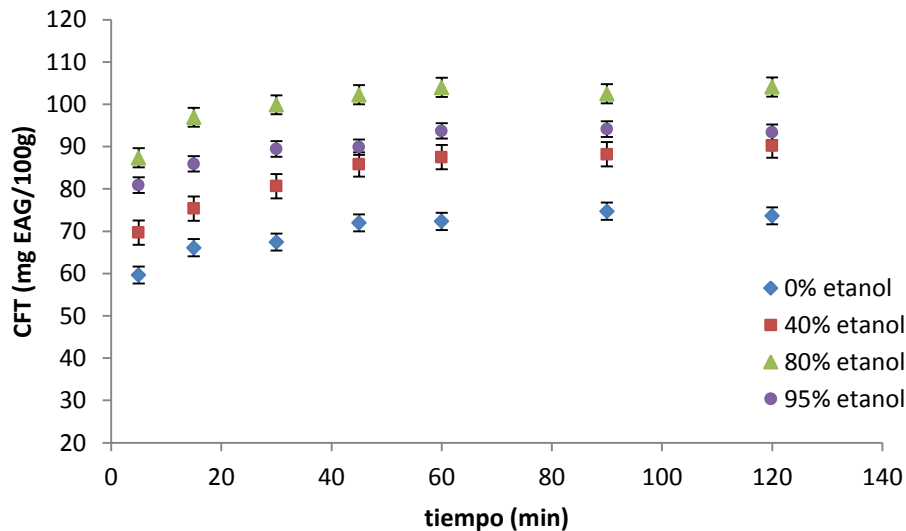


Figura 3.3. Efecto de la composición del solvente sobre la cinética de extracción de CFT a partir de quinoa ($d < 0,5$ mm), con relación sólido/solvente 1/20 a 60 °C.

III.2.1.4. Efecto del tamaño de partícula

La influencia del tamaño de partícula de la matriz sobre la tasa de extracción se estudió en tres fracciones de harina de quinoa de diferente granulometría ($d < 0,5$ mm; $0,5 < d < 0,71$ y $d > 0,71$ mm), realizando en todos los casos las extracciones a 60 °C, con una relación sólido/solvente 1/20, y utilizando etanol 80 % como solvente. Como resultado se pudo observar una reducción de la tasa de transferencia de masa a medida que aumentó el tamaño de partícula, situación que resultó particularmente más notoria durante los primeros 30 min del proceso de extracción (Figura 3.4). Este comportamiento puede entenderse teniendo en cuenta que para la misma masa de material vegetal, el aumento del tamaño de partícula disminuye el área de contacto entre el sólido y el

solvente, con lo que resulta un aumento de la trayectoria de difusión dentro de los poros del sólido (Bucic-Kojic y col., 2007; Wongkittipong y col., 2004). En todos los casos, se alcanzó el equilibrio de extracción alrededor de los 60 min. Aunque los rendimientos en CFT obtenidos en los diferentes ensayos fueron muy similares, se decidió trabajar con un tamaño de partícula inferior a 0,5 mm, ya que resultó ser la fracción más abundante obtenida luego de tamizar la harina de quinoa.

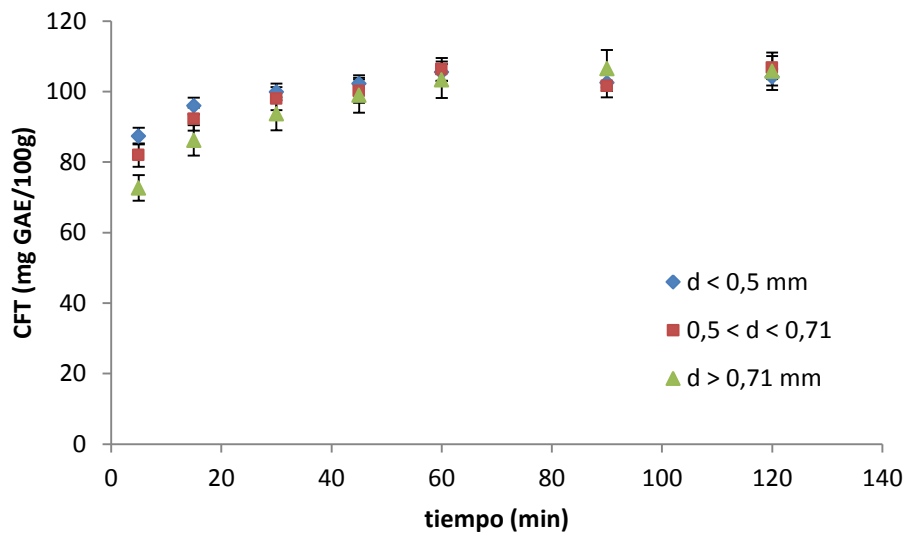


Figura 3.4. Efecto del tamaño de partículas sobre la cinética de extracción de los CFT de quinoa, utilizando etanol 80% como solvente y relación sólido/solvente 1/20 a 60 °C.

III.2.1.5. Efecto de la potencia de ultrasonido

La Figura 3.5 permite comparar diferentes cinéticas de extracción obtenidas sin y con la aplicación de ultrasonido a 50 y 100 W, manteniendo constantes el tipo de solvente (80% etanol), la temperatura (60 °C), el tamaño de partícula ($d < 0,5\text{mm}$) y la relación sólido/solvente (1/20). En los primeros 15 min de extracción se observó un efecto positivo del ultrasonido, al verificarse un incremento en el nivel de CFT en comparación con la extracción sin la asistencia del mismo. Algunos autores han mencionado que una de las ventajas de utilizar ultrasonido es justamente

mejorar el rendimiento de CFT y reducir los tiempos de extracción en diferentes tejidos vegetales (Ma y col., 2008; Liu y col., 2010). Este efecto ha sido atribuido principalmente al comportamiento de las burbujas formadas por cavitación, más que a la propagación de las ondas acústicas. En este sentido, el colapso de las burbujas produce efectos químicos, físicos y mecánicos (Wang y col., 2008), que pueden conducir a la ruptura de las paredes celulares, facilitando de esta manera, la liberación de los compuestos fenólicos desde el interior celular (Ma y col., 2008).

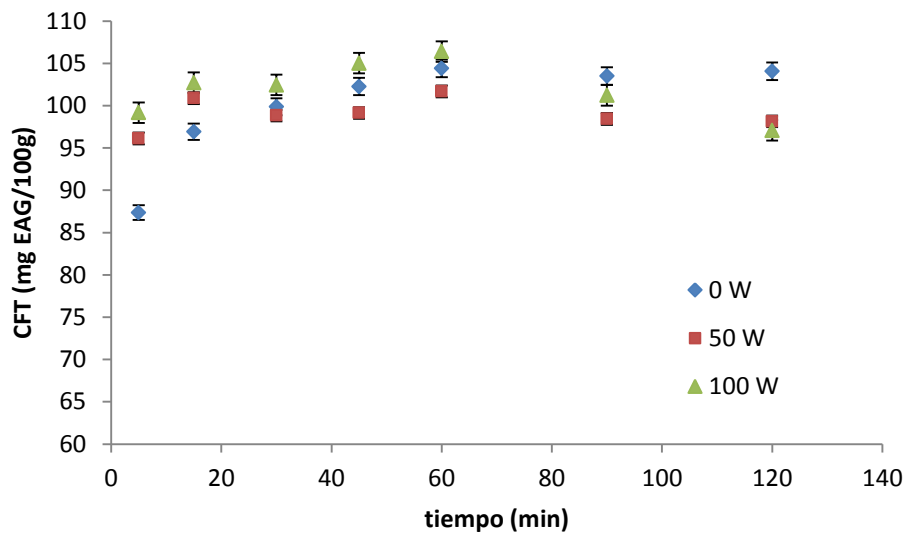


Figura 3.5. Efecto de la aplicación de ultrasonido sobre la cinética de extracción de CFT de quinoa, utilizando etanol 80% como solvente, temperatura de 60 °C, relación sólido/solvente 1/20 y partículas de $d < 0,5$ mm.

También pudo observarse a partir de los 60 min de extracción la aplicación de ultrasonido no ejerció un efecto significativo en el incremento de los contenidos de CFT. Por el contrario, en los tiempos finales del ensayo se produjo un detrimento en los niveles de los mismos en los extractos tratados con ultrasonido con respecto a los obtenidos sin la asistencia del mismo. Este mismo efecto ha sido observado por otros autores, quienes lo atribuyeron a una posible degradación de

algunas especies fenólicas causada por la aplicación de largos tiempos de ultrasonido a la misma matriz (Pingret y col., 2013; Da Porto y col., 2013).

III.2.1.6. Conclusiones

El estudio de los efectos de los principales parámetros operatorios permitió identificar aquellos que más influyeron sobre la extracción de los CFT, con el fin de reducir el número de variables a ser optimizadas. De esta manera, el solvente y la temperatura de extracción junto con las diferentes potencias de ultrasonido evaluadas fueron los parámetros que mostraron las mayores variaciones sobre dicha respuesta (Δ CFT). El resto de los parámetros evaluados mostraron menores variaciones en el contenido de CFT por lo que se decidió utilizar aquellos niveles en los que se obtuvieron los mayores rendimientos en CFT. Como quedó demostrado, el uso de finas partículas ($d < 0,5$ mm) y una relación sólido/solvente 1/20 mostraron una mayor eficiencia en la extracción de los CFT a partir de la harina de quinoa. Además, las cinéticas de extracción mostraron que los rendimientos en CFT fueron casi constantes luego de la primera hora de extracción, incluso cuando se utilizó asistencia de ultrasonido, por lo que el tiempo de extracción se determinó como parámetro fijo en las experiencias posteriores. De esta manera, los tres parámetros que se seleccionaron para optimizar el proceso de extracción y evaluar las posibles interacciones entre ellos fueron la temperatura, la composición del solvente y la potencia de ultrasonido.

III.2.2. Optimización de la extracción de compuestos fenólicos antioxidantes a partir de semillas de quinoa

Para llevar a cabo esta serie de experiencias se utilizó la metodología de superficie de respuesta (MSR), la cual mediante procedimientos matemáticos y estadísticos permite encontrar la relación entre los parámetros operacionales controlables (variables independientes) y las variables de

respuesta (variables dependientes). La MSR es una herramienta muy útil para determinar las condiciones óptimas que permiten mejorar un proceso, ya que considera los efectos de interacción entre los diversos parámetros experimentales (Silva y col., 2007; Bas y Boyaci, 2007). De esta manera, se evaluó el efecto combinado de los tres parámetros seleccionados previamente (temperatura, composición del solvente y potencia de ultrasonido) sobre seis respuestas seleccionadas, según el plan de experiencias mostrado en la Tabla 2.2 (Materiales y Métodos), cuyos resultados se presentan en la Tabla 3.2 y se discuten a continuación.

III.2.2.1. Efecto de los parámetros seleccionados sobre los rendimientos de CFT y FT

Las cantidades de CFT extraídos, bajo las diferentes condiciones experimentales, variaron entre 67,50 y 102,86 mg EAG/100g muestra (b.s.). Por su parte, los niveles de FT variaron entre 1,65 y 26,93 mg EQ/100g muestra (b.s.), resultados que pusieron en evidencia la importancia de las condiciones operacionales sobre los rendimientos de extracción de éstos compuestos bioactivos. La Figura 3.6 muestra el diagrama de Pareto resultante del análisis estadístico correspondiente a ambas respuestas, del cual se desprende que factores e interacciones resultaron estadísticamente significativos en el proceso. La línea azul indica el nivel crítico a partir del cual las variables presentaron un efecto significativo ($p < 0,05$) sobre el rendimiento de CFT y FT. Además, estas gráficas permiten observar aquellos parámetros que ejercieron un efecto positivo (barras color gris) o negativo (barras azules) sobre la variable considerada. Así, se observa por ejemplo, que para ambas respuestas, el solvente (S) resultó ser el parámetro más significativo y que un incremento en la concentración de etanol en el mismo produce un aumento en el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos.

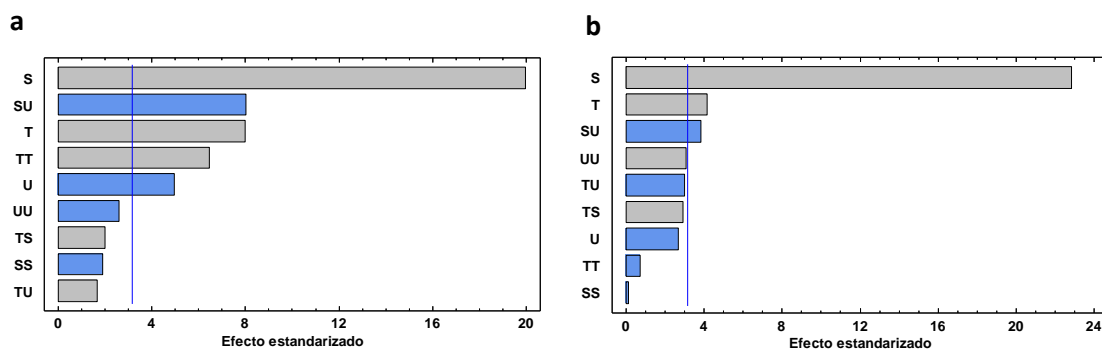


Figura 3.6. Gráficos de Pareto correspondientes al rendimiento de extracción de CFT (a) y de FT (b) a partir de semillas de quinoa, bajo diferentes condiciones de temperatura (T), solvente (S) y potencia de ultrasonido (U).

Tabla 3.2. Condiciones del diseño experimental y valores de respuestas de los extractos de semillas de quinoa.

Nº Exp	X1: Temperatura (°C)	X2: Solvente (% de etanol)	X3: Potencia Ultrasonido (W)	Y1: CFT (mg/100g)	Y2: FT (mg/100g)	Y3: DPPH (% inhibición)	Y4: Rendimiento extracto (g)	Y5: Pureza CFT (%)	Y6: Pureza FT (%)	CFT (HPLC) (mg/100g)
1	20	0	0	67,50	1,65	14,2	15,80	0,43	0,01	2,1
2	60	0	0	73,47	2,69	15,9	17,40	0,45	0,02	2,3
3	20	80	0	96,79	16,85	27,4	4,49	2,16	0,38	21,5
4	60	80	0	102,86	26,93	28,9	6,82	1,51	0,40	22,6
5	20	0	100	70,01	2,73	11,8	17,00	0,41	0,02	2,6
6	60	0	100	75,36	3,17	12,4	18,20	0,41	0,02	2,9
7	20	80	100	77,68	15,97	27,0	3,82	2,03	0,42	21,2
8	60	80	100	91,61	16,93	27,7	6,32	1,29	0,27	21,7
9	40	40	50	76,79	7,41	21,1	7,69	1,00	0,10	16,6
10	40	40	50	77,86	7,93	20,0	7,51	1,04	0,11	15,7
11	40	40	50	80,43	8,93	20,56	9,16	0,92	0,10	16,1
12	40	40	50	78,25	10,01	20,8	8,24	1,04	0,12	15,4
13	20	40	50	85,36	8,81	19,3	6,96	1,23	0,13	16,4
14	60	40	50	92,68	11,41	21,1	8,79	1,05	0,13	15,0
15	40	0	50	74,29	2,29	12,7	17,80	0,42	0,01	2,8
16	40	80	50	88,21	18,77	27,1	4,49	1,74	0,42	20,1
17	40	40	0	79,64	12,97	21,6	5,31	1,50	0,24	17,7
18	40	40	100	81,55	12,57	20,8	8,61	1,05	0,15	16,0

Los resultados del análisis estadístico (ANOVA), considerando los parámetros significativos para las respuestas rendimiento en CFT y FT, se presentan en la Tabla 3.3 y 3.4, respectivamente.

Tabla 3.3. Resultados del ANOVA correspondiente al rendimiento de CFT en extractos de semilla de quinoa, obtenidos bajo diferentes condiciones de temperatura, solvente y potencia de ultrasonido.

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
T	149,382	1	149,382	63,94	0,0041
S	931,804	1	931,804	398,84	0,0003
U	57,8884	1	57,8884	24,78	0,0156
TT	60,9596	1	60,9596	26,09	0,0145
SU	150,945	1	150,945	64,61	0,0040
Modelo	1350,87	5	270,17	18,72	<0,0001
Falta de ajuste	166,168	9	18,4631	7,90	0,0580
Error puro	7,00887	3	2,33629		
Total (corr.)	1524,02	17			

Así, se observó que la cantidad de CFT extraídos fue afectada por las tres variables estudiadas. Además, se registró un efecto significativo de las interacciones solvente- potencia de ultrasonido e interacción cuadrática de la temperatura (Tabla 3.3 y Figura 3.6a). Por su lado, se apreció que la variable de mayor influencia en el rendimiento de extracción de FT fue la composición del solvente y, en menor medida, la temperatura; registrándose además un efecto de interacción solvente- potencia de ultrasonido. Por ser muy próximos los efectos estandarizados al nivel crítico, se decidió considerar dentro del análisis estadístico, el efecto cuadrático de la potencia ultrasonido y

las interacciones entre las variables temperatura-ultrasonido y temperatura-solvente (Tabla 3.4 y Figura 3.6b).

Tabla 3.4. Resultados del ANOVA correspondiente al rendimiento de FT en extractos de semillas de quinoa, obtenidos bajo diferentes condiciones de temperatura, solvente y potencia de ultrasonido.

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
T	22,8614	1	22,8614	22,64	0,0089
S	687,573	1	687,573	681,03	0,0000
TS	11,4242	1	11,4242	11,32	0,0282
TU	11,8098	1	11,8098	11,70	0,0268
SU	19,3442	1	19,3442	19,16	0,0119
UU	14,416	1	14,416	14,28	0,0195
Modelo	767,43	6	127,90	38,87	<0,0001
Falta de ajuste	32,2415	8	4,03408	3,05	0,1942
Error puro	3,9603	3	1,3209		
Total (corr.)	803,625	17			

El *software* utilizado para el análisis estadístico de los datos experimentales, generó también la ecuación de regresión cuadrática 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 obtuvieron las correspondientes ecuaciones modelo para cada una de las variables:

$$\text{CFT} = 79,63 + 3,87x_1 + 9,65x_2 - 2,41x_3 - 4,34x_2x_3 + 3,70x_1^2 \quad (\text{Ec. III.1})$$

$$\text{FT} = 9,44 + 1,51x_1 + 8,29x_2 + 1,20x_1x_2 - 1,22x_1x_3 - 1,56x_2x_3 + 1,80x_3^2 \quad (\text{Ec. III.2})$$

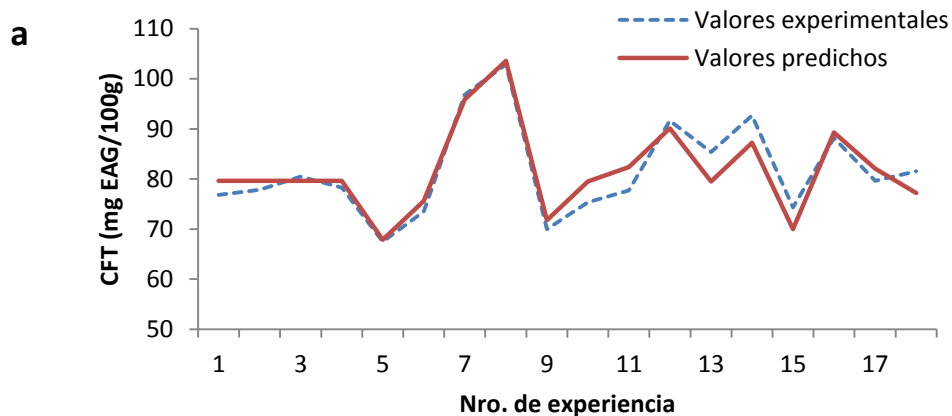
La significancia de los términos de ambos modelos fue demostrada por el bajo valor- P ($<0,0001$) para cada una de las respuestas. Además, el valor no significativo de la falta de ajuste ($p > 0,05$) en ambos casos, mostró que cada modelo resultó adecuado para predecir los valores de respuesta (Hamsaveni y col., 2001). El coeficiente de determinación (R^2) correspondiente a las ecuaciones modelo para CFT y FT fue 0,8864 y 0,9549, respectivamente, lo que indica que no menos del 88,64 % de la variación total de las respuestas fue explicada por los modelos.

En la Figura 3.7 puede observarse el grado de coincidencia entre valores experimentales y predichos, para cada modelo propuesto. Se calculó además el error absoluto medio (EAM) en ambos casos, a partir de la fórmula:

$$\text{EAM} = \sum |V_{\text{exp}} - V_{\text{pred}}| / n$$

Donde V_{exp} : valor experimental, V_{pred} : valor predicho y n : número de pares de datos.

Los resultados de EAM fueron 2,58 y 1,20 para CFT y FT respectivamente, demostrando un buen ajuste y una distribución uniforme de los valores observados alrededor de los predichos, lo que confirmó que efectivamente podría utilizarse un modelo polinomial de segundo orden para representar la relación entre los parámetros seleccionados.



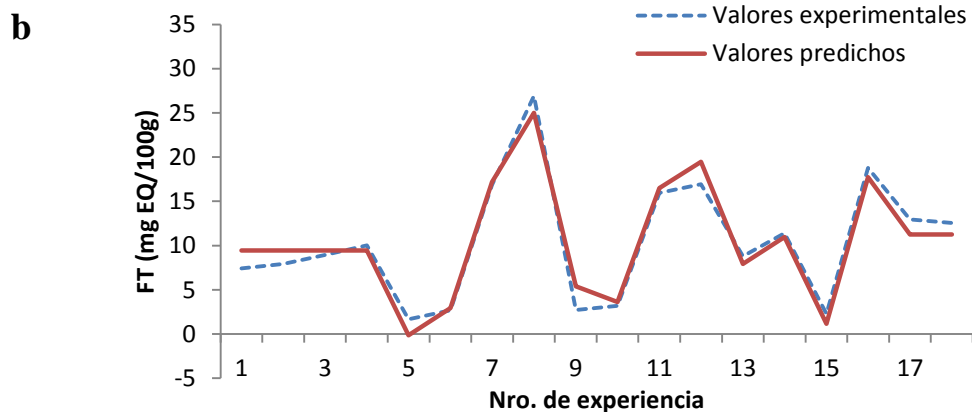
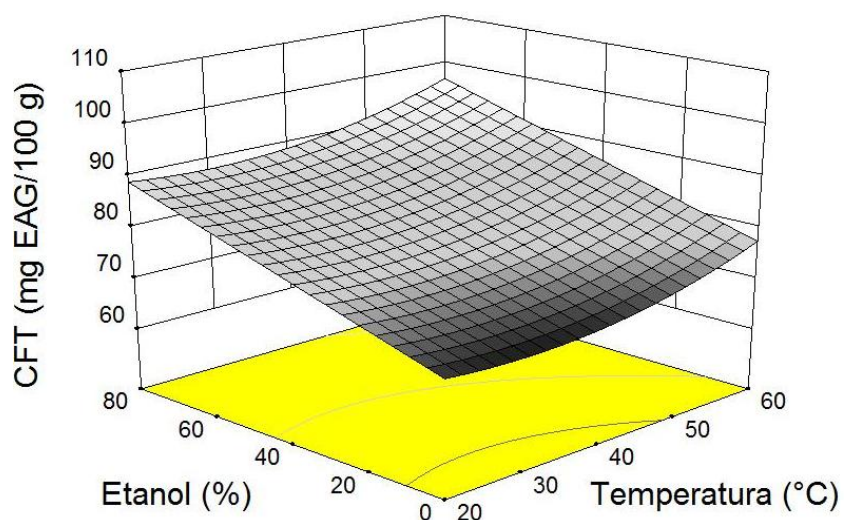


Figura 3.7. Comparación entre los valores experimentales y predichos por los modelos en el rendimiento de CFT (a) y FT (b) en extractos de semillas de quinoa.

Para determinar los niveles óptimos de las variables evaluadas sobre la extracción de los compuestos fenólicos se diseñaron gráficos de superficie de respuesta utilizando las ecuaciones de los modelos ajustados (Ec. III.1 y Ec. III.2). Dichos gráficos se presentan en la Figura 3.8, los que fueron obtenidos modificando dos de las variables estudiadas, dentro del rango experimental, y manteniendo la variable restante constante, en su punto central.



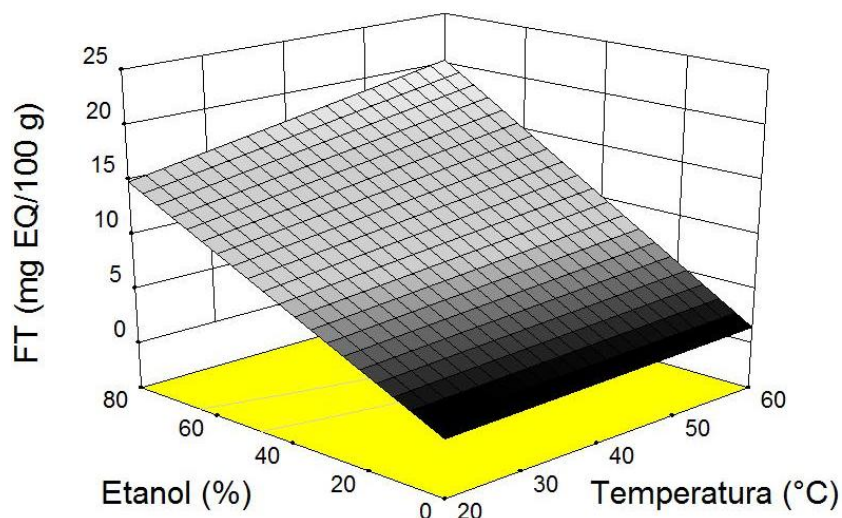


Figura 3.8. Gráficos de superficie de respuesta mostrando interacción entre la temperatura de extracción (X1) y la concentración de etanol (X2) sobre los contenidos de CFT y FT obtenidos a partir de semillas de quinoa.

Del análisis de los gráficos, se observó que la concentración de etanol en el solvente tuvo un marcado efecto positivo lineal con ambas respuestas relacionadas al rendimiento. De hecho, fue la variable más significativa en la extracción de CFT y FT, dentro de las analizadas experimentalmente. Los rendimientos con etanol al 40 %, y especialmente con etanol al 80 %, resultaron mayores a los obtenidos utilizando agua como solvente. El incremento en la concentración de etanol, a potencia de ultrasonido fija (50 W), condujo a un incremento gradual en los contenidos de CFT y FT en los extractos, hasta alcanzar valores máximos en la región cercana al 80 % de etanol. Cabe mencionar que el efecto positivo del etanol en el solvente fue mucho mayor para la extracción de flavonoides que para los compuestos fenólicos totales. Este mismo resultado ya ha sido descrito por otros autores al estudiar la extracción de éstos compuestos a partir de matrices vegetales utilizando concentraciones de etanol similares a las empleadas en el presente estudio (Silva y col., 2007; Gong y col., 2012).

La temperatura, por otra parte, también exhibió un efecto positivo en la extracción, aunque claramente dicho efecto fue de menor grado que el del solvente. Los mayores rendimientos en CFT y FT se alcanzaron a la mayor temperatura utilizada en los ensayos (60 °C). La aplicación de temperatura en una extracción, generalmente aumenta la solubilidad de los compuestos extraíbles, a la vez que incrementa la transferencia de masa debido al incremento de los correspondientes coeficientes de difusión (Ghafoor y col., 2009; Silva y col., 2007). Sin embargo, se ha comprobado que algunas familias de compuestos fenólicos pueden degradarse a temperaturas superiores a los 60 °C (Silva y col., 2007; Spigno y De Faveri, 2007), por lo que este valor fue el límite máximo empleado en el presente estudio.

Por su lado, la Figura 3.9 muestra el efecto de la temperatura de extracción y de la potencia de ultrasonido sobre los contenidos de CFT y FT en los extractos, cuando se mantuvo constante la concentración de etanol en el solvente (40 %). Se observó que el rendimiento de CFT fue casi constante entre 20 y 40 °C, para luego aumentar ligeramente con el incremento de la temperatura, alcanzando un valor máximo a la mayor temperatura utilizada (60 °C). Por otro lado, se observó que el rendimiento de FT aumentó gradualmente con el incremento de la temperatura, hasta alcanzar un máximo valor a 60 °C, en el caso de la extracción sin asistencia de ultrasonido. La aplicación de ultrasonido en la extracción no mejoró significativamente los rendimientos de CFT y FT. Por el contrario, a temperaturas superiores pueden observarse un efecto negativo del mismo sobre ambas respuestas. Numerosos trabajos han descripto mejoras en los rendimientos de compuestos fenólicos al utilizar asistencia de ultrasonido en extracciones realizadas a partir de diversas fuentes vegetales (Wang y col., 2008; Ghafoor y col., 2009; Galvan D'Alessandro y col., 2012; Muñiz-Márquez y col., 2013; González-Centeno y col., 2015). Este efecto ha sido atribuido principalmente a la cavitación de las burbujas que se forman como consecuencia de la propagación de las ondas acústicas en el medio líquido (Ghafoor y col., 2009).

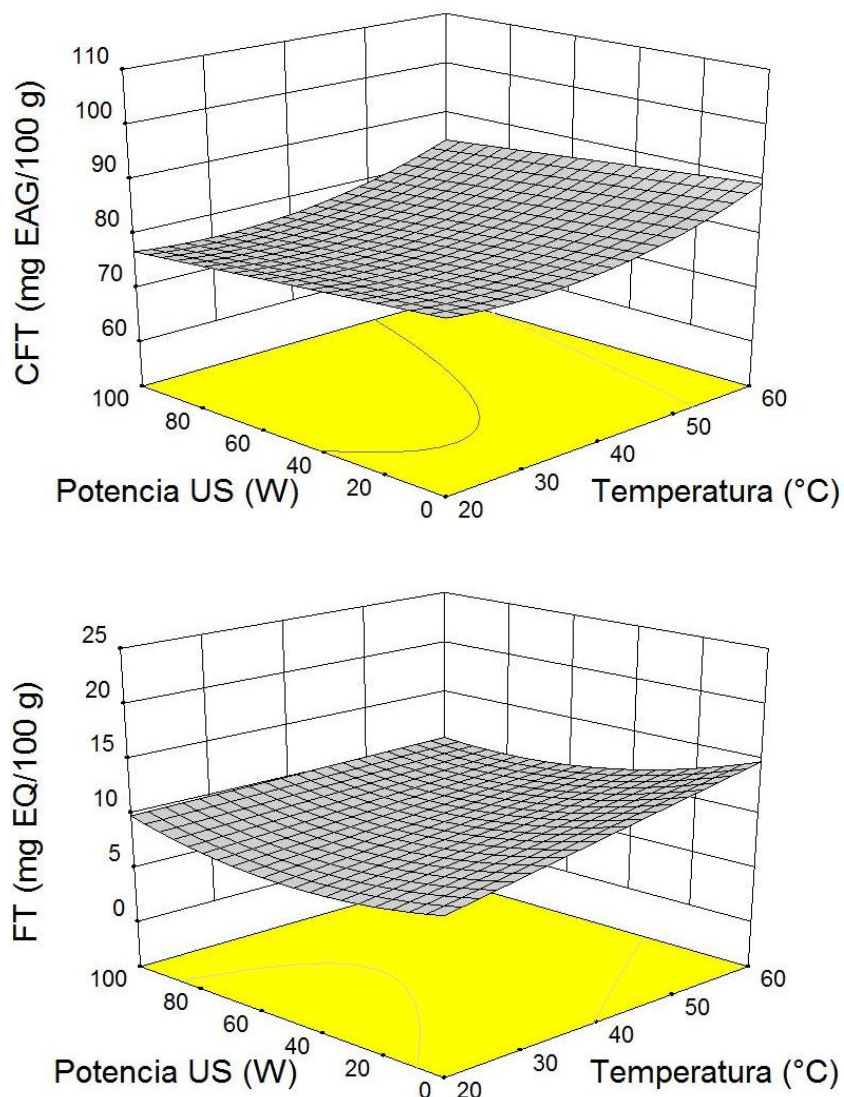


Figura 3.9. Gráficos de superficie de respuesta mostrando interacción entre la temperatura de extracción (X1) y la potencia de ultrasonido (X3) sobre los contenidos de CFT y FT obtenidos a partir de semillas de quinoa.

El colapso de estas burbujas produce efectos físicos, químicos y mecánicos que conducen a la ruptura de las paredes celulares vegetales, resultando un aumento del transporte de masa, al facilitarse el ingreso de solvente en el interior de las células y por ende, la liberación de los compuestos extraíbles (Ma y col., 2008). Además, se ha propuesto que el efecto positivo del

ultrasonido sobre el rendimiento de extracción es mayor en la medida que aumenta el tamaño de partícula de la matriz utilizada (Galvan d'Alessandro y col., 2012).

En el presente estudio, el efecto no significativo del ultrasonido observado en la extracción de los compuestos fenólicos a partir de semillas de quinoa, se podría atribuir, en parte, al pequeño tamaño de partícula de las muestras utilizadas en los ensayos ($d < 0,5$ mm). Adicionalmente, otros estudios han descrito una disminución en la cantidad de compuestos fenólicos extraídos a partir de diversas matrices vegetales luego de aplicar ultrasonido, resultado que ha sido atribuido a diversas causas, incluyendo prolongados tiempos de exposición al ultrasonido (Da Porto y col., 2013), temperaturas superiores a 40 °C (Carrera y col., 2012) o a un efecto combinado de tiempo (> 20 min) y temperatura (40 °C) utilizados durante la extracción (Ma y col., 2008).

Por último, los gráficos de superficie de respuesta de la Figura 3.10, obtenidos a temperatura constante de 40 °C, muestran que el ultrasonido no ejerció un efecto positivo sobre los rendimientos de CFT y FT. De hecho, se observaron disminuciones en los rendimientos de ambas respuestas cuando se utilizó la asistencia de ultrasonido, cuyo efecto se acentuó en la medida que aumentó el contenido de etanol en el solvente de extracción. Por otro lado pudo confirmarse el efecto positivo de dicho contenido de etanol, en particular sobre el rendimiento de FT.

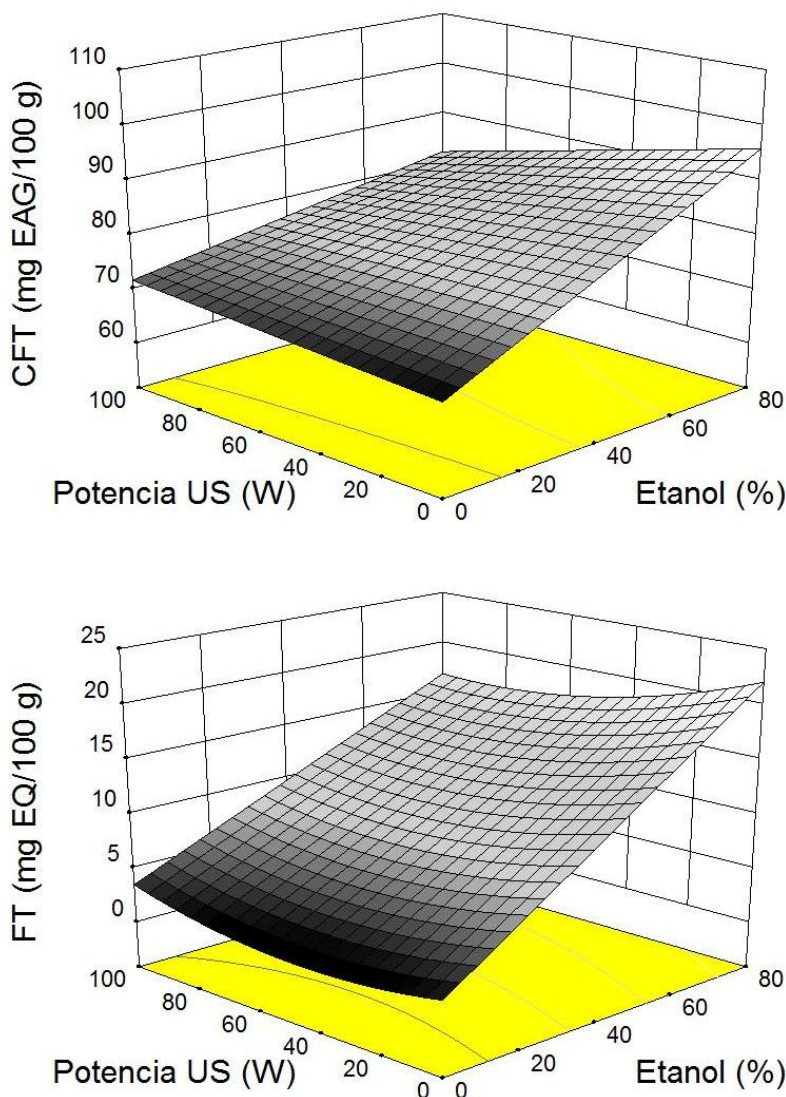


Figura 3.10. Gráficos de superficie de respuesta mostrando interacción entre la potencia de ultrasonido (X3) y la concentración de etanol (X2) sobre el contenido de CFT y FT obtenidos a partir de semillas de quinoa.

III.2.2.2. Efecto de los parámetros seleccionados sobre la actividad antioxidante

El estudio del efecto de la temperatura, porcentaje de etanol en el solvente y potencia de ultrasonido sobre la actividad antioxidante (AA) de los extractos se abordó siguiendo una

estrategia metodológica similar a la aplicada para las respuestas rendimientos de CFT y FT. Así, se determinaron, en primer lugar, aquellos parámetros/interacciones significativos sobre la respuesta mediante el análisis estadístico de los datos. A continuación se obtuvo la ecuación modelo que permita predecir los valores de respuesta, para luego comprobar la significancia estadística del modelo y finalmente analizar los gráficos de superficie de respuesta obtenidos. El método elegido para evaluar la AA, fue el de la inhibición del radical DPPH, debido a que el mismo es ampliamente utilizado para mediciones *in vitro* en extractos vegetales, además de tratarse de una técnica rápida, fiable y reproducible (Koleva y col., 2002).

El rango de variación de la actividad antioxidante de los extractos obtenidos en esta serie de experiencias fue de 11,8 a 28,9 % (Tabla 3.2). Los resultados del análisis estadístico (ANOVA) (Tabla 3.5) y el diagrama de Pareto (Figura 3.11), mostraron que el parámetro más influyente sobre la AA fue el solvente, mientras que la potencia de ultrasonido, la temperatura y la interacción solvente-ultrasonido, si bien resultaron variables con efectos significativos sobre la respuesta evaluada, su impacto resultó comparativamente mucho menor.

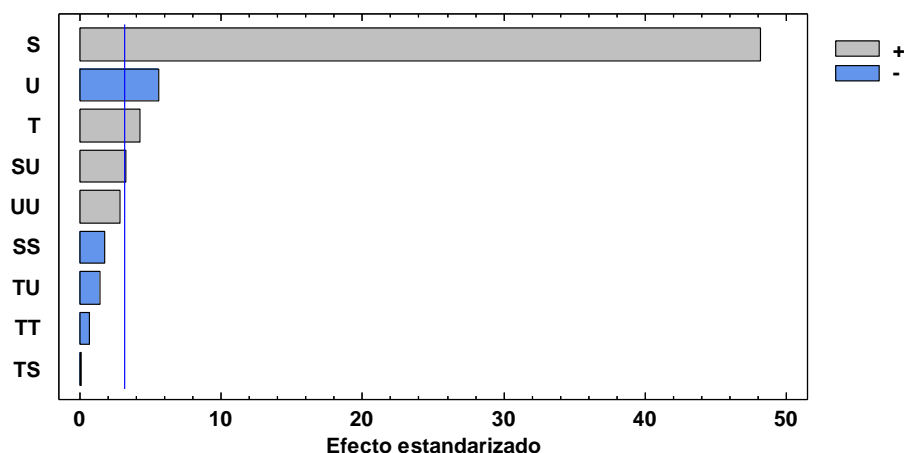


Figura 3.11. Gráfico de Pareto correspondiente a la actividad antioxidante de extractos de semillas de quinoa obtenidos bajo diferentes condiciones de temperatura, solvente y potencia de ultrasonido.

Tabla 3.5. Resultados del ANOVA correspondiente a la actividad antioxidante de extractos de semillas de quinoa obtenidos bajo diferentes condiciones de temperatura, solvente y potencia de ultrasonido.

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
T	3,98161	1	3,98161	18,27	0,0235
S	505,521	1	505,521	2319,35	0,0000
U	6,889	1	6,889	31,61	0,0111
SU	2,31125	1	2,31125	10,60	0,0473
Modelo	518,70	4	129,68	440,37	<0,0001
Falta de ajuste	3,17426	10	0,317426	1,46	0,4196
Error puro	0,653875	3	0,217958		
Total (corr.)	522,531	17			

El modelo de regresión lineal, mostrando sólo los términos significativos ($p < 0,05$), resultó el siguiente:

$$AA = 20,58 + 0,63x_1 + 7,11x_2 - 0,83x_3 + 0,54x_2x_3 \quad (\text{Ec. III.3})$$

El valor no significativo de la falta de ajuste ($p > 0,05$) mostró que el modelo fue adecuado para predecir los valores de respuesta. Además, dicho modelo explicó prácticamente toda la variación observada en la respuesta, ya que el valor de coeficiente de determinación (R^2) fue de 0,9927. El error absoluto medio (EAM) fue de 0,37, mostrando un buen ajuste y una distribución uniforme de los valores observados en torno a los predichos (Figura 3.12).

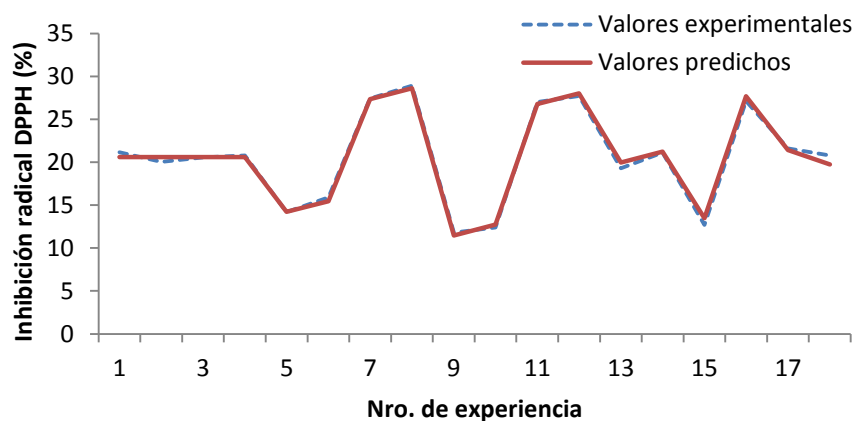
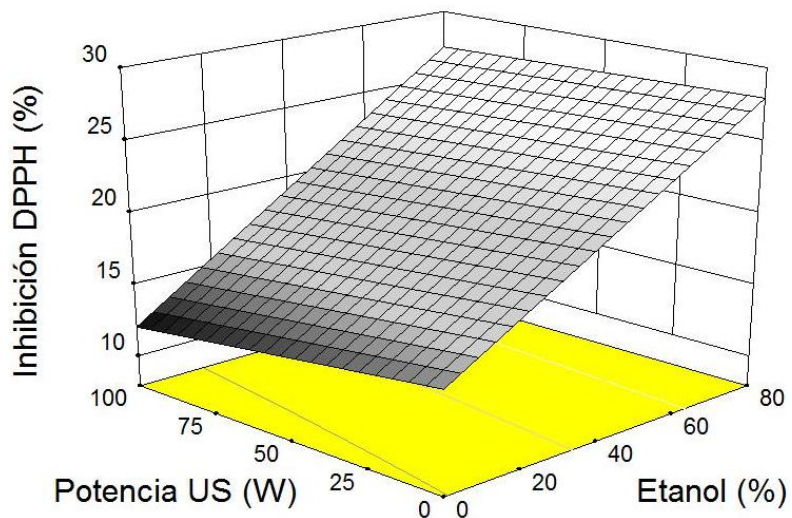


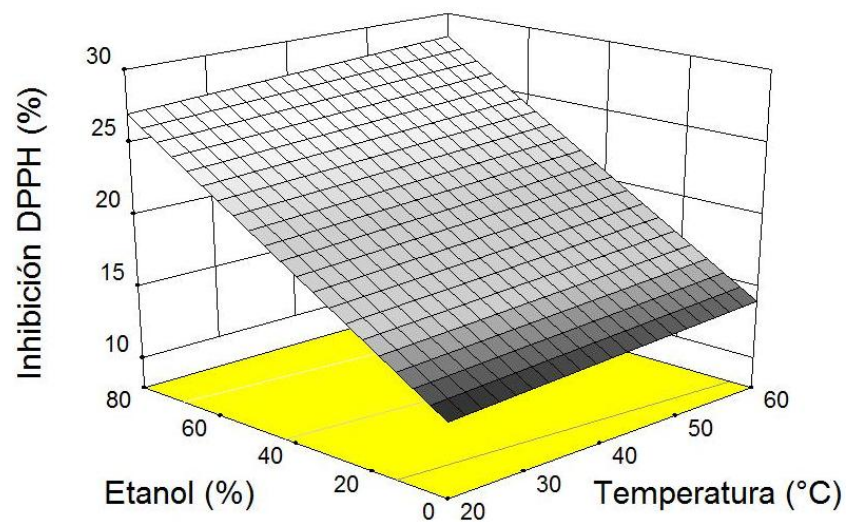
Figura 3.12. Valores experimentales y predichos por el modelo para la respuesta actividad antioxidante en extractos de semillas de quinoa.

Utilizando la ecuación del modelo ajustado (Ec. III.3) se diseñaron los gráficos de superficie de respuesta correspondientes, con el fin de determinar los niveles óptimos de los parámetros evaluados sobre la AA (Figura 3.13). Del análisis de los mismos, se puede observar que la AA de los extractos resultó incrementada, principalmente, con una mayor proporción de etanol en el solvente. Si bien la temperatura de extracción tuvo un efecto similar, el mismo resultó de menor impacto, mientras que la potencia de ultrasonido tuvo un efecto negativo de bajo impacto sobre la AA de los extractos. Estos resultados indican que si se desea obtener extractos con elevada actividad antioxidante, se deben utilizar elevadas concentraciones de etanol en el solvente, altas temperaturas, sin que la asistencia de ultrasonido resulte significativa para este propósito. Estas condiciones experimentales guardaron correspondencia con las observadas para extraer con máxima eficiencia los CFT y FT, por lo que los mismos parecen contribuir a la actividad antioxidante resultante de los extractos.

A



B



C

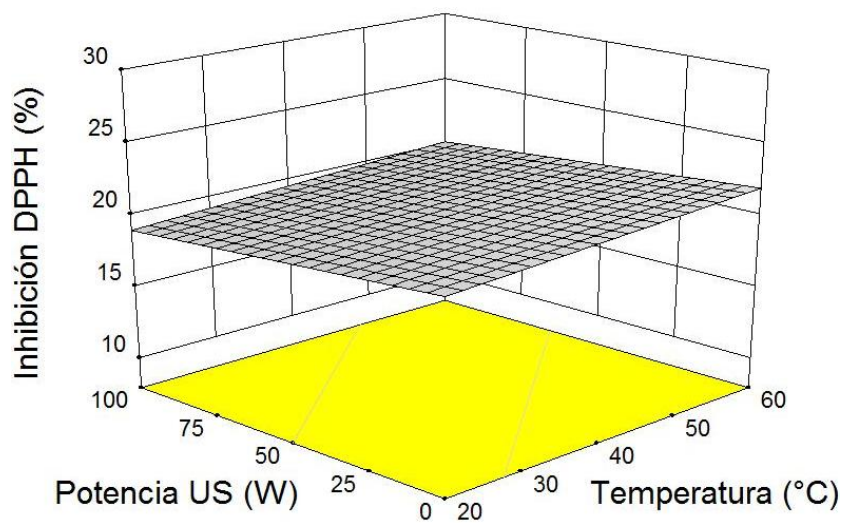


Figura 3.13. Gráficos de superficie de respuesta mostrando interacción entre potencia de ultrasonido y concentración de etanol (A); temperatura de extracción y concentración de etanol (B); potencia de ultrasonido y temperatura de extracción (C) sobre la actividad antioxidante de los extractos de semillas de quinoa.

III.2.2.3. Correlación entre actividad antioxidante y rendimientos de CFT y FT

En la Figura 3.14 se muestran gráficos de correlación entre la actividad antioxidante y contenido en compuestos fenólicos totales (A) y contenido de flavonoides totales (B), para la serie de experiencias realizadas de acuerdo al diseño experimental. En ambos casos, se observó una correlación positiva de ambas respuestas con la AA, cuyos coeficientes de correlación de Pearson resultaron 0,791 y 0,935 para CFT y FT, respectivamente. Estos resultados dan cuenta de que ambas respuestas podrían contribuir con la capacidad de inhibición de radicales DPPH, siendo los flavonoides los que tienen una mayor influencia sobre la AA resultante. Numerosos estudios han comprobado que los flavonoides presentan mayor actividad antioxidante en comparación con compuestos fenólicos de estructura diferente de los mismos. Esto se ha justificado teniendo en cuenta particularidades estructurales inherentes a los flavonoides, como lo es el grupo catecol (*o*-3-4'-dihidroxilo) del anillo B, el doble enlace entre las posiciones 2 y 3 del anillo C conjugado con el grupo carbonilo en la posición 4 del anillo C, y los grupos hidroxilo en las posiciones 5 y 7 del anillo A (Rice-Evans y col., 1996; Soobrattee y col., 2005; Cos y col., 1998).

Un aspecto importante que puede derivarse del análisis de ambos gráficos es el efecto de la composición del solvente en la extracción, existiendo la posibilidad de agrupar los ensayos teniendo en cuenta las diferencias en la actividad antioxidante resultante en cada extracto, las que parecen estar relacionadas con diferentes concentraciones de etanol en el solvente utilizado en cada caso. De esta manera, pueden distinguirse tres grupos, el correspondiente a las extracciones llevadas a cabo con agua pura, en las que se verificaron las actividades antioxidantes más bajas en

los extractos resultantes, uno que incluye extractos con valores intermedios de dicha actividad, en coincidencia con el uso de etanol 40% como solvente de extracción y finalmente un grupo de extractos con las mayores capacidades antioxidantes, que se corresponden con las extracciones realizadas con un solvente con el máximo contenido de etanol utilizado en la serie de experiencias.

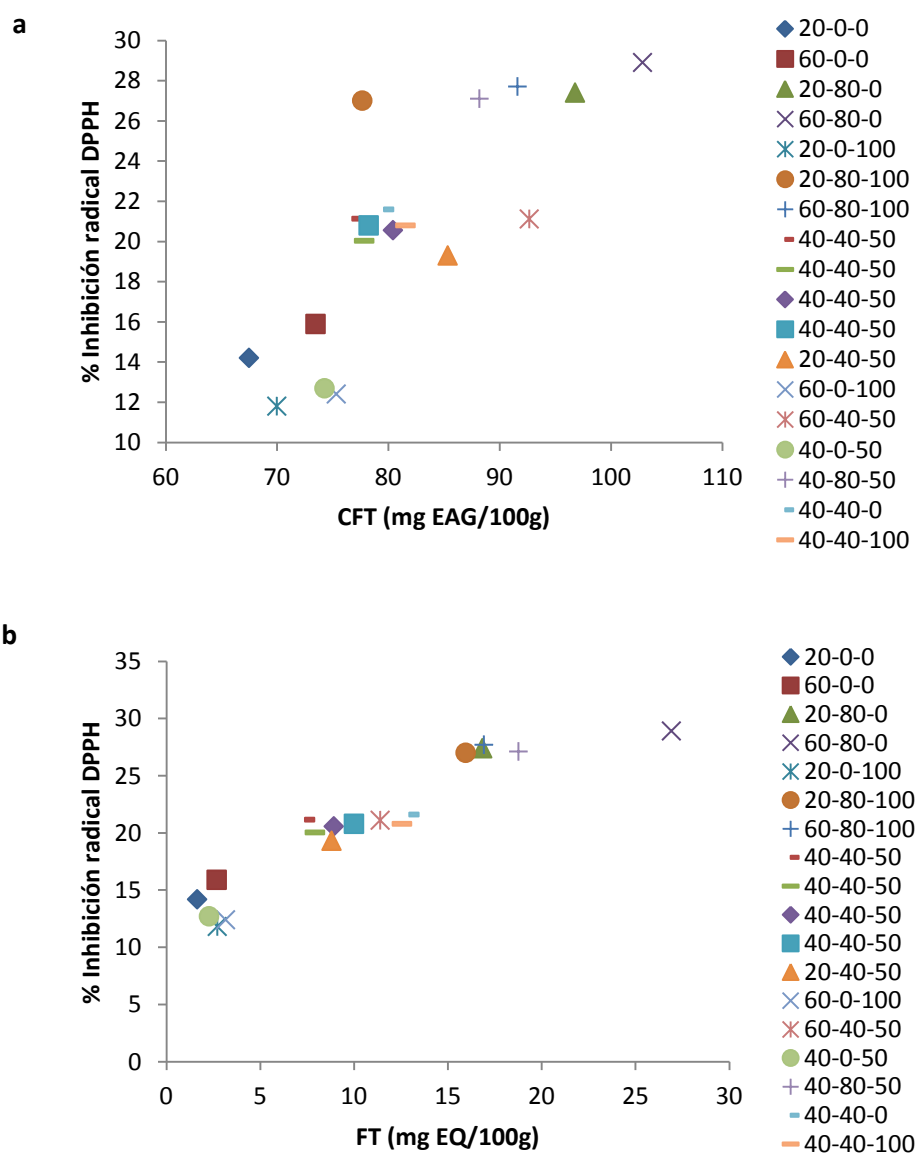


Figura 3.14. Gráficos de correlación entre la actividad antioxidante y la concentración de CFT (A) y entre la actividad antioxidante y la concentración de FT (B). Cada punto del gráfico corresponde a una condición de extracción, cuya referencia se lee (T° - % etanol - potencia de ultrasonido).

III.2.2.4. Efecto de los parámetros seleccionados sobre el rendimiento y la pureza de los extractos

Los resultados del análisis estadístico ANOVA (Tabla 3.6) y el diagrama de Pareto (Figura 3.15) mostraron que el parámetro que más influyó sobre el rendimiento de peso seco de los extractos fue el solvente, tanto en su coeficiente lineal como cuadrático. Por su parte, la temperatura resultó también ser un parámetro condicionante de dicha respuesta, aunque con un impacto menor que la composición del extractante.

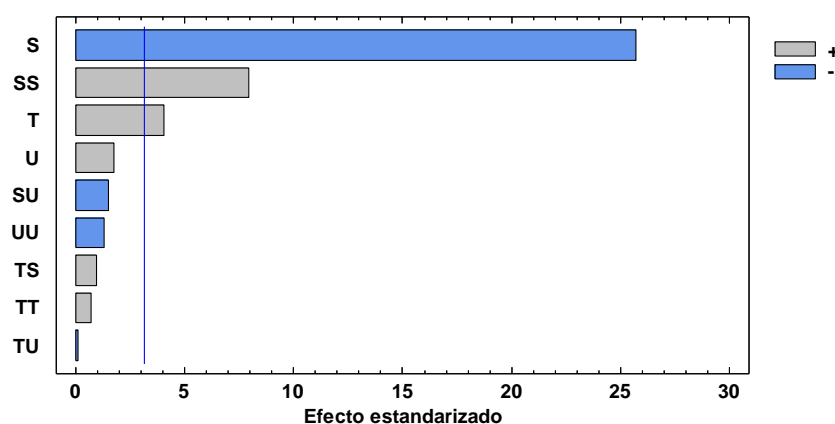


Figura 3.15. Gráfico de Pareto correspondiente al rendimiento total de los extractos obtenidos bajo diferentes condiciones de temperatura, solvente y potencia de ultrasonido.

El modelo de regresión cuadrático para el rendimiento (R_t), mostrando sólo los términos significativos ($p < 0,05$), fue el siguiente:

$$R_t = 7,78 + 0,95x_1 - 6,03x_2 + 3,43x_2^2 \quad (\text{Ec. III.4})$$

El valor no significativo de la falta de ajuste ($p > 0,05$) mostró que el modelo fue adecuado para predecir los valores de respuesta. Además, dicho modelo explicó 97,27 % de la variación total de la respuesta, cuyo error absoluto medio (EAM) fue de 0,58, mostrando un buen ajuste y una distribución uniforme de los valores observados alrededor de los predichos.

Tabla 3.6. Resultados del ANOVA correspondiente al rendimiento total de los extractos obtenidos bajo diferentes condiciones de temperatura, solvente y potencia de ultrasonido.

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
T	8,94916	1	8,94916	7,77	0,0212
S	363,127	1	363,127	315,09	0,0000
SS	52,2961	1	52,2961	45,38	0,0001
Modelo	424,45	3	141,48	166,64	<0,0001
Falta de ajuste	10,2440	11	0,93085	1,70	0,3647
Error puro	1,6432	3	0,55154		
Total (corr.)	436,285	17			

Para mostrar el efecto de las variables principales sobre el Rt de los extractos, se diseñaron los gráficos de superficie de respuesta (Figura 3.16), modificando la temperatura y la concentración de etanol dentro del rango experimental y manteniendo la potencia de ultrasonido en el punto central (50 W).

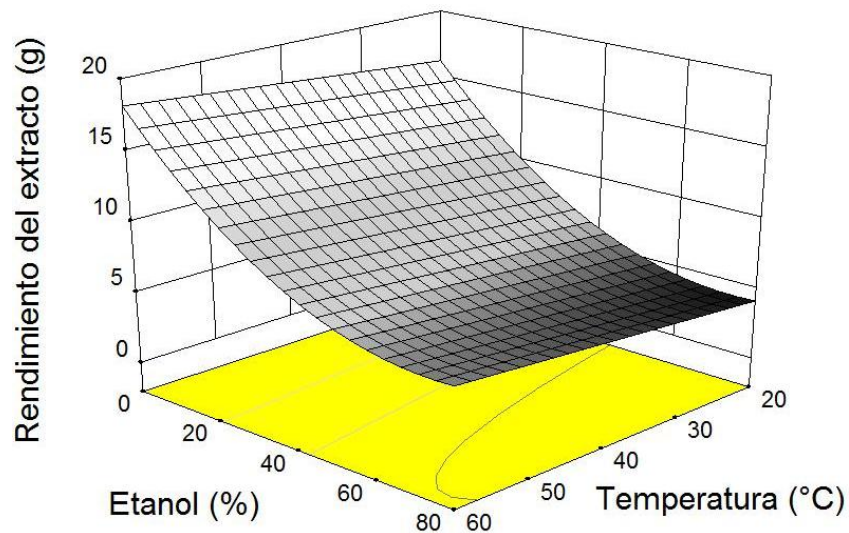


Figura 3.16. Gráfico de superficie de respuesta mostrando la interacción entre la temperatura de extracción y la concentración de etanol sobre el rendimiento total de los extractos.

En la Figura 3.16 se observó que los mayores rendimientos de extracto se obtuvieron utilizando agua como solvente y la mayor temperatura ensayada (60 °C). Situación que se revierte a medida que se disminuye la temperatura de extracción y especialmente cuando se incrementa el contenido de etanol en el solvente. En principio, este resultado se contradice con los obtenidos anteriormente, porque lo que se busca en la extracción es maximizar el rendimiento de los extractos. Sin embargo, cuando se analizó el contenido de compuestos fenólicos y de flavonoides en cada extracto (pureza), se observó que el etanol fue selectivo para la solubilización de este tipo de compuestos y por lo tanto, a medida que se incrementó la proporción de etanol en el solvente, aumentó la concentración de sustancias fenólicas presentes en el extracto, en detrimento de otras de naturaleza diferente. Como se ha indicado previamente, la polaridad del solvente juega un rol muy importante en la eficiencia de extracción (Xia y col., 2011). En este caso, el uso de proporciones de agua en el solvente mayores al 40 %, fueron capaces de solubilizar otras moléculas indeseables de naturaleza hidrofílica, que aumentaron el valor de masa seca de los extractos y, concomitantemente, se produjo un deterioro en la selectividad hacia la extracción de compuestos fenólicos.

Los gráficos de superficie de respuesta de la Figura 3.17 y el diagrama de Pareto representado en la Figura 3.18 permiten obtener las mejores condiciones para aumentar la pureza de los extractos en CFT y FT. En dichas figuras se observó que la composición del solvente fue la principal variable que afectó ambas respuestas, debiéndose utilizar altas concentraciones de etanol para obtener extractos más ricos en estos compuestos. Cabe mencionar, que mientras la temperatura no afectó la pureza de los extractos relativa a FT, sí lo hizo con la pureza de CFT, observándose a altas concentraciones de etanol, una influencia negativa de dicha variable. Este resultado se podría explicar teniendo en cuenta que al aumentar la temperatura de extracción, además de resultar favorecida la solubilización de diversos compuestos fenólicos, también aumenta la solubilidad y

difusión de otros solutos, que al co-extraerse disminuyen la pureza final de los extractos relativa a CFT (Spigno y col., 2007).

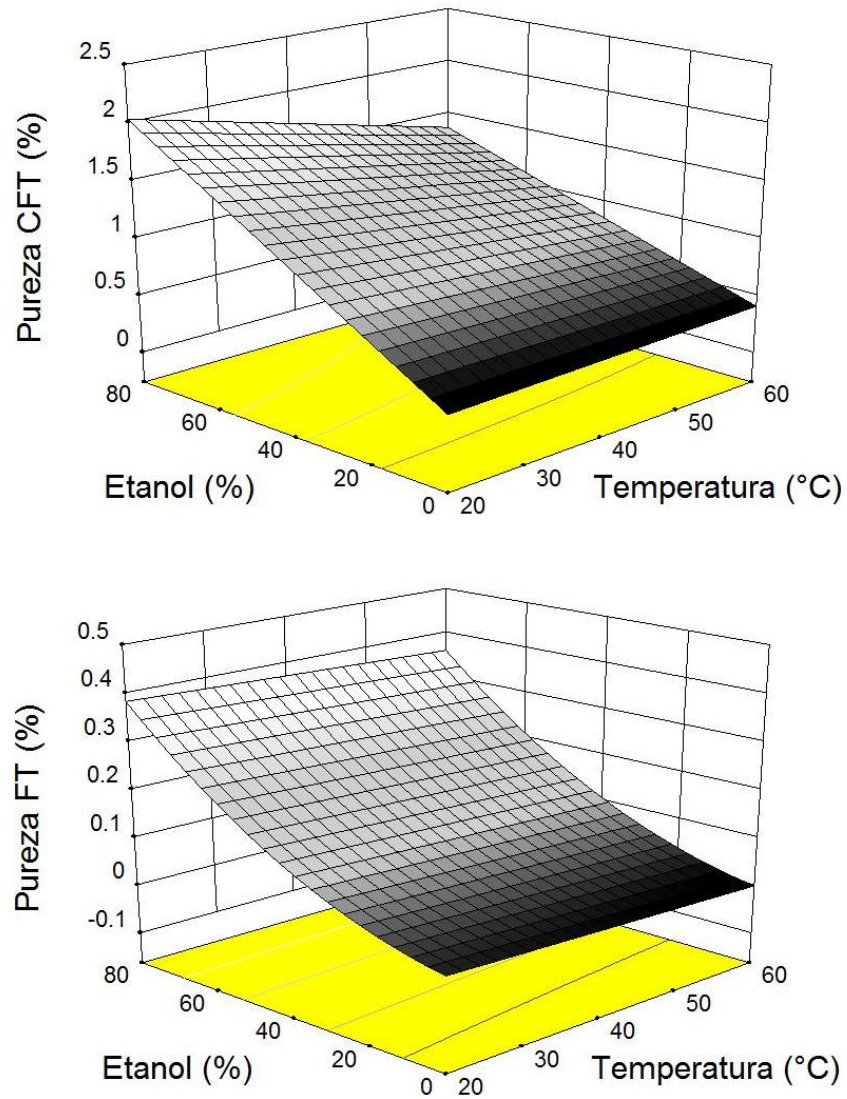


Figura 3.17. Gráficos de superficie de respuesta mostrando interacción entre la concentración de etanol y la temperatura de extracción sobre la pureza de CFT y FT.

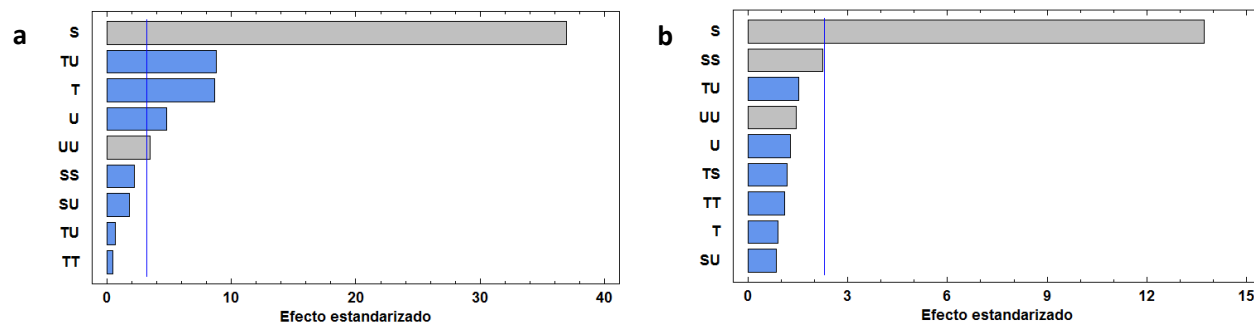


Figura 3.18. Gráficos de Pareto correspondientes a la respuesta pureza de CFT (a) y FT (b) de semillas de quinoa obtenido bajo diferentes condiciones de temperatura, solvente y potencia de ultrasonido.

III.2.2.5. Selección de las condiciones óptimas de extracción

El principal propósito de esta serie de experiencias fue optimizar los parámetros de mayor influencia en el proceso de extracción, con el fin de maximizar el contenido de compuestos fenólicos antioxidantes obtenidos a partir de semillas de quinoa. Para lograr este propósito se utilizó un análisis multirespuesta utilizando la función “deseabilidad” (también llamada conveniencia), disponible en los paquetes de *software* estadístico. Esta función es ampliamente utilizada en la optimización de procesos de múltiples respuesta en ciencia e ingeniería, cuyo valor oscila de cero a uno para cualquier respuesta dada. Un valor de uno representa el caso ideal de extracción, mientras que cero indica que una o más respuestas están fuera de los límites deseables (Radojković y col., 2012). Mediante la aplicación de dicha función, basada en las respuestas observadas y predichas de cada una de las variables estudiadas, se obtuvieron las siguientes condiciones óptimas de extracción: temperatura 60 °C, etanol al 80 % como solvente y sin aplicación de ultrasonido (Figura 3.19).

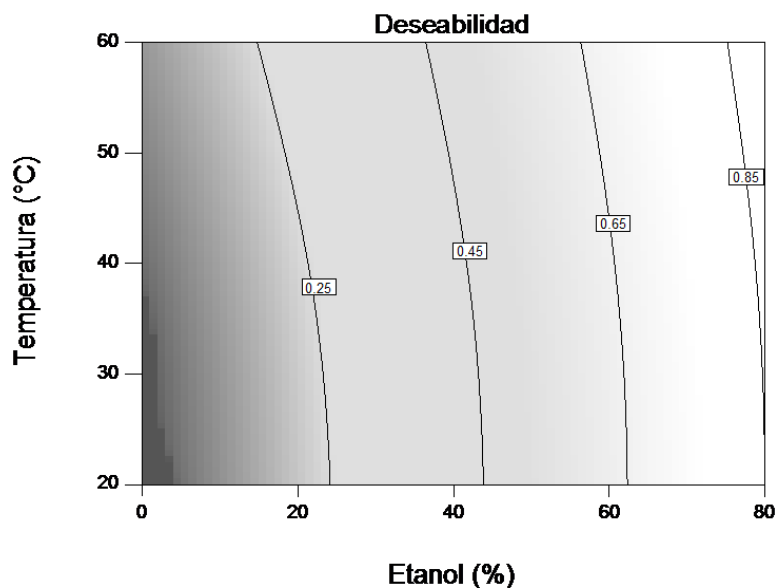


Figura 3.19. Gráfico de la función deseabilidad para las variables que más influyeron sobre el proceso de extracción.

Estas condiciones óptimas coincidieron con uno de los conjuntos de condiciones utilizados para construir el modelo (experiencia número 4, Tabla 3.2). Bajo tales condiciones, el valor de deseabilidad experimental fue 0,9016 y el predicho 0,9047, lo que significa que en las condiciones propuestas se alcanzaron valores muy cercanos a las condiciones ideales de extracción.

III.2.2.6. Análisis cromatográfico de los extractos

Con el propósito de confirmar los resultados obtenidos por métodos colorimétricos para determinar CFT y FT, se realizó un análisis mediante HPLC-DAD de los extractos resultantes del diseño experimental utilizado. Además, este análisis brindó información adicional sobre la composición de los extractos en sustancias fenólicas. El contenido de compuestos fenólicos totales se obtuvo mediante la suma de las concentraciones determinadas para los principales compuestos fenólicos identificados en las semillas de quinoa (detallado en el apartado I.3.4). El análisis por HPLC de los extractos obtenidos en las diversas condiciones detectó y confirmó la presencia de los

ácidos *p*-hidroxibenzoico, vanílico, *p*-cumárico y ferúlico y de los flavonoides quercetina y canferol (Tabla 3.2.). Estos resultados coinciden con lo descrito por otros autores para este mismo pseudocereal (Alvarez-Jubete y col., 2010; Repo-Carrasco y col., 2010; Hirose y col., 2010; Tang y col., 2015). Los ácidos fenólicos fueron detectados en diversas concentraciones en todos los extractos, mientras que la presencia de las agliconas de flavonoides sólo fue detectada en los extractos obtenidos con etanol al 80 %. Este análisis también reveló la presencia de otros compuestos que no fueron identificados y que podrían contribuir a la actividad antioxidante resultante de los extractos de semillas de quinoa, junto con los compuestos fenólicos ya mencionados. En la última columna de la Tabla 3.2 se muestran los valores correspondientes a la sumatoria de las concentraciones determinadas para los seis compuestos fenólicos mayoritarios, bajo cada condición de extracción utilizada. Se puede observar, que la mayor cantidad de compuestos fenólicos se obtuvo en la experiencia número 4, en la que se utilizaron las condiciones de extracción consideradas óptimas por el modelo.

III.2.2.7. Conclusiones

Como parte del presente trabajo de tesis, se optimizaron las condiciones experimentales del proceso de extracción de compuestos fenólicos antioxidantes a partir de semillas de quinoa. Los resultados obtenidos, a través del análisis de superficie de respuesta, permitieron determinar las mejores condiciones operacionales en cuanto a temperatura de extracción, contenido de etanol en el solvente y uso de ultrasonido, con el propósito de obtener extractos con máximos rendimientos y pureza en relación a CFT y FT, que además demostraran altos valores asociados de actividad antioxidante *in vitro*. Todas las respuestas variaron considerablemente, principalmente en función de la composición del solvente. En este sentido, se observó que el contenido de etanol en el solvente fue el parámetro de mayor influencia en el rendimiento de extracción, además de ser la variable que condiciona en mayor medida la selectividad del proceso de extracción,

permitiendo la obtención de extractos con alto grado de pureza relativa a CFT y FT. El aumento del contenido de etanol en el solvente, junto con un incremento de la temperatura mejoró los contenidos de CFT, FT y la AA de los extractos. Por su parte, bajo las condiciones estudiadas, la asistencia de ultrasonido no resultó conveniente para la extracción de compuestos fenólicos antioxidantes presentes en semillas de quinoa.

De esta manera, las condiciones óptimas de extracción resultaron: temperatura de extracción 60 °C, concentración de etanol en el solvente 80 %, relación sólido/solvente 1/20, tamaño de partícula < 0,5 mm, agitación a 120 rpm durante 60 min y sin asistencia de ultrasonido. Bajo estas condiciones experimentales se obtuvo un extracto rico en sustancias fenólicas, que mostró buena actividad antioxidante *in vitro*. Además, se presentó una correlación positiva entre dichas respuestas, poniendo de manifiesto que los CFT y, en particular, los FT contribuyen en el valor de AA resultante de los extractos.

En el presente trabajo, estas condiciones de extracción serán aplicadas en todas las extracciones de los ensayos subsiguientes. Sin embargo, este extracto rico en sustancias antioxidantes naturales, luego de una etapa posterior de concentración y purificación, podría aplicarse potencialmente como suplemento dietario, en la formulación de alimentos funcionales o simplemente como reemplazo de antioxidantes sintéticos.

III.3. Efecto de la germinación sobre las propiedades antioxidantes del grano de quinoa

III.3.1. Determinación de las condiciones de germinación

En un estudio, Jacobsen y col. (1999) demostraron que la humedad del grano y la temperatura representan las variables que mayor efecto tienen en el proceso de germinación de las semillas de quinoa. Los mismos autores, además comprobaron que la luz no tiene influencia sobre la tasa de germinación, ni sobre la cantidad de semillas germinadas en esta misma especie (Jacobsen y col., 1999). Respecto a la influencia que puede tener el pH del medio, Boero y col. (1998) evaluaron la germinación de siete variedades de quinoa en diferentes soluciones buffer en un rango de pH de 3 a 10, concluyendo que no existieron diferencias significativas en los índices germinativos respecto a un control de pH neutro. En vista de estos datos, se decidió llevar a cabo una serie de experiencias preliminares para determinar las condiciones óptimas de T y contenido de humedad para germinar las semillas de quinoa. Los resultados de dichas experiencias se muestran en la Tabla 3.7. En la misma se detallan la cantidad de semillas que germinaron diariamente, durante los cinco días que duró la experiencia, el total de semillas germinadas (%) y el índice de velocidad de germinación (Ivg), bajo cada una de las condiciones ensayadas de temperatura y tiempo de remojo, previo a la germinación.

En el conjunto de ensayos realizados, el total de semillas germinadas varió en promedio entre 56 y 99 % de acuerdo a las condiciones testeadas, valores que corresponden a niveles de germinabilidad “moderada” y “alta”, según la clasificación propuesta por Devesa y col. (1998). Por su parte, el Ivg varió entre 33,08 y 78, que corresponde a valores de velocidad de germinación “rápida” y “muy rápida”, según la clasificación propuesta por Cabello y col., (1998). Otros autores también han reportado una rápida velocidad de germinación de diferentes variedades de quinoa,

alcanzándose el 100 % de semillas germinadas, incluso en tiempos inferiores a las 24 h (Boero y col., 1998; Bois y col., 2006).

Tabla 3.7. Evolución de la germinabilidad (%) e Índice de velocidad de germinación (Ivg) de las semillas de quinoa para cada combinación de tiempo-temperatura estudiado.

T (°C)	Tiempo de remojo (h)	Días de germinación					Total semillas germinadas (%)	Ivg
		1	2	3	4	5		
10	0	28	19	20	8	3	78	46,77
	6	31	16	19	10	3	79	48,43
	12	20	15	7	9	5	56	33,08
20	0	58	38	3	0	0	99	78,00
	6	50	29	12	1	0	92	68,75
	12	43	33	8	3	0	87	62,92
30	0	48	27	9	0	0	84	64,50
	6	52	12	4	2	0	70	59,83
	12	46	7	6	1	0	60	51,75

Los resultados del análisis estadístico ANOVA (Tabla 3.8) mostraron que el parámetro más influyente sobre el porcentaje de germinación fue la temperatura en su término cuadrático, seguido del tiempo de remojo, mientras que la interacción de ambas variables no fue significativa. Por su parte, para el Ivg (Tabla 3.9) la principal variable que influyó fue la temperatura, tanto en su término cuadrático como lineal, seguido del tiempo de remojo con un impacto menor. De la misma manera, la interacción de ambas variables no fue significativa.

Utilizando la ecuación del modelo ajustado, se diseñaron los gráficos de superficie de respuesta, para determinar los niveles óptimos de los parámetros evaluados sobre ambas respuestas (Figura 3.20).

Tabla 3.8. Resultados del ANOVA correspondiente a la germinabilidad de las semillas de quinoa bajo diferentes condiciones de temperatura y tiempo de remojo.

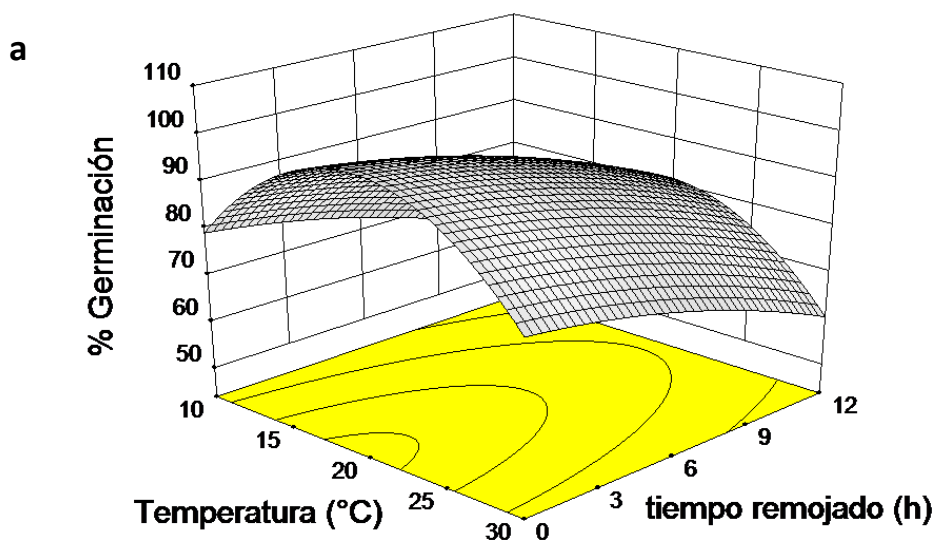
Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
tiempo remoj.	560,667	1	560,667	25,29	0,0151
Temp ²	924,5	1	924,5	41,71	0,0075
Falta de ajuste	74,3333	3	24,7778	1,12	0,4646
Error puro	66,5	3	22,1667		
Total (corr.)	1626,0	8			

Tabla 3.9. Resultados del ANOVA correspondiente a la velocidad de germinación de las semillas de quinoa bajo diferentes condiciones de temperatura y tiempo de remojo.

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Temp.	380,807	1	380,807	35,60	0,0019
tiempo remoj.	287,318	1	287,318	26,86	0,0035
Temp ²	734,467	1	734,467	68,66	0,0004
Error total	53,4849	5	10,697		
Total (corr.)	1456,08	8			

De los mismos se observó, que tanto la cantidad de semillas germinadas como la velocidad de germinación, dependieron principalmente de la temperatura de incubación. Ambas respuestas se

incrementaron con el aumento de la temperatura hasta alcanzar un nivel máximo (cercano a los 20 °C), a partir del cual dichos valores comenzaron a disminuir con el aumento de la temperatura hasta los 30 °C. Respecto del tiempo de remojo previo de las semillas, en ambos casos se observó que un aumento del mismo tuvo un efecto negativo significativo que produjo la disminución en los valores de ambas respuestas, aunque este efecto fue de menor impacto que la temperatura. En este sentido, cabe mencionar que la rapidez en la imbibición de agua por una semilla está determinada por procesos físicos de difusión, donde tienen importancia propiedades de la semilla como tamaño, permeabilidad de la cubierta, contenido de sustancias hidratables, etc. y que además, es importante controlar la tasa de imbibición inicial de agua. La rapidez en la entrada de agua viene controlada por la cubierta seminal, sin embargo, si ésta cubierta se rompe, se produce una imbibición excesivamente rápida de agua que daña irreversiblemente las membranas de las células, provocando la pérdida de sustancias celulares (Bradford, 1995). Debido al pequeño tamaño y permeabilidad de la cubierta de las semillas de quinoa, ésta puede ser la causa principal de la disminución de semillas germinadas en las experiencias donde se realizó un remojo de 6 o 12 h, en comparación con aquellas en las que no se realizó un remojo previo.



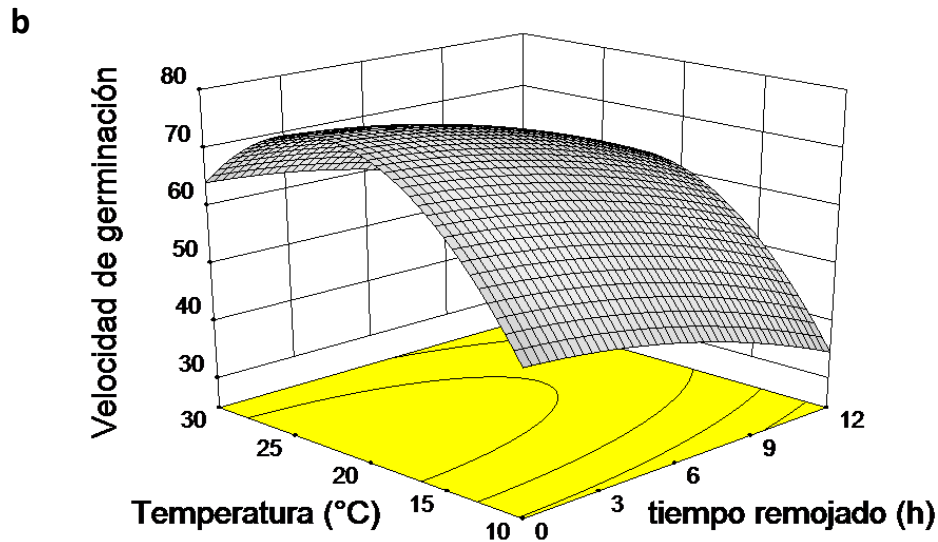


Figura 3.20. Gráficos de superficie de respuesta mostrando interacción entre la temperatura de germinación y el tiempo de remojo previo de las semillas sobre el porcentaje de germinación (a) y la velocidad de germinación (b).

La influencia de la temperatura sobre la germinabilidad final de los granos de quinoa fue evaluada por Jacobsen y col. (1999). En su trabajo, los autores evaluaron tres temperaturas diferentes (6, 10 y 20 °C), concluyendo que a 20 °C el promedio de semillas germinadas fue del 99%, mientras que a 10 °C este porcentaje se redujo a 85 %, con la influencia más drástica a 6 °C, en cuyo caso sólo germinaron el 25 % de las semillas. En otro estudio similar, Chilo y col. (2009) evaluaron el efecto combinado de la temperatura y la salinidad sobre la germinación de dos variedades de quinoa. Como resultado observaron también una disminución del poder germinativo y de la velocidad de germinación a medida que disminuyó la temperatura de 20 a 5 °C, con un incremento de la salinidad del sustrato. Según Mujica y col. (2001), la temperatura media adecuada para el desarrollo de la quinoa se encuentra en el rango de 15-20 °C, aunque se ha observado que con temperaturas medias de 10 °C y hasta 25 °C, el cultivo se desarrolla adecuadamente. Una observación que señala este autor se refiere a las estrategias que las distintas variedades de

quinoa han desarrollado en los ambientes andinos, resaltando los mecanismos de tolerancia a bajas temperaturas, ya que pueden soportar hasta $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ en determinadas etapas fenológicas (Mujica y col., 2001). Por lo tanto se podría suponer que temperaturas de germinación superiores a las consideradas como óptimas ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$) causarían estrés térmico en las semillas, produciendo como consecuencias daños en el germen y pérdida de viabilidad en las mismas.

La influencia de la temperatura sobre la velocidad en la germinación de diez cultivares de quinoa fue evaluada por Bois y col. (2006). Los autores encontraron que la velocidad en la germinación se incrementó con el aumento de temperatura de $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y en relación inversa con el tiempo. Por ejemplo, para lograr el 100 % de granos germinados de un cultivar en particular, se necesitaron 10 h a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ contra 65 h a $2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Por su parte, Jacobsen y col. (1999) también observaron que las semillas germinadas a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ iniciaron la germinación más rápido que aquellas incubadas a temperaturas inferiores y mencionaron que los tiempos necesarios para alcanzar el 50 % de semillas germinadas fueron 50, 94 y 98 h a temperaturas de 20, 10 y $6\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente. En este sentido, se podría decir que las bajas temperaturas retrasan los mecanismos bioquímicos y fisiológicos implicados en la etapa inicial de germinación (Chilo y col., 2009).

En efecto, de acuerdo a los resultados de los ensayos preliminares llevados a cabo en el presente estudio, las condiciones de germinación que permitieron obtener la mayor cantidad de brotes en el menor tiempo, incluyeron el uso de semillas sin remojar, o con un remojo no mayor a 3 h y una temperatura de germinación de $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Así lo demuestra la aplicación de la función “deseabilidad” del *software* estadístico utilizado, basándose en las respuestas observadas y predichas de cada una de las variables estudiadas (Figura 3.21). Las condiciones mencionadas alcanzan valores superiores a 0,95, lo que significa que bajo las condiciones propuestas se alcanzaron valores muy cercanos a las condiciones ideales de germinación.

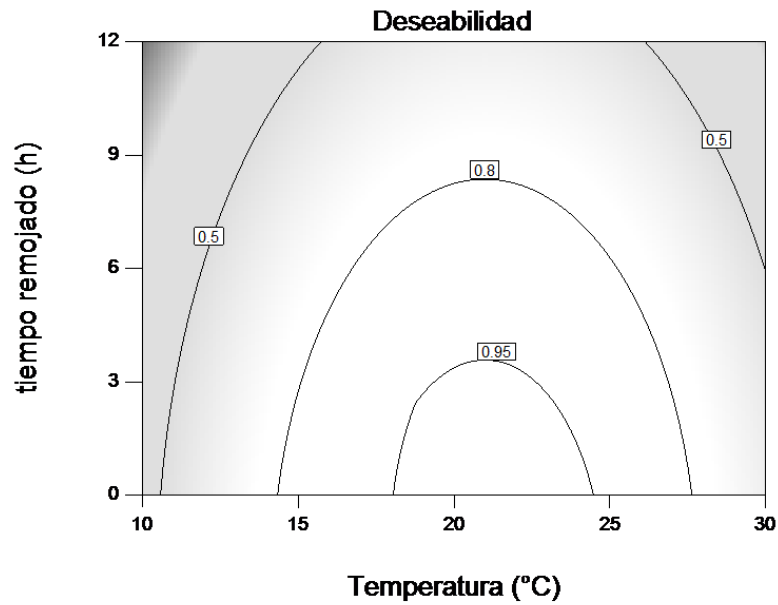


Figura 3.21. Gráfico de la función deseabilidad de las condiciones de germinación ensayadas.

Bajo estas condiciones óptimas, se obtuvo experimentalmente el mayor porcentaje de semillas germinadas (99 %) y el mayor índice de velocidad de germinación (78), que coinciden con la del ensayo realizado a 20 °C y sin remojo previo de las semillas (Tabla 3.7). Además, en estas condiciones, se observó que al segundo día de germinación se obtuvo el 96 % de semillas germinadas y en el recuento del tercer día, dichos brotes habían perdido los restos de las cubiertas seminales y cotiledones, indicando el fin del proceso de germinación (Figura 3.22). Por lo tanto, se definió como tiempo de germinación óptimo el periodo de tres días.

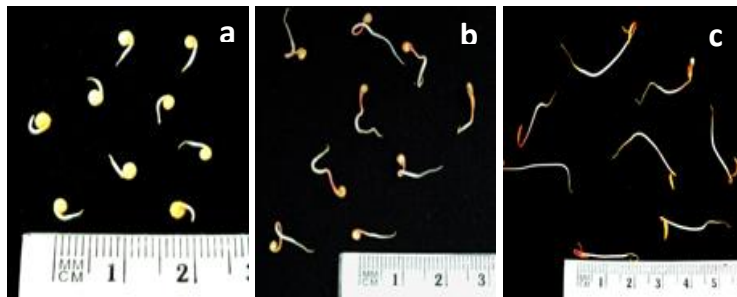


Figura 3.22. Brotes de semillas de quinoa incubados por 24 h (a), 48 h (b) y 72 h (c).

III.3.2. Efecto de la germinación sobre la composición centesimal de la quinoa

En la Tabla 3.10 se presentan los valores de composición centesimal de las semillas de quinoa sin germinar y los correspondientes a cada uno de los estadios de germinación, evaluados en el presente estudio. Como es de esperar, el cambio más notorio que provoca la germinación de la semilla es el aumento del contenido de humedad (que se traduce en una disminución de materia seca), a causa de la absorción de agua por parte del grano durante el proceso. Además, puede observarse que dicho contenido no presentó diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los estadios de germinación evaluados. Por otro lado, no se detectaron cambios significativos en los niveles de fibra dietaria, cenizas y carbohidratos entre las muestras analizadas durante la germinación de las semillas. Respecto al contenido de proteínas, se observó un incremento significativo en los brotes correspondientes a las 72 h de germinación en relación a semillas sin germinar. Este incremento ha sido explicado teniendo en cuenta que el consumo de carbohidratos durante los procesos respiratorios, eleva el porcentaje composicional de los otros componentes (Traore y col., 2004). Sin embargo vale aclarar que el contenido proteico se estimó sobre nitrógeno total y según ciertos autores que también han observado incrementos en el contenido proteico luego de germinar semillas, tanto la síntesis de enzimas como de sustancias nitrogenadas no proteicas (como ácidos nucleicos) pueden contribuir a dicho incremento observado, ya que todos estos compuestos son determinados por el método de Kjeldahl (Moongngarm y Saetung, 2010).

Por otro lado, se registró una disminución paulatina del contenido de lípidos a medida que progresó el proceso germinativo, alcanzando a las 72 h una disminución significativa ($p < 0,05$) aproximada del 24 % al valor obtenido para las semillas de quinoa sin germinar. Este hecho ha sido atribuido a que durante la germinación, los lípidos pueden ser hidrolizados por enzimas lipolíticas

y utilizados para la síntesis de carbohidratos y/o proteínas, o también como fuente de energía necesaria para los cambios bioquímicos que ocurren en la semilla (Obizoba y Atti, 1994; Moongngarm y Saetung, 2010).

Tabla 3.10. Composición centesimal de las semillas de quinoa sin germinar y germinadas durante 24, 48 y 72 h.

	Quinoa sin germinar (% b.s.)	Quinoa germinada (% b.s.)		
		24 h	48 h	72 h
Materia seca	89,85 ± 1,80 ^b	56,56 ± 0,34 ^a	55,08 ± 0,78 ^a	53,02 ± 0,63 ^a
Proteínas	14,70 ± 0,30 ^{a,b}	15,48 ± 0,28 ^{a,b}	14,26 ± 0,16 ^a	15,94 ± 0,22 ^b
Grasas totales	5,92 ± 0,38 ^a	5,03 ± 0,31 ^a	4,89 ± 0,46 ^{a,b}	4,52 ± 0,53 ^b
Fibra dietaria total	14,94 ± 1,12 ^a	15,38 ± 1,36 ^a	15,10 ± 0,95 ^a	14,14 ± 1,10 ^a
Cenizas	3,36 ± 0,07 ^a	3,40 ± 0,18 ^a	3,18 ± 0,09 ^a	3,22 ± 0,11 ^a
Carbohidratos*	61,08 ± 1,27 ^a	60,71 ± 1,41 ^a	62,57 ± 1,32 ^a	62,18 ± 1,85 ^a

Valores expresados como promedio ± D.E. (n=3), en base seca. Los valores dentro de una misma fila con diferente letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

*Calculados por diferencia.

III.3.3. Efecto de la germinación sobre el contenido de compuestos fenólicos de la quinoa

Los contenidos de compuestos fenólicos totales (CFT) y de flavonoides totales (FT) de las semillas de quinoa sin germinar (control) y en cada uno de los estadios de germinación se presentan en la Tabla 3.11. El valor de CFT determinado en semillas sin germinar ($39,3 \pm 0,9$ mg EAG/100 g b.s.) resultó dentro del rango de los valores publicados por otros autores para este mismo pseudocereal (Gorinstein y col., 2007; Alvarez-Jubete y col., 2010; Miranda y col., 2010), que fue de 25,0 a 71,7 mg EAG/100 g (b.s). Vale destacar, que los contenidos de CFT en la semilla de

quinoa dependen, en gran parte, de la variedad analizada. Así, Vollmannová y col. (2013) evaluaron cinco variedades de quinoa en cuanto al contenido de CFT, encontrando diferencias significativas entre dichas variedades, con valores comprendidos entre 45,9 y 183,9 mg EAG/100g (b.s). Por otro lado, Repo-Carrasco-Valencia (2011) informó los niveles de CFT en cuatro variedades de quinoa, los cuales oscilaron entre 142 y 197 mg EAG/100g. Además, Tang y col. (2015) compararon los contenidos de CFT de tres variedades de quinoa de diferente color superficial del grano, hallando valores comprendidos entre 200 y 518 mg EAG/100g, siendo la variedad blanca la que exhibió la menor cantidad, seguida de la roja y finalmente de la variedad negra. Otro estudio, informó un contenido de 375 mg EAG/100g para este pseudocereal (Pasko y col., 2009).

Respecto del contenido de flavonoides totales (FT), determinados por métodos espectrofotométricos, Gorinstein y col. (2007) informaron un contenido de 38,6 mg equivalentes de catequina/100 g b.s., mientras que Tang y col., (2015) hallaron valores entre 50 y 175 mg equivalentes de catequina/100 g. En todos los casos, estos valores resultaron superiores comparados a los obtenidos en el presente estudio (11,06 mg quercetina/100 g b.s.), aunque debe considerarse la diferencia en las unidades equivalentes utilizadas para expresar los resultados en cada caso.

El proceso de germinación produjo incrementos progresivos significativos en los valores de CFT y de FT en las semillas de quinoa. Al final de la germinación (72 h), se observaron aumentos del 101,2 % y 59,6 % en los contenidos de CFT y FT, en relación a semillas sin germinar, respectivamente. Alvarez-Jubete y col. (2010) observaron que brotes de quinoa germinados por 82 h incrementaron el doble el contenido de CFT respecto de un control de semillas sin germinar, resultado que también fue obtenido en el presente estudio. Contrariamente, Pasko y col. (2009) observaron un leve descenso en el nivel de CFT en brotes de quinoa germinados por 4 días,

respecto de un control sin germinar, no observándose diferencias significativas en dicho valor durante los 7 días que se estudió el proceso. Además, estos mismos autores informaron que no se produjeron diferencias entre los contenidos de CFT de brotes obtenidos en presencia de luz y bajo total oscuridad.

Tabla 3.11. Contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) y flavonoides totales (FT) en semillas de quinoa sin germinar y germinadas.

Muestra	CFT (mg EAG/100g)	FT (mg EQ/100g)
Control (0 h)	39,29 ± 0,92 ^a	11,06 ± 0,42 ^a
Estadío 1 (24 h)	47,04 ± 1,31 ^b	12,58 ± 0,25 ^a
Estadío 2 (48 h)	61,68 ± 1,02 ^c	15,68 ± 0,22 ^b
Estadío 3 (72 h)	79,04 ± 1,18 ^d	17,65 ± 0,45 ^b

Los valores (promedio ± D.E.) dentro de una columna con diferente letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Los valores de CFT y FT obtenidos por métodos espectrofotométricos se contrastaron con los calculados luego de la aplicación de HPLC-DAD en los extractos obtenidos. La Figura 3.23 ilustra el perfil cromatográfico obtenido en un extracto de semillas germinadas durante 72 h, como así también el correspondiente al extracto de semillas sin germinar. Para su estudio, los compuestos fenólicos identificados se agruparon en compuestos flavonoides (quercetina y canferol) y ácidos fenólicos, diferenciando dentro de este último grupo, los derivados de ácido benzoico (*p*-hidroxibenzoico, vanillico y gálico) y los derivados del ácido cinámico (ferúlico, *p*-cumárico y cafeico).

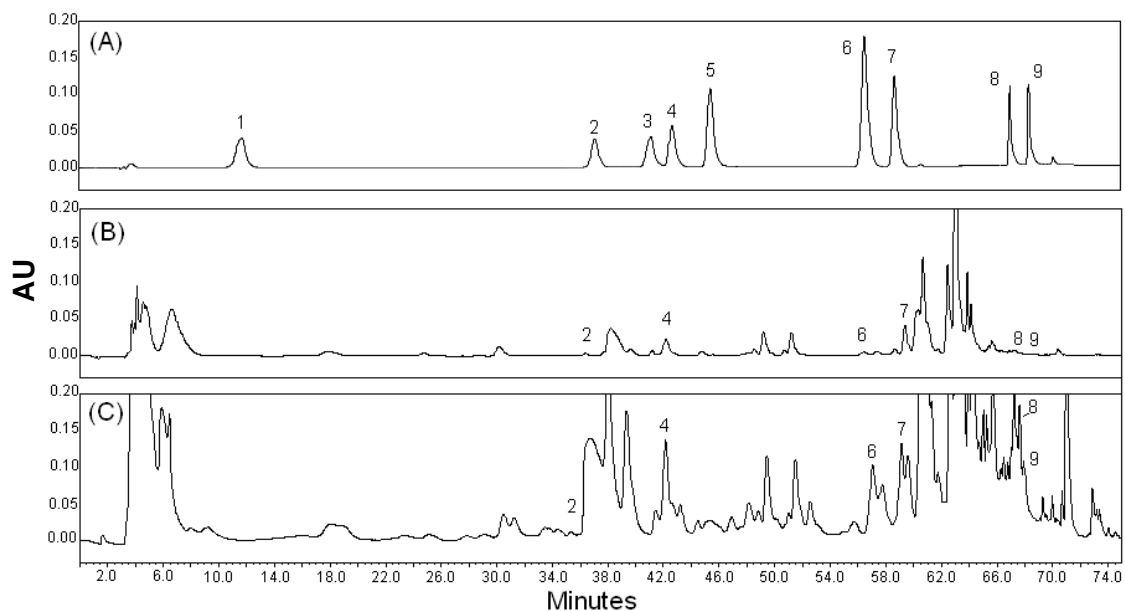


Figura 3.23. Cromatogramas representativos de la separación de estándares de ácidos fenólicos y flavonoides a 280 nm (A), de un extracto etanólico de semillas de quinoa sin germinar (B) y de un extracto etanólico de semillas germinadas durante 3 días (C). Identificación de picos: 1: ác. gálico; 2: ác. *p*-hidroxibenzoico; 3: ác. clorogénico; 4: ác. vanillico, 5: ác. cafeico; 6: ác. *p*-cumárico; 7: ác. ferúlico; 8: quercetina; 9: canferol.

De los resultados puede observarse que la germinación produjo cambios en los niveles de quercetina y canferol, y también en la de los ácidos *p*-hidroxibenzoico, vanillico, *p*-cumárico y ferúlico. Los contenidos de los compuestos fenólicos identificados en semilla de quinoa sin germinar y durante el proceso de germinación, se presentan en la Tabla 3.12. En el estadio final de la germinación (72 h), se observó un aumento de 8,57 veces en el contenido de ácidos fenólicos, donde los ácidos vanillico y ferúlico contribuyeron en un 51,2 % y 21,6 %, al contenido total de los CFT, respectivamente. Resultados de Alvarez-Jubete y col. (2010) confirmaron que el ácido vanillico fue el ácido fenólico más abundante identificado en brotes de quinoa germinados durante 82 h. Por su parte, dentro del grupo de los derivados del ácido cinámico, el más abundante resultó ser el ácido ferúlico, seguido del ácido *p*-cumárico. Cabe destacar, el significativo aumento registrado en el contenido de ácido *p*-cumárico durante el período de

germinación, con un valor en el último estadio, 21 veces mayor que el correspondiente a semillas sin germinar.

Tabla 3.12. Contenidos de ácidos fenólicos y flavonoides (mg/100g b.s.) identificados en semillas de quinoa sin germinar y en los diferentes estadios de germinación.

Compuesto	Control (0 h)	Estadio 1 (24 h)	Estadio 2 (48 h)	Estadio 3 (72 h)
Ac. gálico	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ac. <i>p</i> -OH-benzoico	0,22±0,02 ^a	0,32±0,08 ^a	0,46±0,12 ^a	0,94±0,04 ^b
Ac. vanillico	0,88±0,11 ^a	2,58±0,03 ^b	5,51±0,12 ^c	8,54±0,09 ^d
<i>Total ác. Hidroxibenzoicos</i>	<i>1,09±0,07^a (51%)</i>	<i>2,91±0,05^b (59%)</i>	<i>5,97±0,12^c (58%)</i>	<i>9,48±0,06^d (57%)</i>
Ac. clorogénico	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ac. cafeico	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ac. <i>p</i> -cumárico	0,09±0,05 ^a	0,27±0,03 ^b	0,87±0,03 ^c	1,96±0,02 ^d
Ac. ferulico	0,57±0,09 ^a	1,23±0,10 ^b	2,66±0,07 ^c	3,61±0,08 ^d
<i>Total ác. Hidroxicinámicos</i>	<i>0,66±0,09^a (31%)</i>	<i>1,50±0,07^b (30%)</i>	<i>3,53±0,05^c (34%)</i>	<i>5,56±0,05^d (33%)</i>
Total ácidos fenólicos	1,75±0,06^a	4,40±0,07^b	9,50±0,09^c	15,0±0,06^d
Quercetina	0,23±0,02 ^a	0,33±0,13 ^a	0,61±0,15 ^a	1,36±0,06 ^b
Canferol	0,15±0,04 ^a	0,19±0,05 ^a	0,17±0,04 ^a	0,27±0,05 ^a
Total flavonoides	0,37±0,03^a (18%)	0,52±0,09^a (11%)	0,78±0,10^a (8%)	1,63±0,06^b (10%)
Total compuestos fenólicos	2,13±0,06^a (100%)	4,93±0,07^b (100%)	10,3±0,09^c (100%)	16,7±0,06^d (100%)

Los valores (promedio ± D.E.) dentro de misma fila con diferente letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$). n.d = no detectado.

Otros autores también han observado aumentos de los niveles de ácidos hidroxicinámicos durante la germinación en pseudocereales (Pasko y col., 2009; Repo- Carrasco y col., 2010). Este resultado

puede atribuirse al hecho que los ácidos hidroxicinámicos son constituyentes de la pared celular vegetal, encontrándose principalmente esterificados a las cadenas laterales de arabinosa de arabinoxilanos y lignina (Ishii, 1997), los cuales pueden liberarse mediante la acción de esterasas endógenas, que se activan durante la germinación (Maillard y col., 1996).

Por otra parte, el análisis mediante HPLC, permitió registrar en el último estadio de germinación, un aumento de 4,4 veces en el contenido de flavonoides, respecto al valor inicial, siendo la quercetina el compuesto que resultó más abundante ($1,36 \pm 0,06$ mg/100 g b.s.). En un estudio previo, también se observó un moderado aumento en los contenidos de glucósidos de quercetina y canferol en semillas de quinoa, luego de ser germinadas (Alvarez-Jubete y col., 2010).

El análisis de la Tabla 3.12, tomando en cuenta los grupos de compuestos fenólicos presentes en los extractos correspondientes al ensayo control y a cada estadio de germinación, permite observar que en general, la composición porcentual de cada grupo de compuestos fenólicos permaneció constante en todas las muestras analizadas. En particular, el grupo de los ácidos hidroxibenzoicos contribuyó con el mayor porcentaje al total de compuestos fenólicos identificados en todas las muestras, con valores de 51 % para el control y una media de 58 ± 1 % para los extractos de semillas germinadas. Por su parte, el grupo de los ácidos hidroxicinámicos contribuyó con valores comprendidos entre 30 % y 34 % al total de compuestos fenólicos determinados. Finalmente, los compuestos flavonoides identificados, constituyeron el grupo que contribuyó en menor medida al total de sustancias fenólicas determinadas, con porcentajes variando entre 8 % y 18 %.

De esta manera, los contenidos de CFT determinados mediante métodos espectrofotométricos, resultaron confirmados por los obtenidos utilizando HPLC, pudiéndose reafirmar que se produjo un incremento de los niveles de CFT a medida que progresó el proceso de germinación de semillas

de quinoa. En relación a este resultado, varios autores han mencionado incrementos en los CFT luego de germinar diversos tipos de semillas. Por ejemplo, Tian y col. (2010) germinaron semillas de avena durante seis días, registrando incrementos del 110 % y 355 % a las 72h y 144 h, respectivamente. Otro estudio logró confirmar un incremento del 148 % en el contenido de CFT luego de germinar semillas de lupino (*Lupinus angustifolius*) durante nueve días (Fernandez-Orozco y col., 2006). También, en el caso del garbanzo, se registró un aumento de 156 % en este parámetro luego de tres días de germinación (Fernandez-Orozco y col., 2009). Por otro lado, algunos estudios han obtenido resultados contrarios en este sentido, al comprobar que la germinación de ciertas especies produce disminución en el contenido de CFT. Por ejemplo, Sharma y Gujral (2010) observaron disminuciones significativas de este valor en ocho cultivares de cebada, respecto de sus controles sin germinar. Por su parte, Sinha y Kawatra (2003) observaron un descenso progresivo del contenido de CFT en semillas de caupí (*Vigna unguiculata*) a medida que progresó el proceso de germinación hasta alcanzar las 72 h. Para explicar estos resultados, se han propuesto diversas posibles causas. Así, en el caso de semillas que se remojan previo a la germinación, los compuestos fenólicos podrían ser removidos por movilización de los mismos desde el episperma o tegumento al líquido de remojo por lixiviación, hipótesis que se ve sustentada dado que la mayoría de los polifenoles se encuentran en estas capas externas que recubren a las semillas (Sinha y Kawatra, 2003). Otros autores han mencionado que la disminución registrada en los niveles de CFT luego de la germinación de ciertas especies, podría atribuirse a diversos motivos, incluyendo un incremento de la actividad de enzimas como la polifenol oxidasa o enzimas hidrolíticas (Kumar y col., 1978), la formación de complejos insolubles entre compuestos fenólicos y proteínas, que dificultarían su extracción (Beta y col., 1999) y la metabolización de compuestos fenólicos para formar otros compuestos (Dicko y col., 2005).

Por otro lado, el incremento en el contenido de CFT luego de germinar semillas ha sido atribuido a la liberación de compuestos fenólicos que se encontraban ligados antes de la germinación, gracias a la acción de enzimas hidrolíticas que son activadas durante el proceso (Maillard y col., 1996; Dueñas y col., 2009). Esta hipótesis ha sido comprobada para el caso de ciertas carbohidrasas que liberan las agliconas correspondientes, a partir de glicósidos de compuestos fenólicos en especies vegetales como el arroz y la soja (Tian y col., 2004; Ribeiro y col., 2006). Otra explicación que se ha esgrimido es la síntesis *de novo* de ciertos compuestos fenólicos durante la germinación, como se ha informado para los ácidos hidroxicinámicos en el caso de diferentes especies de porotos (*Phaseolus vulgaris* L.) (Díaz-Batalla y col., 2006).

III.3.4. Efecto del proceso de germinación sobre la actividad antioxidante

Una práctica aceptada para evaluar la actividad antioxidante neta en muestras de alimentos, es utilizar al menos dos métodos que evalúen diferentes mecanismos de acción antioxidante (Moon y Shibamoto, 2009). Siguiendo este criterio, la evaluación de la actividad antioxidante en el presente estudio se llevó a cabo utilizando una combinación de ensayos, que incluyó un método basado en el secuestro de radicales libres y un método basado en la peroxidación lipídica. En particular, el ensayo basado en el secuestro de radicales libres monitoreó la capacidad de los compuestos fenólicos para inhibir el radical DPPH en un medio hidrofílico, mientras que el método de la decoloración del β -caroteno monitoreó las etapas principales de peroxidación lipídica en un medio hidrofóbico. Los valores de actividad antioxidante de semillas de quinoa germinadas evaluados mediante estos dos métodos, se muestran en la Tabla 3.13. Se puede observar que el proceso de germinación incrementó significativamente la actividad antioxidante evaluada mediante ambos métodos, en comparación con los valores correspondientes registrados para el control de semillas sin germinar ($p < 0,05$). En particular, la actividad antioxidante evaluada por el método de

decoloración del β -caroteno, registró un incremento de 10,4 % en el poder de inhibición de la oxidación del β -caroteno en el tercer estadio de germinación (72 h), respecto al control. Además, no se registraron diferencias significativas en este valor entre los diferentes estadios de germinación evaluados. El nivel del incremento de actividad antioxidante registrada por esta metodología, resulta justificable teniendo en cuenta el bajo contenido lipídico de las semillas de quinoa (6,3 % en promedio), que hace que la contribución de antioxidantes lipofílicos a la actividad antioxidante total sea relativamente baja. Además, dada la polaridad del solvente de extracción utilizado, es esperable que se disuelvan y extraigan preferentemente los antioxidantes hidrofílicos presentes en la matriz, los que han demostrado exhibir bajas respuestas en sistemas lipofílicos (Lage y col., 2013).

Tabla 3.13. Valores de actividad antioxidante obtenidos mediante los métodos DPPH y de decoloración del β -caroteno correspondientes a semillas de quinoa sin germinar y germinadas por distintos tiempos.

Muestra	Inhibición radical DPPH (%)	TEAC DPPH (μmol Trolox/100g)	Inhibición oxidación de β-caroteno (%)
Control (0 h)	13,61 \pm 1,10 ^a	259,1 \pm 20,9 ^a	71,40 \pm 1,34 ^a
Estadio 1 (24 h)	16,59 \pm 0,78 ^a	323,8 \pm 15,2 ^a	77,06 \pm 0,89 ^b
Estadio 2 (48 h)	22,46 \pm 0,67 ^b	451,5 \pm 13,5 ^b	78,33 \pm 1,24 ^b
Estadio 3 (72 h)	27,39 \pm 0,61 ^c	558,6 \pm 12,4 ^c	78,86 \pm 0,96 ^b

Los valores (promedio \pm D.E.) dentro de una columna con diferente letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Sin embargo, se debe considerar que este ensayo puede proporcionar información complementaria útil en el estudio de extractos naturales que contienen componentes con diferentes grados de polaridad. Gorinstein y col., (2007) utilizaron el método de decoloración del

β -caroteno para evaluar el potencial antioxidante de algunos cereales y pseudocereales. Los extractos obtenidos a partir de semillas de quinoa con metanol 50 %, exhibieron una inhibición de decoloración del β -caroteno de $34,0 \% \pm 3,1$, siendo este valor inferior al obtenido en el presente estudio ($71,40 \% \pm 1,34$). La causa probable de esta diferencia en la polaridad del solvente de extracción utilizado en cada caso. Adicionalmente, los citados autores observaron que la actividad antioxidante de la quinoa, evaluada mediante este método, resultó significativamente superior a la de tres cultivares de amaranto (*Amaranthus spp.*) (26,0 %) y arroz (21,2 %), aunque resultó inferior en comparación a la del trigo sarraceno (75,6 %) y soja (35,8 %).

Por otro lado, la actividad antioxidante medida por el método de inhibición del radical DPPH presentó niveles con diferencias significativas entre los distintos estadios de germinación evaluados, con un valor final en el último estadio de germinación (72 h) que duplicó el correspondiente al control. El aumento de la actividad antioxidante durante la germinación de semillas de quinoa, ya ha sido descrito por Pasko y col. (2008), quienes observaron el máximo incremento en el nivel de dicha actividad en el sexto día de germinación, manteniéndose ese valor sin diferencias significativas hasta el séptimo día. En otro estudio, Alvarez-Jubete y col. (2010) no observaron diferencias significativas en la capacidad antioxidante, evaluada mediante el método del DPPH, entre semillas y brotes de quinoa obtenidos luego de 82 horas de germinación. El valor de actividad antioxidante hallado en el citado estudio fue de $230 \mu\text{mol}$ equivalentes Trolox (ET)/100g, para semillas de quinoa sin germinar, valor que resultó comparable al obtenido en el presente trabajo ($259,1 \pm 20,9 \mu\text{mol}$ ET/100g). Además, otros autores han informado resultados similares, o incluso superiores, al cuantificar la actividad antioxidante por medio del método DPPH en este pseudocereal. Así, Vollmannová y col. (2013) compararon la actividad antioxidante de cinco ecotipos de quinoa, registrando un amplio rango de valores comprendidos entre 260 y 1240 μmol ET/100g, de acuerdo a la variedad analizada. Por su parte, Dini y col. (2010) obtuvieron

valores de 287 y 671 $\mu\text{mol ET}/100\text{g}$ para una variedad de quinoa dulce y otra amarga, respectivamente. Finalmente, Chlopicka y col. (2012) registraron un valor de actividad antioxidante de 622 $\mu\text{mol ET}/100\text{g}$, utilizando el mismo método.

III.3.5. Efecto de la germinación sobre el contenido de ácido ascórbico

El efecto de la germinación sobre el contenido de ácido ascórbico en semillas de quinoa, se presenta en la Tabla 3.14 y en la Figura 3.24. Puede observarse que la germinación produjo un incremento progresivo en el contenido de ácido ascórbico durante los diferentes estadios de germinación, hasta alcanzar un nivel de casi 16 veces mayor al contenido inicial, a las 72 h del proceso. Datos relacionados encontrados en la bibliografía para semillas de quinoa sin procesar, muestra valores de ácido ascórbico en un rango de 4 mg/100g (Koziol, 1992) a 23,06 mg/100g (Miranda y col., 2012). Otros autores registraron valores intermedios, por ejemplo, Ruales y Nair (1993) indicaron un valor de 16,4 mg/100g, mientras que Dini y col. (2010) registraron valores de 12,0 y 13,0 mg/100g para especies de quinoa provenientes de Perú y Ecuador, respectivamente. Estos valores resultan superiores a los encontrados en las semillas de quinoa en el presente trabajo, aunque cabe destacar que todos los autores mencionados utilizaron métodos colorimétricos para realizar las determinaciones de ácido ascórbico, los cuales sobreestiman el valor presente en las semillas con respecto al método cromatográfico. Por otro lado, Koziol, (1992) sugirió que los valores de ácido ascórbico cuantificados por este tipo de métodos deben ser interpretados con cautela, ya que por un lado, esta vitamina es muy susceptible a la oxidación y por otro lado, se debe tener en cuenta que cuando se someten las semillas de quinoa a procesos de lavado y/o pulido para eliminar las saponinas, puede eliminarse también parte del ácido ascórbico, resultando valores de concentraciones de vitamina C no fidedignos. También se ha informado que las diferencias en los contenidos de vitamina C pueden deberse a la variación

genotípica de las plantas y a las condiciones climáticas bajo las que se desarrollaron. Además, durante la postcosecha, las condiciones de almacenamiento de las semillas, condicionarán el contenido de vitamina C, una vez que las pérdidas de la misma aumentan con el tiempo de almacenamiento, siendo aún mayores bajo condiciones de altas temperaturas y baja humedad relativa. Otros factores responsables de las variaciones en el contenido de ácido ascórbico de semillas, incluyen daños físicos o daño por frío (Lee y Kader, 2000; Dumas y col., 2003; Xu y col., 2008)

Tabla 3.14. Contenido de ácido ascórbico en semillas de quinoa sin germinar y germinadas por 24, 48 y 72 h.

Muestra	Ac. Ascórbico (mg/100g bs)
Control (0 h)	0,38 ± 0,17 ^a
Estadío 1 (24 h)	1,90 ± 0,11 ^b
Estadío 2 (48 h)	4,12 ± 0,31 ^c
Estadío 3 (72 h)	6,06 ± 0,33 ^d

Los valores (promedio ± D.E.) dentro de una columna con diferente letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$)

En contraste con las determinaciones colorimétricas, Lintschinger y col. (1997) determinaron ácido ascórbico en semillas de quinoa mediante HPLC, encontrando valores inferiores a 0,5 mg/100g en semillas sin germinar, valor similar al observado en el presente estudio. En ese mismo trabajo, los autores encontraron un incremento en el contenido de ácido ascórbico luego de germinar las semillas por tres días, indicando que la biosíntesis de vitamina C es un proceso metabólico específico durante la germinación. El nivel de ácido ascórbico informado, correspondiente a brotes de tres días fue de $7,0 \pm 0,7$ mg/100g, valor cercano al obtenido en este estudio ($6,06 \pm 0,33$ mg/100g). Adicionalmente, estos valores resultaron similares a los determinados para semillas de

trigo ($7,9 \pm 0,5$ mg/100g) e inferiores a los correspondientes a semillas de trigo sarraceno ($23,6 \pm 2,3$ mg/100g) (Lintschinger y col., 1997). Por otro lado, el nivel de vitamina C en garbanzo sin procesar resultó indetectable, mientras que luego de germinar las semillas durante 2 y 3 días, se alcanzaron valores de 3,7 y 11,7 mg/100g, respectivamente (Fernández-Orozco y col., 2009). Se ha propuesto que esta biosíntesis de ác. ascórbico durante la germinación de semillas estaría directamente involucrada en la modulación del crecimiento de la planta, incluyendo la primera etapa de germinación del embrión (Tommasi y col., 2001), en la que este compuesto protegería otras sustancias del daño oxidativo, pudiéndose regenerar por reducción, gracias a la acción sinérgica que ejercerían otras moléculas antioxidantes como tocoferoles, glutatión y carotenos (Carr y Frei, 2002).

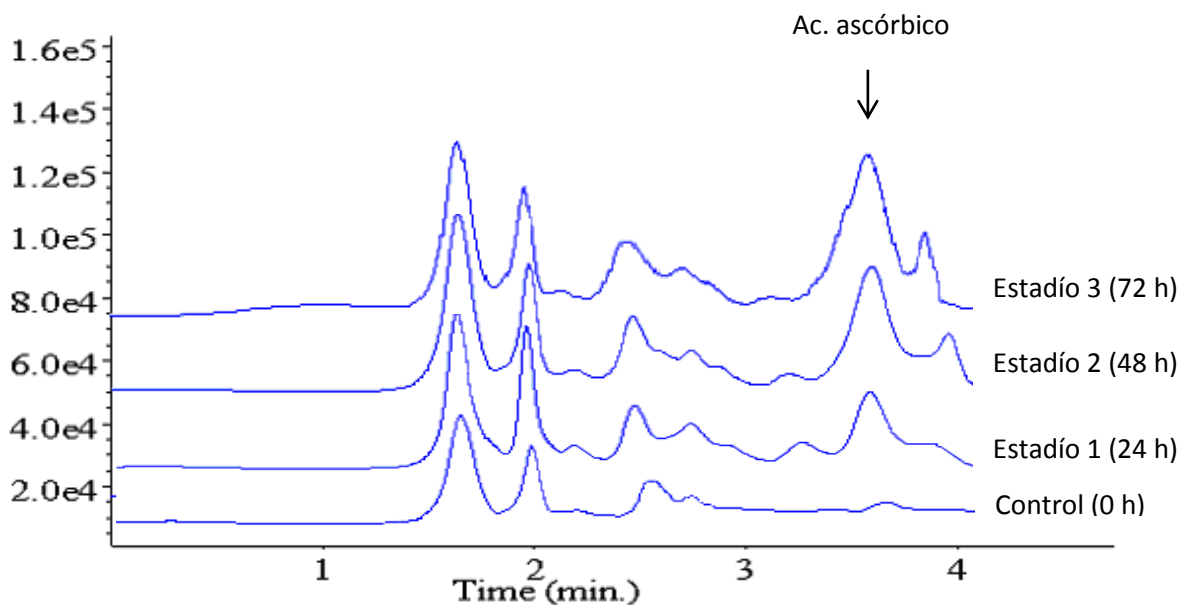


Figura 3.24. Cromatogramas representativos obtenidos para la cuantificación de ácido ascórbico de extractos de semillas de quinoa sin germinar y germinadas por 24, 48 y 72 horas.

III.3.6. Efecto de la germinación sobre el contenido de tocoferoles

La Tabla 3.15 presenta los contenidos y la composición de tocoferoles correspondientes a semillas de quinoa sin germinar y a cada uno de los estadios de germinación evaluados. Así mismo, la Figura 3.25 representa gráficamente dichos parámetros. Para todas las muestras analizadas, la concentración de tocoferoles totales varió en un rango de 6,85 a 10,47 mg/100g, donde el α -tocoferol y el γ -tocoferol fueron los isómeros más abundantes. En semillas sin germinar, el γ -tocoferol resultó el componente principal (aprox. 56%), seguido por el α -tocoferol (aprox. 39 %), mientras que en el caso de las muestras correspondientes a semillas germinadas el α -tocoferol fue, en todos los casos, el isómero más abundante.

Por otro lado, se observó que el proceso de germinación causó un incremento progresivo en el contenido de α -tocoferol, en relación al valor inicial sin germinar, del 27%, 64% y 134% luego de 1, 2 y 3 días de germinación, respectivamente, mientras que el contenido de γ -tocoferol decreció 29% y 38% luego del primer y segundo día, respectivamente. En la Tabla 3.15 se puede observar también que durante el progreso de la germinación, el incremento de α -tocoferol fue acompañado de un aumento paralelo en la actividad de vitamina E (ver punto II.5.6), la que resultó en el tercer día de germinación con un valor 114% mayor que el correspondiente al control.

Los contenidos de α -, β -, γ - y δ -tocoferol obtenidos en este trabajo para semillas de quinoa sin germinar, resultaron comparables a los valores publicados por Ruales y Nair (1993): 2,6; 0,2; 5,3 y 0,3, respectivamente. De acuerdo a la bibliografía disponible consultada, sólo se cuenta con datos de contenido de tocoferoles en quinoa referidos a concentraciones de α -tocoferol, ya que es la forma biológica más activa de la vitamina E. Así, algunos autores encontraron valores de α -tocoferol en quinoa inferiores al observado en este trabajo, mencionando niveles de 0,59 mg/100g (Coulter y Lorenz, 1990) y 2,1 mg/100g (Ryan y col., 2007). Por otro lado, Miranda y col. (2011) informaron concentraciones de α -tocoferol entre 2,44 y 4,64 mg/100g para seis ecotipos

diferentes de quinoa. Por su parte, en otro trabajo, Koziol (1992) encontró un valor de 5,37 mg/100g, mientras que el máximo nivel informado en la bibliografía fue de 72,14 mg/100g para el citado compuesto (Repo-Carrasco y col., 2003).

Tabla 3.15. Contenido, composición de tocoferoles y actividad de vitamina E en semillas de quinoa sin germinar y germinadas por 24, 48 y 72 h.

	Tocoferoles (mg/ 100g b.s.)				Total	Actividad vitamina E (α -TE/100g)
	α -tocoferol	β -tocoferol	γ -tocoferol	δ -tocoferol		
Control (0 h)	2,83 \pm 0,10 ^a	0,09 \pm 0,02 ^a	4,06 \pm 0,01 ^d	0,31 \pm 0,01 ^a	7,29 \pm 0,12 ^{a,b}	3,29 \pm 0,11 ^a
Estadío 1 (24 h)	3,60 \pm 0,20 ^b	0,10 \pm 0,01 ^{a,b}	2,89 \pm 0,02 ^b	0,26 \pm 0,01 ^a	6,85 \pm 0,24 ^a	3,95 \pm 0,21 ^b
Estadío 2 (48 h)	4,64 \pm 0,06 ^c	0,13 \pm 0,02 ^{a,b}	2,51 \pm 0,06 ^a	0,34 \pm 0,11 ^a	7,62 \pm 0,07 ^b	4,96 \pm 0,08 ^c
Estadío 3 (72 h)	6,63 \pm 0,14 ^d	0,17 \pm 0,04 ^b	3,24 \pm 0,32 ^c	0,43 \pm 0,08 ^a	10,47 \pm 0,49 ^c	7,05 \pm 0,20 ^d

Los valores (promedio \pm D.E.) dentro de una columna con diferente letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$)

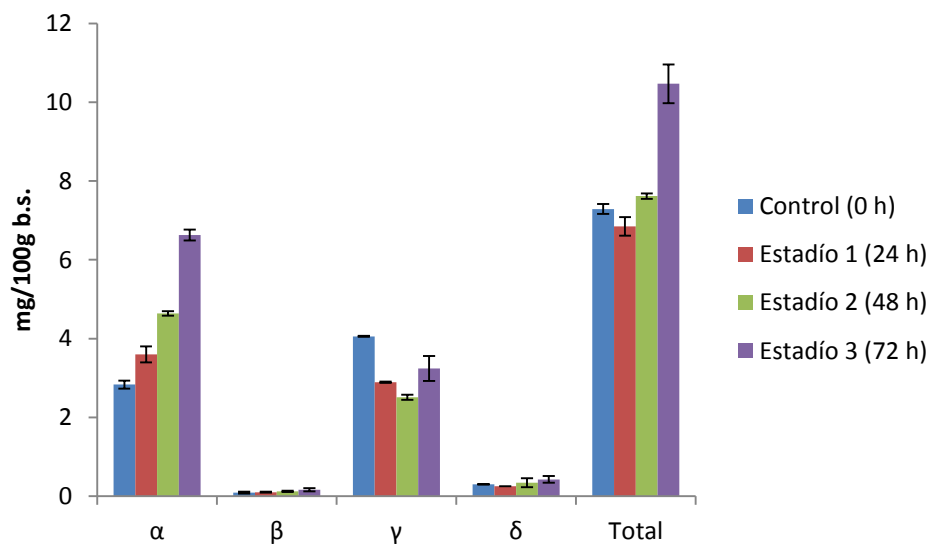


Figura 3.25. Composición de tocoferoles de semillas de quinoa sin germinar y germinadas 24, 48 y 72 horas.

Varios autores han destacado el alto contenido natural de α -tocoferol en semillas de quinoa (Abugoch-James, 2009; Ryan y col., 2007; Repo-Carrasco y col., 2003), el que resulta superior al normalmente encontrado en otros granos como trigo sarraceno (0,1 mg/100g), cebada (1,5 mg/100g) y maíz (0,2 mg/100g) (Ryan y col., 2007). Un contenido elevado de este antioxidante natural en la quinoa, garantiza una alta protección de los ácidos grasos de las membranas celulares contra el daño oxidativo causado por radicales libres (Repo-Carrasco y col., 2003). Desde otro punto de vista, este antioxidante puede conferir estabilidad química de los lípidos en alimentos derivados de la quinoa, tales como aceite o harina, prolongando la vida útil de estos productos. Así lo demuestra el trabajo realizado por Ng y col. (2007), en el que los autores encontraron que los lípidos de la harina de quinoa fueron estables durante 30 días, debido a la protección otorgada por la vitamina E contra la oxidación lipídica.

En la bibliografía consultada, no se encontró información sobre el efecto de la germinación en el contenido de tocoferoles de semillas de quinoa, por lo que no se contó con datos publicados para ser comparados con los resultados obtenidos en el presente estudio. Sin embargo, estudios con distintas especies de semillas llevados a cabo por diversos autores, han demostrado que la germinación conduce a un aumento de la concentración de tocoferoles. Por ejemplo, Fernández-Orozco y col. (2009) hallaron un incremento en el contenido de α -tocoferol de 0,98 a 1,41 mg/100g (44%) y disminuciones respectivas del 65 % y 37 % en los niveles de los isómeros γ y δ , en el caso de semillas de garbanzo germinadas durante 3 días. En otro estudio, los mismos autores observaron un rápido aumento de α -tocoferol, de 0,30 a 8,60 mg/100g en semillas de lupino germinadas durante 6 días (Fernández-Orozco y col., 2006). Estos resultados, correspondientes a semillas de leguminosas, resultaron inferiores a los obtenidos para semillas germinadas de quinoa. Sin embargo, al comparar otros tipos de semillas con este pseudocereal, los incrementos de tocoferoles como consecuencia de la germinación, resultan menores. Tal es el caso de semillas de

sésamo, para las que Hahm y col. (2009) hallaron que el contenido de α -tocoferol resultó no detectable en el caso de semillas sin germinar, para luego incrementarse continuamente hasta alcanzar un valor de 32 mg/100g en el cuarto día de germinación; por su parte el γ -tocoferol redujo su concentración de 31 a 12 mg/100g durante el mismo período de germinación, resultando una concentración final de tocoferoles de 43 mg/100g.

III.3.7. Análisis multivariado de los resultados del tratamiento de germinación aplicado a semillas de quinoa

Con la intención de evaluar la contribución de los diferentes compuestos analizados sobre la actividad antioxidante neta durante el proceso de germinación de semillas de quinoa, el conjunto de resultados obtenidos en la serie de experiencias previas fue sometido a un análisis de componentes principales. En la Figura 3.26 se presentan los dos primeros componentes, que explican el 99,6 % de la varianza total. En estos nuevos ejes se ubican las variables estudiadas (indicadas con círculos amarillos) y cada ensayo de germinación (indicado con rombos azules), de tal manera que sea posible realizar interpretaciones sobre las relaciones conjuntas entre observaciones y variables. Las variables son graficadas como vectores desde el origen, donde los ángulos formados entre los distintos vectores pueden ser interpretados en términos de las correlaciones entre variables. Ángulos de 90° entre dos variables indican que ambas variables no se encuentran correlacionadas y valores inferiores o superiores implican correlación (positiva o negativa, respectivamente). Es decir, un ángulo cercano a cero implica que ambas variables están fuertemente correlacionadas en forma positiva y un ángulo cercano al ángulo llano indica una fuerte correlación negativa entre las mismas.

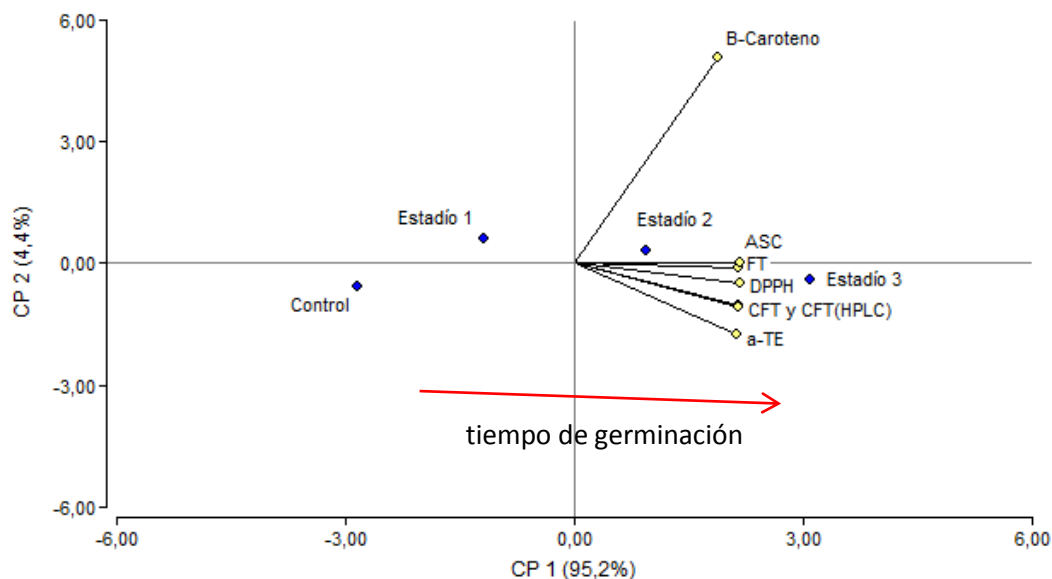


Figura 3.26. Análisis de componentes principales correspondiente a ensayos de germinación de semillas de quinoa. Se indican las posiciones de las muestras en los nuevos ejes (puntos azules) y los vectores que representan las variables originales (puntos amarillos).

De esta manera, el componente 1 explicó el 95,2 % de los datos originales, donde se pudo observar que todas las variables analizadas guardaron relación con la actividad antioxidante medida como la inhibición de radicales DPPH e inhibición de la decoloración del β -caroteno, ya que todas variables tienen valores de peso similares sobre este componente. El componente 2 puede explicar la contribución relativa de cada tipo de compuesto analizado sobre un mecanismo particular de actividad antioxidante, aunque se debe considerar que este componente solo explica un 4,4 % de los datos originales. Bajo esta consideración se podría decir que los compuestos fenólicos totales (CFT, determinados colorimétricamente y por HPLC), flavonoides totales (FT), ácido ascórbico (ASC) y tocoferoles (expresados como equivalentes de α -toc) contribuyen en mayor medida a la inhibición de radicales DPPH por sobre la inhibición de la oxidación del β -caroteno. Por otro lado, observando la ubicación de los ensayos sobre los ejes se puede deducir que a medida que progresó la germinación de las semillas (flecha roja) se produjo un

desplazamiento hacia valores positivos sobre el componente 1, indicando que los estadíos de germinación 2 y especialmente el estadío 3 se asocian en mayor medida con las variables estudiadas.

III.3.8. Conclusiones

Los resultados obtenidos en esta tercera parte del capítulo han permitido en primera instancia determinar las condiciones experimentales óptimas de germinación de semillas de quinoa, bajo las cuales se obtuvo la mayor cantidad de brotes en el menor tiempo. El posterior análisis composicional de los brotes obtenidos en los diferentes estadíos de germinación mostró un incremento en el contenido de proteínas en los brotes del estadío más avanzado, mientras que el resto de los parámetros (grasas, fibra, cenizas y carbohidratos) no mostraron diferencias significativas en sus contenidos entre los diferentes estadíos de germinación.

Respecto al efecto del proceso sobre la actividad antioxidante y el nivel de compuestos que contribuyen a la misma, durante el desarrollo de los brotes se observaron incrementos progresivos significativos en los contenidos de compuestos fenólicos, ácido ascórbico y α -tocoferol, que se correspondieron con un incremento de la actividad antioxidante evaluada mediante diferentes métodos. De esta manera el proceso de germinación y posterior secado de los brotes se presentó como un método sencillo y efectivo para mejorar el contenido de compuestos antioxidantes y la capacidad antioxidante de semillas de quinoa, con el fin de obtener un producto que podría aplicarse en la formulación de potenciales alimentos funcionales.

III.4. Proceso térmico

Como se mencionó en el apartado II.6, la aplicación del tratamiento térmico se realizó en dos series de experiencias. Por un lado, se evaluó el efecto del proceso sobre el nivel de compuestos antioxidantes y actividad antioxidante de semillas de quinoa y por otro lado sobre la harina obtenida a partir de brotes germinados durante tres días, combinando de esta manera dos de los procesos aplicados.

III.4.1. Procesado térmico de semillas de quinoa

Esta serie de experiencias se realizó de acuerdo al diseño experimental mencionado en el apartado II.6.1, en el que las semillas de quinoa se sometieron a temperaturas entre 100 °C y 190 °C por períodos de tiempo que alcanzaron hasta 120 min. A modo representativo, la Figura 3.27 permite apreciar la apariencia de las semillas luego de ser sometidas a diferentes temperaturas durante 30 min y su diferencia con semillas sin tratar (control).

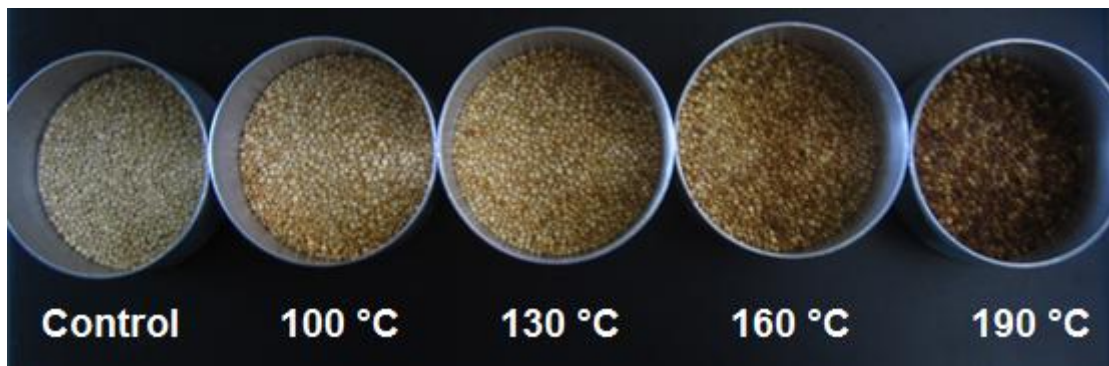


Figura 3.27. Apariencia de semillas de quinoa sin tratar térmicamente y tratadas durante 30 min a distintas temperaturas.

III.4.1.1. Efecto del tratamiento térmico sobre el contenido de compuestos fenólicos

Los contenidos de compuestos fenólicos totales (CFT) obtenidos para las distintas combinaciones tiempo/temperatura utilizadas en el tratamiento térmico aplicado a semillas de quinoa se muestran en la Tabla 3.16 y se grafican en la Figura 3.28. El tratamiento térmico incrementó significativamente el contenido de CFT para todas las temperaturas ensayadas respecto del control de semillas sin procesar ($p < 0,05$), excepto para el tratamiento 100°C/15min, donde dicho incremento no fue estadísticamente significativo respecto del mismo control. De esta manera, los incrementos obtenidos oscilaron en el rango de 18 % a 60 %, mientras que el máximo valor de CFT se obtuvo luego de aplicar el tratamiento térmico a 190°C durante 30min.

Tabla 3.16. Contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) expresados en mg EAG/100g, luego de la aplicación de tratamiento térmico bajo diferentes condiciones de tiempo/temperatura a semillas de quinoa.

Temp (°C)	Tiempo de tostado (min)					
	0	15	30	60	90	120
100	40,15 ± 1,08 a	47,40 ± 1,72 a,b	50,60 ± 1,30 b	51,81 ± 2,12 b	50,96 ± 0,95 b	50,64 ± 2,47 b
130	40,15 ± 1,08 a	52,50 ± 2,61 b	55,73 ± 1,95 b	58,95 ± 2,37 b	56,76 ± 2,82 b	55,02 ± 1,66 b
160	40,15 ± 1,08 a	52,37 ± 1,14 b	56,82 ± 2,25 b	58,29 ± 1,59 b	57,25 ± 2,12 b	56,58 ± 2,17 b
190	40,15 ± 1,08 a	57,03 ± 2,46 b	64,46 ± 1,89 b	63,93 ± 1,41 b	62,62 ± 1,49 b	64,33 ± 2,35 b

Los valores (promedio ± D.E.) dentro de misma fila con diferente letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

En la Figura 3.28 puede observarse que los mínimos y máximos incrementos en el contenido de CFT resultaron para las muestras tratadas a 100°C y 190°C, respectivamente, mientras que en el caso de muestras sometidas a 130°C y 160°C, se obtuvieron valores comprendidos entre dichos mínimos y máximos, para todos los tiempos ensayados.

Cabe destacar, que al aplicar el test de Tuckey para observar diferencias entre las medias de las temperaturas a un tiempo determinado, se observó que a los 15 min del proceso no se verificaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las temperaturas ensayadas. A partir de los 30 min de proceso, se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los ensayos realizados a 100°C y 190°C, mientras que los ensayos realizados a 130°C y 160°C, no fueron significativamente diferentes entre ellos ni con aquellos llevados a cabo a las otras temperaturas seleccionadas para los ensayos.

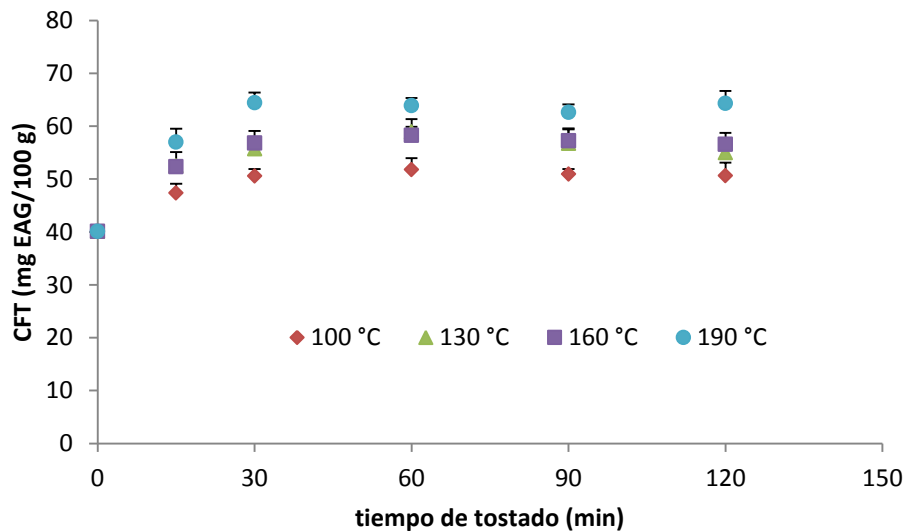


Figura 3.28. Contenido de CFT luego de la aplicación de tratamiento térmico bajo diferentes condiciones de tiempo/temperatura a semillas de quinoa.

Respecto del efecto del procesado térmico sobre los flavonoides totales (FT), los contenidos resultantes luego de la aplicación del mismo bajo las diferentes combinaciones tiempo/temperatura se muestran en la Tabla 3.17 y se grafican en la Figura 3.29. En este caso se observó que los contenidos de FT tienden a aumentar a medida que se incrementa la temperatura de tostado, para todos los tiempos ensayados, aunque respecto al control, sólo fueron estadísticamente significativos los ensayos realizados a 160°C y 190°C para todos los tiempos. El

máximo valor de FT se obtuvo luego del tratamiento llevado a cabo a 190°C por 60min, en cuyo caso el incremento en dicho valor fue de 167 % respecto del control.

Tabla 3.17. Contenido de flavonoides totales (FT), expresados en mg EQ/100g, luego de la aplicación de tratamiento térmico bajo diferentes condiciones de tiempo/temperatura a semillas de quinoa.

Temp (°C)	Tiempo de tostado (min)					
	0	15	30	60	90	120
100	11,21 ± 0,34 a	10,83 ± 0,98 a	12,65 ± 1,16 a	12,42 ± 1,38 a	14,66 ± 0,91 a	14,83 ± 1,73 a
130	11,21 ± 0,34 a	15,77 ± 1,66 a	16,52 ± 1,21 a	18,74 ± 1,33 a	19,62 ± 2,08 a	18,26 ± 1,73 a
160	11,21 ± 0,34 a	21,08 ± 0,39 b	22,74 ± 1,51 b	22,41 ± 0,85 b	24,84 ± 1,38 b	23,26 ± 1,42 b
190	11,21 ± 0,34 a	23,15 ± 1,32 b	27,51 ± 1,15 b,c	28,67 ± 0,99 b,c	29,96 ± 1,27 c	29,33 ± 1,61 b,c

Los valores (promedio ± D.E.) dentro de misma fila con diferente letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Estos resultados permiten afirmar que los contenidos de CFT y FT en semillas de quinoa (determinados por métodos colorimétricos) tienden a aumentar a medida que se incrementa la temperatura del tratamiento térmico (dentro de los rangos experimentales definidos). Este comportamiento resulta comparable al descrito por otros autores. Por ejemplo, Jeong y col., (2004) observaron un incremento en el contenido de CFT del 145% respecto de un control en el caso de semillas de sésamo sometidas a tostado de 200°C durante 60 min. En otro estudio, en el que se utilizaron semillas de cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen), se observaron incrementos de 95 %, 114 % y 145 % en el contenido de CFT luego del tostado de las semillas durante 20 min a 130°C, 160°C y 190°C, respectivamente (Tacora y col., 2010). También, se observaron incrementos en el contenido de CFT al utilizar temperaturas inferiores; por ejemplo, un tostado a 125°C durante 30 min, incrementó alrededor del 100% los niveles de CFT en semillas de cebada (Gallegos-Infante y col., 2010).

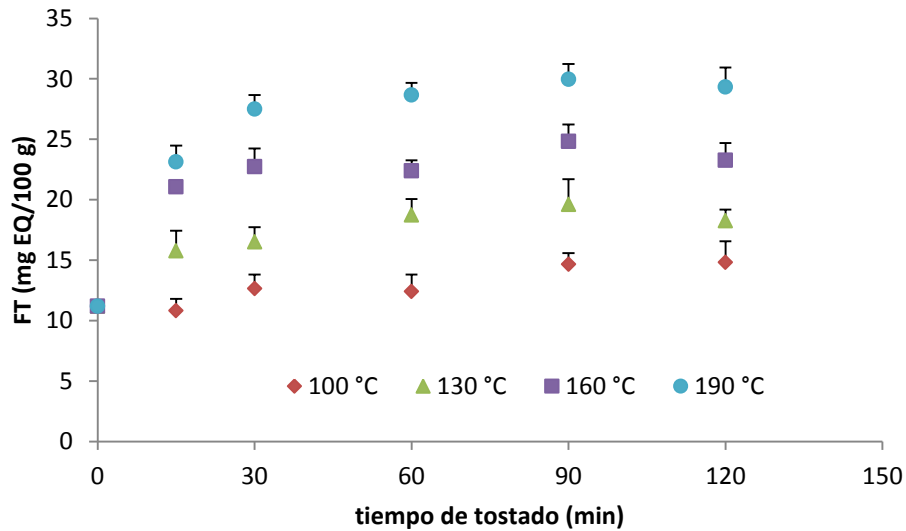


Figura 3.29. Contenido de FT luego de la aplicación de tratamiento térmico bajo diferentes condiciones de tiempo/temperatura a semillas de quinoa.

En contraste, otros autores han observado disminuciones en los niveles de compuestos fenólicos luego de aplicar un proceso térmico en semillas. Tal es el caso de habas (*Vicia fava* L.) tostadas a 150°C durante un lapso de 120 min, para las que se observaron descensos paulatinos en los contenidos de CFT y FT de alrededor del 20% a los 10 min de proceso y de 40-50 % a los 120 min (Siah y col., 2014). En otro estudio, se aplicó un proceso térmico sobre cuatro variedades de leguminosas, observándose un aumento de los niveles correspondientes a CFT y FT en tres variedades de poroto, mientras que se observó el efecto contrario en el caso de semillas de soja (Boateng y col., 2008). Por lo expuesto, es evidente que la naturaleza del cambio que se produce en los contenidos de compuestos fenólicos como respuesta al tratamiento térmico es dependiente de la especie y variedad del grano utilizado, ya que en cada caso se presenta naturalmente un perfil característico propio de compuestos fenólicos (Siah y col., 2014). Estas modificaciones también dependerán del método elegido para extraer los compuestos fenólicos, así como de la temperatura/duración del proceso, dado que bajo determinadas condiciones, el procesado

térmico podría degradar algunos compuestos fenólicos particularmente susceptibles (Boateng y col., 2008; Siddhuraju, 2006; Randhir y col., 2008; Nithiyantham y col., 2012).

Los resultados obtenidos para los contenidos de CFT y FT, luego de aplicar diferentes temperaturas de tostado a semillas de quinoa, se confirmaron mediante análisis cromatográfico. Se compararon los perfiles de compuestos fenólicos de los extractos obtenidos de las muestras de quinoa tostadas durante 30 min a 100°C, 145°C y 190°C. Se seleccionó un tiempo de 30 min en base a los resultados del análisis estadístico, ya que a partir de dicho tiempo se observaron diferencias significativas en los valores obtenidos a las temperaturas ensayadas y además, a cada temperatura dichos valores permanecieron sin diferencias significativas para tiempos superiores de proceso.

De esta manera, durante el tostado de las semillas de quinoa se observaron diferentes perfiles de compuestos fenólicos. La Figura 3.30 ilustra estos perfiles mediante los cromatogramas obtenidos a 280 nm a partir de un extracto de semillas sin procesar (A) y de semillas tostadas durante 30 min a 100°C (B), 145°C (C) y 190°C (D), respectivamente. En las diferentes muestras de quinoa, se cuantificaron diferentes concentraciones de quercetina y canferol, además de los ácidos *p*-hidroxibenzoico, vanillico, *p*-cumárico y ferúlico. Sin embargo no se detectó la presencia de los ácido gálico y cafeico, indicados dentro de los principales compuestos fenólicos encontrados en semillas de quinoa (Repo-Carrasco y col., 2010). Los incrementos más significativos se pudieron observar para el ácido vanillico, el cual incrementa su contenido a medida que aumenta la temperatura de tostado. Por su parte, los compuestos representantes de los ácidos hidroxicinámicos (ácidos *p*-cumárico y ferúlico) experimentaron un marcado incremento en sus contenidos luego del tratamiento realizado a 145°C, produciéndose un descenso drástico de los mismos a mayor temperatura. Respecto a los flavonoides, no se observaron grandes variaciones

en sus niveles hasta el tratamiento de tostado a 145°C, registrando un marcado incremento para ambos compuestos a una mayor temperatura de proceso (190°C).

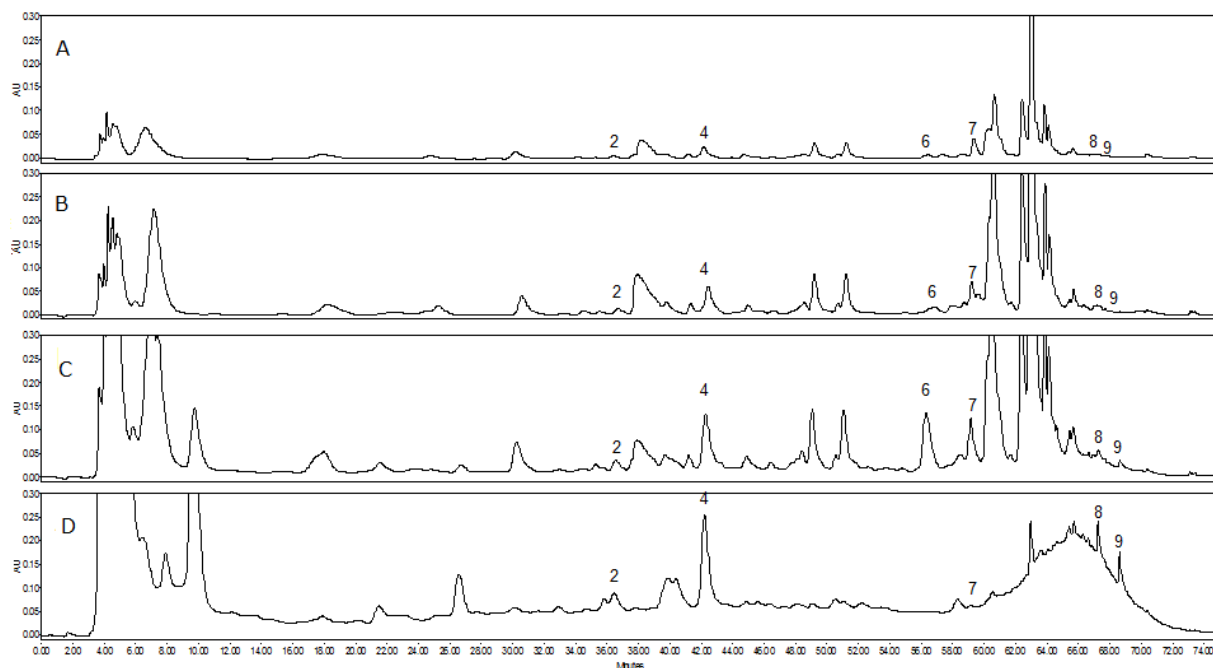


Figura 3.30. Cromatogramas representativos de extractos etanólicos de semillas de quinoa sin procesar (A) y tostadas durante 30 min a: 100°C (B), 145°C (C) y 190°C (D). Identificación de picos: 2: ác. *p*-hidroxibenzoico; 4: ác. vanillico, 6: ác. *p*-cumárico; 7: ác. ferúlico; 8: quercetina; 9: canferol.

El contenido total de cada compuesto fenólico identificado durante el procesado térmico se muestra en la Tabla 3.18. Como se mencionó anteriormente, cada grupo de compuestos fenólicos presentó diferentes comportamientos según la temperatura de proceso. Para los compuestos flavonoides, el análisis mediante HPLC mostró un aumento sostenido significativo en los niveles de quercetina y canferol a medida que se aumentó la temperatura de proceso, alcanzando un valor final 10 veces mayor en relación al contenido inicial a la máxima temperatura ensayada (190 °C).

Tabla 3.18. Contenidos totales (mg/100g b.s.) de los ácidos fenólicos y flavonoides identificados en semillas de quinoa sin procesar y tostadas a 100°C, 145°C y 190°C durante 30 min.

Compuesto	Control (0 min)	100°C (30 min)	145°C (30 min)	190°C (30 min)
Ac. gálico	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ac. <i>p</i> -OH-benzoico	0,22±0,02 ^a	0,79±0,02 ^b	1,42±0,02 ^c	3,31±0,06 ^d
Ac. vanillico	0,88±0,11 ^a	3,66±0,04 ^b	6,70±0,07 ^c	11,35±0,02 ^d
<i>Total ác. Hidroxibenzoicos</i>	<i>1,09±0,07^a (51%)</i>	<i>4,45±0,03^b (70%)</i>	<i>8,12±0,05^c (51%)</i>	<i>14,67±0,04^d (76%)</i>
Ac. clorogénico	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ac. cafeico	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ac. <i>p</i> -cumárico	0,09±0,05 ^a	0,18±0,01 ^a	2,33±0,04 ^b	0,03±0,01 ^a
Ac. ferúlico	0,57±0,09 ^a	0,54±0,02 ^a	2,78±0,01 ^b	0,61±0,01 ^a
<i>Total ác. Hidroxicinámicos</i>	<i>0,66±0,09^a (31%)</i>	<i>0,71±0,02^a (11%)</i>	<i>5,10±0,03^b (32%)</i>	<i>0,64±0,01^a (3%)</i>
Total ácidos fenólicos	1,75±0,06^a	5,16±0,03^b	13,23±0,04^c	15,31±0,03^d
Quercetina	0,23±0,02 ^a	1,02±0,45 ^{a,b}	1,95±0,18 ^b	1,98±0,01 ^b
Canferol	0,15±0,04 ^a	0,16±0,01 ^a	0,79±0,02 ^b	2,00±0,01 ^c
Total flavonoides	0,37±0,03^a (18%)	1,19±0,23^b (19%)	2,74±0,10^c (17%)	3,98±0,01^d (21%)
Total compuestos fenólicos	2,13±0,06^a (100%)	6,35±0,13^b (100%)	15,96±0,07^c (100%)	19,28±0,02^d (100%)

Los valores (promedio ± D.E.) dentro de misma fila con diferente letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$). n.d = no detectado.

Por su parte, los ácidos hidroxibenzoicos (*p*-hidroxibenzoico y vanillico) mostraron incrementos estadísticamente significativos para cada temperatura ensayada, obteniéndose máximos incrementos, al igual que para flavonoides, a los 190°C. Cabe destacar, que en todos los casos, el contenido de ácido vanílico fue siempre superior al de ácido *p*-hidroxibenzoico, manteniéndose una relación aproximada de 4:1 entre ambos compuestos en los distintos ensayos. En relación a los ácidos hidroxicinámicos ferúlico y *p*-cumárico, se registraron los máximos incrementos en los contenidos de ambos ácidos cuando las semillas fueron sometidas a 145 °C durante 30 min, en

cuyo caso se alcanzaron valores 5 y 25 veces mayores con respecto al control, respectivamente. Sin embargo, la aplicación de una mayor temperatura de tostado (190 °C), condujo a un drástico descenso en los niveles de ambos ácidos. Así, el contenido de ácido ferúlico resultó reducido en un 78 % respecto del control, mientras que el ácido *p*-cumárico se tornó indetectable bajo estas condiciones. Estos resultados indicaron mayor estabilidad térmica de los ácidos hidroxibenzoicos en relación a los ácidos hidroxicinámicos, la que parece estar relacionada con la distancia del grupo carboxilo al anillo aromático en cada caso. De esta manera, los ácidos hidroxicinámicos, al presentar el grupo carboxílico más alejado del anillo aromático, resultan descarboxilados más fácilmente que los hidroxibenzoicos (Khuwijitjaru y col., 2014). Lindquist y Yang (2011) indicaron además, que la estabilidad térmica de los compuestos fenólicos depende del tipo y número de grupos sustituyentes en el anillo aromático (amino, hidroxilo, metoxilo), los cuales actúan como grupos activadores que ayudan a la descarboxilación térmica de los compuestos fenólicos. Como consecuencia, un compuesto fenólico es más susceptible a la degradación térmica cuanto mayor es el número de sustituyentes hidroxilo y menor el de sustituyentes metoxilo (Liazid y col., 2007; Khuwijitjaru y col., 2014). Este hecho queda de manifiesto al observar, por ejemplo, la descomposición más rápida del ácido gálico (que contiene tres sustituyentes hidroxilo) en comparación con la del ácido protocatéquico (dos sustituyentes OH) o *p*-hidroxibenzoico (un sustituyente OH) cuando se sometieron a 150 °C durante 30-120 min en soluciones acuosas bajo condiciones subcríticas (Khuwijitjaru y col., 2014). Por otro lado, los grupos sustituyentes metoxilo no afectarían el mecanismo de descarboxilación de los ácidos fenólicos, ya que tanto el ácido vanílico como el ácido *p*-hidroxibenzoico resultaron estables a una temperatura de 175 °C (Liazid y col., 2007). Sin embargo, la presencia del grupo hidroxilo en el ácido vanílico redujo su estabilidad a la misma temperatura un 18,5 % en comparación con el ácido verátrico (ácido 3,4-dimetoxibenzoico (Liazid y col., 2007).

Investigaciones tempranas en granos de cereales señalaron que una gran proporción de compuestos fenólicos se encuentra en forma ligada a diferentes constituyentes celulares, pudiendo estas formas conjugadas resultar solubles o insolubles en los solventes de extracción (Sosulski y col., 1982). Posteriormente, algunos estudios confirmaron incrementos de los contenidos de determinados compuestos fenólicos luego de someter semillas a procesos térmicos. Los autores explicaron que, bajo determinadas condiciones, el procesamiento térmico podría escindir estas formas conjugadas y liberar parte de los ácidos fenólicos ligados, haciéndolos accesibles a la extracción (Dewanto y col., 2002; Zielinski y col., 2006). Por ejemplo, Craff y col. (2010) observaron marcados incrementos en el contenido de ácido *p*-cumárico luego de tostar maní a 150 °C durante 15 min. Los autores adujeron que el tratamiento térmico provocó la liberación de agliconas de este ácido fenólico a partir de algunos derivados del mismo (gliconas), cuyos niveles de hallaron efectivamente disminuidos a lo largo de la aplicación del proceso. Por su lado, Galvez Ranilla y col. (2009) relacionaron los incrementos registrados en el contenido de CFT (especialmente de los ácidos ferulico y *p*-cumárico) luego de tostar porotos con la reducción de los derivados/conjugados de los ácidos hidroxicinámicos que se produjo paralelamente durante el proceso. Resultados similares fueron obtenidos por Rakic y col. (2007), quienes indicaron que el tratamiento térmico de bellotas de roble (*Quercus spp.*) a 200 °C durante 10 min degradó los taninos hidrolizables, resultando un incremento de compuestos fenólicos simples, como el ácido gálico. Por otro lado, Randhir y col., (2008) sugirieron que, además de la disociación de las formas fenólicas conjugadas, el incremento en CFT se produce también por algunas reacciones posteriores de polimerización/oxidación de los constituyentes fenólicos, luego de someter brotes de semillas de trigo (*Triticum aestivum*), trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*), avena (*Avena sativa*) y maíz (*Zea mays*) a un proceso de autoclavado durante 20 min.

III.4.1.2. Efecto del tratamiento térmico sobre los productos de la reacción de Maillard (PRM)

Considerando la presencia de potenciales sustratos reactivos de la reacción de Maillard en semillas de quinoa y las condiciones favorables para que la reacción se lleve a cabo, resulta útil monitorear la formación de los PRM durante los diferentes tratamientos térmicos aplicados a las semillas, dada su posible contribución a la actividad antioxidante neta evaluada en cada caso. En este sentido, se estimó el grado de formación de fracciones de PRM y se relacionaron los resultados con actividad antioxidante y poder reductor de las muestras obtenidas luego de los distintos procesamientos térmicos.

La reacción de Maillard puede producirse como consecuencia de un tratamiento térmico intenso o un almacenamiento prolongado de una matriz alimentaria que contenga los sustratos adecuados y conduce a la formación de una serie compleja de compuestos, algunos de los cuales han demostrado exhibir marcadas propiedades antioxidantes (Manzocco y col., 2001; Mastrocola y col., 2000). Varios estudios han demostrado que la formación de PRM aumenta la capacidad antioxidante de alimentos que fueron sometidos a tratamientos térmicos con calor seco (Kim y col., 2011; Lee y Lee, 2009). En estos casos, se ha señalado principalmente la acción de los PRM intermedios y de las melanoidinas, cuya actividad antioxidante se relaciona a la presencia de estructuras tipo reductona y/o a sus propiedades de quelación de metales (Manzocco y col., 2001). Vale señalar en este punto, que dada la diversidad estructural inherente a los PRM, los mecanismos por los cuales ejercen su actividad antioxidante son múltiples, por lo que es posible que produzcan aumento del poder reductor, de la capacidad de secuestrar oxígeno, de la capacidad de quelar metales, entre otros efectos (Hayase y col., 1989; Nicoli y col., 1997).

III.4.1.2.1 Compuestos fluorescentes intermedios (CFI)

Las vías de formación y estructuras de los CFI formados en las etapas avanzadas de la RM no se conocen con exactitud, por lo que una práctica habitual es estimar su contenido mediante mediciones fluorométricas de las muestras a longitudes de onda de excitación y emisión características. Cuando se excitó a 353 nm, los espectros de emisión de fluorescencia de las muestras procesadas presentaron un máximo a 438 nm, el cual fue utilizado para cuantificar los CFI y expresarlos en μg equivalentes de quinina por g de muestra (b.s.) (sección II.4.8.1).

En la Figura 3.31 se observan los cambios producidos en los niveles de fluorescencia durante los diversos tratamientos térmicos aplicados a semillas de quinoa. Se observaron incrementos significativos respecto del control ($p < 0,05$) para el tratamiento a 160 °C y especialmente para el tratamiento a 190 °C, el cual registró los máximos valores de CFI para todos los tiempos ensayados. Respecto del tiempo de proceso, en los extractos obtenidos a 160°C se observaron aumentos progresivos de los CFI hasta los 90 min, para luego mantenerse constante para mayores tiempos de aplicación. Una tendencia similar se presentó a 190°C, alcanzándose el máximo valor de CFI a un tiempo menor que a 160°C (60 min) y sin cambios significativos a tiempos posteriores.

La formación de compuestos fluorescentes en función del tiempo ha sido descrita en varios sistemas modelo, los que presentaron características particulares dependiendo de las condiciones en las que se produjeron (temperatura, pH y aw) y de los compuestos reaccionantes utilizados. Algunos presentaron un máximo de fluorescencia, en otros la fluorescencia aumentó para luego mantenerse constante y en otros, la misma aumentó de manera continua (Morales y van Boekel, 1997; Morales y Jiménez-Perez, 2001; Matiacevich y col., 2005). Los resultados presentados en la Figura 3.31, permiten observar que las semillas de quinoa procesadas a 160°C y a 190°C mantuvieron constantes sus respectivos niveles de CFI luego de alcanzar el valor máximo para cada tratamiento, a los 90 y 60 min, respectivamente. Este comportamiento puede ser explicado

considerando que los CFI formados sirven de precursores de los pigmentos pardos que se obtienen en las etapas finales de la RM (Labuza y Baisier, 1992).

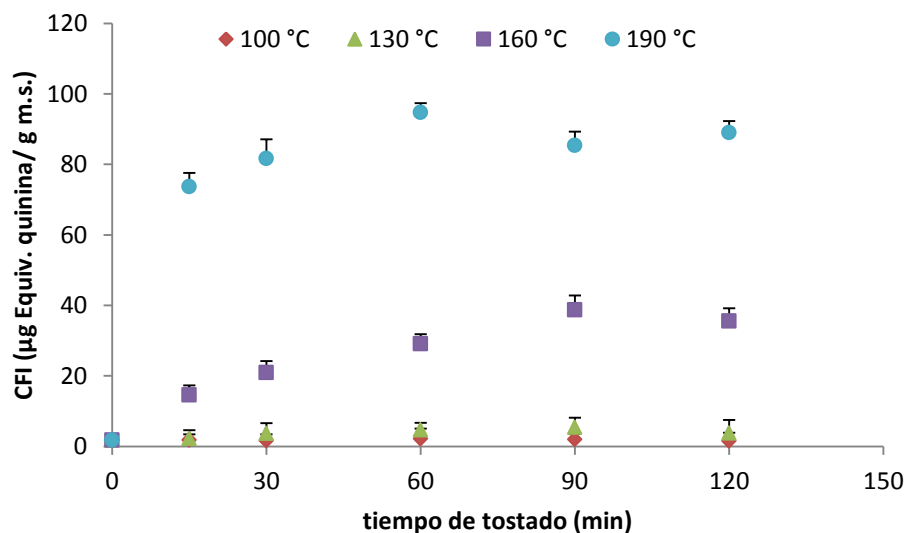


Figura 3.31. Compuestos fluorescentes intermedios de la reacción de Maillard en extractos obtenidos a partir de semillas de quinoa luego de tratamientos térmicos bajo diferentes condiciones de temperatura y tiempo.

III.4.1.2.2 Compuestos finales de la reacción de Maillard (melanoidinas)

En la Figura 3.32 se muestran los valores de absorbancia a 420 nm correspondientes a los extractos obtenidos luego de la aplicación de los diferentes tratamientos térmicos a semillas de quinoa. A mayor valor de absorbancia, mayor intensidad de la coloración parda de los extractos. De dicha figura, puede observarse que el desarrollo de pigmentos pardos se incrementó a medida que aumentó la temperatura y el tiempo de proceso, excepto en el caso del llevado a cabo a 100°C, en el que no se registró un desarrollo apreciable de pigmentos pardos, a ninguno de los tiempos ensayados, respecto del control. Un resultado similar se obtuvo a 130°C, para el que la formación de pigmentos comenzó a apreciarse a partir de los 90 min de aplicación del tratamiento térmico. Por el contrario, la síntesis de pigmentos se hizo evidente a 160°C y especialmente a

190°C, observándose tendencias crecientes en los contenidos de pigmentos pardos con el aumento del tiempo del proceso.

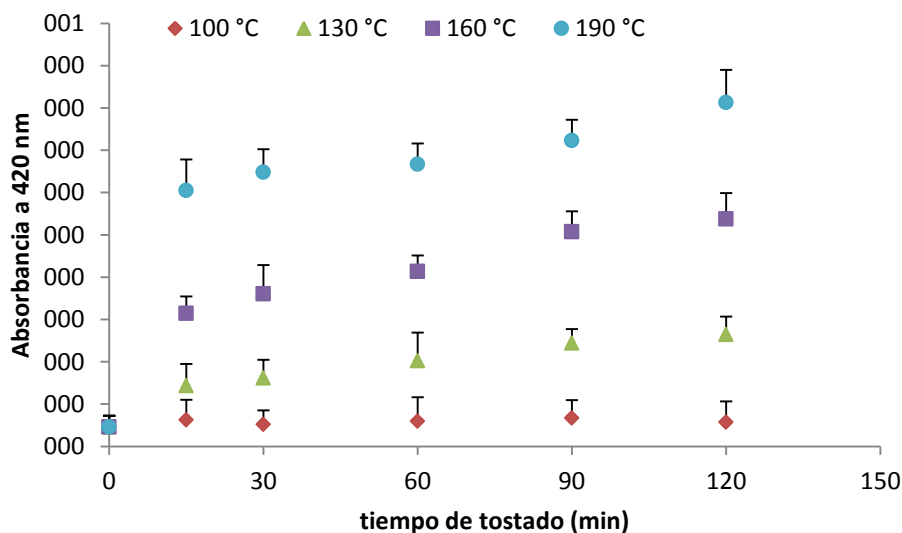


Figura 3.32. Compuestos finales de la reacción de Maillard en extractos obtenidos a partir de semillas de quinoa luego de tratamientos térmicos bajo diferentes condiciones de temperatura y tiempo.

III.4.1.3. Efecto del tratamiento térmico sobre el poder reductor

Se ha señalado que el potencial o poder reductor es un excelente indicador de la capacidad antioxidante de un sistema (Chou y col., 2009). Estudios previos han señalado que el poder reductor de compuestos bioactivos, medido como la capacidad donante de electrones, se encuentra asociado con su actividad antioxidante. Así, estos compuestos pueden actuar como antioxidantes primarios o secundarios, interrumpiendo una reacción en cadena por radicales libres al donar un electrón o un átomo de hidrógeno (Yen y Chen, 1995; Shimada y col., 1992). Durante el desarrollo de la RM, el aumento de los PRM con capacidad reductora se debe principalmente a la formación de compuestos genéricamente conocidos como reductonas, los que pueden ejercer una actividad antioxidante mediante alguno de los mecanismos anteriormente mencionados (Nursten, 2005; Nicoli y col., 1999).

En la Figura 3.33 se presentan los valores correspondientes al poder reductor obtenido en los extractos de semillas de quinoa luego de ser sometidas a los diferentes tratamientos térmicos. Los valores están expresados en μg equivalentes de ácido gálico/mL y en unidades arbitrarias de absorbancia a 700 nm, la que resulta proporcional al poder reductor. Se observaron incrementos progresivos de estos índices a medida que aumentó la temperatura y el tiempo del proceso, especialmente a 160 °C y 190 °C, para las cuales se obtuvieron los máximos valores de poder reductor. Por otra parte, los valores obtenidos para los tratamientos realizados a 100°C y 130°C no se diferenciaron significativamente entre ellos, ni con el control de semillas sin procesar.

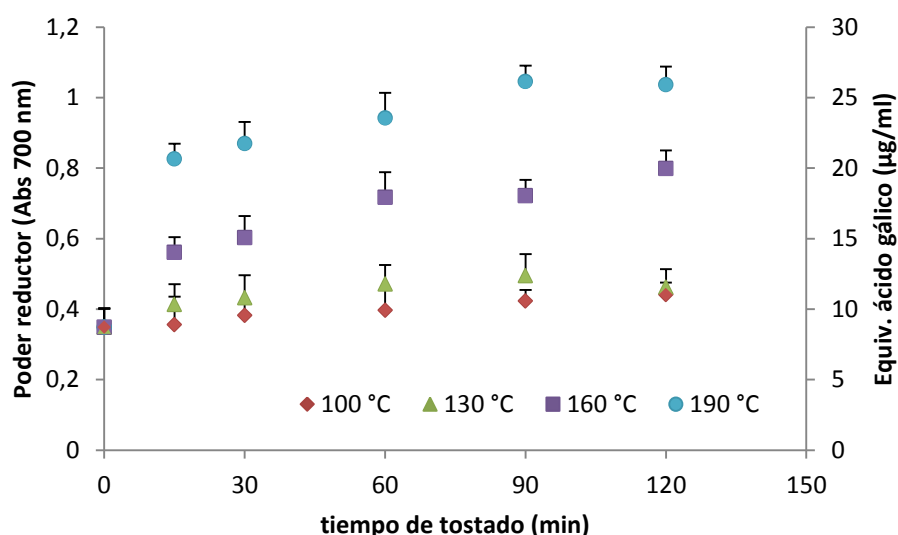


Figura 3.33. Poder reductor de los extractos obtenidos a partir de semillas de quinoa luego de tratamientos térmicos bajo diferentes condiciones de temperatura y tiempo.

III.4.1.4. Efecto del tratamiento térmico sobre la actividad antioxidante

En la Tabla 3.19 y Figura 3.34 se presentan los resultados de actividad antioxidante medida como la inhibición de radicales DPPH (%) en los extractos obtenidos a partir de semillas de quinoa sin procesar (control) y sometidas a distintas combinaciones de temperatura/tiempo. El proceso de tostado incrementó significativamente la actividad antioxidante respecto al control en los ensayos

realizados a 160°C y 190°C a todos los tiempos analizados, resultando mayores los valores correspondientes a la mayor temperatura. En el tratamiento realizado a 160°C el máximo valor de actividad antioxidante se obtuvo a los 60 min de proceso, con un incremento del 78 % con respecto al valor del control. Por otro lado, en el ensayo realizado a 190°C se obtuvo un incremento del 135% en dicho parámetro en relación al control, a los 30 min de proceso. Es importante mencionar que luego de alcanzar dichos máximos, los niveles de actividad antioxidante permanecieron constantes para tiempos superiores de proceso, a ambas temperaturas.

Tabla 3.19. Inhibición de radicales DPPH expresados como porcentaje de inhibición de extractos obtenidos a partir de semillas de quinoa luego de tratamientos térmicos bajo diferentes condiciones de temperatura y tiempo.

Temp (°C)	Tiempo de tostado (min)					
	0	15	30	60	90	120
100	13,93 ± 0,96 a	12,55 ± 1,49 a	14,08 ± 1,98 a	17,62 ± 1,91 a	17,14 ± 2,08 a	17,95 ± 0,78 a
130	13,93 ± 0,96 a	11,80 ± 1,74 a	14,83 ± 2,04 a	19,21 ± 0,75 a	19,19 ± 1,92 a	19,40 ± 1,12 a
160	13,93 ± 0,96 a	19,65 ± 1,95 a,b	22,49 ± 1,85 a,b	24,82 ± 1,69 b	24,63 ± 2,23 b	24,74 ± 1,31 b
190	13,93 ± 0,96 a	26,85 ± 0,58 b	32,74 ± 1,59 b	30,74 ± 1,07 b	31,47 ± 1,23 b	30,94 ± 2,45 b

Los valores (promedio ± D.E.) dentro de misma fila con diferente letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

En contraste, el tostado de semillas de quinoa realizado a 100°C y 130°C no modificó significativamente la actividad antioxidante respecto al control, en todos los tiempos del ensayo. Sin embargo, en los primeros 15 min de proceso a ambas temperaturas, se observaron valores de actividad antioxidante inferiores al obtenido para el control. Este comportamiento ha sido observado en otros alimentos sometidos a tratamientos térmicos y puede ser atribuido a la degradación que sufren los antioxidantes termolábiles presentes naturalmente, como el ácido ascórbico (Nicoli y col., 1997). También se ha postulado que tanto el ácido ascórbico como ciertos

compuestos fenólicos pueden intervenir como reactantes en la reacción de Maillard, pudiendo reaccionar directamente o luego de sufrir oxidación, con los grupos amino de las proteínas o aminoácidos (Sikorski y col., 2007). Esto tendría como consecuencia una disminución en los niveles de dichos compuestos en alimentos tratados térmicamente, resultando una disminución de la actividad antioxidante neta en los mismos (Kaur y Kapoor, 2001; Manzocco y col., 2001). También se ha sugerido que ciertos PRM formados a bajas temperaturas en etapas incipientes del pardeamiento, poseen propiedades pro-oxidantes que podrían contribuir a una disminución en la capacidad antioxidante observada bajo dichas condiciones (Kaur y Kapoor, 2001; Nicoli y col., 1999). Sin embargo, como se ha observado en algunas semillas, estos efectos negativos sobre la actividad antioxidante pueden resultar compensados o incluso superados, cuando el tratamiento térmico se lleva a cabo a altas temperaturas y/o por tiempos prolongados, debido principalmente a la liberación de compuestos fenólicos a partir de la fracción ligada y/o a la formación de nuevos PRM con fuerte actividad antioxidante, que ocurren bajo dichas condiciones (Nicoli y col., 1999). En este sentido, Acar y col. (2009) afirmaron que el efecto neto del tratamiento térmico sobre la actividad antioxidante depende del balance entre la degradación térmica de los antioxidantes presentes naturalmente y la formación de nuevos PRM con capacidad antioxidante, donde la cantidad de éstos últimos dependerá a su vez, de la concentración de reactantes de la reacción de Maillard disponible en la matriz. Así, estos autores observaron fuertes incrementos en la actividad antioxidante durante el tostado de diversas semillas, los que coincidieron con aumentos en las concentraciones de PRM, en particular en el caso de semillas ricas en carbohidratos y proteínas (Acar y col., 2009).

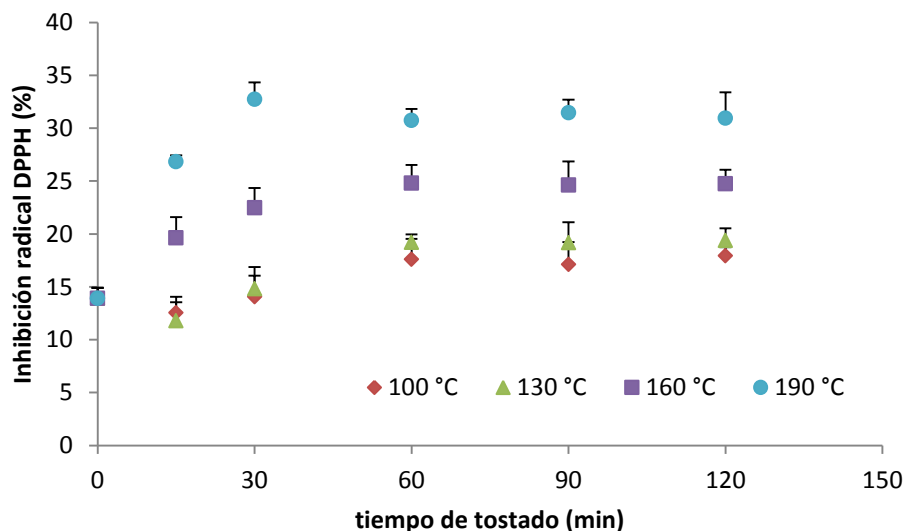


Figura 3.34. Inhibición de radicales DPPH de extractos obtenidos a partir de semillas de quinoa luego de tratamientos térmicos bajo diferentes condiciones de temperatura y tiempo.

III.4.1.5. Análisis multivariado de los resultados del tratamiento térmico aplicado a semillas de quinoa

Con el objetivo de analizar la relación entre los diferentes parámetros determinados para evaluar la actividad antioxidante, la composición de sustancias con estructura fenólica y los índices que permitieron monitorizar el grado de ocurrencia de la reacción de Maillard, se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson (r) para las variables estudiadas. Dichos valores se presentan en la Tabla 3.20, donde CFT y FT representan las cantidades de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales, respectivamente, DPPH la actividad antioxidante, PR el poder reductor de los extractos y CFI y Abs 420, los valores indicadores del grado de formación de compuestos intermedios y finales de la reacción de Maillard, respectivamente, luego de la aplicación de los procesos térmicos bajo diferentes condiciones a semillas de quinoa.

Tabla 3.20. Coeficientes de correlación de Pearson (r) entre los parámetros medidos en muestras de quinoa procesadas térmicamente.

	CFT	FT	DPPH	PR	CFI	Abs 420
CFT	1,00					
FT	0,89	1,00				
DPPH	0,83	0,96	1,00			
PR	0,81	0,96	0,96	1,00		
CFI	0,73	0,88	0,93	0,96	1,00	
Abs 420	0,82	0,97	0,95	0,99	0,94	1,00

Cada variable presentó una correlación positiva significativa ($p < 0,05$) con el resto de las variables analizadas, por lo que en principio no fue posible establecer el grupo particular de componentes (compuestos fenólicos o PRM) que ejerció mayor influencia sobre la actividad antioxidante o el poder reductor de las muestras. Adicionalmente, se llevó a cabo un análisis de componentes principales utilizando los mismos datos. En la Figura 3.35 se muestran los dos primeros componentes resultantes de dicho análisis, los cuales explicaron el 99,0 % de la varianza total.

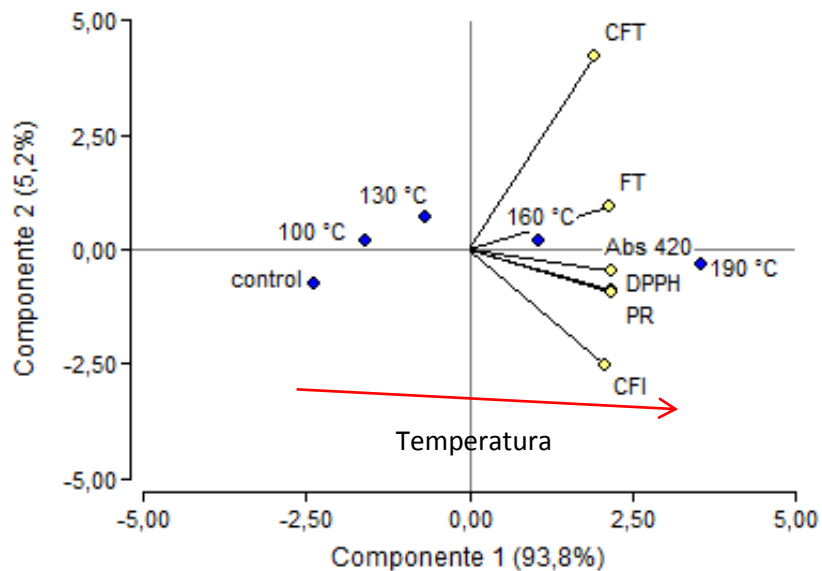


Figura 3.35. Análisis de componentes principales correspondiente a ensayos de tratamiento térmico de semillas de quinoa. Se indican las posiciones de las muestras en los nuevos ejes (puntos azules) y los vectores que representan las variables originales (puntos amarillos).

El componente 1 explicó el 93,8 % de los datos originales, lo que indica que tanto los compuestos fenólicos como los PRM están estrechamente relacionados tanto con la actividad antioxidante como con el poder reductor, una vez que todas las variables (círculos amarillos) tienen valores de peso similares sobre este componente. El componente 2 permitió diferenciar los compuestos antioxidantes con estructura fenólica (en sus valores positivos) de los PRM (valores negativos), aunque se debe considerar que este componente sólo explica un 5,2 % de los datos originales. De acuerdo a la contribución relativa de cada variable analizada sobre la actividad antioxidante, se podría decir que la variable que influyó en mayor medida la inhibición de radicales DPPH y el incremento del poder reductor fue la formación de melanoidinas, detectadas a 420 nm y en menor medida los compuestos fluorescentes intermedios de la RM. Dentro de los compuestos fenólicos, el de mayor influencia sobre la actividad antioxidante resultó el grupo de los flavonoides. Por otro lado, observando la posición de los ensayos sobre los ejes (rombos azules) se puede deducir que a medida que se incrementó la temperatura de los mismos (flecha roja) se produjo un desplazamiento hacia valores positivos sobre el componente 1, indicando que los ensayos realizados a 160 °C y, especialmente a 190 °C, se asociaron con los mayores valores de las variables estudiadas.

III.4.2. Procesado térmico de harina de quinoa germinada

Esta serie de experiencias se realizó de acuerdo a lo mencionado en el apartado II.6.1, sometiendo la harina resultante de quinoa germinada durante 3 días a un tratamiento térmico a temperaturas de 100 °C, 145 °C y 190 °C, respectivamente, durante 30 min. Los resultados de estos ensayos se presentan en la Tabla 3.21. A fines comparativos, se incluyen en la misma los resultados obtenidos al aplicar a las semillas cada proceso por separado.

Tabla 3.21. Contenidos promedios de CFT, FT, AA, PR,CFI y melanoidinas de semillas de quinoa procesadas térmicamente, germinadas y sometidas al proceso combinado.

	CFT (mg EAG/100g)	FT (mg EQ/100g)	Inhibición DPPH (%)	PR (µg EAG/ml)	CFI (µg quinina/g)	Melanoidinas (Abs 420 nm)
Control	39,29 a	11,06 a	13,61 a	8,73 a	1,81 a	0,02 a
T 100 °C	50,60 c	12,65 a	14,08 a	9,55 a	1,67 a	0,03 a
T 145 °C	56,28 d	19,63 c	18,66 b	12,93 b	16,44 b	0,13 b
T 190 °C	64,46 e	27,51 d	32,74 e	21,72 d	81,71 d	0,32 c
G 1 dia	47,04 b	12,58 a	16,59 a	11,25 b	-	-
G 2 dia	61,68 e	15,68 b	22,46 c	14,82 b	-	-
G 3 dia	79,04 f	17,65 b	27,39 d	17,03 c	-	-
G3 + T100	90,53 g	17,82 b	40,68 f	26,10 e	33,88 c	0,18 b
G3 + T145	143,29 h	41,71 e	70,75 h	48,98 g	126,55 f	0,76 e
G3 + T190	89,68 g	48,97 f	53,04 g	39,74 f	96,84 e	0,48 d

T: temperatura, G: germinado. Los valores promedio dentro de misma columna con diferente letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Analizando cada respuesta, se observó que la combinación de ambos procesos generó valores superiores en comparación a los obtenidos luego de la aplicación de cada proceso por separado bajo las mismas condiciones experimentales. En particular, Los CFT correspondientes al proceso combinado no variaron según el mismo patrón que para el caso de semillas sólo procesadas térmicamente. Así, mientras que la aplicación de este último proceso en forma aislada provocó incrementos progresivos de CFT con el aumento de la temperatura utilizada, la combinación de procesos de germinación y térmico, G3+T145, produjo el valor máximo en dicho parámetro, el que disminuyó para el proceso combinado realizado a mayor temperatura. Por su parte, los FT incrementaron progresivamente su contenido con el incremento de la temperatura del proceso

combinado, observándose un mayor incremento con el aumento de temperatura de 100 °C a 145 °C que cuando la temperatura aumentó de 145 °C a 190 °C. La tendencia observada en los contenidos de este grupo particular de compuestos fenólicos se estudió mediante el análisis de los extractos por HPLC. El examen de los cromatogramas resultantes (Figura 3.36) y los contenidos de los compuestos fenólicos identificados (Tabla 3.22) permiten observar que se verificaron incrementos en los contenidos de los ácidos fenólicos y flavonoides para el caso de harina de quinoa germinada sometida a una temperatura de 145 °C, en comparación con aquella sometida a 100 °C. De manera similar a lo que ocurrió en semillas procesadas térmicamente, un incremento de la temperatura a 190 °C produjo un descenso drástico en los compuestos del grupo de los ácidos hidroxicinámicos (ácidos *p*-cumárico y ferúlico). Por su parte, los flavonoides resultaron ser los compuestos más estables a las temperaturas ensayadas, mostrando incrementos significativos luego de la aplicación del tratamiento térmico a las semillas a 145°C y a 190 °C, en los que en particular se observaron aumentos importantes de canferol.

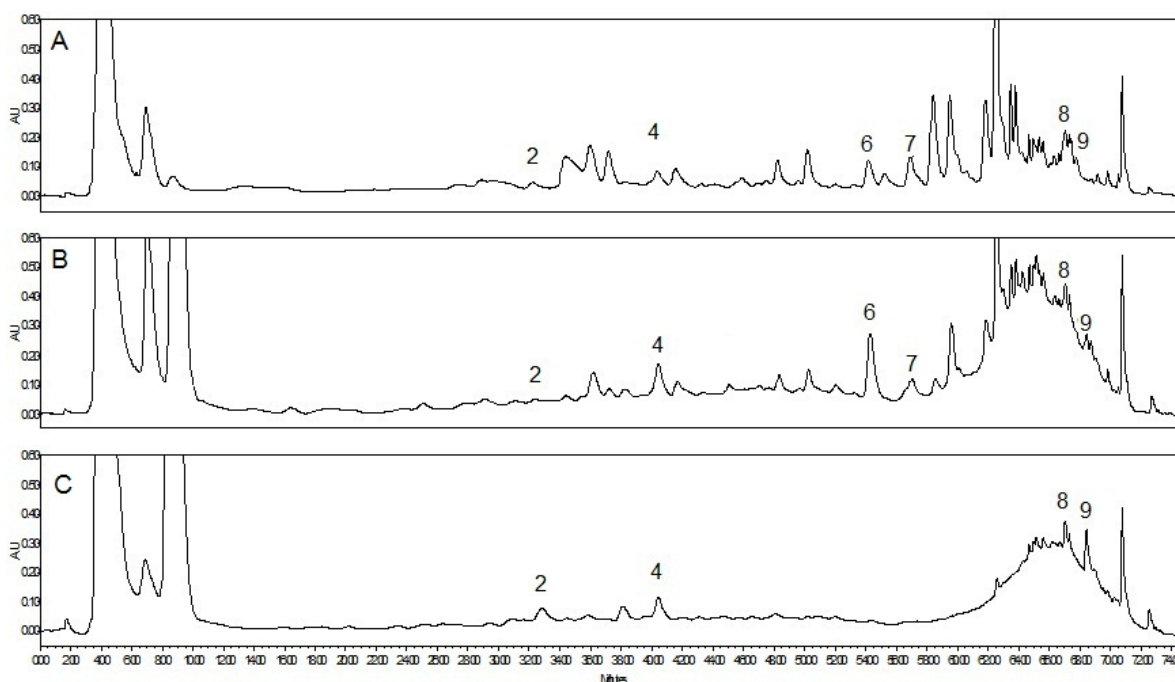


Figura 3.36. Cromatogramas representativos de extractos etanólicos de semillas de quinoa

germinadas/tostadas durante 30 min a 100°C (A), 145°C (B) y 190°C (C). Identificación de picos: 2: ácido *p*-hidroxibenzoico; 4: ácido vanílico, 6: ácido *p*-cumárico; 7: ácido ferúlico; 8: quercetina; 9: canferol.

Tabla 3.22. Contenidos totales (mg/100g b.s.) de los ácidos fenólicos y flavonoides identificados en semillas de quinoa sin procesar y sometidas al proceso combinado de germinación/tratamiento térmico a 100°C, 145°C y 190°C durante 30 min.

Compuesto	Control (0 min)	G3+T100°C	G3+T145°C	G3+T190°C
Ac. gálico	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ac. <i>p</i> -OH-benzoico	0,22±0,02 ^a	3,08±0,17 ^b	7,81±0,72 ^c	7,17±0,08 ^c
Ac. vanílico	0,88±0,11 ^a	8,97±0,29 ^c	10,67±0,91 ^c	5,80±0,02 ^b
<i>Total ácido Hidroxibenzoicos</i>	1,09±0,07 ^a (51%)	12,05±0,2 ^b (58%)	18,48±0,54 ^c (47%)	12,97±0,04 ^d (70%)
Ac. clorogénico	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ac. cafeico	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ac. <i>p</i> -cumárico	0,09±0,05 ^a	2,32±0,04 ^b	7,46±0,04 ^c	n.d.
Ac. ferúlico	0,57±0,09 ^a	5,50±0,07 ^b	9,19±0,54 ^c	n.d.
<i>Total ácido Hidroxicinámicos</i>	0,66±0,09 ^a (31%)	7,82±0,04 ^b (38%)	16,65±0,26 ^c (42%)	n.d.
Total ácidos fenólicos	1,75±0,07^a	19,86±0,03^c	35,13±0,35^d	12,97±0,04^b
Quercetina	0,23±0,02 ^a	0,65±0,01 ^b	2,62±0,13 ^d	1,75±0,00 ^c
Canferol	0,15±0,04 ^a	0,17±0,00 ^a	1,47±0,13 ^b	3,88±0,03 ^c
Total flavonoides	0,37±0,03^a (18%)	0,82±0,01^b (4%)	4,10±0,13^c (10%)	5,63±0,02^d (30%)
Total compuestos fenólicos	2,13±0,06^a (100%)	20,69±0,03^b (100%)	39,23±0,27^c (100%)	18,60±0,03^d (100%)

Los valores (promedio ± D.E.) dentro de misma fila con diferente letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$). n.d = no detectado.

Por otro lado, los compuestos de la reacción de Maillard (CFI y melanoidinas) evaluados en el proceso combinado incrementaron sus niveles, alcanzando el máximo aumento cuando la temperatura pasó de 100 °C a 145 °C (Tabla 3.21). Este incremento es debido al incremento de reactantes de la reacción de Maillard que se produce durante el germinado, cuya formación de

productos derivados de la reacción es más intensa a 145 °C que a 100 °C. Durante la germinación de las semillas se produce la hidrólisis de sustancias de reserva, tales como almidón para dar dextrinas o monosacáridos y de proteínas que generan péptidos o aminoácidos libres, productos que son luego movilizados desde los cotiledones al eje embrionario en desarrollo (Bau y col., 1997; Alonso y col., 2000). Los grupos carbonilo de los azúcares reductores liberados y los grupos amino libres de aminoácidos, péptidos o proteínas resultantes, son capaces de dar lugar a la primera etapa de la compleja RM, por medio de una reacción de condensación que genera una base de Schiff (Martins y col., 2001; Zhang y Zhang, 2007). Por otro lado, es bien conocido que el incremento de temperatura aumenta la velocidad de la reacción de Maillard y consecuentemente la formación de productos, como ha sido comprobado en diferentes sistemas modelo aminoácido-azúcar calentados a diferentes temperaturas (Miller y col., 1980, Benzing-Purdie y col., 1985; Wijewickreme y col., 1997) o en ciertos alimentos como jugo de naranja o leche en polvo (del Castillo y col., 1998; Morales y col., 1997). Sin embargo, en el presente estudio el incremento de temperatura a 190 °C produjo una disminución en los niveles de los PRM evaluados en comparación con la muestra sometida a 145 °C (Tabla 3.21). Esto podría ser debido a la degradación térmica que sufren los precursores de la reacción de Maillard bajo las condiciones de alta temperatura utilizada y bajo contenido de humedad de la muestra (Wnorowski y Yaylayan, 2000; Yahya y col., 2014). Tal es el caso de la glucosa, que sufre degradación térmica a temperaturas superiores a los 150 °C (Nursten, 2005).

Finalmente, la actividad antioxidante y el poder reductor siguieron la misma tendencia que los CFT y los PRM evaluados (Tabla 3.21), es decir, sus niveles aumentaron, alcanzando el máximo incremento en la condición G3+T145 (valores que superaron en 5 veces el valor obtenido para el control). El posterior incremento de la temperatura (190 °C) redujo los valores de inhibición de radicales DPPH y poder reductor en un 25 % y 19 %, respectivamente. Estos resultados

concuerdan con los obtenidos por Coghe y col. (2006), quienes observaron un incremento máximo en la inhibición de radicales DPPH al tostar granos de cebada germinados a 150 °C, mientras que en muestras tostadas a 180 °C, los autores observaron una reducción en dicho parámetro, justificando dicho resultado por la pérdida de grupos funcionales con actividad antiradicalaria formados a 150 °C en reacciones de polimerización que ocurren a temperaturas superiores.

III.4.2.1. Análisis multivariado de los resultados del tratamiento térmico aplicado a harina de quinoa germinada

En la Tabla 3.23 se presentan los coeficientes de correlación de Pearson (r) para las variables estudiadas, donde CFT y FT representan las cantidades de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales, respectivamente, DPPH la actividad antioxidante, PR el poder reductor de los extractos y CFI y Abs 420, los valores indicadores del grado de formación de compuestos intermedios y finales de la reacción de Maillard, respectivamente, luego de la aplicación de los procesos combinados de germinación y tostado, bajo diferentes condiciones a semillas de quinoa.

Tabla 3.23. Coeficientes de correlación de Pearson (r) entre los parámetros medidos en muestras de quinoa sometidas a proceso combinado de germinación y proceso térmico.

	CFT	FT	DPPH	PR	CFI	Abs 420
CFT	1,00					
FT	0,74	1,00				
DPPH	0,96	0,88	1,00			
PR	0,93	0,91	0,99	1,00		
CFI	0,79	0,92	0,91	0,92	1,00	
Abs 420	0,85	0,90	0,93	0,95	0,98	1,00

Cada variable mostró correlación positiva significativa ($p < 0,05$) con el resto de las variables analizadas, por lo que no fue posible determinar qué grupos de compuestos contribuyeron en mayor medida sobre la actividad antioxidante o el poder reductor resultantes de las muestras.

Adicionalmente, se realizó un análisis de componentes principales, utilizando los datos obtenidos en los ensayos con semillas de quinoa sólo germinadas, con aquellas sólo tratadas térmicamente y con los que resultaron de la combinación de ambos procesos (Figura 3.37). En este caso los dos primeros componentes explicaron el 97,7 % de la varianza total, de la cual el componente 1 representa el 92,1 % de los datos originales.

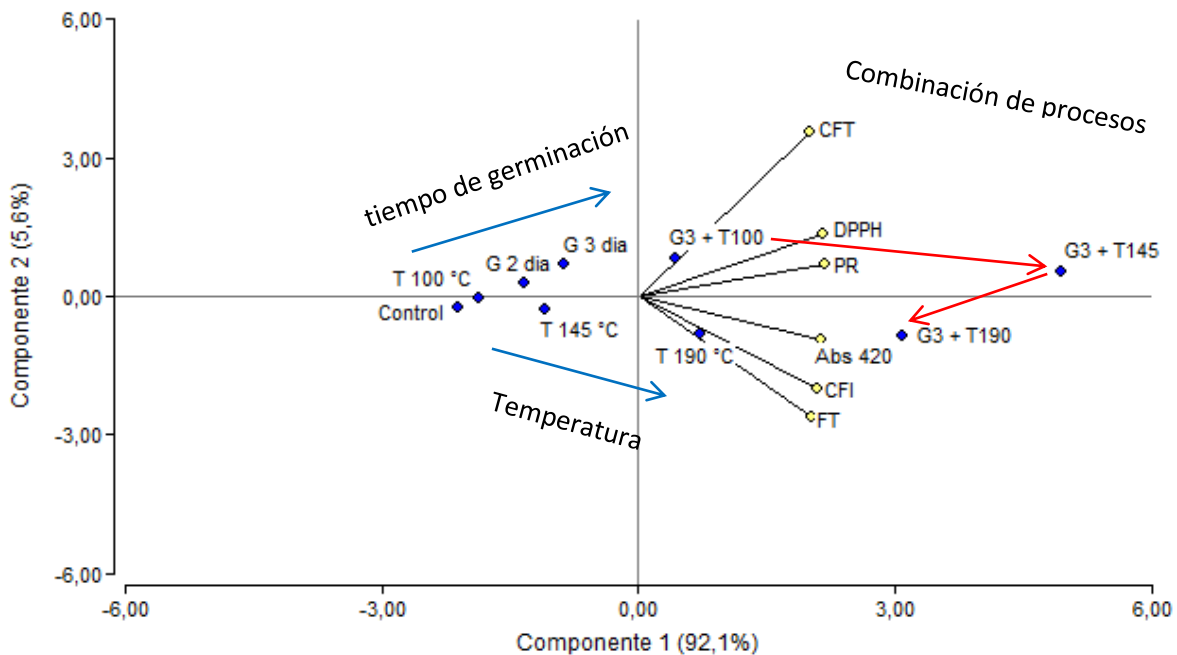


Figura 3.37. Análisis de componentes principales correspondiente a ensayos de germinación, tratamiento térmico y combinación de ambos procesos de semillas de quinoa. Se indican las posiciones de las muestras en los nuevos ejes (puntos azules) y los vectores que representan las variables originales (puntos amarillos).

En dicha figura se puede observar que tanto los compuestos fenólicos como los PRM están estrechamente relacionados con la actividad antioxidante y el poder reductor, ya que todas las variables tienen valores de peso similares sobre el componente 1. El componente 2 puede explicar la contribución relativa de cada variable analizada sobre la actividad antioxidante, aunque se debe considerar que este componente explica sólo un 5,6 % de los datos originales. Bajo esta

consideración, en los procesos aplicados se puede deducir que a medida que se incrementó la temperatura de tostado en las semillas o los tiempos de germinación (flechas azules) se produjo un desplazamiento hacia valores positivos sobre el componente 1, indicando que el incremento de ambos parámetros de proceso coincide con los mayores valores de las variables estudiadas. Una observación interesante es que el componente 2 permitió diferenciar ambos procesos: mientras que el incremento de la temperatura se relacionó con el incremento en los contenidos de los PRM y compuestos flavonoides, el incremento del tiempo de germinación se asoció a los contenidos de CFT y actividad antioxidante. Por su parte, en la combinación de procesos se observó que el incremento en el valor sobre la componente 1 se produjo al incrementar la temperatura de 100 °C a 145 °C (flecha roja), en cuyo caso un aumento de la temperatura de tostado (190 °C) produjo una disminución de los valores sobre dicha componente. Así, la muestra que mostró mayor peso sobre la componente 1 y que se asoció en mayor medida con las variables estudiadas fue la combinación G3+T145.

III.4.3. Conclusiones

Los resultados obtenidos en esta cuarta parte del capítulo han mostrado el efecto de la aplicación de diferentes tratamientos térmicos sobre el nivel de compuestos antioxidantes y actividad antioxidante, tanto en semillas de quinoa como en harina obtenida a partir de brotes germinados durante tres días, combinando en esta última serie de experiencias el proceso de germinación con un posterior tratamiento térmico.

Las semillas de quinoa sometidas a las diferentes combinaciones de tiempo/temperatura ensayadas mostraron diferencias en los diferentes parámetros evaluados. De manera general, el incremento de temperatura condujo a aumentos en los niveles de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales, productos de la reacción de Maillard (compuestos fluorescentes intermedios y

melanoidinas) y actividad antioxidante. En la mayoría de estas respuestas, sólo los valores obtenidos a 160°C y 190 °C fueron significativamente diferentes a los correspondientes al control, alcanzándose valores máximos a los 30 o 60 min de proceso para luego mantenerse prácticamente constantes para tiempos superiores de proceso. De esta manera, se pudo concluir que la actividad antioxidante observada luego de la aplicación de los diferentes procesos dependió del balance entre la degradación térmica de los antioxidantes presentes naturalmente en las muestras y la formación de nuevos compuestos con capacidad antioxidante, resultando en un efecto neto sobre la actividad antioxidante en la que se compensó o superó las disminuciones provocadas por la degradación de antioxidantes naturales en el caso de muestras sometidas a un tratamiento térmico de condiciones más drásticas (mayor temperatura y/o tiempos de procesado).

La combinación del procesos (germinado / tratamiento térmico) mostró ser una alternativa interesante para incrementar la actividad antioxidante de las semillas de quinoa, ya que se alcanzaron valores superiores en todas las respuestas evaluadas, en comparación a los correspondientes luego de la aplicación de cada proceso por separado, bajo las mismas condiciones. A diferencia de las muestras sólo procesadas térmicamente (que incrementaron progresivamente los valores de respuesta con incrementos en la temperatura de proceso), en la combinación de procesos se alcanzaron los máximos valores de actividad antioxidante y de la mayoría de las respuestas evaluadas utilizando una menor temperatura. De esta manera, la combinación de procesos resultó ser más eficiente en la mejora de la capacidad antioxidante de las semillas de quinoa, a la vez que permitió reducir el consumo energético durante el proceso térmico.

III.5. Irradiación con luz UV

III.5.1. Estudios preliminares de irradiación sobre semillas y brotes

Se evaluaron diferentes dosis de radiación UV-C sobre semillas remojadas y sobre brotes con el propósito de determinar aquella que produzca el mayor efecto en la acumulación de compuestos fenólicos e incremento de la actividad antioxidante bajo las condiciones experimentales utilizadas.

La Figura 3.38 muestra el contenido de CFT para los diferentes tiempos de irradiación UV-C ensayados sobre semillas remojadas y brotes.

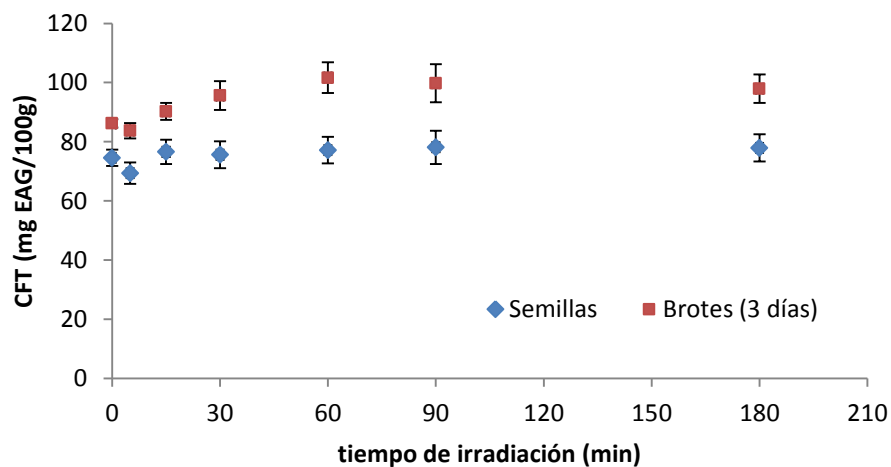


Figura 3.38. Contenido de CFT en extractos obtenidos a partir de semillas y brotes de quinoa luego de tratamiento de irradiación con luz UV-C durante distintos tiempos.

El análisis estadístico de los datos indicó que en las semillas irradiadas no se produjeron modificaciones en el contenido de CFT, para todos los tiempos ensayados. respecto del control.

Por el contrario, en los brotes irradiados se observó un incremento que fue significativo para el tiempo de irradiación de 60 min ($26,7 \text{ kJ/m}^2$), cuyo valor promedio resultó ser 18 % superior respecto del valor obtenido para el control de brotes sin irradiar. Este resultado indica que la luz UV actuó como agente inductor de estrés sobre los brotes y el incremento en el contenido de compuestos fenólicos observado podría ser parte del mecanismo de defensa de las plántulas de

quinoa al estrés inducido por la luz UV. Estudios previos han indicado que la irradiación UV puede incrementar la expresión y actividad de enzimas del metabolismo secundario de las plantas, tales como la fenilalanina amonio liasa (PAL) y la chalcona sintasa (CHS), acelerando la biosíntesis y acumulación de compuestos fenólicos (Jenkins y col., 2001; Shetty y col., 2002; Pluskota y col., 2005; Tang y col., 2010; Wei y col., 2013). Se ha postulado que la protección contra la radiación UV por parte de estos compuestos (principalmente flavonoides y otros fenilpropanoides) se debe a que absorben ciertas bandas de este tipo de radiación y por lo tanto actúan como filtros naturales (Hashiba y col., 2006; Liakoura y col., 2001), además de que pueden reducir eficazmente el impacto de los radicales libres formados durante dicho período (Spitaler y col., 2006). Es por ello que se ha mencionado que estos compuestos se acumulan principalmente en las capas epidérmicas de hojas y tallos que reciben una mayor exposición de radiación (Dixon y Paiva, 1995). Esta podría ser la causa del incremento en CFT observado en los brotes y no en las semillas.

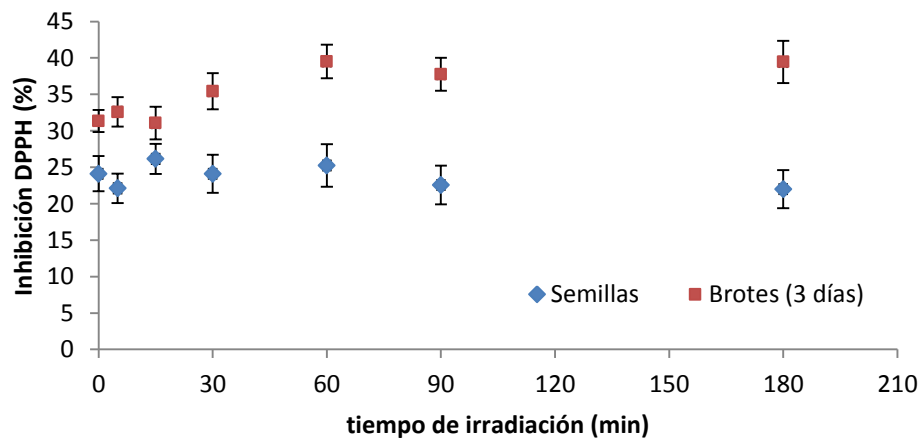


Figura 3.39. Actividad antioxidante de extractos obtenidos a partir de semillas y brotes de quinoa luego de tratamiento de irradiación con luz UV-C durante distintos tiempos.

Respecto a la actividad antioxidante, en las semillas irradiadas no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) para los tiempos de irradiación ensayados (Figura 3.39).

Por su parte, los brotes irradiados mostraron un leve incremento en la inhibición de radicales

DPPH con una tendencia similar a la que presentó el contenido de CFT, con incrementos observados a los 60 y 90 min de irradiación, estadísticamente significativos respecto del control.

En un estudio donde se evaluó el efecto de la aplicación de los tres tipos de irradiación UV (UV-A, UV-B y UV-C) por diferentes tiempos sobre hojas de gandul (*Cajanus cajan*) se observó que la luz UV-C indujo el mayor incremento en CFT y en menor tiempo de irradiación, comparado con UV-B y UV-A (Wei y col., 2013). Además, tiempos superiores de irradiación no produjeron mayores incrementos en el nivel de CFT, de manera similar a lo observado en el presente estudio para brotes de quinoa. En el caso de gandul, el mismo estudio citado previamente, encontró que la actividad antioxidante (medida como inhibición de radicales DPPH) de los extractos obtenidos fue superior para una dosis mayor de irradiación UV-B, concluyendo entonces que la acumulación de fitoquímicos es específica según el tipo de radiación (Wei y col., 2013). Varios autores han observado que, a diferencia de la luz UV-A, la luz UV-B y UV-C tiene la capacidad de incrementar la concentración de compuestos fenólicos totales (principalmente flavonoides) en hojas de plantas tales como pimiento (*Capsicum annum*) (Mahdavian y col., 2008), trigo duro (Balouchi y col., 2009), soja (Enteshari y col., 2006) o en la piel de ciertos frutos tales como uva (Zhang y col., 2012) o arándanos (Wang y col., 2009). Por el contrario, otros autores no han observado tales incrementos en los niveles de CFT y FT, como es el caso de cultivos de *Scenedesmus quadricauda* expuestos durante una hora a radiación UV-C (Kováčik y col., 2010). De esta manera, la irradiación UV podría ser considerada como un proceso efectivo para inducir la biosíntesis de sustancias con potenciales propiedades saludables, aplicable sólo en el caso de determinadas especies vegetales.

Considerando que en los ensayos preliminares de irradiación se evaluó el efecto de la luz UV sobre los estadíos extremos de germinación (semillas y brotes de 3 días), en la segunda serie de experiencias de irradiación se decidió considerar también los estadíos intermedios de germinación

y evaluar posibles cambios en el contenido de polifenoles y actividad antioxidante durante tiempos posteriores de incubación. De acuerdo a los resultados obtenidos en los estudios preliminares, se seleccionó para los ensayos posteriores un tiempo de irradiación 60 min, que corresponde a una dosis de $26,7 \text{ kJ/m}^2$.

III.5.2. Irradiación UV-C durante la germinación de semillas de quinoa

Esta serie de experiencias se realizó según el plan detallado en la Tabla 2.6, donde se irradió cada estadio de germinación con una dosis de exposición de $26,7 \text{ kJ/m}^2$ y se tomaron muestras cada 24 h, hasta el cuarto día de germinación, inclusive, para observar el efecto de la radiación durante un período de incubación posterior. La Figura 3.40 muestra ejemplos de los brotes irradiados en cada estadio, obtenidos el cuarto día de germinación. En la misma se puede apreciar que la exposición a la luz UV-C causó daños en las células que componen la radícula y también se observó una mayor pigmentación en los brotes irradiados en estadios avanzados.

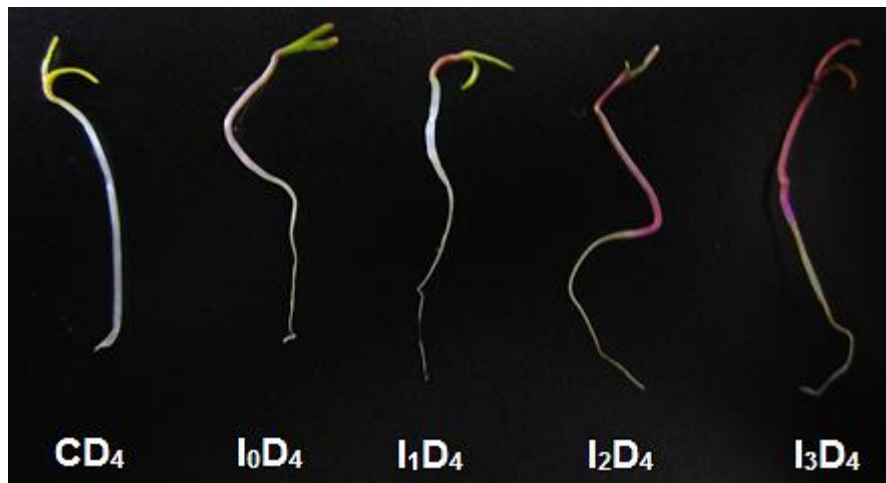


Figura 3.40. Brotes obtenidos el cuarto día de germinación luego de la aplicación de una dosis de irradiación UV-C de $26,7 \text{ kJ/m}^2$ en los distintos estadios de germinación.

III.5.2.1. Efecto sobre el contenido de CFT, FT y betalaínas totales

La Figura 3.41 muestra el efecto de la dosis de radiación UV-C ($26,7 \text{ kJ/m}^2$) sobre el contenido de CFT en cada estadio de germinación y su efecto residual durante al menos 24 hs de incubación posterior. Es interesante analizar en esta figura el nivel de CFT de cada estadio comparado con el respectivo control de semillas/brotos sin irradiar. De manera general, se observó que cada estadio de germinación irradiado resultó en valores similares o inferiores a su respectivo control, excepto para la muestra irradiada el día 3 (I3) la cual mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto de su control. Estos resultados muestran que el efecto de acumulación de CFT debido a la radiación UV se produce a partir de que los brotes exponen los cotiledones y son éstos últimos los que reciben la radiación y los responsables de desencadenar la respuesta al estrés inducido por la luz UV-C.

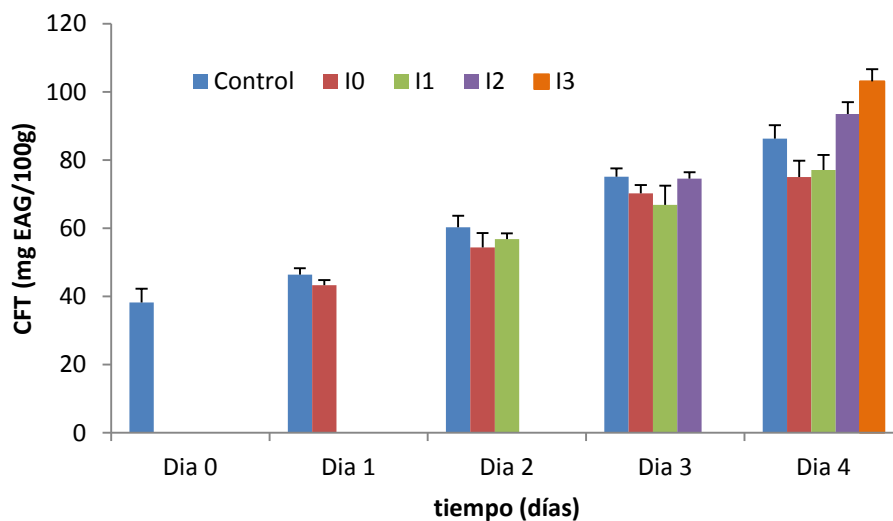


Figura 3.41. Contenido de CFT para los diferentes estadios irradiados con luz UV-C ($26,7 \text{ kJ/m}^2$).

El efecto de la radiación UV-C en cada estadio sobre el contenido de FT se muestra en la Figura 3.42. Se puede observar que las muestras irradiadas no mostraron diferencias respecto del control ($p < 0,05$) para cada estadio de germinación. De manera similar, Kováčik y col. (2010) no

observaron incrementos en los niveles de FT en cultivos de *Scenedesmus quadricauda* expuestos durante una hora a radiación UV-C. Por el contrario, otros autores han mencionado incrementos en el nivel de FT luego de irradiar plantas adultas bajo luz UV-C (Enteshari y col., 2006; Mahdavian y col., 2008). Por su parte, Guajardo-Flores y col. (2014) observaron incrementos en los contenidos de ciertos flavonoides en las cubiertas seminales de porotos negros irradiados con luz UV-C durante 10 h. Sin embargo varios trabajos mencionan la fracción de radiación UV-B como aquella capaz de regular la biosíntesis de los compuestos flavonoides en plantas (Shirley 1996; Logemann y col., 2000; Lavola y col., 2003; Jansen y col., 2008; Zhang y Björn, 2009). Esto se debe a que la radiación UV-B induce cambios complejos en la expresión génica de las plantas (Jansen y col., 2008) donde ciertas enzimas implicadas en la ruta de la biosíntesis de flavonoides tales como la fenilalanina amonio liasa (PAL) y chalcona sintasa (CHS) han sido identificadas como inducibles por la radiación UV-B (Schnitzler y col., 1996; Pluskota y col., 2005; Zhang y Björn, 2009; Wei y col., 2013).

A pesar de que investigaciones recientes han permitido aumentar el conocimiento en el tema, los cambios en los niveles de los metabolitos en las plantas inducidos por la luz UV parecen ser específicos según la especie y/o cultivar y dependen también de la severidad y la dinámica de exposición, así como de otros parámetros ambientales (Jansen y col., 2008). Los mecanismos por los cuales se acumulan ciertos compuestos fenólicos en las diferentes plantas sometidas a la radiación UV son demasiado complejos y muestran la necesidad de estudiarlos en mayor detalle para alcanzar conclusiones más acertadas (Zhang y col., 2012; Katerova y col., 2012).

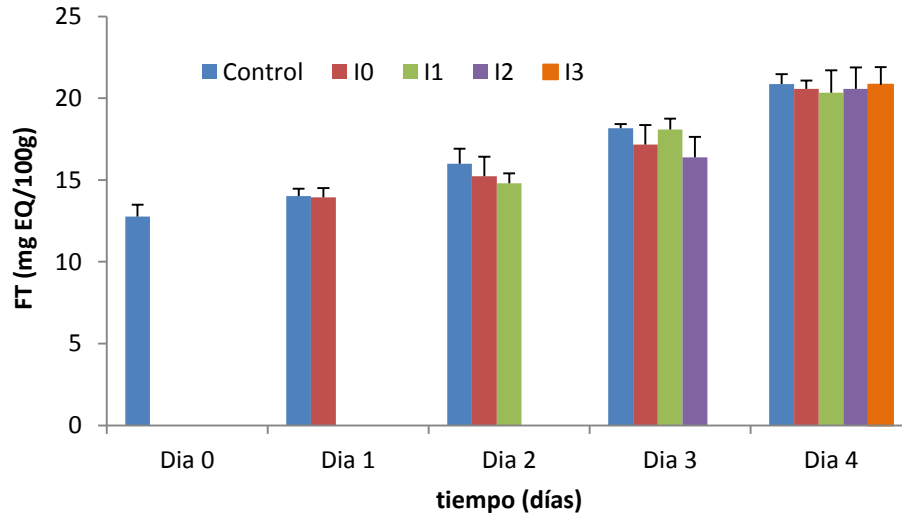


Figura 3.42. Contenido de FT para los diferentes estadíos irradiados con luz UV-C (26,7 kJ/m²).

Se ha mencionado en el caso de numerosas especies de plantas superiores la presencia transitoria de ciertos pigmentos, justo después de la germinación de las semillas (Kubasek y col., 1992) y se ha explicado que la acumulación de estos compuestos, de color rojo o púrpura, es consecuencia de un proceso de estrés de la planta (Winkel-Shirley, 2002). En los brotes de quinoa obtenidos en esta serie de experiencias, pudo observarse el desarrollo de una pigmentación violácea rojiza sobre los cotiledones e hipocótilo de los mismos (Figura 3.40), que a simple vista resultó ser más intensa sobre los brotes irradiados en estadíos avanzados de germinación. La coloración en las plantas de quinoa se debe a la presencia de betalaínas (en lugar de antocianinas) por pertenecer taxonómicamente al orden de las *Caryophyllales* (Castellanos-Santiago y Yahia, 2008; Repo-Carrasco y col., 2010). Betalaínas y antocianinas son dos familias diferentes de pigmentos que no se encuentran juntas en la misma planta. Las razones evolutivas de esta aparente exclusión mutua no han sido adecuadamente explicadas, sin embargo, a nivel bioquímico, ha sido demostrado que las enzimas relevantes para la producción de antocianinas no son expresadas en las plantas productoras de betalaínas (Shimada y col., 2007; Brockington y col., 2011). Existen dos tipos de betalaínas: betaxantinas y betacianinas. Las betaxantinas son derivados imínicos del ácido

betalámico con diferentes aminas y aminoácidos que les otorgan una pigmentación de color amarillo, mientras que en las betacianinas el ácido betalámico aparece condensado con *ciclo*-dihidroxifenilalanina (*ciclo*-DOPA) y son de color violeta (Gandía-Herrero y García-Carmona, 2013). La presencia conjunta de ambos pigmentos genera tonalidades del naranja al rojo, siendo posibles además una serie de distintos patrones jaspeados (Gandía-Herrero y col., 2005). Se ha mencionado que las betalaínas son moléculas bioactivas con una fuerte actividad antioxidante (Escribano y col., 1998; Cai y col., 2003; Gandía-Herrero y col., 2012), es por ello que se estimó el contenido de ambos tipos de betalaínas en cada una de las muestras obtenidas. Los resultados se presentan en la Figura 3.43.

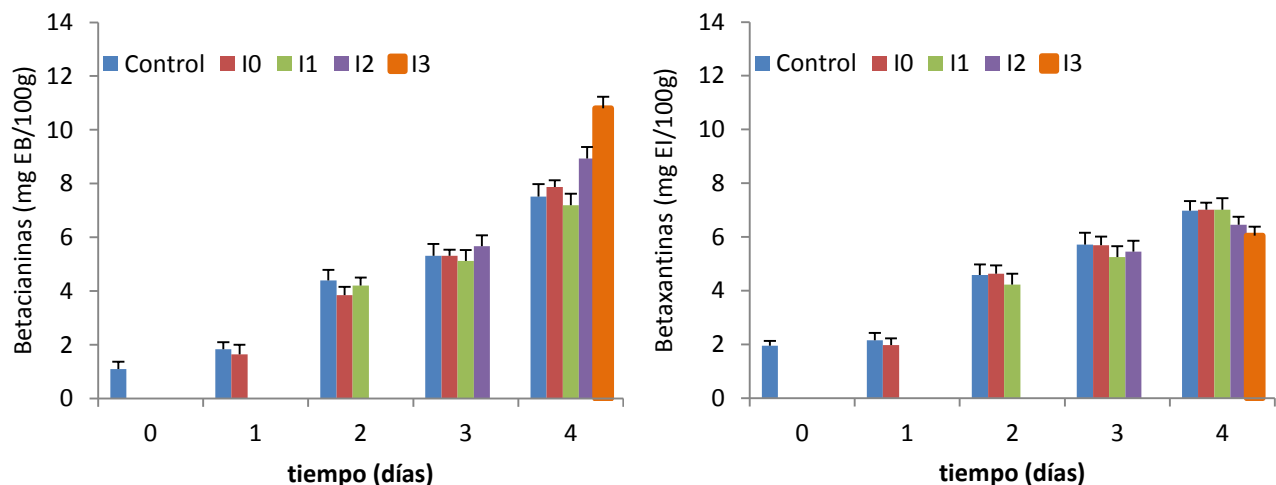


Figura 3.43. Contenido de betacianinas y betaxantinas en brotes de quinoa irradiados en los diferentes estadios de germinación con luz UV-C.

En ambas figuras se puede observar, que tanto el contenido de betacianinas como de betaxantinas se incrementó progresivamente con los días de germinación y en general, las muestras irradiadas en los diferentes estadios mantuvieron valores similares al respectivo control, excepto en el cuarto día donde se observó un incremento en el contenido de betacianinas (43 %) para la muestra I3 respecto del control. Para esta muestra, se observó una disminución en el contenido de

betaxantinas, aunque dicho valor no fue significativamente diferente ($p < 0,05$) del control. El contenido de betalaínas totales (betacianinas + betaxantinas) se muestra en la Figura 3.44. En la misma se observó que para cada día las muestras irradiadas fueron similares al control excepto en el cuarto día donde la muestra I3 fue significativamente diferente del control, I0 e I1.

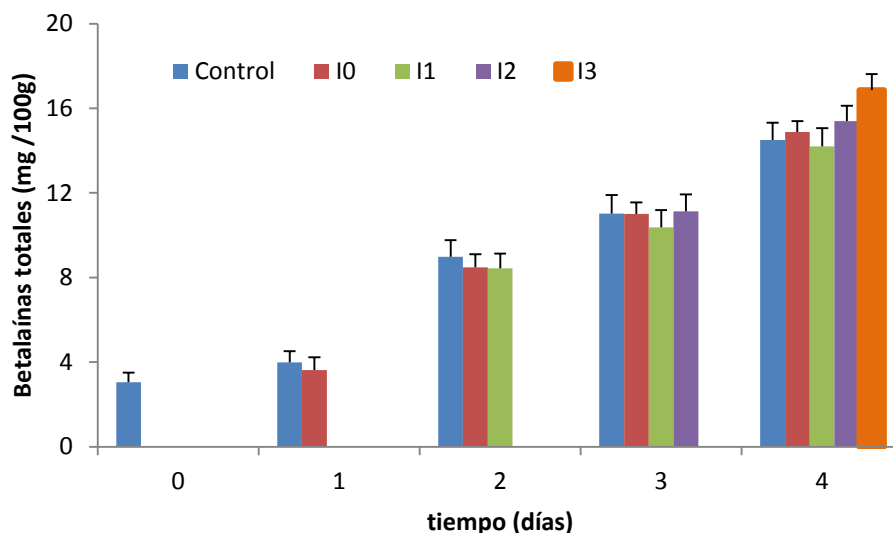


Figura 3.44. Contenido de betalaínas totales en los diferentes estadios irradiados con luz UV-C.

A diferencia de otras familias de pigmentos vegetales, la ruta biosintética de las betalaínas aún no ha sido aclarada totalmente. Sin embargo, en años recientes han sido demostradas experimentalmente muchas reacciones que parecen estar involucradas. El uso de herramientas moleculares que no estaban disponibles en la concepción temprana de esta ruta biosintética ha demostrado el papel central de enzimas tales como 4,5-DOPA-extradiol-dioxigenasa, tirosinasa o betanidin-glucosiltransferasa (Gandía-Herrero y García-Carmona, 2013), para las cuales se ha mencionado que en las plantas, sus síntesis están reguladas a nivel transcripcional (Joy y col., 1995; Sepúlveda-Jiménez y col., 2005; Sasaki y col., 2009). Por lo tanto se podría hipotetizar un efecto inductivo por parte de la luz UV en la transcripción génica de ciertas enzimas claves de la ruta biosintética de las betalaínas, tal como sucede para la ruta de los fenilpropanoides por

ejemplo. En este sentido, Ibdah y col. (2002) encontraron una acumulación de betacianinas en plantas de la especie *Mesembryanthemum crystallinum* irradiadas con diferentes franjas de luz UV. De manera interesante, los autores observaron un mayor acúmulo de betanina a medida que disminuyeron progresivamente la longitud de onda dentro del rango ultravioleta, lo que afirma el incremento de BT observado en el presente estudio.

III.5.2.3. Efecto sobre la actividad antioxidante

En la Figura 3.45 se presentan los resultados de actividad antioxidante medida como la inhibición (%) de radicales DPPH en la muestras sin irradiar (controles) y aquellas irradiadas en cada estadio de germinación. Estadísticamente no existieron diferencias significativas ($p > 0,05$) en las muestras irradiadas dentro de cada día, excepto en la muestra I3 del cuarto día, donde se observó un incremento de 21 % en la inhibición de radicales DPPH respecto del valor obtenido para el control.

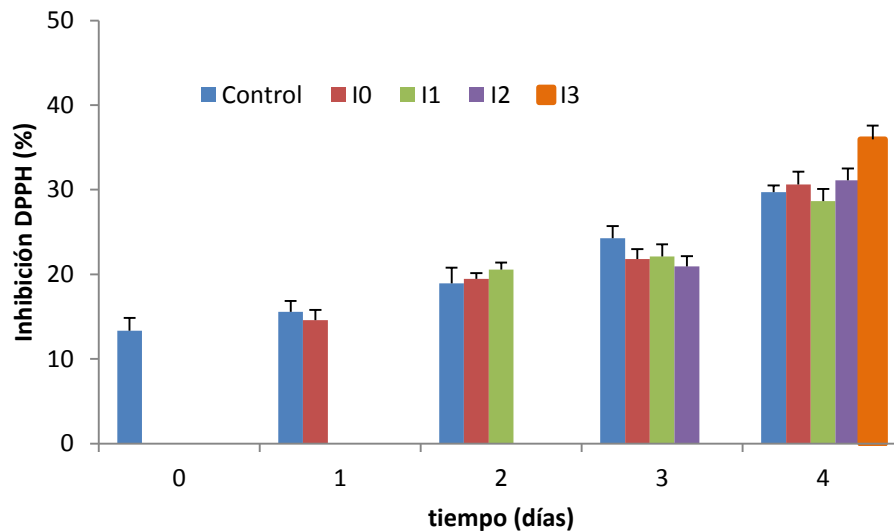


Figura 3.45. Inhibición de radicales DPPH para los diferentes estadios irradiados con luz UV-C (26,7 kJ/m²).

Este resultado confirma por un lado que la irradiación de una dosis de luz UV-C sobre semillas o brotes previos al desprendimiento de las cubiertas seminales no tiene efecto sobre la inhibición de

radicales DPPH. Además se confirmó que la irradiación de dicha dosis no tuvo efecto residual en la inducción de una respuesta antioxidante cuando la exposición se realizó en un estadio temprano y posterior incubación de la muestra.

III.5.3. Integración de los resultados de irradiación UV-C durante la germinación de semillas de quinoa

La Figura 3.46 presenta el análisis de componentes principales aplicado a los resultados obtenidos en el proceso de irradiación UV-C durante la germinación de las semillas de quinoa. En este caso los dos primeros componentes explicaron el 98,6 % de la varianza total, donde el componente 1 explicó el 94,5 % de los datos originales.

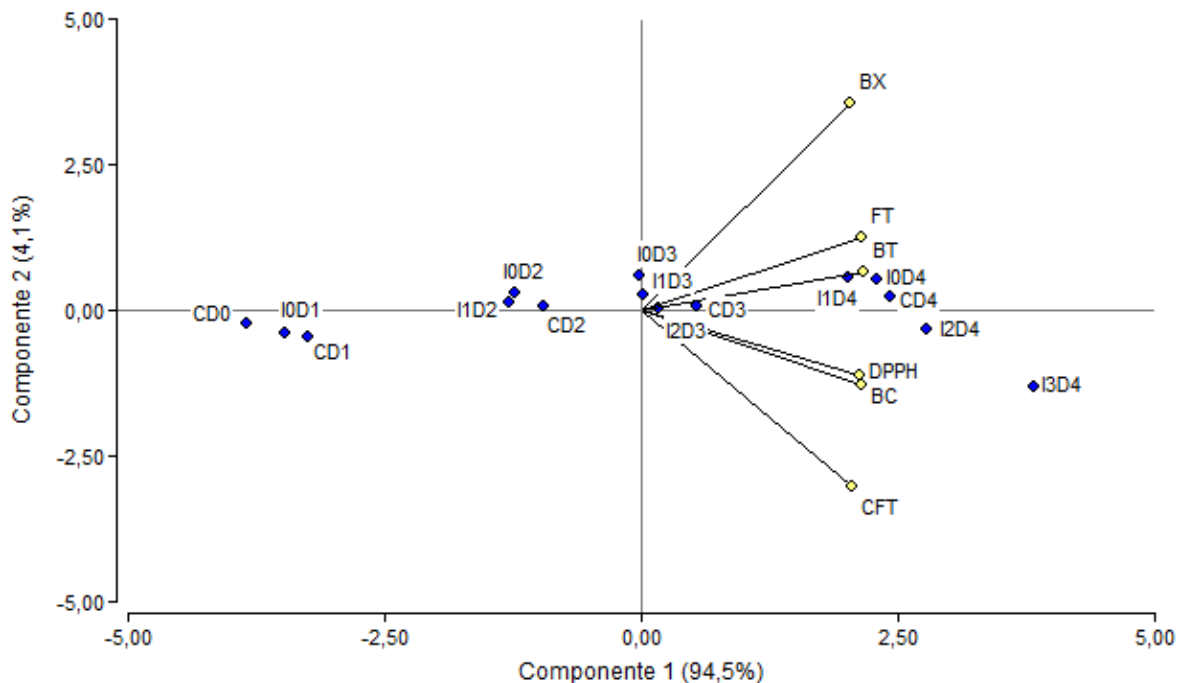


Figura 3.46. Análisis de componentes principales correspondiente a ensayos de irradiación de semillas de quinoa con luz UV en diferentes estadios de germinación.

De esta manera, se pudo observar que todas las variables analizadas guardaron relación con la actividad antioxidante debido a los valores de peso similares sobre este componente. El

componente 2 puede explicar la contribución relativa de cada tipo de compuesto analizado sobre la inhibición de radicales DPPH y poder reductor. De esta manera se observó que las betacianinas acumuladas en los brotes contribuyeron en mayor medida a la inhibición de radicales DPPH con un aporte importante de los CFT. Por otro lado, observando la ubicación de los ensayos sobre los ejes se puede deducir que en cada estadio de germinación las muestras obtuvieron valores de peso similares sobre la componente 1, siendo esta diferencia mayor en el cuarto día, donde la muestra I3D4 adquiere el mayor peso sobre esta componente mostrando su asociación con las variables de actividad antioxidante, betacianinas y CFT.

III.5.4. Conclusiones

Los resultados obtenidos en esta quinta parte del capítulo han mostraron en primera instancia que la aplicación de una dosis de radiación UV-C de $26,7 \text{ kJ/m}^2$ produjo un efecto positivo significativo sobre la acumulación de compuestos fenólicos e incrementó la actividad antioxidante en brotes del tercer estadio de germinación, no observando tal efecto en el caso de semillas de quinoa remojadas y posteriormente germinadas.

La aplicación posterior de la misma dosis de exposición UV-C en los diferentes estadios de germinación y posterior incubación de los brotes mostró que la irradiación UV-C tuvo un efecto sobre la acumulación de compuestos fenólicos totales y pigmentos betalámicos (principalmente betacianinas) sólo durante la irradiación del estadio de germinación más avanzado, mientras que no se observó tal efecto en el nivel de compuestos flavonoides para ningún estadio de germinación irradiado. Los incrementos mencionados en tales compuestos antioxidantes se correspondieron con un incremento significativo de la actividad antioxidante para el mismo estadio de germinación. De esta manera, la combinación del proceso de germinación con la posterior aplicación de una dosis de radiación UV-C mostró cierta efectividad para mejorar el

contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de semillas de quinoa en comparación a considerar sólo el proceso de germinación de las semillas.

III.6. Comparación de los procesos aplicados

Para determinar cuál de los procesos aplicados en el presente trabajo resultó más eficiente con el fin de mejorar las propiedades antioxidantes de semillas de quinoa, se realizó una comparación entre los resultados de variables comunes obtenidos a partir de una serie de ensayos seleccionados. En la Figura 3.47 se presentan los valores obtenidos de concentraciones de CFT, FT y actividad antioxidante correspondientes a los siguientes ensayos: control (semillas sin procesar), tratamiento térmico (100, 145 y 190 °C por 30 minutos, respectivamente), germinación (3 días bajo condiciones óptimas), proceso combinado de germinación e irradiación UV-C (brotes de cuatro días irradiados con una dosis de 26,7 kJ/m² durante el tercer día de germinación) y finalmente proceso combinado de germinación y tratamiento térmico (brotes de tres días deshidratados molidos con posterior tratamiento térmico a 100, 145 y 190 °C durante 30 min, respectivamente). La línea verde horizontal indica el nivel de inhibición de radicales DPPH obtenido para el control y permite comparar el efecto que causó cada proceso sobre dicha variable.

Dentro de cada serie de ensayos correspondientes a la aplicación de los procesos de tratamiento térmico, germinación, germinación + irradiación UV-C y germinación + tratamiento térmico, los máximos incrementos alcanzados respecto al control sobre los valores de actividad antioxidante fueron: 141 %, 101 %, 164 % y 420 %, respectivamente. De esta manera, la aplicación del proceso combinado germinación + tratamiento térmico a 145 °C durante 30 min condujo al mayor incremento de actividad antioxidante, como así también del contenido de CFT en semillas de quinoa.

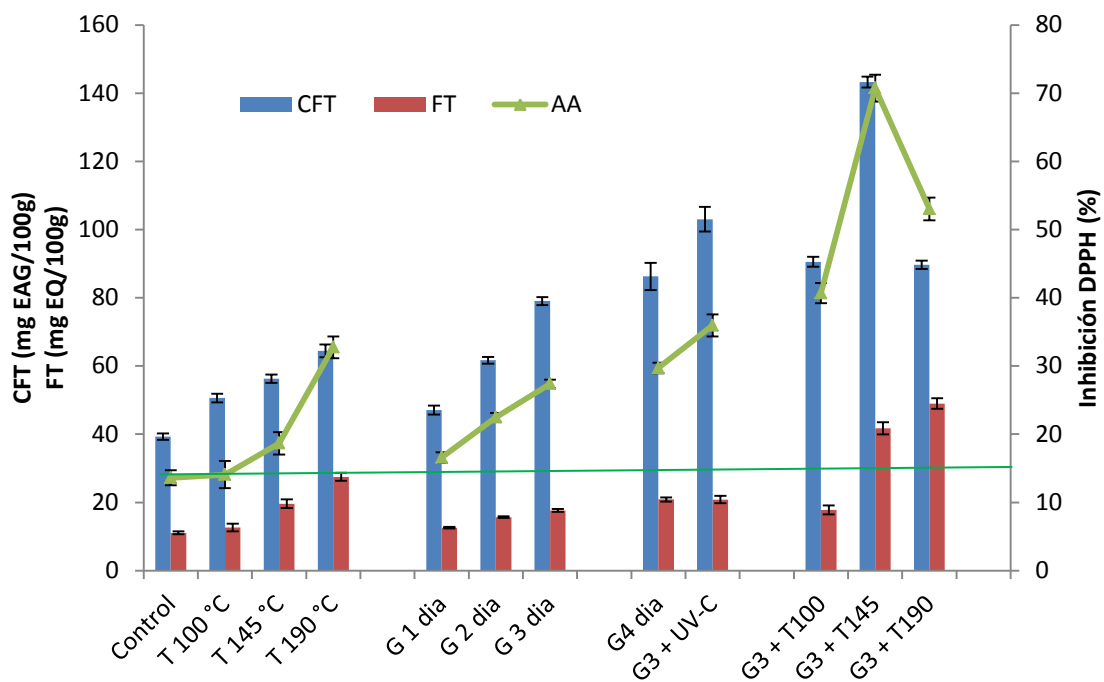


Figura 3.47. Contenidos de CFT, FT y AA luego de la aplicación de procesos seleccionados a semillas de quinoa.

III.7. Elaboración de tapas de alfajores de almidón de maíz enriquecidas en compuestos antioxidantes

De acuerdo a los resultados presentados en el apartado anterior, el ingrediente obtenido luego de la aplicación del proceso combinado de germinación y posterior tratamiento térmico a 145 °C durante 30 min a partir de semillas de quinoa, fue seleccionado para formular un producto alimenticio rico en compuesto antioxidantes y con potenciales propiedades funcionales. Con este propósito se realizaron ensayos tendientes a la obtención de una formulación óptima de tapas de alfajores de almidón de maíz, sustituyendo distintas proporciones de la materia prima básica de este producto por el ingrediente de quinoa (IQ) seleccionado. La Figura 3.48 muestra los productos

elaborados con 10, 20 y 30 % de IQ así como el producto control formulado con 100 % de almidón de maíz.

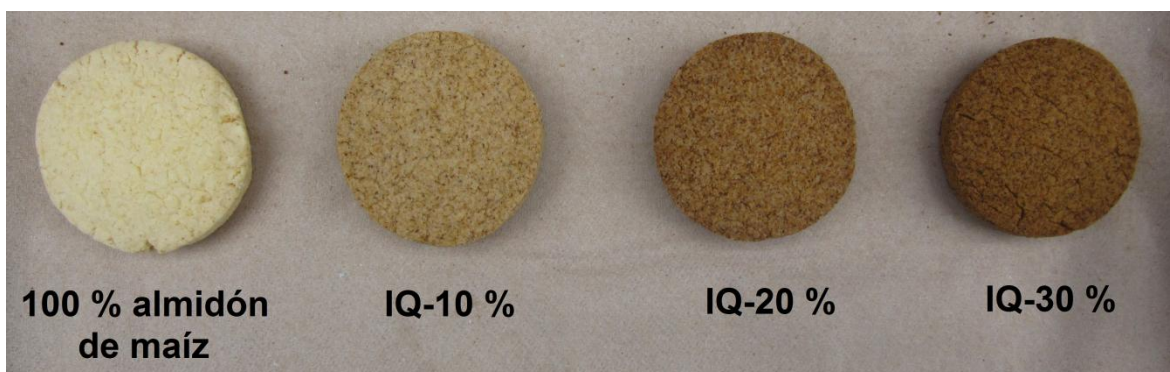


Figura 3.48. Aspecto de las tapas de alfajores elaboradas con 100 % de almidón de maíz y reemplazo del mismo en 10, 20 y 30 % por el IQ.

III.7.1. Caracterización composicional de los productos formulados

La Tabla 3.24 presenta la composición centesimal de las tapas de alfajores de almidón de maíz elaboradas según las distintas formulaciones ensayadas como así también la correspondiente al IQ y al producto control sin agregado de IQ. El reemplazo de almidón de maíz en un 10, 20 o 30 % por el IQ propuesto no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre las formulaciones ni en comparación al control para los contenidos de grasas totales, cenizas y carbohidratos. Respecto al contenido de proteínas se observó un incremento gradual a medida que se incorporó una mayor cantidad del IQ en las diferentes formulaciones de tapas de alfajores. Este aumento fue notorio debido a que en la formulación control no se utilizaron ingredientes que aporten cantidades importantes de proteína en el producto final y por lo tanto la adición de un ingrediente con buen aporte proteico (como el utilizado en este caso) produce aumentos claramente visibles.

Tabla 3.24. Composición centesimal del ingrediente de quinoa utilizado y las diferentes formulaciones de tapas de alfajores ensayadas.

	Ingrediente de Quinoa (% b.s.)	Formulaciones de tapas de alfajores (% b.s.)			
		100 % almidón de maíz	IQ-10 %	IQ-20 %	IQ-30 %
Materia seca	95,64 ± 1,83	94,87 ± 0,46 ^a	94,59 ± 0,52 ^a	95,81 ± 0,77 ^a	95,83 ± 0,83 ^a
Proteínas	15,60 ± 0,32	2,78 ± 0,35 ^a	3,50 ± 0,27 ^{a,b}	4,36 ± 0,21 ^{b,c}	5,11 ± 0,22 ^c
Grasas totales	4,49 ± 0,28	28,78 ± 0,48 ^a	28,81 ± 0,57 ^a	28,85 ± 0,46 ^a	29,15 ± 0,53 ^a
Fibra dietaria	14,9 ± 0,76	2,43 ± 0,35 ^a	3,92 ± 0,38 ^{a,b}	5,84 ± 0,42 ^{b,c}	7,04 ± 0,61 ^c
Cenizas	3,30 ± 0,11	0,33 ± 0,06 ^a	0,46 ± 0,08 ^a	0,65 ± 0,11 ^a	0,74 ± 0,09 ^a
Carbohidratos*	61,71 ± 1,34	65,68 ± 1,80 ^a	63,31 ± 1,99 ^a	60,30 ± 1,87 ^a	57,96 ± 2,62 ^a

Valores expresados como promedio ± D.E. (n=2). Los valores dentro de una misma fila con diferente letra son significativamente diferentes (p < 0,05).

*Calculados por diferencia.

En los últimos años se han publicado varios trabajos de investigación que han evaluado las semillas de quinoa o fracciones de las mismas para su incorporación en la formulación de diversos productos, generalmente con el objetivo de mejorar sus características nutricionales. En este sentido, Alvarez-Jubete y col., (2009) evaluaron las harinas de amaranto, quinoa y trigo sarraceno como potenciales ingredientes saludables para mejorar la calidad nutricional de panes libres de gluten. Los panes resultantes mostraron mayores contenidos de proteína, grasa, fibra y minerales en comparación a un control elaborado con harina de arroz y almidón de papa, concluyendo que las semillas evaluadas representan una alternativa saludable a los ingredientes utilizados frecuentemente en este tipo de productos. De manera similar, Hager y col. (2012) investigaron la composición nutricional de siete harinas comerciales libres de gluten (avena, arroz, sorgo, maíz, tef (*Eragrostis tef*), trigo sarraceno y quinoa y las compararon con la de trigo, concluyendo que

particularmente las harinas de quinoa y de tef fueron las de mayor valor nutricional, por lo que fueron propuestas como materias primas de elección para la producción de alimentos libres de gluten. Así, Stikic y col., (2012) ensayaron el agregado de 10, 15 y 20 % de semillas de quinoa enteras en formulaciones de panes elaborados con harina de trigo, observando un incremento en el contenido proteico además de mejorar las características sensoriales y las propiedades reológicas del producto final. En otro trabajo, Schumacher y col. (2010) desarrollaron un producto a base de chocolate negro con la adición de diferentes proporciones de semillas de quinoa tostadas (100 °C, 3 h) con la intención de incrementar el contenido proteico del mismo. Los autores hallaron que el producto obtenido resultó con una alta aceptación sensorial y, en comparación a un control sin el agregado de semillas, se incrementó el contenido de proteínas, aminoácidos esenciales y vitamina E. La harina de quinoa se ha utilizado también para reemplazar o sustituir parte de la sémola de trigo en la producción de pastas secas (Mastromatteo y col., 2012). En este caso los autores afirmaron que aunque las propiedades reológicas de las masas en las diferentes mezclas fueron adecuadas para el proceso de elaboración, la cantidad de harina que puede ser agregada en la formulación depende en gran medida del grado de satisfacción de los parámetros sensoriales evaluados. Conclusiones similares fueron mencionadas por Föste y col. (2014), cuyo trabajo evaluó la adición de 10, 20, 30, 40 y 80 % de salvado de quinoa en formulaciones de panes libres de gluten. En este caso, la evaluación sensorial del producto final indicó que el agregado de 40 % de salvado de quinoa intensificó notoriamente el sabor amargo y generó un *off-flavor* que afectó negativamente la aceptabilidad global del producto, por lo que se decidió utilizar menores cantidades de dicho ingrediente para mejorar la calidad sensorial de las galletas. De manera similar Rosell y col., (2009) evaluaron la sustitución de harina de trigo en niveles de 12,5 a 100 % por harina de quinoa en la elaboración de panes. Los autores concluyeron

que sensorialmente fueron aceptables aquellos panes que incorporaron hasta un 25 % de harina de quinoa.

En el presente trabajo, y únicamente a modo de test sensorial general y preliminar, se le pidió a un grupo de voluntarios (n = 19) que determinen sensorialmente aquella formulación de tapa de alfajor (codificada) que era de su preferencia. El 63 % de los panelistas eligió la formulación IQ-20 % como de mayor preferencia, mientras que para el 37 % restante fue la formulación IQ-10 %. La principal causa de no aceptación de una formulación con mayor proporción de IQ, fue la intensidad del sabor amargo que impartió este ingrediente al producto final, en comparación a un control. Estos resultados sensoriales preliminares concuerdan entonces con los mencionados anteriormente por otros autores, estableciendo que la cantidad máxima de un ingrediente de quinoa que puede ser incluida en la formulación de un producto alimenticio, depende en gran medida del grado de aceptación de los parámetros sensoriales del mismo.

III.7.2. Contenido de CFT, FT, AA y melanoidinas en el producto elaborado

En la Tabla 3.25 se presentan los niveles de CFT, FT, AA y melanoidinas correspondientes a cada una de las diferentes formulaciones de tapas de alfajores elaboradas reemplazando 10, 20 y 30 % de almidón de maíz por el ingrediente seleccionado de quinoa o por harina de quinoa sin procesar. En la misma tabla también se incluyen los valores correspondientes a un ensayo control de tapas de alfajores elaboradas con 100 % de almidón de maíz., De acuerdo a los resultados de CFT y FT se observó que a medida que se incrementó la cantidad de IQ en la formulación se incrementó significativamente el contenido de compuestos fenólicos. A su vez cada reemplazo porcentual de IQ en la formulación base fue superior a su respectivo control elaborado con harina de quinoa sin procesar. Una comparación entre los niveles de CFT y FT observados en las diferentes formulaciones con los valores esperados (calculados usando la aproximación que el IQ es el único

ingrediente que contribuye al aporte de compuestos fenólicos) sugiere que pudo haber ocurrido algún tipo de degradación de estos compuestos durante el horneado.

Respecto a la actividad antioxidante se observó que el incremento del IQ en la formulación de las tapas de alfajores incrementó paulatinamente la inhibición del radical DPPH aunque experimentalmente no existieron diferencias significativas entre IQ-20 % y IQ-30 % ($p > 0,05$). De manera similar a lo que sucedió con los compuestos fenólicos, cada reemplazo de IQ en la formulación mostró valores de actividad antioxidante superiores a sus respectivos controles elaborados con harina de quinoa. El contenido de melanoidinas en las diferentes formulaciones se evaluó para estimar el grado de formación de las mismas durante la etapa de horneado. De esta manera se observó que la elaboración de las tapas de alfajores con almidón de maíz o su reemplazo por 10 % del IQ o hasta 30 % de harina de quinoa no mostró diferencias estadísticas significativas en los niveles de melanoidinas formadas. Sin embargo el agregado del IQ en un 20 % o 30 % en la formulación realizó un aporte de melanoidinas que fue estadísticamente significativo en comparación a las formulaciones mencionadas anteriormente.

La Tabla 3.25. Niveles de CFT, FT, AA y melanoidinas formadas en las diferentes formulaciones de productos elaboradas.

	CFT (mg EAG/100g)	FT (mg EQ/100g)	TEAC DPPH (μmol Trolox/100g)	Melanoidinas (Abs 420 nm)
100 % almidón de maíz	12,53 \pm 0,7 a	0,35 \pm 0,1 a	237,9 \pm 14,5 a	0,02 \pm 0,00 a
IQ-10 %	23,64 \pm 1,0 c	3,44 \pm 0,3 c	369,3 \pm 12,2 b	0,06 \pm 0,00 a
IQ-20 %	37,68 \pm 1,5 d	7,86 \pm 0,4 d	531,5 \pm 24,6 c	0,16 \pm 0,01 b
IQ-30 %	45,51 \pm 1,4 e	10,51 \pm 0,7 e	619,1 \pm 19,0 c	0,19 \pm 0,02 b
Control Q-10 %	14,67 \pm 0,9 a,b	1,30 \pm 0,3 a,b	251,0 \pm 11,7 a	0,02 \pm 0,00 a
Control Q-20 %	19,42 \pm 1,1 b,c	2,27 \pm 0,3 a,b,c	286,1 \pm 10,6 a,b	0,02 \pm 0,00 a
Control Q-30 %	20,38 \pm 1,4 b,c	3,04 \pm 0,2 b,c	316,8 \pm 18,9 a,b	0,03 \pm 0,00 a

Valores expresados como promedio \pm D.E. (n=3), en base seca. Los valores dentro de una misma columna con diferente letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Aunque las características sensoriales y propiedades químicas, reológicas y nutricionales de varios productos alimentarios elaborados con quinoa han sido investigados, el número de trabajos que consideran la actividad antioxidante es más limitado y por tanto difícil de comparar con los resultados obtenidos en el presente estudio. A modo orientativo se pueden mencionar algunos trabajos que evaluaron actividad antioxidante en panes utilizando harina de quinoa en mezclas con harinas de otras especies vegetales. Por ejemplo Chlopicka y col., (2012) reemplazaron 15 % y 30 % de harina de trigo por harina de quinoa en la formulación. De manera similar a los resultados obtenidos en el presente trabajo, los autores observaron incrementos en los contenidos de CFT y FT a medida que aumentaron el contenido de harina de quinoa, sin embargo, no observaron una correspondencia sobre la actividad antioxidante (evaluada como inhibición del radical DPPH) en los panes obtenidos. Aunque el incremento de un 15 % a un 30 % de harina de quinoa incrementó la actividad antioxidante, ambos valores fueron inferiores al obtenido para el control elaborado 100 % con harina de trigo. Los autores atribuyeron este hecho a la pérdida cuantitativa y cualitativa de compuestos con actividad antioxidante que se encontraban presentes en la harina y se redujeron durante el proceso de horneado. De manera similar, Alvarez-Jubete y col., (2010) elaboraron panes utilizando una mezcla de harina de quinoa y harina de arroz (relación 1:1) o 100 % con harina de quinoa. Dichas formulaciones fueron comparadas de acuerdo al contenido de CFT y actividad antioxidante a un pan control libre de gluten (elaborado con harina de arroz y almidón de papa) y otro pan control elaborado con harina de trigo. De acuerdo a sus resultados, el contenido de CFT y AA (medida como inhibición de radicales DPPH) mostraron correlación positiva, disminuyendo el nivel de ambas variables en el orden: pan elaborado con 100 % harina de quinoa > 50 % quinoa \geq control 100 % harina de trigo > control libre de gluten.

III.7.3. Conclusiones

Atendiendo al último objetivo del proyecto, en esta sexta parte del capítulo se propuso la aplicación del ingrediente de quinoa (IQ) seleccionado por sus propiedades antioxidantes en la formulación de un producto alimenticio libre de gluten. Las tapas de alfajores elaboradas reemplazando 10, 20 y 30 % de almidón de maíz por el IQ propuesto, mostraron incrementos significativos en el contenido de proteínas de manera proporcional a la cantidad de IQ incorporado en la correspondiente formulación, mientras que el resto de los parámetros de composición no mostraron diferencias significativas con el producto control. Por otro lado, a medida que se incrementó la cantidad de IQ en la formulación, también se incrementó significativamente el contenido de compuestos fenólicos (CFT y FT) en el producto final, aunque en niveles menores al esperado. Respecto a la actividad antioxidante, se observó que el incremento del IQ en la formulación incrementó la capacidad de inhibición del radical DPPH en los productos resultantes, aunque no existieron diferencias significativas para los productos elaborados con 20 % y 30 % de IQ, sugiriendo la ocurrencia de degradación de compuestos con actividad antioxidante durante el horneado. Finalmente, un ensayo sensorial realizado con voluntarios indicó una preferencia general hacia el producto que incorporó 20 % de IQ, demostrando que aunque este ingrediente podría ser incluido en mayores proporciones en la formulación del producto, un factor que debe considerarse como limitante en la cantidad máxima de IQ a utilizar es el grado de satisfacción que se alcanza en los parámetros normalmente evaluados en ensayos sensoriales.

Capítulo IV. CONCLUSIONES GENERALES

El presente trabajo de tesis aporta conocimientos básicos y tecnológicos sobre el efecto de la aplicación de diferentes procesos sobre el perfil de compuestos bioactivos antioxidantes en productos obtenidos a partir de semillas de quinoa. Estos conocimientos permiten la selección de potenciales procesos y de sus condiciones óptimas para obtener materias primas vegetales con propiedades antioxidantes mejoradas.

Los antioxidantes naturales se presentan como ingredientes de gran interés en la industria alimentaria debido a sus potenciales aplicaciones tecnológicas sumadas a las posibles actividades biológicas que presentan. Entre las diversas fuentes de antioxidantes naturales disponibles, el grano de quinoa, además de presentar un elevado valor nutricional, es una especie rica en compuestos fenólicos poco estudiada en este sentido. De esta manera, los resultados obtenidos en el presente estudio permiten considerar esta especie vegetal, de potencial interés regional, como alternativa para la elaboración de alimentos, que además de nutritivos, aporten compuestos con capacidad antioxidante.

El estudio de los efectos de los principales parámetros operatorios permitió identificar aquellos que más influyeron sobre el proceso de extracción de compuestos fenólicos antioxidantes a partir de la quinoa y por lo tanto reducir el número de parámetros a ser optimizados. Los efectos positivos del incremento de etanol en el solvente y el aumento de la temperatura sobre el rendimiento de extracción quedaron demostrados. Por su parte, en las condiciones estudiadas, la asistencia de ultrasonido no fue apropiada para mejorar el rendimiento de extracción de los compuestos fenólicos.

Los resultados obtenidos en el proceso de germinación mostraron en primera instancia las condiciones experimentales de germinación que permitieron obtener el mayor número de semillas germinadas en el menor tiempo. Bajo estas condiciones, los brotes en los diferentes estadios

mostraron un incremento progresivo en el contenido de compuestos antioxidantes (debido a biosíntesis o liberación enzimática de estos compuestos) que se tradujeron en incrementos sobre los niveles de actividad antioxidante hasta el fin del proceso de germinación.

Los resultados de los estudios de tratamientos térmicos a diferentes condiciones de tiempo/temperatura aplicados sobre semillas mostraron que los mayores incrementos en los niveles de actividad antioxidante y compuestos que contribuyeron a la misma se alcanzaron utilizando temperaturas entre 160°C y 190 °C durante 30 a 60 min. En este caso, la actividad antioxidante observada en las diferentes condiciones dependió del balance resultante de la degradación térmica de los antioxidantes naturales y la formación de nuevos compuestos con capacidad antioxidante en las muestras. Por su parte, en la combinación de procesos (germinado / tratamiento térmico) se alcanzaron valores superiores en todas las respuestas evaluadas utilizando menores temperaturas. De esta manera, la combinación de procesos resultó ser una alternativa más eficiente para mejorar la capacidad antioxidante de las semillas de quinoa con respecto a la aplicación de los procesos por separado, a la vez que permitió reducir el consumo energético durante el proceso térmico.

Los estudios de irradiación UV-C mostraron que la aplicación de una dosis adecuada de radiación produjo la acumulación de compuestos fenólicos y pigmentos betalámicos que incrementaron la actividad antioxidante de los brotes correspondientes al último estadio de germinación ensayado, no observándose tal efecto sobre brotes de estadios anteriores ni sobre semillas.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los diferentes procesos aplicados se seleccionó la combinación del proceso de germinación y posterior tratamiento térmico (145 °C, 30 min) para obtener un ingrediente a partir del grano de quinoa que fue utilizado para la formulación de tapas de alfajores de almidón de maíz libres de gluten. Como resultado, el producto final mostró un

incremento en el contenido proteico y una mejora de las propiedades antioxidantes con respecto al producto elaborado sin el ingrediente. Sin embargo, aunque el ingrediente seleccionado tiene el potencial de ser incorporado en mayor proporción en la formulación del producto, la máxima cantidad a ser utilizado queda limitada por el grado de aceptación sensorial por parte de los consumidores.

Capítulo V. REFERENCIAS

-
- Acar, O. C., Gökmen, V., Pellegrini, N., Fogliano, V. (2009). Direct evaluation of the total antioxidant capacity of raw and roasted pulses, nuts and seeds. *European Food Research Technology*, 229, 961-969.
- Adlercreutz, H., Mazur, W. (1997). Phyto-oestrogens and Western diseases. *Annals of Medicine*, 29, 95-120.
- Adom, K.K., Liu, R.H. (2002). Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (21), 6182-6187.
- Ahamed, N.T., Singhal, R.S., Kulkarni, P.R. Mohinder, P. (1998). A lesser-known grain, *Chenopodium quinoa*: review of the chemical composition of its edible parts. *Food and Nutrition Bulletin*, 19, 61-70.
- Ahmed, M.U., Thorpe, S.R., Baynes, J.W. (1986). Identification of N epsilon-carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *Journal of Biological Chemistry*, 261, 4889-4894.
- Alamprese, C., Ratti, S., Rossi, M. (2009). Effects of roasting conditions on hazelnut characteristics in a two-step process. *Journal of Food Engineering*, 95, 272-279.
- Alonso, R., Aguirre, A., Marzo, F. (2000). Effects of extrusion and traditional processing methods on antinutrients and in vitro digestibility of protein and starch in faba and kidney beans. *Food Chemistry*, 68, 159-165.
- Alvarez-Jubete, L., Arendt, E.K., Gallagher, E. (2009). Nutritive value and chemical composition of pseudocereals as gluten-free ingredients. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60, 240-257.
- Alvarez-Jubete, L., Wijngaard, H., Arendt, E., Gallagher, E. (2010). Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa, buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking. *Food Chemistry* 119, 770-778.
- Amaral, J., Casal, S., Seabra, R., Olivera, B. (2006). Effects of Roasting on Hazelnut Lipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35, 1315-1321.
- Ames, B. N. (1983). Dietary carcinogens and anticarcinogens oxygen radicals and degenerative diseases. *Science*, 221, 1256-1262.
- Ames, J.M. (2001). Melanoidins as pro- or antioxidants. *Cerevisia*, 26, 210-216.
- Ameur, L.A., Trystram, G., Birlouez-Aragon, I. (2006). Accumulation of 5-hydroxymethyl-2-furfural in cookies during the backing process: Validation of an extraction method. *Food Chemistry*, 98, 790-796.

- Andarwulan, N., Fardiaz, D., Wattimena, G. A. y Shetty, K. (1999). Antioxidant activity associated with lipid and phenolic mobilization during seed germination of *Pangium edule* Reinw. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3158-3163.
- Ando, H., Chen, Y., Tang, H., Shimizu, M., Watanabe, K., Miysunaga, T. (2002). Food components in fractions of quinoa seed. *Food Science Technology Research*, 8, 80-84.
- Anese, M., Manzocco, L., Nicoli, M.C., Lericci, C.R. (1999). Antioxidant properties of tomato juice as affected by heating. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 750-754.
- Antognoni, F., Zheng, S., Pagnucco, C., Baraldi, R., Poli, F., Biond, S. (2007) Induction of flavonoid production by UV-B radiation in *Passiflora quadrangularis* callus cultures. *Fitoterapia*, 78, 345-352.
- AOAC (1990). Official methods of analysis, 15th ed. AOAC International, Gaithersburg, USA.
- AOCS (1998). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. AOCS Press, Champaign, USA.
- Arai, S. (1996). Studies on functional foods in Japan. State of the art. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 60, 9-15.
- Arts, I.C., Van De Putte, B., Hollman, P.C. (2000). Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 2. Tea, wine, fruit juices, and chocolate milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1752-1757.
- Ashwell, M. (2005). Conceptos sobre Alimentos Funcionales. ILSI Europe. Concise Monograph Series, ILSI Press. ISBN 1-57881-157-0.
- Atten, M.J., Godoy-Romero, E., Attar, B.M., Milson, T., Zopel, M., Holian, O. (2005). Resveratrol regulates cellular PKC alpha and delta to inhibit growth and induce apoptosis in gastric cancer cells. *Investigational New Drugs*, 23, 111-119.
- Azizah, A. H., Nik Ruslawati, N. M. y Swee Tee, T. (1999). Extraction and characterization of antioxidant from cocoa by-products. *Food Chemistry*, 64, 199-202.
- Bacigalupo, A. y Tapia, M. (1990). Potencial agroindustrial de los cultivos andinos subexplotados. En: Tapia M. (ed.). *Cultivos Andinos subexplotados y su aporte a la alimentación*. FAO. Ediciones Gegra S.A. Santiago, Chile. pp. 136-163.
- Balouchi, H.R., Sanavy, S.A.M.M., Emam, Y., Dolatabadian, A. (2009). UV radiation, elevated CO₂ and water stress effect on growth and photosynthetic characteristics in durum wheat. *Plant, Soil and Environment*, 55, 443-453.
- Barceló, J., Nicolás, G., Sabater, B., Sánchez, R. (2001). Maduración y germinación de las semillas. En: *Fisiología Vegetal*, Luca de Tena, J.I. (Ed.), Ediciones Pirámide, España, 477-503.

- Bas, D. y Boyaci, I.H. (2007). Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78, 836–845.
- Bates, L. (1994). Dry heat processing of full-fat soybeans and other ingredients. Technical Bulletin. American Soybean Association. Singapore. pp: 1-5.
- Bau, H.M., Villaume, C., Nicolas, J.P., Méjean, L. (1997). Effect of germination on chemical composition, biochemical constituents and antinutritional factors of soya bean (*Glycine max*) seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 73, 1-9.
- Bazykina, N.I., Nikolaevskii, A.N., Filippenko, T.A., Kaloerova, V.G. (2002). Optimization of conditions for the extraction of natural antioxidants from raw plant materials. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 36, 100-103.
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
- Benzing-Purdie, L.M., Ripmeester, J.A., Ratcliffe, C.I. (1985). Effects of Temperature on Maillard Reaction Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33, 31-33.
- Berker, K.I., Güçlü, K., Tor, I., Demirata, B. Apak, R. (2010). Total Antioxidant Capacity Assay Using Optimized Ferricyanide/Prussian Blue Method. *Food Analytical Methods*, 3, 154-168.
- Beta, T., Rooney, L.W. Marovatsanga, L.T., Taylor, J.R.N. (1999). Phenolic compounds and kernel characteristics of Zimbabwean sorghum. *Journal of the Science of food and Agriculture*, 79, 1003-1010.
- Beutner, S., Bloedorn, B., Hoffmann, T., Martin, H.D. (2000). Synthetic singlet oxygen quenchers. *Methods in Enzymology*, 319, 226–241.
- Bewley, J.D. (1997). Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*. American Society of Plant Physiologists, 9, 1055-1066.
- Bhargava, A., Shukla, S., Ohri, D. (2006). *Chenopodium quinoa*—An Indian perspective. *Industrial Crops and Products* 23, 73–87.
- Birlouez-Aragon, I., Saavedra, G., Tessier, F.J., Galinier, A., Ait-Ameur, L., Lacoste, F. (2010). A diet based on high-heat-treated foods promotes risk factors for diabetes mellitus and cardiovascular diseases. *American Journal of Clinical Nutrition*, 91, 1220–1226.
- Blunden, G., Culling, C., Jewers, K. (1975). Steroidal saponins: a review of actual and potential plant sources. *Tropical Science*, 17, 139–154.
- Boateng, J., Verghese, M., Walker, L.T., Ogotu, S. (2008). Effect of processing on antioxidant contents in selected dry beans (*Phaseolus spp.* L.). *LWT Food Science and Technology*, 41, 1541-1547.

- Bocco, A., Cuvelier, M. E., Richard, H. y Berset, C. (1998). Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2123-2129.
- Boeing, J.S., Oliveira Barizão, E., Costa e Silva, B., Fernandes Montanher, P., de Cinque Almeida, V., Vergilio Visentainer, J. (2014). Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. *Chemistry Central Journal*, 8, 48-57.
- Boero, C., González, J.A, Prado, F.E. (2000). Germinación de diferentes variedades de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) bajo distintas condiciones de salinidad y pH. En: *Cultivos andinos subexplotados y su aporte a la alimentación*. FAO, (Roma).
- Bois, J.F., Winkel, T., Lhomme, J.P., Raffailac, J.P., Rocheteau, A. (2006). Response of some Andean cultivars of quinoa *Chenopodium quinoa* Willd. to temperature: effects on germination, phenology, growth and freezing. *European Journal of Agronomy*, 25, 299-308.
- Bolton, J.R. (2001). *Ultraviolet Application Handbook*. Bolton Photosciences Inc., J.R. Bolton (ed.), Ontario, Canadá.
- Bonilla, F., Mayen, M., Merida, J., Medina, M. (1999). Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. *Food Chemistry*, 66, 209-215.
- Borrelli, R.C., Fogliano, V. (2005). Bread crust melanoidins as potential prebiotic ingredients. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49, 673–678.
- Boveris, A. D., Galatro, A., Sambrotta, L., Ricco, R., Gurni, A. A., Puntarulo, S. (2001). Antioxidant capacity of a 3-deoxyanthocyanidin from soybean. *Phytochemistry*, 58, 1097-1105.
- Bradford, K.J. (1995). Water relations in seed germination. En: Kigel, J. y Galili, G. (Editores). *Seed development and germination*, 352-396- Marcell Dekker Inc., New York.
- Brady, K., Ho, C., Rosen, R., Sang, S. Karwe, M. (2007). Effects of processing on the nutraceutical profile of quinoa. *Food Chemistry*, 100, 1209–1216.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28, 25-30.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56, 317-333.
- Bravo, L., Saura-Calixto, F. (1998). Characterization of dietary fiber and the in vitro indigestible fraction of grape pomace. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49, 135-141.
- Brockington, S.F., Walker, R.H., Glover, B.J., Soltis, P.S., Soltis, D.E. (2011). Complex pigment evolution in the Caryophyllales. *New Phytologist*, 190, 854-864.

- Brown J.E., Cheynier, V., Clifford, M. (2006). *Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications*. Andersen, O.M., Markham, K.R. (Eds). CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton (EE.UU.).
- Brown, J. E.; Khodr, H.; Hider, R. C.; Rice-Evans, C. (1998). Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. *Biochemical Journal*, 330, 1173-1178.
- Bucala, R., Makita, Z., Vega, G., Grundy, S., Koschinsky, T., Cerami, A. (1994). Modification of low density lipoprotein by advanced glycation end products contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91, 9441–9445.
- Bucic-Kojic, A., Planinic, M., Tomas, S., Bilic, M., Velic, D. (2007). Study of solid liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*, 81, 236-242.
- Buettner, G. R., Jurkiewicz, B. A. (1996). Chemistry and biochemistry of ascorbic acid. En: Cadenas, E., Packer, L., editores. *Handbook of antioxidants*. New York: Marcel Dekker: 91–115.
- Cabello, M., Ruiz, T., Devesa, J.A. (1998). Ensayos de germinación en endemismos ibéricos. *Acta Botanica Malacitana*, 23, 59-69.
- Cai, Y., Sun, M., Corke, H. (2003). Antioxidant activity of betalains from plants of the *Amaranthaceae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2288-2294.
- Caldwell, M.M, Flint, S.D. (1997). Uses of biological spectral weighting functions and the need of scaling for the ozone reduction problem. *Plant Ecology*, 128, 66-76.
- Cantos, E., garcía-Viguera, C., Pascual-Teresa, S., Tomás-Barberán, F.A. (2000). Effect of Postharvest Ultraviolet Irradiation on Resveratrol and Other Phenolics of Cv. Napoleon Table Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4606-4612.
- Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L. (1997). Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids. Structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*. 22, 749-760.
- Carr, A.C., Frei, B. (2002). Vitamin C and cardiovascular diseases. En: *Handbook of antioxidants*. Cadenas, E., Packer, L. (Eds.), Marcel Dekker, New York, Inc.
- Carrera, C., Ruiz-Rodríguez, A., Palma, M., Barroso, C.G. (2012). Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. *Analytica Chimica Acta*, 732, 100-104.
- Castellanos-Santiago, E., Yahia, E.M. (2008). Identification and quantification of betalains from the fruits of 10 Mexican prickly pear cultivars by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 5758-5764.

-
- Cerny, C. (2008). The aroma side of the Maillard reaction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1126, 66-71.
- Chauhan, G.S., Zillman, R.R., Eskin, N.A.M. (1992). Dough mixing and breadmaking properties of quinoa-wheat flour blends. *International Journal of Food Science and Technology*, 27, 701-705.
- Chemat, F., Zill-E-Huma, Khan, M.K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction, *Ultrasonic Sonochemistry*, 18(4), 813–815.
- Cheng, Z., Su, L., Moore, J., Zhou, K., Luther, M., Yin, J., Yu, L. (2006). Effect of postharvest treatment and heat stress on availability of wheat antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5623-5629.
- Chilo, G; Vacca Molina, M., Carbajal, R., Ochoa, M. (2009). Efecto de la temperatura y salinidad sobre la germinación y crecimiento de plántulas de dos variedades de *Chenopodium quinoa*. *Agriscientia*, 26, 15-22.
- Chio, K.S., Tappel, A.L. (1969). Synthesis and characterization of the fluorescent products derived from malonaldehyde and amino acids. *Biochemistry*, 8, 2821-2827.
- Chlopicka, J., Pasko, P., Gorinstein, S., Jedryas, A., Zagrodzki, P. (2012). Total phenolic and total flavonoid content, antioxidant activity and sensory evaluation of pseudocereal breads. *LWT - Food Science and Technology*, 46, 548-555.
- Chou, H., Kuo, J., Lin, E. (2009). Comparative antioxidant properties of water extracts from different parts of Beefsteak plant (*Perilla frutescens*). *Journal of Food and Drug Analysis*, 17, 489-496.
- Coghe, S., Gheeraert, B., Michiels, A., Delvaux, F.R. (2006). Development of Maillard Reaction Related Characteristics During Malt Roasting. *Journal of the Institute of Brewing*, 112, 148-156.
- Colbach, N., Chauvel, B., Durr, C., Richard, G. (2002). Effect of environmental conditions on *Alopecurus myosuroides* germination. I. Effect of temperature and light. *European Weed Research Society*, 42, 210-221.
- Collins, A.R. (2005). Assays for oxidative stress and antioxidant status: applications to research into the biological effectiveness of polyphenols. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 261-267.
- Corbineau, F. y Côme, D. (1995). Control of seed germination and dormancy by the gaseous environmet. En: *Seed Development and germination*, Kigel, J. y Galili, G. (Editores). pp. 397-424. Marcel Dekker Inc., New York.

- Corsini, M.S., Silva, M.G., Jorge, N. (2009). Loss in tocopherols and oxidative stability during the frying of frozen cassava chips. *Grasas y Aceites*, 60, 77-81.
- Cortell, J.M., Kennedy, J.A. (2006). Effect of shading on accumulation of flavonoid compounds in (*Vitis vinifera* L.) pinot noir fruit and extraction in a model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8510-8520.
- Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K., Van Poel, B., Pieters, L., Ulietnck, A.J., Binghe, D.V. (1998). Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Products*, 61, 71-76.
- Coulter, L. y Lorenz, K. (1990). Quinoa composition, nutritional value, food applications. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 23, 203–207.
- Coward, L., Smith, M., Kirk, M., Barnes, S. (1998). Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68, 1486-1491.
- Crowe, J.H., Hoekstra, F.A., Crowe, L.M. (1992). Anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology*, 54, 579-599.
- Cummings, J. H., Antoine, J.-M., Azpiroz, F., Bourdet-Sicard, R., Brandtzaeg, P., Calder, P. C., Gibson, G. R., Guarner, F., Isolauri, E., Pannemans, D., Shortt, C., Tuijtelaars, S., Watzl, B. (2004). PASSCLAIM - Gut health and immunity. *European Journal of Nutrition*, 43, 118-173.
- Da Porto, C., Porretto, E., Decorti, D. (2013). Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 1076-1080.
- Dalfo, E., Portero-Otin, M., Ayala, V., Martinez, A., Pamplona, R., Ferrer, I. (2005). Evidence of oxidative stress in the neocortex in incidental Lewy body disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 64, 816–830.
- Danon, A., Gallois, P. (1998). UV-C radiation induces apoptotic-like changes in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 437, 131-136.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., van Montagu, M., Inze, D., van Breusegem, F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *CMLC, Cellular and Molecular Life Sciences*, 57, 779-795.
- de Man JM. (1999). Principles of food chemistry. Gaithersburg, Md.: Aspen Publishers.
- del Castillo, M.D., Corzo, N., Polo, M.C., Pueyo, E., Olano, A. (1998). Changes in the amino acid composition of dehydrated orange juice during accelerated nonenzymatic browning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 277-280.

- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J.P.E., Tognolini, M., Borges, G., Crozier, A. (2013). Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants and Redox Signaling*, 18, 1818-1892
- Delgado-Andrade, C. (2013). Maillard reaction products: some considerations on their health effects. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. DOI 10.1515/cclm-2012-0823.
- Denev, P., Ciz, M., Ambrozova, G., Lojek, A., Yanakieva, I., Kratchanova, M. (2010). Solid-phase extraction of berries anthocyanins and evaluation of their antioxidative properties. *Food Chemistry*, 123, 1055-1061.
- Dent, M., Dragovic-Uzelac, V., Penic, M., Brncic, M., Bosiljkov, T., Levaj, B. (2013). The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in Dalmatian Wild Sage (*Salvia officinalis* L.) extracts. *Food Technology and Biotechnology*, 51, 84-91.
- Devesa, J.A., Ruiz, T., Rodríguez, P. (1998). Seed germination in wild clovers (*Trifolium*, Leguminosae) from Southwestern Europe (Spain). *Plant Biosystems*, 132, 225-232.
- Dewanto, V., Wu, X., Liu R. H. (2002). Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4959-4964.
- Dhingra, D., Michael, M., Rajput, H., Patil, R.T. (2012). Dietary fibre in foods: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 49, 255–266.
- Diaz-Batalla, L., Widholm, J.M., Fahey, G.C., Castaño-Tostado, E. Paredes-López, O. (2006). Chemical components with health implications in wild and cultivated Mexican common bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2045-2052.
- Diaz-Reinoso, B., Moure, A., Dominguez, H., Parajo, J. C. (2006). Supercritical CO₂ extraction and purification of compounds with antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2441–2469.
- Dibert, K., Cros, E. (1989). Solvent extraction of oil and chlorogenic acid from green coffee. Part II: Kinetic data. *Journal of Food Engineering*, 10(3), 199-214.
- Dicko, M.H., Gruppen, H., Traore, A.S., Van-Berkel, W.J.H., Voragen, A.G.J. (2005). Evaluation of the effect of germination on phenolic compounds and antioxidant activity in sorghum varieties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 2581–2588.
- Dinelli, G., Aloisio, I., Bonetti, A., Marotti, I., Cifuentes, A. (2007). Compositional changes induced by UV-B radiation treatment of common bean and soybean seedlings monitored by capillary electrophoresis with diode array detection. *Journal of Separation Science*, 30, 604-611.

- Dini, I., Tenore, G. C., Dini, A. (2004). Phenolic constituents of Kancolla seeds. *Food Chemistry*, 84, 163-168.
- 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.
- Dixon, R.A., Paiva, N.L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, 7, 1085-1097.
- Dueñas, M., Hernández, T., Estrella, I., Fernández, D. (2009). Germination as a process to increase the polyphenol content and antioxidant activity of lupin seeds (*Lupinus angustifolius* L.). *Food Chemistry*, 117, 599-607.
- Dumas, Y., Dadomo, M., Di Lucca, G., Grolier, P. (2003). Effects of environmental factors and agricultural techniques on antioxidant content of tomatoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 369-382.
- Dunn, J.A., Ahmed, M.U., Murtiashaw, M.H., Richardson, J.M., Walla, M.D., Thorpe, S.R., Baynes J.W. (1990). Reaction of ascorbate with lysine and protein under autoxidizing conditions: formation of N epsilon-(carboxymethyl) lysine by reaction between lysine and products of autoxidation of ascorbate. *Biochemistry*, 29, 10964-10970.
- Durling, N.E., Catchpole, O.J., Grey, J.B., Webby, R.F., Mitchell, K.A., Foo, L.Y., Perry, N.B. (2007). Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol-water mixtures. *Food Chemistry*, 101, 1417-1424.
- Edge R, Garvey MC, Truscott TG. (1997). The carotenoids as antioxidants—a review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 41(3):189-200.
- Ellis, G. (1959). The Maillard reaction. En: *Advances in carbohydrate chemistry*. M. L. Wolfrom. New York, Academic Press: 63-134.
- Enteshari, S., Kalantari, K., Ghorbanli, M. (2006). The effect of Epibrassinosteroid and different bands of ultraviolet radiation on the pigments content in *Glicine max* L. *Pakistan journal of Biological Science*, 9, 231-237.
- Ericsson, M. C. (2002). Lipid oxidation of muscle foods. En *Food Lipids. Chemistry, Nutrition and Biotechnology*. C. C. Akoh y D. B. Min, Eds. Marcel Dekker, Inc. New York. 365-411.
- Escribano, J., Pedreño, M.A., García-Carmona, F., Muñoz, R. (1998). Characterization of the antiradical activity of betalains from *Beta vulgaris* L. roots. *Phytochemical Analysis*, 9, 124-127.
- Espin, J. C., y Tomás-Barberán, F. A. (2005). Constituyentes bioactivos no nutricionales de alimentos de origen vegetal y su aplicación en alimentos funcionales. En: M. Juárez, A. Olano, y F.

- Morais, Alimentos Funcionales (pp. 101-166). Madrid: Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología.
- Fernández-Orozco, R., Frías, J., Muñoz, R., Zielinski, H., Piskula, M. K., Kozłowska, H., Vidal-Valverde, C. et al. (2008). Effect of fermentation conditions on the antioxidant compounds and antioxidant capacity of *Lupinus angustifolius* cv. zapaton. *European Food Research and Technology*, 227, 979-988.
- Fernández-Orozco, R., Frías, J., Zielinski, H., Muñoz, R., Piskula, M. K., Kozłowska, H., Vidal-Valverde, C. (2009). Evaluation of bioprocesses to improve the antioxidant properties of chickpeas. *LWT – Food Science and Technology*, 42, 885-892.
- Fernández-Orozco, R., Piskula, M. K., Zielinski, H., Kozłowska, H., Frías, J., Vidal-Valverde, C. (2006). Germination as a process to improve the antioxidant capacity of *Lupinus angustifolius* L. var. Zapaton. *European Food Research and Technology*, 223, 495–502.
- Fischer, U.A., Carle, R., Kammerer, D.R. (2013). Thermal stability of anthocyanins and colourless phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) juices and model solutions. *Food Chemistry*, 138, 1800–1809.
- Föste, M., Nordlohne, S.D., Elgeti, D., Linden, M.H., Heinz, V., Jekle, M., Becker, T. (2014). Impact of quinoa bran on gluten-free dough and bread characteristics. *European Food Research and Technology*, en prensa. DOI: 10.1007/s00217-014-2269-x.
- Frankel, E. N. (1998). Lipid oxidation. En: *The Oily Press*. Dundee, Scotland.
- Frankel, E.N., Huang, S.W., Kanner, J., German, J.B. (1994). Interfacial Phenomena in the Evaluation of Antioxidants: Bulk Oils vs. Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1054-1059.
- Gallegos-Infante, J.A., Rocha-Guzman, N.E., Gonzalez-Laredo, R.F., Pulido-Alonso, J. (2010). Effect of processing on the antioxidant properties of extracts from Mexican barley (*Hordeum vulgare*) cultivar. *Food Chemistry*, 119, 903-906.
- Galvan d’Alessandro, L., Kriaa, K., Nikov, I., Dimitrov, K., (2012). Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. *Separation and Purification Technology*, 93, 42-47.
- Galvez Ranilla, L., Genovese, M. I., Lajolo, F. (2009). Effect of different cooking conditions on phenolic compounds and antioxidant capacity of some selected Brazilian bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 5734–5742.
- Gandía-Herrero, F., Escribano, J., García-Carmona, F. (2012). Purification and antiradical properties of the structural unit of betalains. *Journal of Natural Products*, 75, 1030-1036.
- Gandía-Herrero, F., García-Carmona, F. (2013). Biosynthesis of betalains: yellow and violet plant pigments. *Trends in Plant Science*, 18, 334-343.

- Gandía-Herrero, F., García-Carmona, F., Escribano, J. (2005). Floral fluorescence effect. *Nature*, 437, 334.
- García-Agustín, P., Primo-Millo, E. (1993). Germinación de las semillas. En: *Fisiología y Bioquímica Vegetal*, Azcon-Bieto, J., Talon, M. (Eds), España, McGraw Hill Interamericana, 419-433.
- Garvin, S., Ollinger, K., Dabrosin, C. (2006). Resveratrol induces apoptosis and inhibits angiogenesis in human breast cancer xenografts in vivo. *Cancer Letters*, 231, 113-122.
- Gee, J.M., Price, K.R., Ridout, C.L., Wortley, G.M., Hurrell, R.F., Johnson, I.T. (1993). Saponins of quinoa (*Chenopodium quinoa*): effect of processing on their abundance in quinoa products and their biological effects on intestinal mucosal tissue. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 63, 201–209.
- Ghafoor, K., Choi, Y.H., Jeon, J.Y., Jo, I.H. (2009). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 4988-4994.
- Giovannucci E. 1999. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. *Journal of the National Cancer Institute* 91(4), 317–331.
- Gómez-Caravaca, A.M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Caboni, M.F. (2011). Simultaneous determination of phenolic compounds and saponins in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) by a liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionization-time-of-flight mass spectrometry methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 10815-10825.
- Gong, Y., Hou, Z., Gao, Y., Xue, Y., Liu, X., Liu, G. (2012). Optimization of extraction parameters of bioactive components from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue using response surface methodology. *Foods and Bioproducts Processing*, 90, 9-16.
- González-Centeno, M.R., Comas-Serra, F., Femenia, A., Rosselló, C., Simal, S. (2015). Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera* L.): Experimental kinetics and modeling. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22, 506-514.
- Gorinstein, S., Lojek, A., Ciz, M., Pawelzik, E., Delgado-Licon, E., Medina, O., Moreno, M., Salas, I., Goshev, I. (2008). Comparison of composition and antioxidant capacity of some cereals and pseudocereals. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 629–637.
- Gorinstein, S., Medina Vargas, O.J., Jaramillo, N.O., Arnao Salas, I., Martínez Ayala, A.L., Arancibia-Avila, P., Toledo, F., Katrich, E., Trakhtenberg, S. (2007). The total polyphenols and the antioxidant potentials of some selected cereals and pseudocereals. *European Food Research Technology*, 225, 321-328.

- Gregory, J. F. (1996). Vitamins. En: Fennema O. R., editor. Food chemistry. 3ra ed. New York: Marcel Dekker. 431–530.
- Guajardo-Flores, D., Serna-Guerrero, D., Serna-Saldívar, S. O., Jacobo-Velázquez, D. A. (2014). Effect of germination and UV-C radiation on the accumulation of flavonoids and saponins in black bean seed coats. *Cereal Chemistry*, 91, 276–279.
- Hager, A.S., Wolter, A., Jacob, F., Zannini, E., Arendt, E.K. (2012). Nutritional properties and ultra-structure of commercial gluten free flours from different botanical sources compared to wheat flours. *Journal of Cereal Science*, 56, 239-247.
- Hagerman, A. E., Riedl, K. M., Jones, G. A., Sovik, K. N., Ritchard, N. T., Hartzfeld, P. W. Halliwell, B., Murcia, M. A., Chirico, S., Auroma, O. I. (1995). Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work?. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 35, 7-20.
- Hamsaveni, D.R., Prapulla, S.G., Divakar, S. (2001). Response surface methodological approach for the synthesis of isobutyl isobutyrate. *Process Biochemistry*, 36, 1103-1109.
- Hanasaki, Y., Ogawa, S., Fukui, S. (1994). The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 16, 845–850.
- Harborne, J. B. (1989). *Methods in Plant Biochemistry*, Vol 1: Plants Phenolics, pp 552.
- Harbourne, N., Jacquier, J.C., O’Riordan, D. (2009). Optimisation of the aqueous extraction conditions of phenols from meadowsweet (*Filipendula ulmaria* L.) for incorporation into beverages. *Food Chemistry*, 116, 722-729.
- Hashiba, K., Iwashina, T., Matsumoto, S. (2006). Variation in the quality and quantity of flavonoids in the leaves of coastal and inland *Campanula punctata*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 34, 854–861.
- Hasler, C.M., Brown, A.C. (2009). Position of the American Dietetic Association: Functional Foods. *Journal of the American Dietetic Association*, 109, 735-746.
- Hassimotto, N.M., Genovese, M.I., Lajolo, F.M. (2005). Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2928-2935.
- Hein, G. (2006). Glycation endproducts in osteoporosis – Is there a pathophysiologic importance? *Clinica Chimica Acta*, 371, 32–36.
- Henriquez, C., Aliaga, C., Lissi, E. (2002). Formation and decay of the ABTS derived radical cation: A comparison of different preparation procedures. *International Journal of Chemical Kinetics*, 34, 659–665.

- Herrero, M., Mendiola, J.A., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2010). Supercritical fluid extraction: recent advances and applications. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2495-2511.
- Hewedy, M.M., Kiesner, C., Meissner, K., Hartkopf, J. Erbersdobler, H.F. (1994). Effects of UHT heating of milk in an experimental plant on several indicators of heat treatment. *Journal of Dairy Research*, 61, 305-309.
- Hirose, Y., Fujita, T., Ishii, T., Ueno, N. (2010). Antioxidative properties and flavonoid composition of *Chenopodium quinoa* seeds cultivated in Japan. *Food Chemistry*, 119, 1300-1306.
- Hodge, J. E. (1967). Origin of flavor in foods: Nonenzymatic browning reactions. En *Chemistry and Physiology of Flavors*; Schultz, H. W., Day, E. A., Libbey, L. M., Eds.; AVI Publishing Company, Inc., Westport, C.T., pp 465-491.
- Hodge, J.E. (1953). Dehydrated foods-chemistry of browning reactions in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1, 928-943.
- Hoffmann-Ribani, R., Huber, L.S., Rodriguez-Amaya, D.B. (2009). Flavonols in fresh and processed Brazilian fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 263-268.
- Hofmann, S.M., Dong, H.J., Li, Z., Cai, W., Altomonte, J., Thung, S.N. (2002). Improved insulin sensitivity is associated with restricted intake of dietary glycoxidation products in the db/db mouse. *Diabetes*, 51, 2082-2089.
- Hollman, P.C.H., Arts, I.C.W. (2000). Flavonols, flavones and flavanols: Nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 80, 1081-1093.
- Hrdlicka, J. (1976). Study of changes occurring during thermic and hydrothermic reactions. Effect of heavy metal ion reaction course of nonenzymic browning. *Sbornik E Potraviny Scientific papers E Food*, 8, 65-82.
- Hsieh, T.C., Wang, Z., Hamby, C.V., Wu, J.M. (2005). Inhibition of melanoma cell proliferation by resveratrol is correlated with upregulation of quinone reductase 2 and p53. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 334, 223-230.
- Huang, D., Ou, D.B., Prior, R.L. (2005) The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- Huang, W.-Y.a , Cai, Y.-Z.a, Zhang, Y. (2010). Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: Potential use for cancer prevention. *Nutrition and Cancer*, 62, 1-20.
- Hudson, B. J. F., Lewis J. I. (1983). Polyhydroxy flavonoid antioxidants for edible oils. Structural criteria for activity. *Food Chemistry*, 10(1), 47-55.
- Ishii, T. (1997). Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Science*, 127, 111-127.

- IUPAC (1992). Standard Methods for the Analysis of oils, Fats and Derivates. 7th ed. Eds. Paquot C, Hautffenne A. International Union of Pure and Applied Chemistry, Blackwell Scientific Publications Inc., Oxford, UK.
- Jacobsen, S.E., Jornsgard, B., Christiansen, J.L, Stolen, O. (1999). Effect of harvest time, drying technique, temperature and light on the germination of quinoa. *Seed Science & Technology*, 27, 937-944.
- Jain, N.K. y Saha, J.R. (1971). Effect of storage length on seed germination in jute (*Corchorus* spp.). *Agronomy Journal*, 63, 636-638.
- Jansen, M.A.K. (2002). Ultraviolet-B radiation effects on plants: induction of morphogenic responses. *Physiologia Plantarum*, 116, 423–429.
- Jansen, M.A.K., Hectors, K., O'Brien, N.M., Guisez, Y., Potters, G. (2008). Plant stress and human health: Do human consumers benefit from UV-B acclimated crops? *Plant Science*, 175, 449-458.
- Jenkins, G.I., Long, J.C., Wade, H.K., Shenton, M.R., Bibikova, T.N. (2001). UV and blue light signalling: pathways regulating chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 151, 121-131.
- Jeong, S.M., Kim, S.Y., Kim, D.R., Nam, K.C., Ahn, D.U., Lee, S.C. (2004). Effect of seed roasting conditions on the antioxidant activity of defatted sesame meal extracts. *Food Chemistry and Toxicology*, 69, 377-381.
- Joy, R.W., Sugiyama, M., Fukuda, H., Komamine, A. (1995) Cloning and characterization of polyphenol oxidase cDNAs of *Phytolacca americana*. *Plant Physiology*, 107, 1083-1089.
- Kafkas, E., Koşar, M., Türemis, N. (2006). Analysis of sugars, organic acids and vitamin C contents of blackberry genotypes from Turkey. *Food Chemistry*, 97, 732-736.
- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J.-P., Pihlaja, K., Kujala, T. S. y Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3954-3962.
- Katerova, Z., Ivanov, S., Mapelli, S., Alexieva, V. (2009). Phenols, proline and low-molecular thiol levels in pea (*Pisum sativum*) plants respond differently toward prolonged exposure to ultraviolet-B and ultraviolet-C radiations. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31, 111-117.
- Katerova, Z., Todorova, D., Tasheva, K., Sergiev, I. (2012). Influence of ultraviolet radiation on plant secondary metabolite production. *Genetics and Plant Physiology*, 2, 113-144.
- Kaur, C., Kapoor, H. (2001). Antioxidants in fruits and vegetables - the millennium's health. *International Journal of Food Science and Technology*, 36, 703-725.

- Kawamura, S. (1983). Seventy years of the Maillard reaction. In *The Maillard reaction in Food and Nutrition*; Waller, G. R., Feather, M. S., Eds.; American Chemical Society, Washington D.C., pp 3-18.
- Kechinski, C.P., Guimaraes, P.V.R., Norena, C.P.Z., Tessaro, I.C., Marczak, L.D.F. (2010). Degradation kinetics of anthocyanin in blueberry juice during thermal treatment. *Journal of Food Science*, 75(2), 173–176.
- Kensil, C.R., Mo, A.X. Truneh, A. (2004). Current vaccine adjuvants: an overview of a diverse class. *Frontiers in Bioscience*, 9, 2972-2988.
- Khan, M.K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A.S., Dangles, O., Chemat, F. (2010). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavonone glycosides) from oranges (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*, 119, 851-858.
- Khuwijitjaru, P., Plernjit, J., Suaylam, B., Samuhaseneetoo, S., Pongsawatmanit, R., Adachi, S. (2014). Degradation Kinetics of Some Phenolic Compounds in Subcritical Water and Radical Scavenging Activity of Their Degradation Products. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 92, 810-815.
- Kim, H., Kim, G., Oh, H., Yoo, S., Kim, Y., Oh, M. (2011). Influence of roasting on the antioxidant activity of small black soybean (*Glycine max* L. Merrill). *LWT - Food Science and Technology*, 44, 992 - 998.
- Kim, J.S., Lee, Y.S. (2009). Antioxidant activity of Maillard reaction products derived from aqueous glucose/glycine, diglycine, and triglycine model systems as a function of heating time. *Food Chemistry*, 116, 227-232.
- Koleva, I.I., Van Beek, T.A., Linszen, J.P.H., De Groot, A., Evstatieva, L.N. (2002). Screening of plant extracts for antioxidant activity: A comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis*, 13, 8-17.
- Konishi, Y., Hirano, S., Tsuboi, H., Wada, M. (2004). Distribution of minerals in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seeds. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 68(1), 231–234.
- Kováčik, J., Klejdus, B., Backor, M. (2010). Physiological Responses of *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae) to UV-A and UV-C Light. *Photochemistry and Photobiology*, 86, 612-616.
- Kovács, E., Keresztes, Á. (2002). Effect of gamma and UV-B/C radiation on plant cells. *Micron* 33, 199-210.
- Koziol, M. J. (1992). Chemical composition and nutritional evaluation of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). *Journal of Food Composition Analysis*, 5, 35-68.

-
- Kreft, S., Štrukelj, B., Gaberščik, A., Kreft, I. (2002). Rutin in buckwheat herbs grown at different UV-B radiation levels: comparison of two UV spectrophotometric and an HPLC method. *Journal of Experimental Botany*, 53, 801-1804.
- Kubasek, W.L., Shirley, B.W., McKillop, A., Goodman, H.M., Briggs, W., Ausubel, F.M. (1992). Regulation of flavonoid biosynthetic genes in germinating *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Cell*, 4, 1229-1236.
- Kumar, K.G., Venkataraman, L.V., Jaya, T.V., and Krishnamurthy, K.S. (1978). Cooking characteristics of some germinated legumes: Changes in phytins, Ca, Mg and Pectins. *Journal of Food Science*, 43, 85-93.
- Labuza, T.P., Baisier, W.M. (1992). Kinetics of nonenzymatic browning. En: Schwartzberg, H.G., Hartel, R.W., editores. *Physical chemistry of foods*. Marcel Dekker, New York, pp. 595-649.
- Lang, Q., Wai, C. M. (2001). Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies — A practical review. *Talanta*, 53, 771–782.
- Larrauri, J. A., Ruperez, P., Saura-Calixto, F. (1997). Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1390-1393.
- Larrosa M, Llorach R, Espín JC, Tomás -Barberán FA. (2002). Increase of antioxidant activity of tomato juice upon functionalisation with vegetable byproduct extracts. *LWT-Food Science and Technology*, 35, 532-542
- Lavola, A., Aphalo, P.J., Lahti, M., Julkunen-Tiitto, R. (2003). Nutrient availability and the effect of increasing UV-B radiation on secondary plant compounds in Scots pine. *Environmental and Experimental Botany*, 49, 49-60.
- Leclere, J., Birlouez-Aragon, I. (2001). The fluorescence of advanced Maillard products is a good indicator of lysine damage during the maillard reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4682-4687.
- Lee, J., Koo, N., Min. D. (2004). Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3, 21-33.
- Lee, S., Lee, J. (2009). Effects of oven-drying, roasting, and explosive puffing process on isoflavone distributions in soybeans. *Food Chemistry*, 112, 316 - 320.
- Lee, S.K., y Kader, A.A. (2000). Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology and Technology*, 20, 207-220.
- Lempereur, I., Rouau, X., Abecassis, J. (1997). Genetic and agronomic variation in arabinoxylan and ferulic acid contents of durum wheat (*Triticum durum* L.) grain and its milling fractions. *Journal of Cereal Science*, 25, 103-110.

- Leybros, J., Frémeaux, P. (1990). Extraction solide-liquide. I. Aspects théoriques. Techniques de l'ingénieur, Génie des procédés. Paris, Francia. ISSN 1762-8725.
- Li, H., Tsao, R., Deng, Z. (2012). Factors affecting the antioxidant potential and health benefits of plant foods. *Canadian Journal of Plant Science*, 92, 1101-1111.
- Li, X.H., Lv, B.L., Xie, J.Z., Liu, J., Zhou, X.W., Wang, J.Z. (2012). AGEs induce Alzheimer like tau pathology and memory deficit via RAGE-mediated GSK-3 activation. *Neurobiology Aging*, 33, 1400-1410.
- Liakoura, V., Manetas, Y., Karabourniotis, G. (2001). Seasonal fluctuations in the concentration of UV-absorbing compounds in the leaves of some Mediterranean plants under field conditions. *Physiologia Plantarum*, 111, 491-500.
- Liazid, A., Palma, M., Brigui, J., Barroso, C. G. (2007). Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 1140, 29-34.
- Lin, E., Li, ia-Ching. (2010). Evaluation of superoxide radical scavenging capacity and reducing power of areca flower extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4, 975-981.
- Lindquist, E., Yang, Y. (2011). Degradation of benzoic acid and its derivatives in subcritical water. *Journal of Chromatography A*, 1218, 2146-5152.
- Liu, Q.M., X.M. Yang, L. Zhang, G. Majetich. (2010). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of chlorogenic acid from *Folium eucommiae* and evaluation of its antioxidant activity. *Journal of Medicinal Plants Research*, 23, 2503-2511.
- Liu, R.H. (2003). Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 517-520.
- Liyana-Pathirana, C., Shahidi, F., (2005). Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry*, 93, 47-56.
- Logemann, E., Tavernaro, A., Schulz, W., Somssich, I.E., Hahlbrock, K. (2000). UV light selectivity coinduces supply pathways from primary metabolism and flavonoid secondary product formation in parsley. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 1903-1907.
- Loyall, L., Uchida, K., Braun, S., Furuya, M., Frohnmeyer, H. (2000). Glutathione and a UV light-induced glutathione S-transferase are involved in signaling to chalcone synthase in cell cultures. *Plant Cell*, 12, 1939-1950.
- Luque de Castro, M. D., Garcia-Ayuso, L. E. (1998). Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*, 369, 1-10.

- Ma, Y.Q., Ye, X.Q., Fang, Z.X., Chen, J.C., Xu, G.H., Liu, D.H. (2008). Phenolic compounds and antioxidant activity of extracts from ultrasonic treatment of Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) Peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 5682–5690.
- Madrid, A. y Cenzano, J. M. (2000). Los aditivos en los alimentos según la Unión Europea y la legislación española. AMV Editores. Madrid.
- Mafart, P., Béliard, E. (1992). *Génie Industriel Alimentaire*. Tomo II. Techniques Séparatives. Editions Tec & Doc, Lavoisier, ISBN : 2-85206-808-7.
- Mahdavian, K., Ghorbanli, M., Kalantari, K. (2008). The effect of ultraviolet radiation on the contents of chlorophyll, flavonoid, anthocyanin and proline in *Capsicum annuum* L. *Turkish Journal of Botany*, 32, 25-33.
- Maillard, M.N., Soum, M.H., Boivin, P., Berset, C. (1996). Antioxidant activity of barley and malt: Relationship with phenolic content. *Lebensmittel Wissenschaft and Technologie*, 29, 238-244.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémés, C., Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-747.
- Manzocco, L., Calligaris, S., Mastrocola, D., Nicoli, M., Lerici, C. (2001). Review of nonenzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Trends in Food Science & Technology*, 11, 340-346.
- Marfil, P.H.M., Santos, E.M., Telis, V.R.N. (2008). Ascorbic acid degradation kinetics in tomatoes at different drying conditions. *LWT-Food Science and Technology*, 41, 1642-1647.
- Martins, S., Jongen, W., van Boekel, M.A. (2001). Review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in Food Science and Technology*, 11, 364-373.
- Mason, T. J., Paniwnyk, L., Lorimer, J.P. (1996). The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 3, 253-260.
- Mastrocola, D., Munari, M. (2000). Progress of the Maillard Reaction and Antioxidant Action of Maillard Reaction Products in Preheated Model Systems Turing Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3555-3559.
- Mastromatteo, M., Chillo, S., Civica, V., Iannetti, M., Suriano, N., del Nobile, M.A (2012). A multistep optimization approach for the production of healthful pasta based on nonconventional flours. *Journal of Food Process Engineering*, 35, 1-21.
- Matiacevich, S.B., Buera, M.d.P. (2006). A critical evaluation of fluorescence as a potential marker for the Maillard reaction. *Food Chemistry*, 95, 423-430.

- Matiacevich, S.B., Santagapita, P., Buera, M. (2005). Fluorescence from the Maillard reaction and its potential applications in food science. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 483–495.
- Mayer-Miebach, E., Behsnilian, D., Reginer, M., Schuchmann, H.P. (2005). Thermal processing of carrots: Lycopene stability and isomerisation with regard to antioxidant potential. *Food Research International*, 38, 1103-1108.
- Mazzeo, T., N'Dri, D., Chiavaro, E., Visconti, A., Fogliano, V., Pellegrini, N. (2011). Effect of two cooking procedures on phytochemical compounds, total antioxidant capacity and colour of selected frozen vegetables. *Food Chemistry*, 128, 627-633.
- Mc Carthy, M.A., Mattheus, R.H. (1994). Nutritional Quality of Fruits and Vegetables Subjected to Minimal Processes. En *Minimally Processed Refrigerated Fruits and Vegetables*, (Wiley,R.C., ed), pp. 313-326, Chapman and Hall, New York.
- Meade, S. J., Reid, E.A., Gerrard, J.A. (2005). The impact of processing on the nutritional quality of food proteins. *Journal of AOAC International*, 88, 904-922.
- Mensink, R. P.; Aro, A.; Den Hond, E.; German, J. B.; Griffin, B. A.; Ter Meer, H.-U.; Mutanen, M.; Pannemans, D., y Stahl, W. (2003) PASSCLAIM - Diet-related cardiovascular disease. *European Journal of Nutrition*, 42 (1), 6-27.
- Meydani, M. (2000). Effect of functional food ingredients: vitamin E modulation of cardiovascular diseases and immune status in the elderly. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 1665–1668.
- Middleton Jr., E., Kandaswami, C., Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacological Reviews*, 52, 673–839.
- Mihara, S., Masuda, H. (1988). Structure-odor relationships for disubstituted pyrazines, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, 1242-1247.
- Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V., Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84, 407–412.
- Miller, R., Olason, K., Pernemalm, P.A., Theander, O. (1980). Studies of the Maillard Reaction . Mechanism of Saccharide Polymerization and Depolymerization. Marshall, J.J. (Ed.). Academic Press, New York.
- Miranda, M., Vega-Gálvez, A., López, J., Parada, G., Sanders, M., Aranda, M., Uribe, E. Di Scala, K. (2010). Impact of air-drying temperature on nutritional properties, total phenolic content

- and antioxidant capacity of quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Industrial Crops and Products* 32, 258-263.
- Miranda, M., Vega-Gálvez, A., Quispe-Fuentes, I., Rodríguez, M.J., Maureira, H., Martínez, E.A. (2012). Nutritional aspects of six quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) ecotypes from three geographical areas of Chile. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 72, 175-181.
- Moon, J.K. y Shibamoto, T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1655-1666.
- Moongngarm, A., Saetung, N. (2010). Comparison of chemical compositions and bioactive compounds of germinated rough rice and brown rice. *Food Chemistry*, 122, 782-788.
- Morales, F., Jiménez-Pérez, S. (2001) Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Food Chemistry*, 72, 119-125.
- Morales, F.J. Romero, C., Jiménez-Pérez, S. (1997). Chromatographic determination of bound hydroxymethylfurfural as an index of milk protein glycosylation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1570-1573.
- Morales, F.J., Açar, Ö.Ç., Serpen, A., Arribas-Lorenzo, G., Gökmen, V. (2007). Degradation of free tryptophan in a cookie model system and its application in commercial samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6793-6797.
- Morales, F.J., Somoza, V., Fogliano, V. (2012). Physiological relevance of dietary melanoidins. *Amino Acids*, 42, 1097-1109.
- Morales, F.J., van Boekel, M.A.J.S. (1997). A study on advanced Maillard reaction in heated casein/sugar solutions: fluorescence accumulation. *International Dairy Journal*, 7, 675-683.
- Morgan, P.E., Dean, R.T., Davies, M.J. (2002). Inactivation of cellular enzymes by carbonyls and protein-bound glycation/glycoxidation products. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 403, 259-269.
- Mottram, D.S. (1994). Flavour compounds formed during the Maillard reaction. In *Thermally Generated Flavors: Maillard, Microwave and Extrusion Processes*; Parliament, T. H., Morello, M. J., McGorin, R.J., Eds.; American Chemical Society: Washington DC, pp 104-126.
- Mujica, A., Canahua, A., Saravia, R. (2001). Agronomía del cultivo de quinua. En: *Quinoa (Chenopodium quinoa Willd.) Ancestral cultivo andino, alimento del presente y futuro*. Mujica, Jacobsen, Izquierdo, Marathe (Eds). pp. 456. FAO
- Muñiz-Márquez, D.B., Martínez-Ávila, G.C., Wong-Paz, J.E., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar, C.N. (2013). Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Laurus nobilis* L. and their antioxidant activity. *Ultrasonics sonochemistry*, 20, 1149-1154.

- Mushtaq, M., Wani, S.M. (2013). Polyphenols and human health- A review. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4,338-360.
- Naczka, M., Shahidi, F. (2006). *Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1523-1542.
- Nadeau, F., Gaudreau, A., Angers, P., Arul, J. (2012). Changes in the level of glucosinolates in broccoli florets (*Brassica oleracea* var. Italica) during storage following postharvest treatment with UV-C. *Acta Horticulturae*, 945, 145-148.
- Natella, F., Nardini, M., Gianetti, I., Dattilo, C., Scaccini, C. (2002). Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6211-6216.
- Neeman, G., Henig-Server, N., Eshel, A. (1999). Regulation of the germination of *Rhus coriaria*, a post-fire pioneer, by heat, ash, pH, water potential and ethylene. *Physiology Plantarum*, 106, 47-52.
- Neff, M.M., Fankauer, C., Chory, J. (2000). Light: an indicator of time and place. *Genes and Development*, 14, 257-271.
- Ng, S., Anderson, A., Cokera, J., Ondrusa, M. (2007). Characterization of lipid oxidation products in quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Food Chemistry*, 101, 185–192.
- Nicoli, M., Anese, M., Parpinel, M., Franceschi, S., Lerici, C. (1997). Loss and/or formation of antioxidants during food processing and storage. *Cancer Letters*, 114, 71-74.
- Nicoli, M.C., Anese, M., Parpinel, M. (1999). Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends in Food Science & Technology*, 10, 94-100.
- Nijveldt, R. J., van Nood, E., van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., van Norren, K., van Leeuwen, P. A. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74, 418-425.
- Nithiyantham, S., Selvakumar, S., Siddhuraju, P. (2012). Total phenolic content and antioxidant activity of two different solvent extracts from raw and processed legumes, *Cicer arietinum* L. and *Pisum sativum* L. *Journal of Food Composition Analysis*, 27, 52–56.
- Nursten H. (2005). The Chemistry of non enzymatic browning. En: Maillard Reaction. Chemistry, Biochemistry and Implications. London, Royal Society of Chemistry, pp. 5-26.
- Oakenfull, D., Sidhu, G. (1990). Could saponins be a useful treatment for hypercholesterolaemia? *European Journal of Clinical Nutrition*, 44, 79–88.

- Obizoba, I.C., Atti, J.V. (1994). Evaluation of the effect of processing techniques on the nutrient and antinutrient contents of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) seeds. *Plant Foods for Human Nutrition*, 45, 23-24.
- Oshodi, A.A., Ogungbenle, H.N., Oladimeji, M.O. (1999). Chemical composition, nutritionally valuable minerals and functional properties of benniseed (*Sesamun radiatum*), pearl millet (*Pennisetum typhoides*) and quinoa (*Chenopodium quinoa*) flours. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 50, 325–331.
- Öste, R.E., Dahlqvist, A., Sjoström, H., Naren, O., Miller, R. (1986). Effect of Maillard reaction products on protein digestion. In vivo studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34, 355-358.
- Overby, L., Frost, D. (1951). The effects of heat on the nutritive value of protein hydrolysates with dextrose. *The Journal of Nutrition*, 56, 539-547.
- Pan, X., Niu, G., Liu, H. (2003). Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *Chemical Engineering and Processing*, 42, 129-133.
- Parr, A.J., Bolwell, G.P. (2000). Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 985-1012.
- Pasko, P., Barton, H., Zagrodzki, P., Gorinstein, S., Fołta, M., Zachwieja, Z. (2009). Anthocyanins, total polyphenols and antioxidant activity in amaranth and quinoa seeds and sprouts during their growth. *Food Chemistry*, 115, 994-998.
- Patras, A., Brunton, N.P., O'Donnell, C., Tiwari, B.K. (2010). Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science and Technology*, 21, 3-11.
- Pérez, D.D., Leighton, F., Aspee, A., Aliga, C., Lissi, E. (2000). A comparison of methods employed to evaluate antioxidant capabilities. *Biological Research*, 33 (2), 71-77.
- Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63 (7), 1035-1042.
- Piironen, G.W., Price, K.R., Rhodes, M.J.C., Williams, G. (1986). Tocopherols and tocotrienols in Finnish foods: vegetables, fruits and berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34, 742–746.
- Pinelo, M., Del Fabbro, P., Marzocco, L., Nunez, M.J., Vicoli, M.C. (2005). Optimisation of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* by-products. *Food Chemistry*, 92, 109-117.
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A.S., Chemat, F. (2013). Degradation during application of ultrasound in food processing: A review. *Food Control*, 31, 593-606.

- Pluskota, W.E., Michalczyk, D.J., Gorecki, R.J. (2005). Control of phenylalanine ammonia-lyase gene promoters from pea by UV irradiation. *Acta Physiologiae Plantarum*, 27, 229–236.
- Podsedeck, A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT-Food Science and Technology*, 40, 1-11.
- Podsedeck, A., Sosnowska, D., Redzynia, M., Koziolkiewicz, M. (2008). Effect of domestic cooking on the red cabbage hydrophilic antioxidants. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 1770-1777.
- Pokorny, J. (2007). Are natural antioxidants better – and safer – than synthetic antioxidants?. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109:629-642.
- Pokorny, J. y Parkanyiova, J. (2004). Advantages and disadvantages of natural antioxidants in comparison with synthetic antioxidants. Euro Fed Lipid Congress, Edinburgh, Scotland.
- Poux, M., Cognet, P., Gourdon, C. (2010). Génie des procédés durables, du concept à la concrétisation industrielle. L'usine nouvelle, Dunod, Paris, ISBN 978-2-10-051605-6.
- Prasad, K.N., Yang, E., Yi, C., Zhao, M., Jiang, Y. (2009). Effects of high pressure extraction on the extraction yield, total phenolic content and antioxidant activity of longan fruit pericarp. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 155-159.
- Prego, I., Maldonado, S., Otegui, M. (1998). Seed structure and localization of reserves in *Chenopodium quinoa*. *Annals of Botany*, 82, 481–488.
- Prentice, A., Bonjour, J.-P., Branca, F., Cooper, C., Flynn, A., Garabedian, M., Müller, D., Pannemans, D., Weber, P. (2003). PASSCLAIM - Bone health and osteoporosis. *European Journal of Nutrition*, 42(S1).
- Prior, R. L., Cao, G. (2000). Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables: diet and health implications. *Horticulture Science*, 35, 588-592.
- Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 239–262.
- Prosky, L., Asp, N., Schweizer, T., de Vries, J., Furda, I. (1988). Determination of insoluble soluble and total dietary fiber in foods and food products: Interlaboratory Study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists (JAOAC)*, 71, 1017-1023.
- Pszczola, D.E. (2003). Getting more fruits and vegetables into foods. *Food Technology*, 57, 52-63.
- Radojković, M., Zeković, Z., Jokić, S., Vidović, S., Lepojević, Ž., Milošević, S. (2012). Optimization of solid-liquid extraction of antioxidants from black mulberry leaves by response surface methodology. *Food Technology & Biotechnology*. 50, 167-176.

- Rahn, R.O. (1997). Potassium iodide as a chemical actinometer for 254 nm radiation: use of iodate as an electron scavenger. *Photochemistry and Photobiology*, 66, 450-455.
- Rai, R., Meena, R.P., Smita, S.S., Shukla, A., Rai, S.K., Pandey-Rai, S. (2011). UV-B and UV-C pre-treatments induce physiological changes and artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. -An antimalarial plant. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 105, 216-225.
- Rakic, S., Petrovic, S., Kukic, J., Jadranin, M., Tesevic, V., Povrenovic, D. (2007). Influence of thermal treatment on phenolic compounds and antioxidant properties of oak acorns from Serbia. *Food Chemistry*, 104, 830-834.
- Ramírez-Jiménez, A., García-Villanova, B., Guerra-Hernández, E. (2001). Effect of toasting time on the browning of sliced bread. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 513-518.
- Ramírez-Jiménez, A., Guerra-Hernández, E., García-Villanova, B. (2000). Browning indicators in bread. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4176-4181.
- Randhir, R., Kwon, Y.I., Shetty, K. (2008). Effect of thermal processing on phenolics, antioxidant activity and health-relevant functionality of select grain sprouts and seedlings. *Innovative Food Science Emerging Technology*, 9, 355-364.
- Recio, I., López Fandiño, R. (2005). Ingredientes y productos lácteos funcionales: bases científicas de sus efectos en la salud. En: M. Juárez, A. Olano, & F. Morais, *Alimentos Funcionales* (pp. 23-100). Madrid: Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología.
- Repo-Carrasco, R., Espinoza, C., Jacobsen, S. (2003). Nutritional value and use of the andean crops quinoa (*Chenopodium quinoa*) and kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*). *Food Reviews International*, 19, 179-189.
- Repo-Carrasco, R., Hellström, J., Pihlava, J. Mattila, P. (2010). Flavonoids and other phenolic compounds in Andean indigenous grains: Quinoa (*Chenopodium quinoa*), kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) and kiwicha (*Amaranthus caudatus*). *Food Chemistry*, 120, 128-133.
- Repo-Carrasco-Valencia R. (2011). Andean indigenous food crops: Nutritional value and bioactive compounds. *Publicación de la Universidad de Turku, Turku, Finlandia*.
- Repo-Carrasco-Valencia, R., Serna, L.A. (2011). Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) as a source of dietary fiber and other functional components. *Food Science and Technology (Campinas)*, 31, 225-230.
- Ribeiro, M.L.L., Mandarino, J.M.G., Carrao-Panizzi, M.C., de Oliveira, M.C.N., Campo, C.B.H., Nepomuceno, A.L., Ida, E.I. (2006). Isoflavone content and β -glucosidase activity in soybean cultivars of different maturity groups. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 19-24.

-
- Riccardi, G.; Aggett, P. J.; Brighenti, F.; Delzenne, N.; Frayn, K.; Niewenhuizen, A.; Pannemans, D.; Theis, S.; Tuijelaars, S., y Vessby, B. (2004) PASSCLAIM - Body weight regulation, insulin sensitivity, and diabetes risk. *European Journal of Nutrition*, 43 (2), 7-46.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933-956.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2, 152-159.
- Riechel, T. L. (1998). High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1887-1892.
- Robards, K., Prentzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66, 401-436.
- Roberfroid, M. B. (2000). Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71(6), 1660-1664.
- Rodriguez de Sotillo, D., Hadley, M. y Holm, E. T. (1994). Potato peel waste, stability and antioxidant activity of a freeze-dried extract. *Journal of Food Science*, 59, 1031-1033.
- Romdhane, M., Gourdon, C. (2002). Investigation in solid-liquid extraction: Influence of ultrasound, *Chemical Engineering Journal* 87: 11-19.
- Rosell, C.M., Cortez, G., Repo-Carrasco, R. (2009). Breadmaking Use of Andean Crops Quinoa, Kañiwa, Kiwicha, and Tarwi. *Cereal Chemistry*, 86, 386-392.
- Ross, K.A., Beta, T. and Arntfield, S.D. (2009). A comparative study on the phenolic acids identified and quantified in dry beans using HPLC as affected by different extraction and hydrolysis methods. *Food Chemistry* 113 (1):336-344.
- Ruales, J., Nair, B.M. (1992). Nutritional quality of the protein in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seeds. *Plant Foods for Human Nutrition*, 42, 1-12.
- Ruales, J., Nair, B.M. (1993). Content of fat, vitamins and minerals in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seeds. *Food Chemistry*, 48, 131-136.
- Rufián-Henares, J.A., de la Cueva, S.P. (2009). Antimicrobial activity of coffee melanoidins: a study of their metal-chelating properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 432-438.
- Rufián-Henares, J.A., Morales F.J. (2007). Functional properties of melanoidins: In vitro antioxidant, antimicrobial and antihypertensive activities. *Food Research International*, 40, 995-1002.

- Rumsey, S. C., Wang, Y., Levine, M. (1999). Vitamin C. En: Papas, A. M., editor. Antioxidant status, diet, nutrition, and health. Boca Raton, Fla.: CRC Press. 479-496.
- Ryan, E., Galvin, K., O'Connor, T., Maguire, A., O'Brien, N. (2007). Phytosterol, squalene, tocopherol content and fatty acid profile of selected seeds, grains, and legumes. *Plant Foods for Human Nutrition*, 62, 85–91.
- Safer, A.M., Al-Nughamish, A.J. (1999). Hepatotoxicity induced by the anti-oxidant food additive, butylated hydroxytoluene BHT, in rats. An electron microscopical study. *Histology and Histopathology*, 14(2), 391-406.
- Sánchez-Moreno, C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8, 121-137.
- Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A, Saura-Calixto F. (1998): A procedure to measure the antiradical efficiency to polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 270-276.
- Sasaki, N., Abe, Y., Goda, Y., Adachi, T., Kasahara, K., Ozeki, Y. (2009). Detection of DOPA 4,5-dioxygenase (DOD) activity using recombinant protein prepared from *Escherichia coli* cells harboring cDNA encoding DOD from *Mirabilis jalapa*. *Plant Cell Physiology*, 50, 1012-1016.
- Sawa, T., Nakao, M., Akaike, T., Ono, K. y Maeda, H. (1999). Alkylperoxyl radical-scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds, implications for the anti-tumorpromoter effect of vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 397-402.
- Scalbert, A., Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*, 130, 2073-2085.
- Schlesier K, Harwat M, Böhm V, Bitsch R. (2002). Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radical Research*, 36, 177-187.
- Schnitzler, J.P., Jungblut, T.P., Heller, W., Köfferlein, M., Hutzler, P., Heinzmann, U., Schmelzer, E., Ernst, D., Langebartels, C., Sandermann, H. (1996). Tissue localization of UV-B screening pigments and of chalcone synthase mRNA in needles of Scots pine seedlings. *New Phytologist*, 132, 247-258.
- Schreiner, M., Mewis, I., Huyskens-Keil, S., Jansen, M.A.K., Zrenner, R., Winkler, J.B., O'Brien, N., Krumbein, A. (2012). UV-B-induced secondary plant metabolites - potential benefits for plant and human health. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31, 229-240.
- Schumacher, A.B., Brandelli, A., Macedo, F.C., Pieta, L., Klug, T.V., de Jong, E.V. (2010). Chemical and sensory evaluation of dark chocolate with addition of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Journal of Food Science and Technology*, 47, 202–206.

- Sepúlveda-Jiménez, G., Rueda-Benítez, P., Porta, H., Rocha-Sosa, M. (2005). A red beet (*Beta vulgaris*) UDP-glucosyltransferase gene induced by wounding, bacterial infiltration and oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, 56, 605-611.
- Shama, G. (2007). Process challenges in applying low doses of ultraviolet light to fresh produce for eliciting beneficial hormetic responses. *Postharvest Biology and Technology*, 44, 1-8.
- Shama, G., Alderson, P. (2005). UV hormesis in fruits: A concept ripe for commercialisation. *Trends in Food Science and Technology*, 16, 128-136.
- Sharma, P., Gujral, H.S. (2010). Antioxidant and polyphenol oxidase activity of germinated barley and its milling fractions. *Food Chemistry*, 120, 673-678.
- Sherwin, E. R. (1978). Oxidation and antioxidants in fat and oil processing. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 55, 809-814.
- Sherwin, E. R. (1990). Antioxidants. En *Food Antioxidants*. Ed. Branen, A.L., Davidson, P.M. and Salminen, S. Marcel Dekker Inc. New York.
- Shi, H., Noguchi, N., Niki, E. (2001). Flavonoids and other polyphenols. *Methods in Enzymology*, 335, 157-166.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., Nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 945-948.
- Shimada, S., Otsuki, H., Sakuta, M. (2007). Transcriptional control of anthocyanin biosynthetic genes in the Caryophyllales. *Journal of Experimental Botany*, 58, 957-967.
- Shirley, B.W. (1996). Flavonoid biosynthesis: 'new' functions for an 'old' pathway. *Trends in Plant Science*, 1, 377-382.
- Siddhuraju, P. (2006). The antioxidant activity and free radical scavenging capacity of phenolics of raw and dry heated moth bean (*Vigna aconitifolia*) (Jacq.) Marechal seed extracts. *Food Chemistry*, 99, 149-157.
- Sikora, E., Cieslik, E., Leszczynska, T., Filipiak-Florkiewicz, A., Pisulewski, P.M. (2008). The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. *Food Chemistry*, 107, 55-59.
- Sikorski, Z., Pokorny, J., Damodaran, S. (2007). Physical and chemical interactions of components in food systems. *Food Chemistry*. K. L. Parkin y O. Fennema. New York, CRC Press.
- 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. and 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.
- Sinha, R., Kawatra, A. (2003). Effect of processing on phytic acid and polyphenol contents of cowpeas (*Vigna unguiculata* (L) Walp). *Plant Foods for Human Nutrition*, 58, 1-8.
- Soliz-Guerrero, J. B., Jasso de Rodriguez, D., Rodriguez-Garcia, R., Angulo-Sanchez, J. L., Mendez-Padilla, G. (2002). Quinoa saponins: concentration and composition analysis. En: Janick, J., Whipkey, A. (Eds.), *Trends in New Crops and New Uses*. ASHS Press, Alexandria, VA, pp. 110-114.
- Soobrattee, M. A., Neergheen, V. S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O. I., Bahorun, T. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research, Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 579, 200-213.
- Sosulski, F., Kryger, K., Hogge, L. (1982). Free, esterified and insoluble-bound phenolic acids. 3. Composition of phenolic acids in cereal and potato flours. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 30, 337-340.
- Sparg, S.G., Light, M.E., Van Staden, J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, 94, 219-243.
- Spigno, G., De Faveri, D.M. (2007). Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *Journal of Food Engineering*, 78, 793-801.
- Spigno, G., Tramelli, L., De Faveri, D.M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81:200-208.
- Spitaler, R., Schlorhauser, P.D., Ellmerer, E.P., Merfort, I., Bortenschlager, S., Stuppner, H., Zidorn, C. (2006). Altitudinal variation of secondary metabolite profiles in flowering heads of *Arnica montana* cv. ARBO. *Phytochemistry*, 67, 409-417.
- Stampfer, M. J., Hennekens, C. H., Manson, J. E., Colditz, G. A., Rosner, B., Willett, W. C. (1993). Vitamin consumption and the risk of coronary disease in women. *New England Journal of Medicine*, 328, 1444-1449.
- Stikic, R., Glamoclija, D., Demin, M., Vucelic-Radovic, B., Jovanovic, Z., Milojkovic-Opsenica, D., Jacobsen, S.E., Milovanovic, M. (2012). Agronomical and nutritional evaluation of quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.) as an ingredient in bread formulations. *Journal of Cereal Science*, 55, 132-138.

- Stuardo, M., San Martín, R. (2008). Antifungal properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) alkali treated saponins against *Botrytis cinerea*. *Industrial Crops and Products*, 27, 296-302.
- Suja, K.P., Jayalekshmy, A. and Arumugan, C. 2005. Antioxidant activity of sesame cake extract. *Food Chemistry* 91, 213-219.
- Sun, J., Chu, Y.F., Wu, X., Liu, R.H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7449-7454.
- Sun, Y., Liu, D., Chen, J., Ye, X., Yu, D. (2011). Effects of different factors of ultrasound treatment on the extraction yield of the all-trans- β -carotene from citrus peels. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(1), 243-249.
- Sun, Y., Liu, Z., Wang, J. (2011). Ultrasound-assisted extraction of five isoflavones from *Iris tectorum* Maxim. *Separation and Purification Technology*, 78, 49–54.
- Takahashi, M., Suzuki, M., Kushida, K., Miyamoto, S., Inoue, T. (1997). Relationship between pentosidine levels in serum and urine and activity in rheumatoid arthritis. *British Journal of Rheumatology*, 36, 637–642.
- Tang, D., Dong, Y., Ren, H., Li, L., He, C. (2014). A review of phytochemistry, metabolite changes, and medicinal uses of the common food mung bean and its sprouts (*Vigna radiata*). *Chemistry Central Journal*, 8, 1-9.
- Tang, K., Zhan, J.C., Yang, H.R., Huang, W.D. (2010). Changes of resveratrol and antioxidant enzymes during UV-induced plant defense response in peanut seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 167, 95-102.
- Tang, Y., Li, X., Zhang, B., Chen, P., Liu, R., Tsao, R. (2015). Characterisation of phenolics, betanins and antioxidant activities in seeds of three *Chenopodium quinoa* Willd. genotypes. *Food Chemistry*, 166, 380-388.
- Taylor, L.T. (1996). Properties of supercritical fluids. *Supercritical fluid extraction*. John Wiley & Sons. New York, USA. pp. 7–27.
- Tessier, F.J. (2010). The Maillard reaction in the human body. The main discoveries and factors that affect glycation. *Pathologie Biologie*, 58, 214-219.
- Thompson, D., Moldeus, P. (1988). Citotoxicity of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene in insolated rat hepatocytes. *Biochemical Pharmacology*, 37, 2201-2207.
- Thompson, L.U., Robb, P., Serraino, M., Cheung, F. (1991). Mammalian lignan production from various foods. *Nutrition and Cancer*, 16, 43–52.
- Tian, B., Xie, B., Shi, J., Wu, J., Cai, Y., Xu, T., Xue, S., Deng, Q. (2010). Physicochemical changes of oat seeds during germination. *Food Chemistry*, 119, 1195-1200.

- Tian, S., Nakamura, K., Kayahara, H. (2004). Analysis of phenolic compounds in white rice, brown rice, and germinated brown rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4808-4813.
- Tomas-Barberan, F.A., Clifford, M.N. (2000). Flavanones, chalcones and dihydrochalcones-nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1073-1080.
- Tommasi, F., Paciolla, C., De Pinto, M.C., De Gara, L. (2001). A comparative study of glutathione and ascorbate metabolism during germination of *Pinus pinea* L. seeds. *Journal of Experimental Botany*, 361, 1647-1654.
- Traore, T., Mouquet, C., Icard-Verniere, C., Traore, A. S., Treche, S. (2004). Changes in nutrient composition, phytate and cyanide contents and alpha-amylase activity during cereal malting in small production units in *Ouagadougou* (Burkina Faso). *Food Chemistry*, 88, 105-114.
- Tsaliki, E., Lagouri, V. y Doxastakis, G. (1999). Evaluation of the antioxidant activity of lupin seed flour and derivatives (*Lupinus albus ssp.* Graecus). *Food Chemistry*, 65, 71-75.
- Tsurunaga, Y., Takahashi, T., Katsube, T., Kudo, A., Kuramitsu, O., Ishiwata, M., Matsumoto, S. (2013). Effects of UV-B irradiation on the levels of anthocyanin, rutin and radical scavenging activity of buckwheat sprouts. *Food Chemistry*, 141, 552-556.
- Valcárcel-Yamani, B., Caetano, S. (2012). Applications of Quinoa (*Chenopodium Quinoa* Willd.) and Amaranth (*Amaranthus* Spp.) and Their Influence in the Nutritional Value of Cereal Based Foods. *Food and Public Health*, 2, 265-275.
- Valls-Bellés, V., Torres, M.C., Muñiz, P., Boix, L. (2004). The protective effects of melanoidins in adryamicin-induced oxidative stress in isolated rat hepatocytes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1701-1707.
- van Acker S. A. B. E., van den Berg D. J., Tromp, M. N. J. L., Griffioen, D. H., van Bennekom, W. P., van der Vijgh, W. J. F., Bast, A. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 331- 342.
- van Boekel, M.A.J.S. (2006). Formation of flavour compounds in the Maillard reaction. *Biotechnology Advances*, 24, 230-233.
- van den Broeck, I., Ludikhuyze, L., Weemaes, C., van Loey, A. and Hendrickx, M. (1998) Kinetics for Isobaric-isothermal Degradation of L-ascorbic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2001-2006.
- Vásquez-Caicedo, A.L., Schilling, S., Carle, R., Neidhart, S. (2007). Effects of thermal processing and fruit matrix on [beta]-carotene stability and enzyme inactivation during transformation of mangoes into purée and nectar. *Food Chemistry*, 102, 1172-1186.

- Vega-Gálvez, A., Miranda, M., Vergara, J., Uribe, E., Puente, L., Martínez, E. A. (2010). Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). An ancient Andean grain: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 2541-2547.
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry. *Innovative Food Science Emerging*, 9, 161-169.
- Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8, 303-313.
- Vitaglione, P., Fogliano, V., Pellegrini, N. (2012). Coffee, colon function and colorectal cancer. *Food and Function*, 3, 916-922.
- Vitaglione, P., Morisco, F., Mazzone, G., Amoroso, D.C., Ribocco, M.T., Romano, A. (2010). Coffee reduces liver damage in a rat model of steatohepatitis: the underlying mechanisms and the role of polyphenols and melanoidins. *Hepatology*, 52, 1652-1661.
- Vollmannová, A., Margitanová, E., Tóth, T., Timoracká, M., Urmínská, D., Bojnanská, T., Čicová, I. (2013). Cultivar influence on total polyphenol and rutin contents and total antioxidant capacity in buckwheat, amaranth, and quinoa seeds. *Czech Journal of Food Science*, 31, 589-595.
- Wanasundara, U.N., Shahidi, F. (1998). Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. *Food Chemistry*, 63:335-342.
- Wang, C.C., Chu, C.Y., Chu, K.O., Choy, K.W., Khaw, K.S., Rogers, M.S., Pang, C.P. (2004). Trolox equivalent antioxidant capacity assay versus oxygen radical absorbance capacity assay in plasma. *Clinical Chemistry*, 50, 952-954.
- Wang, C.Y., Chen, C.T., Wang, S.Y. (2009). Changes of flavonoid content and antioxidant capacity in blueberries after illumination with UV-C. *Food Chemistry*, 117, 426-443.
- Wang, H., Provan, G.J., Helliwell, K. (2004). Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. *Food Chemistry*, 87,307-311.
- Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y., Li, X., (2008). Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chemistry*, 106, 804-810.
- Wang, L.Q. (2002). Mammalian phytoestrogens: enterodiol and enterolactone. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 777, 289-309.
- Wang, S., Meckling, K.A., Marcone, M.F., Kakuda, Y., Tsao, R. (2011). Synergistic, additive, and antagonistic effects of food mixtures on total antioxidant capacities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 960-968.

- Wang, Z., Pan, Z., Ma, H., Atungulu, G.G. (2011). Extract of phenolics from pomegranate peels. *The Open Food Science Journal*, 5, 17-25.
- Wei, Z.F., Luo, M., Zhao, C.J., Li, C.Y., Gu, C.B., Wang, W., Zu, Y.G., Efferth, T., Fu, Y.J. (2013). UV-Induced Changes of Active Components and Antioxidant Activity in Postharvest Pigeon Pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 1165-1171.
- Weisburger, J.H. (1999). Mechanisms of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea. *Food and Chemical Toxicology* 37(9/10), 943–948.
- Wells-Knecht, M.C., Thorpe, S.R., Baynes, J.W. (1995). Pathways of formation of glycoxidation products during glycation of collagen. *Biochemistry*, 34, 15134-15141.
- Wen, T.N., Prasad, K.N., Yang, B., Ismail, A. (2010). Bioactive substance contents and antioxidant capacity of raw and blanched vegetables. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 464-469.
- Wennermark, B., Ahlmén, H., Jägerstad, M. (1994). Improved vitamin E retention by using freshly milled whole-meal wheat-flour during drum-drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42 (6), 1348-1351.
- Westenhoefer, J., Bellisle, F., Blundell, J. E., de Vries, J., Edwards, D., Kallus, W., Milon, H., Pannemans, D., Tuijelaars, S., Tuorila, H. (2004). PASSCLAIM – Mental state and performance. *European Journal of Nutrition*, 43(2), 85-117.
- Wettasinghe, M., Shahidi, F. (1999). Evening primrose meal: A source of natural antioxidants and scavenger of hydrogen peroxide and oxygen-derived free radicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1801-1812.
- Wijewickreme, A.N., Kitts, D.D., Durance, T.D. (1997). Reaction conditions influence the elementary composition and metal chelating affinity of nondialyzable model Maillard reaction products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4577-4583.
- Wildman, R.E.C. (2007). *Handbook of nutraceuticals and functional foods*. Second edition. Wildman R.E.C., Wildman, R., Wallace, T.C. (Eds). CRC Press, Taylor & Francis Group. Boca Raton (EE.UU.). 562 p.
- Winkel-Shirley, B. (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 218-223.
- Wnorowski, A., Yaylayan, V.A. (2000). Influence of pyrolytic and aqueous-phase reactions on the mechanism of formation of Maillard products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3549-3554.

- Wongkittipong, R., Prat, L., Damronglerd, S., Gourdon, C. (2004). Solid-liquid extraction of andrographolide from plants-experimental study kinetic reaction and model. *Separation and Purification Technology*, 40, 147-154.
- Wootton-Beard, P.C., Ryan, L. (2011). Improving public health? : The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages. *Food Research International*, 44, 3135-3148.
- Wright, K.H., Pike, O.A., Fairbanks, D.J. Huber, C.S. (2002). Composition of *Atriplex hortensis*, sweet and bitter *Chenopodium quinoa* seeds. *Journal of Food Science*, 67, 1383-1385.
- Xia, E.Q., Ai, X.X., Zang, S.Y., Guan, T.T., Xu, X.R., Li, H.B. (2011). Ultrasound-assisted extraction of phyllyrin from *Forsythia suspensa*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18, 549–552.
- Xu, B., Chibber, R., Ruggiero, D., Kohner, E., Ritter, J., Ferro, A. (2003). Impairment of vascular endothelial nitric oxide synthase activity by advanced glycation end products. *Faseb Journal*, 17, 1289-1291.
- Xu, S., Hu, J., Tan, H., Zhang, S. (2008). Effects of genotype and environment on vitamin C content and its heterosis in towel gourd fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 293-293.
- Yahya, H., Linforth, R.S.T., Cook, D.J. (2014). Flavour generation during commercial barley operations: A time course study. *Food Chemistry*, 145, 378–387.
- Yang, L., Jiang, J.G., Li, W.F., Chen, J., Wang, D.Y., Zhu, L. (2009). Optimum extraction process of polyphenols from the bark of *Phyllanthus emblica* L. based on the response surface methodology. *Journal of Separation Science*, 32, 1437-1444.
- Yao, L.H., Jiang, Y.M., Shi, J., Tomás-Barberán, F.A., Datta, N., Singanusong, R., Chen, S.S. (2004). Flavonoids in Food and Their Health Benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*, 59, 113-122.
- Yen, G., Chen, H. (1995). Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 27-32.
- Yen, G.C., Tsai, L.C., Lii, J.D. (1992). Antimutagenic effect of Maillard browning products obtained from amino acids and sugars. *Food and Chemical Toxicology*, 30, 127-132.
- Yilmaz, Y., Toledo, R.T. (2006). Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 41-44.
- Zacchini, M., de Agazio, M. (2004). Spread of oxidative damage and antioxidative response through cell layers of tobacco callus after UV-C treatment. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42, 445–450.

-
- Zhang, G., He, L., Hu, M. (2011). Optimized ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Prunella vulgaris* L. and evaluation of antioxidant activities in vitro. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12, 18-25.
- Zhang, W.J., Björn, L.O. (2009). The effect of ultraviolet radiation on the accumulation of medicinal compounds in plants. *Fitoterapia*, 80, 207-218.
- Zhang, Y., Zhang, Y. (2007). Formation and reduction of acrylamide in Maillard reaction: A review based on the current state of knowledge. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47, 521-542.
- Zhang, Z.Z., Li, X.X., Chu, Y.N., Zhang, M.X., Wen, Y.Q., Duan, C.Q., Panm Q.H. (2012). Three types of ultraviolet irradiation differentially promote expression of shikimate pathway genes and production of anthocyanins in grape berries. *Plant Physiology and Biochemistry*, 57, 74-83.
- Zhu, N., Sheng, S., Li, D., Lavoie, E., Karwe, M., Rosen, R., Ho, C. (2001). Antioxidative flavonoid glycosides from quinoa seeds (*Chenopodium Quinoa* Willd.). *Journal of Food Lipids*, 8, 37-44.
- Zhu, Q.Y., Huang, Y., Chen, Z.Y. (2000). Interaction between flavonoids and α -tocopherol in human low density lipoprotein. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 11(1), 14-21.
- Zieliński, H., Michalska, A., Piskula, M.K., Kozłowska, H. (2006). Antioxidants in thermally treated buckwheat groats. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50, 824-832.
- Zu, Y.G, Wei, X.X., Yu, J.H., Li, D.W., Pang, H.H., Tong, L. (2011). Responses in the physiology and biochemistry of Korean pine (*Pinus koraiensis*) under supplementary UV-B radiation. *Photosynthetica*, 49, 448-458.