

## RECUPERACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LIGNANOS DE LA SEMILLA DE LINO.

Negro, Emilse<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Cátedra de Bromatología y Nutrición. Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral.*

*Director/a: Dr. Bernal, Claudio*

*Codirector/a: Dra. Vera Candiotti, Luciana*

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Lino, Lignanos, Extracción, Optimización, Nutrientes Funcionales

### INTRODUCCIÓN

El cambio en el estilo de vida humana está generando modificaciones en los hábitos alimentarios y de consumo, tendiendo a mejorar la nutrición como sistema de prevención, incluyendo productos en el mercado que contribuyan a la salud y bienestar. En este sentido, en los últimos años, se ha revalorizado el consumo humano de lino (*Linum usitatissimum* L) y de sus derivados, por sus numerosos efectos beneficiosos sobre la salud. Se sabe que el aceite de lino es una fuente rica en ácidos grasos poliinsaturados, con efectos preventivos sobre enfermedades crónicas no transmisibles. De la extracción de aceite de lino se genera un subproducto, denominado expeller, rico en proteínas y compuestos bioactivos, como esteroides, tocoferoles, escualeno, carotenoides y compuestos fenólicos, como los lignanos. Estos últimos, son fitoestrógenos que pueden tener acciones similares a los estrógenos en los humanos y se encuentran formando parte de una estructura polimérica compleja llamada oligómero, una macromolécula compuesta por 5 moléculas de secoisolariciresinoldiglicósido (SDG) y 4 moléculas de ácido hidroximetilglutárico (HMG) unidas mediante enlaces éster. Otros compuestos fenólicos, como el glucósido de ácido cafeínico (CAG), glucósido de ácido *p*-cumárico (CouAG) y glucósido de ácido ferrúlico (FAG) participan de la macromolécula mediante la unión con el glucósido de SDG. Para liberar a los lignanos del oligómero es necesario realizar un proceso de hidrólisis alcalina, donde se liberan los glicanos (SDG, CouAG, FAG) y luego una hidrólisis ácida donde se liberan finalmente los lignanos individuales o aglicones (secoisolariciresinol-SECO-, ácido *p*-cumárico, ácido ferrúlico). Estudios recientes demostraron que dietas ricas en lignanos reducen el riesgo de enfermedades cardiovasculares, carcinogénesis e inflamación. Dichos estudios proporcionan la base para el interés actual por el uso de compuestos bioactivos naturales como ingredientes alimentarios funcionales y como suplementos alimenticios. Por lo que, la cuantificación de estos compuestos es sumamente importante por su valor nutricional.

Título del proyecto: Aprovechamiento de residuos de la industria aceitera para el mejoramiento de la estabilidad y valor nutricional de aceites ricos en ácidos grasos omega 3.

Instrumento: Beca Interna Doctoral

Año convocatoria: 2020

Organismo financiador: CONICET

Director/a: Dr. Claudio A. Bernal

## OBJETIVO

- Recuperar y cuantificar los lignanos del expeller molido y desgrasado de la semilla de lino.

## METODOLOGÍA

### **Etapas 1: Optimización de la extracción de lignanos**

Para evaluar el efecto que tiene el tipo de solvente, el tiempo y la temperatura sobre la extracción de los lignanos presentes en el expeller de lino molido y desgrasado, se construyó un diseño experimental factorial general que consistió en la realización de 12 puntos experimentales. Los factores fueron evaluados en los siguientes niveles: tipo de solvente (metanol:agua y etanol:agua, 70/30 v/v), tiempo de extracción (1, 2 y 6 horas) y temperatura (25 y 40°C).

Para realizar cada experiencia se pesó 1 g de expeller previamente molido con un molinillo y desgrasado con éter de petróleo, se adicionaron 10 mL de la mezcla extractante y se realizó la extracción acorde a las condiciones experimentales establecidas en el diseño. Luego de la realización de cada punto experimental se midió la capacidad reductora (CR) del extracto empleando el método de Folin-Ciocalteu. Para estimarla cantidad de LGN extraídos se utilizó una curva de calibrado construida con un estándar de SECO. Luego se procedió a realizar un análisis ANOVA sobre los resultados obtenidos (mg SECO/g de expeller) considerando que hay significancia de efectos cuando  $p < 0.1$ .

### **Etapas 2: Optimización de la hidrólisis alcalina**

Para evaluar el efecto que tienen la concentración de NaOH, el tiempo y la temperatura sobre el proceso de hidrólisis alcalina para la liberación de los lignanos mayoritarios del expeller de lino, se construyó un diseño experimental factorial general que consistió en la realización de 10 puntos experimentales. Los factores fueron evaluados en los siguientes niveles: concentración NaOH (0.3 y 1 mol/L), tiempo (1, 3 y 12 horas) y temperatura (25 y 60 °C). La hidrólisis ácida se realizó sin variación de factores acidificando una alícuota del extracto hidroalcohólico obtenido posterior a la hidrólisis alcalina y calentando en baño de agua a 95°C durante 2 horas.

Dado que la liberación de los lignanos implica un incremento en la CR del extracto hidroalcohólico, se utilizó el método de Folin-Ciocalteu para evidenciar la ruptura del oligómero y posterior liberación de los glicanos y aglicones. Por consiguiente, se midió la CR del extracto hidroalcohólico y de los extractos obtenidos luego de cada hidrólisis, de cada punto experimental.

Empleando la curva de calibrado realizada con SECO se estimó la concentración de lignanos liberada en cada etapa. Como respuesta se evaluó el cambio (incremento o disminución) de la CR luego de la hidrólisis alcalina ( $CR_1$ =liberación de los glicanos) y luego de la hidrólisis ácida ( $CR_2$ =liberación de los aglicanos), respecto a la CR inicial. Por último, se procedió a realizar un análisis ANOVA sobre los resultados obtenidos (se consideró que hay significancia de efectos cuando  $p < 0.1$ ).

## RESULTADOS Y CONCLUSIONES

### **Etapas 1: Optimización de la extracción de lignanos**

En la Tabla 1 se muestran los puntos experimentales (combinación de factores y niveles) realizados en el diseño con sus correspondientes respuestas.

Tabla 1: Diseño experimental factorial general realizado para la selección de factores evaluados en la extracción de LGN

| FACTORES         |             |                  | RESPUESTA          |
|------------------|-------------|------------------|--------------------|
| Tipo de solvente | Tiempo (hs) | Temperatura (°C) | mg SECO/g expeller |
| Etanol           | 2           | 40               | 7.93               |
| Metanol          | 2           | 40               | 7.41               |
| Metanol          | 1           | 25               | 7.10               |
| Etanol           | 1           | 25               | 7.39               |
| Metanol          | 2           | 25               | 7.81               |
| Etanol           | 2           | 25               | 7.83               |
| Metanol          | 6           | 40               | 6.05               |
| Etanol           | 6           | 40               | 8.31               |
| Metanol          | 1           | 40               | 7.86               |
| Etanol           | 1           | 40               | 5.59               |
| Metanol          | 6           | 25               | 7.62               |
| Etanol           | 6           | 25               | 5.13               |

Luego de realizar el test ANOVA se observó que ninguno de los tres factores (tipo de solvente, tiempo y temperatura) afectó significativamente la cantidad de lignanos extraída ( $p > 0.1$ ). Esto significa que independientemente de los niveles de factores seleccionados, la respuesta (cantidad de lignanos extraída) será la misma (Tabla 2). Por consiguiente, para continuar con las demás experiencias se seleccionó como extractante la mezcla etanol:agua (70:30, v/v) dado que minimiza la pérdida por evaporación cuando se realiza calentamiento (en la extracción de LGN o en los siguientes pasos de hidrólisis), es una mezcla más económica y menos contaminante, un tiempo de 2 horas y temperatura de 25 °C.

Tabla 2: Valores de probabilidad obtenidos para cada factor analizado en la extracción de LGN

| Factores                | Valor de probabilidad |
|-------------------------|-----------------------|
| Modelo de ajuste        | 0.7727                |
| Tipo solvente           | 0.7871                |
| Tiempo                  | 0.9135                |
| Temperatura             | 0.5119                |
| R <sup>2</sup> ajustado | -0.2521               |

## Etapa 2: Optimización de la hidrólisis alcalina

En la Tabla 3 se muestran los puntos experimentales (combinación de factores y niveles) realizados en el diseño con sus correspondientes respuestas.

Tabla 3: Diseño experimental factorial general realizado para la selección de factores evaluados en la hidrólisis alcalina

| FACTORES     |             |                  | RESPUESTAS |       |
|--------------|-------------|------------------|------------|-------|
| NaOH (mol/L) | Tiempo (hs) | Temperatura (°C) | CR1        | CR 2  |
| 0.3          | 1           | 25               | 0.00       | 18.38 |
| 1            | 1           | 25               | 0.00       | 21.95 |
| 0.3          | 12          | 25               | 4.20       | 32.92 |
| 1            | 12          | 25               | 0.00       | 0.00  |
| 0.3          | 3           | 25               | 9.01       | 29.75 |
| 1            | 3           | 25               | 0.00       | 16.20 |
| 0.3          | 1           | 60               | 18.33      | 22.88 |
| 1            | 1           | 60               | 13.11      | 46.30 |
| 0.3          | 3           | 60               | 34.94      | 49.07 |
| 1            | 3           | 60               | 31.11      | 63.24 |

Luego de realizar el test ANOVA se observó que todos los factores individuales evaluados (concentración de NaOH, tiempo y temperatura) y la interacción entre el tiempo y la temperatura (BC) afectaron significativamente la respuesta CR1 (liberación de los glicanos) (Tabla 4). Por otra parte, sólo la temperatura de extracción afectó significativamente a la CR2 (liberación de los aglicanos). Asimismo, se observó que la interacción entre la concentración de NaOH y la temperatura fue significativa (AC) (Tabla 4). Analizando la Figura 1 se observó que una hidrólisis llevada a cabo con 1 mol/L NaOH, durante 3 hs y 60°C favorece la liberación de los glicanos y aglicanos.

Tabla 4: Valores de probabilidad obtenidos para cada factor analizado en el proceso de hidrólisis alcalina

| Factores                | Valor de probabilidad |        |
|-------------------------|-----------------------|--------|
|                         | CR1                   | CR2    |
| Modelo de ajuste        | 0.0008                | 0.0425 |
| A-NaOH (mol/L)          | 0.0367                | 0.7812 |
| B-Tiempo (hs)           | 0.0065                | 0.7577 |
| C-Temperatura (°C)      | 0.0002                | 0.0165 |
| AB                      | 0.8062                | 0.7577 |
| AC                      | 0.9974                | 0.0763 |
| BC                      | 0.0165                | 0.7577 |
| R <sup>2</sup> ajustado | 0.9868                | 0.7204 |

CR1: liberación de glicanos; CR2: liberación de aglicanos

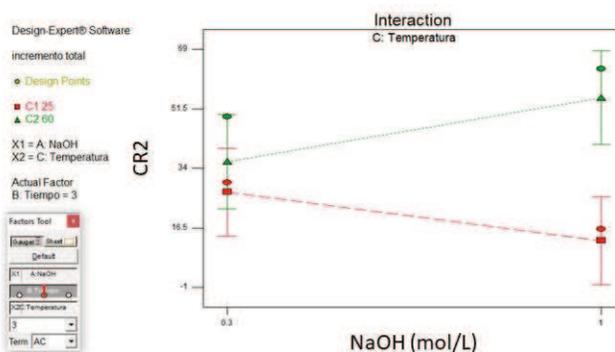


Figura 1. Gráfica de nivel para la variación de temperatura y concentración de NaOH (tiempo de extracción 3 horas).

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- **Chen LY, Cheng CW, Liang JY**, 2015. Effect of esterification condensation on the Folin–Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols, *Food Chemistry*, 170, 10-15.
- **Cheng C, Yu X, McClements D, Huang Q, Tang H, Yu K, Xiang X, Chen P, Wang X, Deng Q**, 2019. Effect of flaxseed polyphenols on physical stability and oxidative stability of flaxseed oil-in-water nanoemulsions, *Food Chemistry*, 301, 125207.
- **Eliasson C, Kamal-Eldin A, Andersson R, Aman P**, 2003. High-performance liquid chromatographic analysis of secoisolariciresinoldiglucoside and hydroxycinnamic acid glucosides in flaxseed by alkaline extraction, *Journal Chromatography A*, 1012(2), 151-9.
- **Li X, Yuan JP, Xu SP, Wang JH, Liu X**, 2008. Separation and determination of secoisolariciresinoldiglucoside oligomers and their hydrolysates in the flaxseed extract by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1185(2), 223-32.