

**UNIVERSIDAD PERUANA UNIÓN**  
FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA  
Escuela Profesional de Ingeniería de Industrias Alimentarias



**Optimización de los parámetros de extracción de compuestos  
fenólicos totales de hojas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.)  
variedad INIA 420 – Negra collana**

Por:

Andrés Alberto Corimayhua Silva

Asesor:

Reynaldo Justino Silva Paz

Lima, diciembre de 2017

**Área temática:** Otras Ingenierías y Tecnologías

**Línea de Investigación – UPeU:** Ciencia de los Alimentos

**Ficha catalográfica:**

Corimayhua Silva, Andrés Alberto

Optimización de los parámetros de extracción de compuestos fenólicos totales de hojas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) variedad INIA 420 – Negra Collana / Andrés Alberto Corimayhua Silva; Asesor: Dr. Reynaldo Justino Silva Paz. – Lima, 2018.

114 páginas: gráficos, tablas.

Tesis (Titulación), Universidad Peruana Unión, Facultad de Ingeniería y Arquitectura, Escuela Profesional de Ingeniería de Industrias Alimentarias, 2017.

Incluye: referencias, resumen y anexos.

1. Hojas de quinua 2. Compuestos fenólicos Totales 3. Capacidad Antioxidante 4. Diseño Central Compuesto

## DECLARACIÓN JURADA DE AUTORÍA DEL INFORME DE TESIS

Reynaldo Justino Silva Paz, de la Facultad de Ingeniería y Arquitectura, Escuela Profesional de Ingeniería de Industrias Alimentarias, de la Universidad Peruana Unión.

### DECLARO

Que el presente informe de investigación titulado: "**Optimización de los parámetros de extracción de compuestos fenólicos totales de hojas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) variedad INIA 420 – Negra Collana**" que constituye la memoria que presenta el Bachiller **Andrés Alberto Corimayhua Silva** para aspirar al título de Profesional de **Ingeniero** ha sido realizado en la Universidad Peruana Unión bajo mi dirección.

Las opiniones y declaraciones en este informe son de entera responsabilidad del autor, sin comprometer a la institución.

Y estando de acuerdo, firmo la presente constancia en Lima, a los 27 días de agosto del año 2018.



---

Dr. Reynaldo Justino Silva Paz

Optimización de los parámetros de extracción de compuestos  
fenólicos totales de hojas de quinua (*Chenopodium quinoa Willd.*)  
variedad INIA 420 – Negra collana

# TESIS

Presentada para optar el Título Profesional de Ingeniero de Alimentos

## JURADO CALIFICADOR

  
Ph. D. Leonor Segunda Bustinza Cabala  
**Presidenta**

  
Ing. Eduardo Alberto Meza Mantari  
**Secretario**

  
Dr. Noe Benjamin Pampa Quispe  
**Vocal**

  
Ing. Joel Jerson Coaquira Quispe  
**Vocal**

  
Dr. Reynaldo Justino Silva Paz  
**Asesor**

Lima, 29 de diciembre de 2017

## DEDICATORIA

A Dios y a mis padres.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar a Dios, por otorgarme las capacidades física, mental y espiritual para realizar esta investigación.

Al señor Genaro Miranda, por su gran aporte en la entrega de la materia prima.

Al Ing. Guido Anglas, por permitir el uso del laboratorio Centro de Investigación de Tecnología de los Alimentos (UPeU – Juliaca) para el acondicionamiento de la materia prima.

A la Dra. Leonor Bustinza, por permitir la implementación de nuevos métodos de análisis de alimentos en la E.P. de Ingeniería de Industrias Alimentarias mediante la compra de insumos químicos.

Al Ing. Joel Coaquira, por su motivación, apoyo y confianza para investigar en la Ciencia de Alimentos.

A mis amigos Elmer Véliz y Orlando Flores, por la capacitación en los ensayos de composición química de alimentos.

Al Dr. Noé Pampa, por los consejos brindados durante la ejecución del proyecto de investigación.

Al Dr. Reynaldo, por su asesoría durante las etapas del proceso de tesis.

A mis padres, por el apoyo moral, motivacional y espiritual.

A todas las personas que contribuyeron en la realización de esta investigación.

## ÍNDICE GENERAL

Capítulo I INTRODUCCIÓN.....	1
Capítulo II REVISIÓN DE LITERATURA .....	4
4.1 Planta de quinua .....	4
4.2 Hojas de quinua .....	6
4.2.1 Generalidades .....	6
4.2.2 Clasificación taxonómica .....	7
4.2.3 Nomenclatura regional.....	8
4.2.4 Distribución prehispánica.....	8
4.2.5 Variedad INIA 420 Negra Collana.....	10
4.2.6 Característica estructural.....	11
4.2.7 Labores de post-cosecha y rendimiento .....	12
4.2.8 Plagas y enfermedades .....	13
4.2.9 Composición fisicoquímica y valor nutricional.....	20
4.3 Compuestos fenólicos.....	26
4.3.1 Pigmentos .....	32
4.4 Ensayos de Capacidad Antioxidante.....	34
4.4.1 Ensayo de fenoles totales por el reactivo Folin Ciocalteu (TPC).....	35
4.4.2 Ensayo de Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox (TEAC) ..	37
4.4.3 Ensayo de Capacidad de Barrido del radical DPPH .....	39
Capítulo III MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
4.1 Lugar de ejecución.....	42
4.2 Insumos químicos y equipos .....	42
4.3 Materia vegetal y preparación de la muestra.....	42

4.4	Caracterización de la materia vegetal .....	43
4.4.1	Contenido de humedad .....	43
4.4.2	Contenido de cenizas .....	43
4.4.3	Contenido de lípidos .....	43
4.4.4	Contenido de proteínas .....	44
4.5	Extracción de la materia vegetal .....	44
4.6	Composición química del extracto vegetal .....	45
4.6.1	Determinación del contenido fenólico total (TPC) .....	45
4.6.2	Ensayo de barrido del radical DPPH.....	45
4.6.3	Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox (TEAC) .....	46
4.7	Diseño experimental y análisis estadístico .....	46
Capítulo IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....		51
4.1	Caracterización de la materia vegetal .....	51
4.2	Análisis estadístico de la extracción de TPC .....	54
4.2.1	Diseño factorial 2 <sup>2</sup> .....	54
4.2.2	Diseño central compuesto .....	63
4.3	Composición química de los extractos de hojas de quinua .....	78
Capítulo V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....		84

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución de algunas especies del género <i>Chenopodium</i> .....	9
Tabla 2. Características morfológicas de la quinua INIA 420 Negra Collana.....	11
Tabla 3. Composición fisicoquímica de las hojas de quinua (g/100 g peso fresco)21	
Tabla 4. Ingesta diaria recomendada de algunas vitaminas y minerales.....	22
Tabla 5. Concentraciones de minerales en hojas de quinua (mg/100 g peso fresco)22	
Tabla 6. Composición de vitaminas en hojas de quinua.....	24
Tabla 7. Composición de aminoácidos de hojas de quinua comparada con otros vegetales.....	25
Tabla 8. Las principales clases de compuestos fenólicos en plantas.....	30
Tabla 9. Modelo de Diseño factorial 2 <sup>2</sup> .....	47
Tabla 10. Modelo de Diseño Central Compuesto.....	48
Tabla 11. Composición fisicoquímica de las hojas de quinua INIA 420 Negra Collana .....	51
Tabla 12. Composición fisicoquímica de otros vegetales.....	52
Tabla 13. ANOVA del diseño factorial 2 <sup>2</sup> .....	56
Tabla 14. Diseño factorial 2 <sup>2</sup> para la extracción de compuestos fenólicos totales (mg GAE/100 g H.Q.).....	58
Tabla 15. Estimación de los efectos para el contenido de TPC a 75 min.....	60
Tabla 16. Diseño Central Compuesto para la extracción de TPC de hojas de quinua .....	65
Tabla 17. ANOVA de los tiempos de extracción sobre el TPC.....	66
Tabla 18. Estimación de los efectos para el contenido de TPC a 45 min.....	72
Tabla 19. Estimación de los efectos para el contenido de TPC a 60 min.....	73
Tabla 20. Coeficientes de regresión de los tiempos de extracción a 60 min.....	76
Tabla 21. Valores experimentales vs predichos de TPC de H.Q. a 60 min.....	77
Tabla 22. Composición química de los extractos de hojas de quinua INIA 420 Negra Collana.....	78
Tabla 23. Composición química de extractos de hojas de otros vegetales.....	79

Tabla 24. Compuestos fenólicos de hojas de quinua .....	81
Tabla 25. Correlación de análisis de TPC vs DPPH y TEAC.....	83

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vista general de <i>Chenopodium quinoa</i> (B); flor hermafrodita (B1); flor hembra (B2); fruto (B3); semilla (B4).....	5
Figura 2. Forma de las hojas de quinua .....	6
Figura 3. Larva del “Ticuchi” ( <i>Copitarsia turbata</i> ) .....	14
Figura 4. Daño del “ticuchi” en hoja de quinua .....	14
Figura 5. Gusano cortador, grasiento o de tierra ( <i>Agrotis ipsilon</i> ).....	14
Figura 6. Daño de <i>Agrotis ípsilon</i> .....	14
Figura 7. <i>Eurysacca melanocampta</i> (“polilla de la quinua”) .....	16
Figura 8. Daño de la larva de <i>Eurysacca melanocampta</i> .....	16
Figura 9. Larva de <i>Eurysacca quinoa</i> .....	16
Figura 10. <i>Eurysacca quinoa</i> (“polilla de la quinua”).....	16
Figura 11. Daño producido en las hojas de quinua por insectos minadores .....	18
Figura 12. Daños de mildiu en diferentes variedades de hojas de quinua .....	19
Figura 13. Estructura de seis fenoles simples (Harborne, 1989) .....	26
Figura 14. Origen biosintético de fenoles de plantas de las vías del shikimato y fenilalanina.....	28
Figura 15. Estructuras de algunos fenólicos vegetales comunes .....	29
Figura 16. Neutralización del radical ABTS <sup>•+</sup> por acción de antioxidantes.....	37
Figura 17. Espectro de absorción del radical catión ABTS.....	38
Figura 18. DPPH (radical libre) (Huang et al., 2005) .....	40
Figura 19. Difenilpicrilhidrazina (no radical) (Molyneux, 2004) .....	40
Figura 20. Diagrama de flujo general de análisis aplicados a las hojas de quinua	50
Figura 21. Extracto etéreo de hojas de quinua INIA 420 Negra Collana.....	53
Figura 22. Curva de extracción de TPC en el intervalo de 90 min .....	60
Figura 23. Gráfico de probabilidad normal de la extracción de TPC a 75 min .....	61
Figura 24. Superposición de gráficos de contorno de la extracción de TPC a los tiempos de 1 – 90 min.....	62

Figura 25. Diferencia de agitación de H.Q. en solución etanólica de mayor (A) y menor (B) concentración .....	64
Figura 26. Histograma de residuales (A) y gráfico de probabilidad normal (B) del contenido de TPC a 60 min .....	69
Figura 27. Curva de extracción de TPC por 105 min.....	71
Figura 28. Gráficos de contorno (A) y superficie de respuesta (B) para el contenido TPC a 60 min .....	75
Figura 29. Valores experimentales vs predichos de TPC a 60 min.....	77

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Desarrollo de la curva estándar de ácido gálico .....	94
Anexo 2. Desarrollo de la curva estándar de Trolox (ensayo DPPH) .....	95
Anexo 3. Desarrollo de la curva estándar de Trolox (ensayo TEAC).....	96
Anexo 4. Curvatura para el ANOVA del diseño factorial $2^2$ .....	97
Anexo 5. Test de Tukey para el diseño factorial $2^2$ .....	98

## SÍMBOLOS USADOS

<b>ABTS</b>	2,2-Azino-bis (3 ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt.
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>CONCYTEC</b>	Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica
<b>FAO</b>	Food & Agriculture Organization
<b>DCCR</b>	Diseño Central Compuesto Rotativo (CCRD – Central Composite Rotatable Design)
<b>DPPH</b>	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
<b>EAG</b>	Equivalentes de Ácido Gálico (GAE – Gallic Acid Equivalent).
<b>ERO</b>	Especies Reactivas de Oxígeno (ROS – Reactive Oxygen Species).
<b>H.Q.</b>	Hojas de quinua
<b>INIA</b>	Instituto Nacional de Innovación Agraria
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud (WHO – World Health Organization)
<b>TEAC</b>	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (CAET – Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox)
<b>TROLOX</b>	6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid

## RESUMEN

Las hojas de quinua, fuente rica de compuestos bioactivos in vitro, vitaminas y minerales, forman parte de la dieta de los pobladores de los Andes desde la antigüedad. En Asia y América se acostumbraba consumir este alimento en forma de ensaladas, y en el Perú, las hojas eran dispuestas como antiinflamatorios contra el dolor de muelas, fracturas, hemorragias internas y desinfectantes del tracto urinario. Por lo tanto, la falta de recursos para la investigación en el lugar de origen conduciría al descuido de algunos cultivos alimentarios. La escasa literatura con respecto al contenido fenólico y actividad biológica de las hojas de quinua condujeron a la investigación cuyo objetivo fue la optimización de los parámetros de extracción de compuestos fenólicos totales en la variedad INIA 420 – Negra Collana. La composición fisicoquímica de las hojas de quinua demostró un contenido de humedad (84%), lípidos (2%) y proteínas (1.3%) acordes a los reportes de investigación. Por otro lado, la optimización, basada en un diseño factorial 2<sup>2</sup> y posterior Diseño Central Compuesto, de los parámetros de extracción demostró que el contenido fenólico total fue obtenido a la concentración de solvente de 30% y temperatura de 50°C a los 60 min. Los extractos obtenidos en este proceso fueron sometidos a los ensayos DPPH y TEAC los cuales reportaron valores de 6414.35 y 5009.97  $\mu\text{mol T.E./100 g}$ , respectivamente. La optimización de los parámetros de extracción demostró que las hojas de quinua poseen un contenido fenólico mayor a otras hojas del grupo de las Chenopodiaceas cuya actividad anticancerígena podría convertirla en parte de una dieta saludable. Finalmente, la aplicación industrial de esta investigación en el lugar de origen sería un procedimiento relativamente nuevo que reaprovecharía las hojas de quinua y combatiría la desnutrición infantil.

**Palabras clave:** Hojas de quinua, Compuestos Fenólicos Totales, Capacidad Antioxidante, Diseño Central Compuesto.

## ABSTRACT

Quinoa leaves, rich source of in vitro bioactive compounds, vitamins and minerals, are part of the diet of the inhabitants of the Andes since ancient times. In Asia and America it was customary to consume this food in the form of salads, and in Peru, the leaves were arranged as anti-inflammatories against toothache, fractures, internal hemorrhages and disinfectants of the urinary tract. Therefore, the lack of resources for research in the place of origin would lead to the neglect of some food crops. The scarce literature regarding the phenolic content and biological activity of quinoa leaves led to research whose objective was the optimization of extraction parameters of total phenolic compounds in the variety INIA 420 - Negra Collana. The physicochemical composition of the quinoa leaves showed a moisture content (84%), lipids (2%) and proteins (1.3%) according to the research reports. On the other hand, the optimization, based on a factorial design  $2^2$  and subsequent Central Composite Design, of the extraction parameters showed that the total phenolic content was obtained at the solvent concentration of 30% and temperature of 50°C at 60 min. The extracts obtained in this process were submitted to the DPPH and TEAC assays, which reported values of 6414.35 and 5009.97  $\mu\text{mol T.E./100 g}$ , respectively. Optimization of extraction parameters showed that quinoa leaves have a higher phenolic content than other leaves of the Chenopodiaceae group, which anticancer activity could make them part of a healthy diet. Finally, the industrial application of this research in the place of origin would be a relatively new procedure that would reuse the quinoa leaves and combat child malnutrition.

**Keywords:** Chenopodium quinoa leaves, Total Phenolic Compounds, Antioxidant Capacity, Central Composite Design.

## Capítulo I INTRODUCCIÓN

En el pasado, el rechazo de los cultivos alimentarios menos conocidos no se debía a una inferioridad, sino a la falta de recursos para la investigación en el lugar de origen y a menudo a su desprecio como “plantas de los pobres” (Thoufeek Ahamed et al., 1998). Sin embargo, los cultivos de alimentos y piensos que han sido descuidados están ganando reconocimiento.

La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.), grano andino (Hugh, 1990) originario de Sudamérica perteneciente a la familia *Chenopodiaceae* (Jacobsen & Stølen, 1993), ha sido reconocida como un alimento completo debido a su calidad proteica. Posee extraordinarias propiedades nutricionales; no sólo por su contenido de proteína (15%) sino también por su gran balance de aminoácidos, contenido de almidón, minerales y aceites. Es una importante fuente de vitaminas, y contiene compuestos como polifenoles, fitoesteroles y flavonoides, con posibles beneficios nutraceuticos (Abugoch James, 2009; Letelier, Rodríguez-Rojas, Sánchez-Jofré, & Aracena-Parks, 2011).

Así como el género *Chenopodium* proporciona semillas comestibles de color rosa a crema, también suministra hojas sabrosas y nutritivas (Thoufeek Ahamed et al., 1998). En particular, las hojas del grano inca, hasta ahora tratadas como residuos sin valor, son comestibles y pueden ser consumidas en ensaladas, así también usadas como suplementos valiosos para los alimentos funcionales (Gawlik-Dziki et al., 2013).

En el 2003, el Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) promovió el consumo de hojas de quinua, cultivadas en la ciudad de Lima, debido a sus propiedades nutricionales y como un sustituto de vegetales como la acelga y la espinaca. Actualmente, la Universidad Nacional de San Agustín (UNSA), a través del Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC), plantea la creación de una mini planta piloto con el objetivo de obtener extractos nutraceuticos de las hojas de quinua y combatir la desnutrición infantil en el Perú. El proyecto se

llevará a cabo en la ciudad de Arequipa y su aplicación beneficiará a los sectores de nutrición y salud.

Las hojas de quinua (HQ) son caracterizadas por un alto contenido de compuestos fenólicos potencialmente biodisponibles, de los cuales, alrededor del 80% están biodisponibles en condiciones *in vitro* (Gawlik-Dziki, Swieca, Dziki, Tomilo, & Baraniak, 2012). Asimismo, se ha demostrado que las hojas poseen actividad antioxidante debido a su contenido de fenoles, que inhiben el estrés oxidativo causado por las especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, poca información está disponible concerniente al contenido fenólico, actividad biológica y potencial nutracéutico de los compuestos fenólicos en las hojas de quinua (Gawlik-Dziki et al., 2013).

Los compuestos fenólicos vegetales han sido analizados por ejercer diversos efectos biológicos (Fang, Yang, & Wu, 2002; Liu, 2004). Las propiedades nutracéuticas de las plantas dietéticas se consideran comúnmente en términos de su contenido fenólico (Gawlik-Dziki et al., 2013). Estos compuestos actúan como agentes anticancerígenos y cardioprotectores que pueden contribuir a la quimioprevención de una variedad de enfermedades humanas, incluyendo enfermedades coronarias, desorden neurodegenerativo, diabetes y ciertos tipos de cáncer (Gawlik-Dziki et al., 2013; Smirnoff, 2005). Además, protegen a algunas biomoléculas importantes (ADN, lípidos y proteínas) en contra del daño oxidativo inducido por las especies reactivas del oxígeno (ERO) (Cai, Luo, Sun, & Corke, 2004; Peng et al., 2010) debido a que actúan como agentes reductores de radicales libres, donadores de hidrógeno e inhibidores de enzimas pro-oxidativas (Gawlik-Dziki et al., 2013).

Los escasos estudios sobre el contenido fenólico y la actividad antioxidante durante el estado vegetativo de la hoja de quinua variedad INIA 420 Negra Collana brindan la oportunidad de investigar este alimento que surge como una nueva alternativa para combatir la desnutrición infantil en el Perú. Este potencial biológico estimula el estudio para la comprensión de la riqueza fitoquímica y fundamento bioquímico de los compuestos fenólicos y actividad antioxidante de las hojas de quinua. Además, la optimización de los parámetros de extracción de compuestos

fenólicos en las hojas de quinua haría posible la implementación de un control del proceso aportando calidad a los resultados obtenidos y su aplicación en productos alimentarios con beneficios nutracéuticos.

El objetivo de la investigación fue optimizar los parámetros de temperatura de extracción y concentración de etanol a diferentes tiempos de extracción para la determinación de compuestos fenólicos de hojas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) variedad INIA 420 – Negra collana en estado vegetativo del distrito de Cabana, Juliaca.

La investigación servirá como base académica para otros estudios científicos y así incrementar la relevancia teórica y metodológica acerca de las propiedades de las hojas de quinua. Fortalecerá el conocimiento y actitudes de la población rural, en favor del aprovechamiento y consumo de las hojas de quinua, las cuales podrían ser industrializadas y aplicadas en productos alimenticios convirtiéndose en un procedimiento relativamente nuevo en el país.

“Clama a mí, y yo te responderé, y te enseñaré cosas grandes y ocultas que tú no conoces” (Jeremías 33:3).

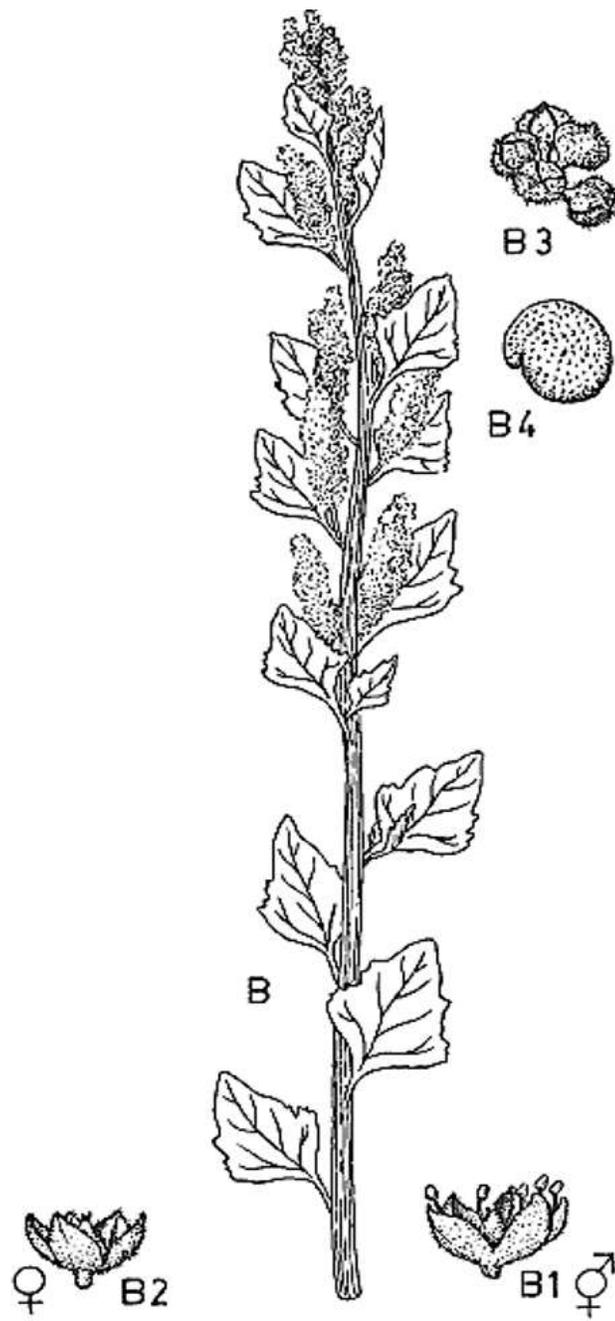
## Capítulo II REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1 Planta de quinua

La quinua es un grano altamente nutritivo que crece tradicionalmente en los altos Andes de Bolivia, Perú y Ecuador (Bois, Winkel, Lhomme, Raffailac, & Rocheteau, 2006) a 3800 msnm (Bhargava, Shukla, & Ohri, 2006). Este cultivo fue un alimento importante para los Incas y permanece todavía como un cultivo alimentario. La quinua pertenece a la clase *Dicotyledoneae*, familia *Chenopodiaceae*, género *Chenopodium*, y especie quinua (Abugoch James, 2009). Este cultivo anual de primavera alcanza una altura de planta que oscila entre 0.5 a 3 metros, posee vigorosas raíces que oscilan entre 14 – 30 cm de profundidad, corteza firme y compacta, y un grado de ramificación (Figura 1) que es controlado por factores genéticos y ambientales (Jacobsen & Stølen, 1993).

Las semillas planas, redondas y pequeñas que miden alrededor de 1.5 mm de diámetro pueden ser utilizadas para la alimentación humana, en productos de harina y en materia prima de animales debido a su alto valor nutritivo y habilidad para adaptarse a amplios rangos de condiciones agroecológicas (Stikic et al., 2012). Estas son usadas como un componente alimenticio básico, y pueden reemplazar la proteína animal en las dietas debido a su alto contenido proteico (12 – 19%), aminoácidos esenciales, tales como histidina, lisina, arginina y metionina (Kozioł, 1992; Mujica, 1984), grasa (5 – 10%), almidón (51 – 61%) y fibra cruda (2 – 3%). Esto lo hace nutricionalmente superior a la mayor parte de los cereales (Mastebroek, Limburg, Gilles, & Marvin, 2000; Thoufeek Ahamed et al., 1998).

Además, es una fuente importante de minerales, vitaminas y compuestos con posibles beneficios nutraceuticos, como los polifenoles incluyendo a los flavonoides (Abugoch James, 2009). Su valor biológico es comparable a la caseína y es especialmente adecuado para las mezclas de alimentos con legumbres y cereales (Mujica, 1984).



**Figura 1. Vista general de *Chenopodium quinoa* (B); flor hermafrodita (B1); flor hembra (B2); fruto (B3); semilla (B4)**

**(Mujica, 1984)**

## 4.2 Hojas de quinua

### 4.2.1 Generalidades

Por milenios, las poblaciones locales han consumido tradicionalmente los granos y hojas jóvenes de quinua debido a una peculiar combinación entre una fuerte adaptabilidad a las condiciones de crecimiento ambientales extremas (sequía, frío y salinidad del suelo) y el excelente valor nutricional de las mismas (Zevallos et al., 2014). Las hojas de quinua constituyen una fuente económica de vitaminas y minerales. Además, son ampliamente usadas como alimento para los humanos (generalmente hojas más jóvenes) y el ganado (Thoufeek Ahamed et al., 1998).

Tapia, Gandarillas, Mujica, Alandia, y Cardozo, (1979) señalan que la época oportuna para la utilización de las hojas de quinua en la alimentación humana es poco antes del inicio de la floración, que puede ocurrir entre los 60 y 80 días después de la germinación. En concordancia, Thoufeek Ahamed et al. (1998), indica que la correlación entre el contenido de nutrientes de la hoja y su edad (dependiendo de la posición en la planta) es un importante factor en la elección de hojas para la cosecha (Thoufeek Ahamed et al., 1998).



**Figura 2. Forma de las hojas de quinua**

**Fuente: Corimayhua, A. (2016)**

El consumo de la hoja de quinua es conocido en la región andina del Perú y Bolivia, y al respecto Tapia, Gandarillas, Mujica, Alandía, y Cardozo, (1979) afirman que su uso podría reemplazar el de las hojas de espinaca, especie a la cual es muy afín botánicamente. Asimismo, Siener, Hönow, Seidler, Voss, y Hesse (2006), mencionan que en los países asiáticos y americanos, las hojas de quinua son consumidas como vegetales, y las hojas de amaranto como ensalada china.

Las hojas, además de los tallos y granos, tienen usos medicinales y las propiedades atribuidas a ellas incluyen la cicatrización, anti-inflamación, analgesia contra el dolor de muelas y como desinfectantes del tracto urinario. Además, son usadas en el caso de fracturas, hemorragia interna, repelente de insectos (Mujica, 1984) y respecto a los compuestos fitoquímicos (potencialmente bioaccesibles y biodisponibles), las hojas de quinua presentan efectos inhibitorios sobre la proliferación, motilidad y competencia de células de cáncer de próstata (Gawlik-Dziki et al., 2013).

#### **4.2.2 Clasificación taxonómica**

El nombre completo *Chenopodium quinoa* Willd., incluye la abreviación del autor correspondiente a Carl Ludwig Willdenow. Las especies *Chenopodium quinoa* Willd. incluyen las formas de maleza domesticadas y silvestres (Abugoch James, 2009).

La clasificación taxonómica según Takhtajan (2009) es la siguiente:

División	:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	:	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase	:	<i>Caryophyllidae</i>
Orden	:	<i>Caryophyllales</i>
Familia	:	<i>Chenopodiaceae</i>
Subfamilia	:	<i>Chenopodioideae</i>
Tribu	:	<i>Chenopodieae</i>
Género	:	<i>Chenopodium</i>
Especie	:	<i>Chenopodium quinoa</i>

### 4.2.3 Nomenclatura regional

La quinua recibe diferentes nombres comunes que varían de acuerdo al idioma, la localidad o el país. Los más comunes que se encuentran en la literatura son los siguientes (FAO, PROINPA, INIAF, & FIDA, 2013):

Quechua	:	Kiuna, quinua, parca
Aymara	:	Supha, jopa, jupha, jauira, jiura, aara, ccallapi, vocali
Azteca	:	Huatzontle
Chibcha	:	Suba, supha, pasca
Mapuche	:	Quinua
Español	:	Quinua, quínoa, quingua, quiuna, kinoa, triguillo, trigo inca, arrocillo, arroz del Perú, Dahuie, juba, ubaque, uvate, jaira, suba
India	:	Bathu
Portugués	:	Arroz miúdo do Perú, espinafre do Perú, quinoa
Inglés	:	Quinoa, quinua, kinoa, sweet quinoa, Peruvian rice, Inca rice, petty rice
Francés	:	Ansérine quinoa, riz de Pérou, petit riz de Pérou, quinoa
Italiano	:	Quinua, chinua
Alemán	:	Reisspinat, Peruanischer reisspinat, reismelde, Reissgerwacks, Inkaweizen

### 4.2.4 Distribución prehispánica

Pulgar Vidal (1954) citado por Tapia, Gandarillas, Mujica, Alandia, & Cardozo, (1979), cree que tanto los Chibchas como otras tribus de la meseta Cundi-boyacense (Colombia) cultivaron intensamente la quinua. Por otro lado, los antiguos habitantes de Cuyumbe (actuales ruinas de San Agustín en el Huila, Colombia), quienes tenían relaciones con los pobladores de la sabana de Bogotá, ayudaron a la dispersión de la quinua hacia el sur de la actual Colombia, y que en una etapa posterior habiendo emigrado hacia el sur del continente, hubieran llevado sus semillas, entre ellas la quinua, que compartida con otras naciones, explicaría su distribución en Ecuador.

En el norte del Perú el cultivo de la quinua fue común, pero en asociación con el maíz. Más al sur, ésta alcanzó importancia tanto en el “Callejón de Huaylas” como en el valle del Mantaro, donde fue ampliamente cultivada por la tribu de los Huancas. Numerosas fuentes relatan que a la llegada de los españoles a esa región, los “colcas” o depósitos de alimentos tenían grandes cantidades de grano de quinua (M. Tapia et al., 1979).

Ulloa Mogollón (1586), citado por Tapia et al., (1979), hace referencia al uso de la quinua en la provincia de los Collaguas (Bolivia). Existen evidencias de que la quinua era ampliamente cultivada en los valles del norte de Chile. En 1558, Cortés Hoguea, primero en visitar la isla de Chiloé (Chile) halló en ella siembras de quinua. En el territorio argentino, Pedro Sotelo (1583), citado por (M. Tapia et al., 1979), menciona esos cultivos en el valle de Calchaquies y en las cercanías de Córdoba.

Toro (1964), citado por Tapia et al., (1979), relaciona la antigüedad del cultivo y el origen de la domesticación de la quinua, con el actual uso de las voces quechua “kiuna” y aimará “jupha” y “jiura”, y las ve como pruebas de que las razas aimará y quechua fueron las primitivas domesticadoras de esta planta.

**Tabla 1. Distribución de algunas especies del género *Chenopodium***

<b>Especies</b>	<b>Países</b>
<i>C. quinoa</i> , <i>C. pallidicaule</i>	Argentina, Bolivia, Chile, Guatemala, Perú
<i>C. berlandieri</i>	México, Estados Unidos
<i>C. album</i>	India (Valles del Himalaya)
<i>C. ambrosioides</i>	India
<i>C. amaranticolor</i>	India
<i>C. murale</i>	India
<i>C. striatum</i>	Checoslovaquia
<i>C. opulifolium</i>	Checoslovaquia
<i>C. foliosum-polyspermum</i>	Finlandia

**Fuente: (Prakash, Nath, & Pal, 1993)**

Actualmente, la planta de quinua sigue cultivándose en Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Chile y Argentina. Su marginación empezó con la introducción de los

cereales, tales como la cebada y el trigo, que eventualmente la reemplazaron. La reducción en su área de cultivo en los países andinos es también debido a razones técnicas, económicas y sociales (Mujica, 1984).

#### **4.2.5 Variedad INIA 420 Negra Collana**

Es importante considerar la adaptación de las variedades a las diferentes condiciones de clima y altitud; si bien la quinua tiene amplia adaptación como especie, muchas variedades tienen adaptación muy específica a ciertos ambientes. En algunos ambientes crecen vegetativamente sin llegar a fructificar o son de ciclos tan cortos que están listas a cosechar en pleno periodo de lluvias con bajos rendimientos y calidad de granos. Por lo tanto la elección de la variedad es muy importante (Gómez P. & Aguilar C., 2016).

La quinua INIA 420 Negra Collana es una variedad comercial del Altiplano. Fue desarrollada en el ámbito de la Estación Experimental Agraria Illpa – Puno por el equipo de investigadores del Programa Nacional de Innovación Agraria en Cultivos Andinos, entre ellos el Ing. M. Sc. Vidal Apaza Mamani, Ing. Gladys Cáceres Sanizo y Téc. Eloy Ladislao Copa Mamani; la coordinación del Ing. Rigoberto Estrada Zuniga y el apoyo del Ing. Policarpo Catacora Ccama del PNIA en Recursos Genéticos y el Blgo. M. Sc. Pedro Delgado Mamani del PNIA en Manejo Integrado de Plagas (INIA - Estación Experimental Agraria Illpa, 2013).

Es un compuesto de 13 accesiones de 12 localidades, comúnmente conocidas como “Quyту jiwras”. Su mejor desarrollo se logra en la zona agroecológica Suni del Altiplano, entre los 3815 y 3900 m.s.n.m., con clima frío seco, precipitación de 400 a 550 mm y temperatura de 4° a 15°C (Gómez P. & Aguilar C., 2016).

La altura de planta varía de 94 a 110 cm y el período vegetativo va de 136 a 140 días. Las semillas tienen el pericarpio de color plomo y el epispermo de color negro. Se informa de un rendimiento promedio de 3000 kg/ha (Gómez P. & Aguilar C., 2016).

Las características morfológicas de las hojas de quinua variedad INIA 420 Negra Collana son las siguientes:

**Tabla 2. Características morfológicas de la quinua INIA 420 Negra Collana**

<p><b>Tallo</b></p> 	<p>Diámetro : 1.2 a 1.5 cm</p> <p>Presencia de axilas pigmentadas : Ausentes</p> <p>Presencia de estrías : Presentes</p> <p>Color de estrías : Verde</p> <p>Color : Verde</p> <p>Presencia de ramificación : Ausente</p>	<p><b>Hoja</b></p> 	<p>Borde de las hojas inferiores : Dentado</p> <p>Dientes de las hojas basales : 12 dientes</p> <p>Longitud máxima del peciolo : 28 a 36 mm</p> <p>Longitud máxima de las hojas : 64 a 96 mm</p> <p>Ancho máximo de las hojas : 53 a 66 mm</p>
<p><b>Inflorescencia o panoja</b></p> 	<p>Número de panoja por planta : 1</p> <p>Color de la panoja antes de la madurez : Verde</p> <p>Color de la panoja en la cosecha : Gris</p> <p>Tipo de panoja : Diferenciada y terminal</p> <p>Forma de la panoja : Glomerulada</p> <p>Longitud de panoja : 30 a 38 cm</p> <p>Diámetro de panoja : 5 a 7 cm</p>	<p><b>Grano</b></p> 	<p>Color del perigonio : Verde</p> <p>Color del pericarpio : Gris</p> <p>Color del episperma : Negro brillante</p> <p>Aspecto del perisperma : Opaco</p> <p>Diámetro del fruto : 1.6 mm</p>

**Fuente:** (INIA - Estación Experimental Agraria Illpa, 2013)

#### 4.2.6 Característica estructural

La hoja, como la de todas las dicotiledóneas, está formada por el peciolo y la lámina. Los peciolos son largos, finos, acanalados en su lado superior y de un largo variable dentro de la misma planta. Los que nacen directamente del tallo son más largos, y los de las ramas primarias más cortos (M. Tapia et al., 1979). El color del peciolo puede ser verde, rosado, rojo y púrpura (Gómez P. & Aguilar C., 2016).

La lámina de la hoja presenta tres nervios principales que nacen del peciolo. Las láminas son más grandes en el follaje y más pequeñas en la inflorescencia. Las láminas son polimórficas en la misma planta. Las láminas de la planta o el follaje (hojas inferiores) pueden ser triangulares o romboidales y las de la inflorescencia (hojas superiores) pueden ser triangulares o lanceoladas (Gómez P. & Aguilar C., 2016; M. Tapia et al., 1979).

Las hojas pueden tener márgenes enteros, dentados o aserrados. El número de dientes es variable, puede variar de 3 a 20. Las hojas inferiores pueden medir hasta 15 cm de largo por 12 cm de ancho. Las hojas superiores son más pequeñas y pueden carecer de dientes, como las hojas que salen de las inflorescencias que apenas miden 10 cm de largo por 2 cm de ancho (M. Tapia et al., 1979).

Las hojas y las partes tiernas de la planta están generalmente cubiertas con una pubescencia vesicular-granular blanca, rosada o púrpura. Esta pubescencia granular contiene oxalato de calcio capaz de absorber agua del medio ambiente e incrementar la humedad relativa de la atmósfera que rodea las hojas. El color de la lámina predominantemente es verde; en algunas variedades puede observarse hojas de color verde-púrpura. A la madurez las láminas se tornan amarillas, naranjas, rosadas, rojas o púrpuras (Gómez P. & Aguilar C., 2016).

#### **4.2.7 Labores de post-cosecha y rendimiento**

Actualmente, la quinua es el principal sustento de la población andina y uno de los alimentos que cubre aproximadamente el 80% de la demanda internacional (L. M. Cruces, 2016). Después de la cosecha del grano, las hojas y demás partes de la planta de quinua son almacenadas y luego utilizadas como abono para la tierra (S.G. Miranda, comunicación personal, septiembre 6, 2017). Las hojas y los tallos también sirven para alimentar a los rumiantes; la paja y los restos del cultivo para alimentar a ovejas, cerdos, caballos y aves de corral (FAO, 1994; Thoufeek Ahamed et al., 1998).

M. E. Tapia & Fries (2007), mencionan que se obtienen de 600 a 800 kg/ha de grano en cultivos tradicionales y condiciones de secano. Por ejemplo, la variedad Sajama ha producido hasta 3000 kg/ha, siendo el promedio comercial 1500 – 2500 kg/ha, con el empleo de niveles adecuados de fertilización, desinfección de la semilla, siembra en surcos y control de malezas. En cuanto a los rendimientos de broza, estos varían también de acuerdo a la fertilización, obteniéndose en promedio 5000 kg/ha de broza (*kiri*) y 200 kg de hojuela pequeña, formada por perigonios y partes menudas de hojas y tallos (*jipi*).

De igual forma, Mujica (1984), menciona que el rendimiento del grano de quinua llega hasta los 5000 kg/ha y el sub producto (paja) de la cosecha hasta 5 – 10 ton/ha, que es destinado como forraje para el ganado. Los restos de la planta, a pesar de haber sido tema de estudios académicos, no son reutilizados con propósito industrial excepto como abono y pienso para animales.

#### **4.2.8 Plagas y enfermedades**

La quinua sufre el ataque de una serie de insectos durante todo su período vegetativo e incluso el grano almacenado también está expuesto (Ortiz R. & Zanabria, 1979). Las plagas de insectos pueden reducir el rendimiento de los granos de quinua entre 8 y 40%, dependiendo del tipo de insecto, la incidencia y la época de cultivo (Gómez P. & Aguilar C., 2016). De acuerdo al tipo de daño que causan, Ortiz R. y Zanabria, (1979) clasifican a los insectos en:

- Cortadores de plantas tiernas
- Minadores y destructores de granos
- Masticadores y defoliadores
- Picadores y chupadores

Por otro lado, las medidas de control de las enfermedades, a diferencia de las plagas insectiles, no dependen de evaluaciones previas en campo sino más bien de medidas preventivas, tanto tácticas culturales, elección de la variedad, control biológico y control químico con aplicaciones calendarizadas antes que aparezcan los síntomas de la enfermedad (L. M. Cruces, 2016).

De acuerdo con Apaza, Cáceres, Estrada, y Pinedo (2013), la variedad INIA 420 Negra Collana posee una reacción intermedia a factores bióticos como la ticona o ticuchis (*Feltia experta*) y *Spodoptera sp.*, reacción alta frente a kcona kcona (*Eurysacca quinoa* Povolny) y *Eurysacca melanocampta* Meyrick, y reacción tolerante a la enfermedad del Mildiu (*Peronospora farinosa* f.sp. *chenopodii*).

#### **A. Cortadores de plantas tiernas (Ticona o ticuchi)**

Se les denomina comúnmente “ticonas” o “ticuchis” y son un grupo complejo que está formado por lo menos de tres especies. Son insectos que se alimentan cortando plantas recién germinadas o destruyendo panojas y hojas apicales en formación. Los “ticuchis” atacan a la quinua, especialmente durante la primera edad de la planta (8 hojas) o recién germinada, cortándose a la altura del cuello de la raíz, con lo que la planta se cae y muere. En ataques severos, los campos de quinua presentan gran número de fallas, obligando en unos casos a resembrar y en otros a arar el terreno (Ortiz R. & Zanabria, 1979).



Figura 3. Larva del “Ticuchi” (*Copitarsia turbata*)



Figura 4. Daño del “ticuchi” en hoja de quinua



Figura 5. Gusano cortador, grasiendo o de tierra (*Agrotis ipsilon*)



Figura 6. Daño de *Agrotis ipsilon*

**Fuente: (Luis M. Cruces & Callohuari, 2016)**

Los adultos son de actividad nocturna. La hembra coloca los huevos individualmente en el suelo suelto y húmedo o en las hojas inferiores de las plantas hospederas. Las larvas, al emerger, se alimentan de las hojas

inferiores, y a partir del tercer estadio se alimentan de plantas pequeñas cortándolas por la base (L. M. Cruces, 2016).

Durante el día las larvas permanecen refugiadas en el suelo donde construyen una celda protectora; en el crepúsculo y durante la noche, salen para alimentarse de los tallitos tiernos de las plantas (L. M. Cruces, 2016).

### **B. Minadores y destructores de granos (kcona kcona)**

Es el grupo de insectos que se alimenta del parénquima de las hojas, panojas y tallos, formando galerías o minas a manera de estuches. Son lepidópteros de las familias Gelechiidae y Pyralidae, así como dípteros de la familia Agromyzidae (M. Tapia et al., 1979).

Entre los insectos que perjudican el desarrollo de la quinua, la “kcona – kcona”, “kcanocuru” o “pegador de hojas”, es probablemente la plaga más importante. Un ataque intenso de esta plaga puede reducir a cero la producción de grano. Su nombre común se refiere al hecho de moler el grano como resultado de un ataque intenso (Ortiz R. & Zanabria, 1979).

Las polillas hembras realizan las posturas en las inflorescencias, en la cara inferior de las hojas tiernas y en los brotes donde depositan sus huevos en grupos de 30 a 40, o aisladamente. De 7 a 12 días, luego de la ovoposición, los huevos eclosionan y las pequeñas larvas empiezan a alimentarse, bien sea minando el parénquima de las hojas, o destruyendo el ovario de las flores o los granos lechosos (Ortiz R. & Zanabria, 1979).

Investigaciones recientes en Puno y en el altiplano de Bolivia, indican que la kcona – kcona es una plaga de primer orden del cultivo de la quinua. Las variaciones de quinuas dulces y blancas son relativamente las preferidas de esta plaga, habiéndose encontrado hasta 150 larvas en una sola planta (Ortiz R. & Zanabria, 1979).



Figura 7. *Eurysacca melanocampta* (“polilla de la quinua”)



Figura 8. Daño de la larva de *Eurysacca melanocampta*



Figura 9. Larva de *Eurysacca quinoa*



Figura 10. *Eurysacca quinoa* (“polilla de la quinua”)

Fuente: (Luis M. Cruces & Callohuari, 2016)

El ataque de estos insectos es más intenso en las épocas de sequía y “veranillos”. Las larvas de la primera generación (noviembre – diciembre) minan y destruyen las hojas e inflorescencias en formación, pegan las hojas tiernas, enrollándolas y alimentándose en el interior del parénquima. En ataques severos, las plantas aparecen arrepolladas y en pocos días se puede destruir el cultivo (Ortiz R. & Zanabria, 1979).

Las larvas de la segunda generación (marzo – mayo) atacan a las plantas en estado de maduración (grano pastoso y seco), localizándose en el interior de las panojas donde comen el grano. En infestaciones severas aparece un polvo blanco alrededor de la base de la planta, producto de la destrucción del grano y de las deyecciones de la larva, situación que puede prolongarse en las parvas durante el secado. Estas larvas de la segunda generación ocasionan los mayores daños a los cultivos de la quinua (Ortiz R. & Zanabria, 1979).

Insectos como la mosca minadora de hojas (*Liriomiza brasiliensis* Frost), oruga de hojas e inflorescencias (*Hymenia recurvalis*), polilla de la quinua (*Pachyzancla bipunctalis*) y gusano medidor (*Perisoma sordescens* Dognin) son también minadores y destructores de las hojas de quinua (Ortiz R. & Zanabria, 1979).



(A) *Liriomyza braziliensis* “Mosca Minadora”, (B) *Spoladea recurvalis* “Gusano telarañero”, (C) *Herpetogramma bipunctalis*

**Figura 11. Daño producido en las hojas de quinua por insectos minadores**

**Fuente: Luis M. Cruces & Callohuari (2016)**

### C. Mildiu (*Pernonospora farinosa*)

De las enfermedades conocidas que afectan a la quinua, sin duda la más importante y generalizada es el mildiú. En Perú, García Rada (1947), citado por Alandia B., Otazú M., y Salas T. (1979), fue aparentemente el primero en citar una enfermedad de la quinua. El registró el mildiú en los departamentos de Cuzco y La Libertad.

Es el patógeno más severo en la quinua y la afecta tanto en costa, en el altiplano como en valles interandinos. También se informa sus daños en otros lugares fuera de la región andina. Los mayores daños de la enfermedad se presentan en las hojas, provocando la reducción del área fotosintética de la planta, y consecuentemente afecta negativamente el desarrollo y rendimiento de la planta. La enfermedad provoca el enanismo (infección sistémica) y la defoliación prematura, los cuales se traducen en la reducción del rendimiento entre el 10% y el 30% (Gómez P. & Aguilar C., 2016).

Se presenta como manchas pequeñas de forma irregular y que van creciendo a medida que la enfermedad se desarrolla, su coloración puede ser clorótica o amarilla, rosada, rojiza u otro dependiendo del color de la planta (Figura 12) y se observa un micelio de color gris en el envés de las hojas, siendo muy abundante en las variedades susceptibles. Si bien, se la encuentra más en las hojas, se pueden observar síntomas en tallos, ramas, inflorescencia y granos (Gómez P. & Aguilar C., 2016).



**Figura 12. Daños de mildiu en diferentes variedades de hojas de quinua  
(Luis M. Cruces & Callohuari, 2016)**

Evaluaciones de campo indican, que existe resistencia genética natural en algunas poblaciones de quinua. De la evaluación de 444 líneas del banco de germoplasma de quinua en Puno, se ha determinado que el 39.6% corresponde a líneas resistentes, el 53.4% a moderadamente resistentes, el 6.5% a susceptibles, y el 0.4% a muy susceptibles (Alandia B. et al., 1979).

#### **4.2.9 Composición fisicoquímica y valor nutricional**

Algunos autores reportan la composición fisicoquímica (Tabla 3) de algunas variedades de hojas de quinua, incluyendo datos de vitaminas y minerales, basados en 100 g de muestra. Entre los minerales, cabe destacar el contenido de calcio (153 – 377 mg) y magnesio (83 mg) a comparación del zinc, hierro, fósforo y potasio que se muestran en la Tabla 5. Asimismo, los contenidos de vitamina A, riboflavina (B<sub>2</sub>) y vitamina C (Tabla 6) convertirían a las hojas de quinua en un alimento recomendable para el consumo humano.

Las sales de calcio proveen rigidez al esqueleto y evitan el desarrollo de la osteoporosis. El magnesio regula los flujos de potasio en el sistema muscular al igual que el metabolismo del calcio. La vitamina A es un esencial nutriente para el normal funcionamiento del sistema visual, mantenimiento de la integridad celular epitelial, función del sistema inmunológico, crecimiento y reproducción. La vitamina C es un excelente antioxidante de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Finalmente, la vitamina B<sub>2</sub> funciona como una coenzima que participa en la formación de algunas vitaminas y sus coenzimas a través de reacciones redox; su consumo evita la ariboflavinosis que incluyen dolor de garganta y edema de las membranas mucosas faríngea y oral (National Academy of Sciences, 1998; World Health Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2004).

**Tabla 3. Composición fisicoquímica de las hojas de quinua (g/100 g peso fresco)**

Variedad	Humedad	Lípidos	Nitrato	Proteína	Cenizas	Fibra	Carbohidratos	Oxalato
<b>Kozioł (1992)<sup>a</sup></b>	85.2	1.8	–	3.3	3.3	1.9	4.8	–
<b>Wahli (1990)<sup>b</sup></b>	86.57	0.52	0.43	3.89	2.61	1.87	4.78	–
<b>M. Tapia et al. (1979)<sup>c</sup></b>								
Sajama	87.3	2.2 <sup>a</sup>	–	2.78	3.44	–	–	–
Real de Bolivia	83.6	2.1 <sup>a</sup>	–	2.84	3.59	–	–	–
Blanca Real	84.9	1.9 <sup>a</sup>	–	3.58	3.65	–	–	–
Blanca amarga	81.8	–	–	4.16	3.59	–	–	–
Cheweca	84.9	2 <sup>a</sup>	–	3.10	3.13	–	–	–
Tupiza	83.7	2.1 <sup>a</sup>	–	3.31	3.54	–	–	–
<b>Bhargava et al. (2006)<sup>d</sup></b>								
	86.52	–	–	–	–	–	–	–
<b>Prakash et al. (1993)<sup>e</sup></b>								
Chenopodium quinoa (Perú)	89.8	–	0.44	3	–	–	–	0.9
Chenopodium quinoa (Guatemala)	90.1	–	0.37	2.7	–	–	–	1.4
Chenopodium quinoa (Chile)	90.9	–	0.43	2.8	–	–	–	1.1
Chenopodium quinoa (Bolivia)	91.0	–	0.34	2.8	–	–	–	1.0
<b>Instituto Nacional de Salud (2009)<sup>f</sup></b>								
	81.4	0.6	–	4.7	3.8	1.8	9.5	–

<sup>a</sup>Datos promedio de una variedad desconocida de H.Q., <sup>b</sup>Datos promedio de 12 variedades desconocidas de H.Q., <sup>c</sup>Los datos fueron expresados en g/100 g de hojas tiernas frescas, <sup>d</sup>Los datos fueron promediados y expresados en g/100 g H.Q frescas, <sup>e</sup>Los datos de muestras cultivadas de H.Q. fueron expresados en g/100 g peso fresco, <sup>f</sup>Datos de una variedad peruana desconocida de H.Q.

**Tabla 4. Ingesta diaria recomendada de algunas vitaminas y minerales**

Grupo	Calcio (mg/día)	Magnesio (mg/día)	Vitamina A (µg RE/día)	Riboflavina (mg/día)	Vitamina C (mg/día)
<b>Niños</b>					
4 – 6 años	600	76	450	0.6	30
7 – 9 años	700	100	500	0.9	35
<b>Adolescentes</b>					
10 – 18 años (Mujeres)	1300	220	600	1.0	40
10 – 18 años (Hombres)	1300	230	600	1.3	40
<b>Adultos</b>					
19 – 50 años (pre- menopáusico, Mujeres)	1000	220	500	1.1	45
51 – 65 años (menopáusico, Mujeres)	1300	220	500	1.1	45
19 – 65 años (Hombres)	1000	260	600	1.3	45

**Fuente:** World Health Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations (2004)

Actualmente, el Instituto Nacional de Estadística e Informática (2017) reporta que la desnutrición crónica en la población menor de cinco años en el Perú es de 13.1%. La Organización Mundial de la Salud (2004) informa que el consumo diario de calcio y magnesio, para los niños de 4 – 6 años, es de 600 mg y 76 mg, respectivamente (Tabla 4). Esto quiere decir que la población infantil, especialmente en la zona rural, debería consumir aproximadamente 100 g de H.Q. para cubrir la demanda de magnesio y, aproximadamente 200 g de H.Q. para el calcio.

**Tabla 5. Concentraciones de minerales en hojas de quinua (mg/100 g peso fresco)**

	Ca	Zn	Mg	Na	K	P	Cu	Fe
<b>Kozioł (1992)</b>	153	0.59	83	289	357	42	0.07	0.87
<b>Instituto Nacional de Salud (2009)</b>	377	–	–	–	–	63	–	1.50

El consumo diario de vitamina A en niños, adolescentes y adultos oscila de 450 – 600 mg. Por ello, una cantidad ≤ 200 g de H.Q. sería recomendable. En países en vías de desarrollo, la vitamina A tiene un significado nutricional importante, puesto que

la deficiencia de la misma resultaría en una susceptibilidad mayor a las infecciones hasta la ceguera (Kozioł, 1992). Para cubrir la demanda de riboflavina (B<sub>2</sub>) en niños de 4 – 6 años, el consumo de H.Q. sería aproximadamente de 64 g; ~100 g para niños de 7 – 9 años, y 105 – 137 g para adolescentes y adultos. Finalmente, considerando los contenidos de vitamina C reportados por Prakash, Nath, & Pal (1993), se recomendaría el consumo entre 25 y 38 g de H.Q. para cubrir la demanda diaria del mismo en niños, adolescentes y adultos.

Por otro lado, la familia *Chenopodiaceae*, además de las familias *Polygonaceae* y *Amaranthaceae*, incluye la mayor parte de las especies con concentraciones de oxalato excesivamente altas. Por ejemplo, los contenidos promedio de oxalato soluble y total en los granos de quinua son 131 y 184 mg/100 g de porción comestible, respectivamente. En las raíces de la remolacha se encontraron contenidos de oxalato soluble (59.3 mg/100 g) y total (160 mg/100 g) menores. Sin embargo, en las hojas de espinaca los contenidos promedio de oxalato soluble (1029 mg/100 g) y total (1959 mg/100 g) son mayores, al igual que en las hojas de la remolacha forrajera con contenidos de oxalato soluble y total de 327 y 874 mg/100 g, respectivamente (Siener et al., 2006).

Thoufeek Ahamed et al. (1998), menciona que el contenido de oxalato en las hojas del género *Chenopodium* oscila de 0.9 - 3.9 g/100 g de peso fresco, concentrado principalmente en los tallos. Por lo tanto, los contenidos de oxalato soluble y total son considerablemente mayores en hojas y tallos que en raíces y frutos (Siener et al., 2006). Los riesgos del consumo de hojas de quinua asociados con el contenido de oxalato de calcio son mínimos, siempre que no se exceda la ingesta de 50 – 200 mg/día (Gawlik-Dziki et al., 2015; Siener et al., 2006).

La composición de aminoácidos de las hojas de quinua, comparada con aquellas de otros vegetales está dado en la Tabla 7. El mayor contenido de lisina y el menor contenido de metionina son sus características más distinguibles. Las hojas de quinua también pueden ser comestibles en ensaladas y son importantes en regiones donde las verduras son escasas (Thoufeek Ahamed et al., 1998).

**Tabla 6. Composición de vitaminas en hojas de quinua**

<b>Variedad</b>	<b>Tiamina (mg/100 g)</b>	<b>Riboflavina (mg/100 g)</b>	<b>Niacina (mg/100 g)</b>	<b>Vit. A (µg RE/100 g)</b>	<b>Vit. C (mg/100 g)</b>	<b>Vit. E (mg α TE/100 g)</b>
<b>Kozioł (1992)<sup>a</sup></b>	–	–	–	1251	–	1.3
<b>Bhargava et al. (2006)<sup>b</sup></b>	–	–	–	3779.16 <sup>c</sup>	–	–
<b>Prakash et al. (1993)<sup>c</sup></b>						
Chenopodium quinoa (Perú)	–	–	–	1058.4	230	–
Chenopodium quinoa (Guatemala)	–	–	–	890.4	130	–
Chenopodium quinoa (Chile)	–	–	–	688.8	120	–
Chenopodium quinoa (Bolivia)	–	–	–	1596	210	–
<b>Instituto Nacional de Salud (2009)<sup>d</sup></b>	0.06	0.95	1.20	251	11.1	–

<sup>a</sup>Valor de vitamina A y E de H.Q. secas expresadas en µg RE (Retinol Equivalents) y mg α-TE (Tocopherol Equivalents).

<sup>b</sup>Los datos de vitamina A de H.Q. frescas fueron promediados y expresados en µg/100 g.

<sup>c</sup>La Vit. A fue calculada a partir de los datos de carotenoides en muestras cultivadas de H.Q. multiplicados por 0.084 µg RE (World Health Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2004). Los datos fueron expresados en base a 100 g de muestra fresca.

**Tabla 7. Composición de aminoácidos de hojas de quinua comparada con otros vegetales**

Vegetales	Aminoácidos (g/100 g de proteína)											
	Arg	His	Lis	Trp	Fen	Tir	Met	Cis	Tre	Leu	Ile	Val
Quinua, var. Sajama <sup>a</sup>	9.00	3.30	8.4	–	8.1	0.5	0.5	–	4.7	10.2	6.1	7.1
Quinua – 1 <sup>b</sup>	6.20	2.40	7.60	–	9.40		2.00		4.70	9.60	5.80	7.50
Quinua – 2 <sup>c</sup>	0.92	0.32	0.75	0.02	0.11	0.37	0.05	–	0.17	0.41	0.41	0.29
Amaranto <sup>c</sup>	0.24	0.13	0.25	0.07	0.18	0.19	0.07	0.04	0.14	0.37	0.29	0.28
Repollo <sup>c</sup>	0.45	0.13	0.24	0.07	0.20	0.12	0.06	0.07	0.22	0.34	0.23	0.26
Hojas de moringa <sup>c</sup>	0.38	0.14	0.32	0.1	0.29	–	0.11	0.13	0.25	0.46	0.28	0.35
Espinaca <sup>c</sup>	0.35	0.14	0.40	0.1	0.33	0.31	0.11	0.08	0.29	0.53	0.3	0.35

<sup>a</sup>Wahli, (1990); <sup>b</sup>Kozioł (1992), presenta valores de fenilalanina + tirosina y metionina + cisteína; <sup>c</sup>Thoufeek Ahamed, Singhal, Kulkarni, & Pal (1998).

### 4.3 Compuestos fenólicos

Las plantas y alimentos contienen una gran variedad de derivados fenólicos incluyendo fenoles simples, fenilpropanoides, derivados de ácido benzoico, flavonoides, estilbenos, taninos, lignanos y ligninas. Junto con los ácidos carboxílicos de cadena larga, los compuestos fenólicos son también componentes de suberina y cutina. Estas sustancias más variadas son esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas y también actúan como antialimentarios y antipatógenos. La contribución de los compuestos fenólicos a la pigmentación de los alimentos vegetales es también reconocida (Shahidi & Naczka, 2004).

El término “fenólico” o “polifenol” puede definirse químicamente con precisión como una sustancia que posee un anillo aromático que lleva un sustituyente hidroxilo, incluyendo derivados funcionales (ésteres, éteres metílicos, glucósidos, etc.). El fenol en sí mismo es un producto natural, pero la mayoría de los compuestos fenólicos tienen dos o más grupos hidroxilo y se derivan de uno u otro de los fenoles dihidrídicos o trihidrídicos comunes (Harborne, 1989).

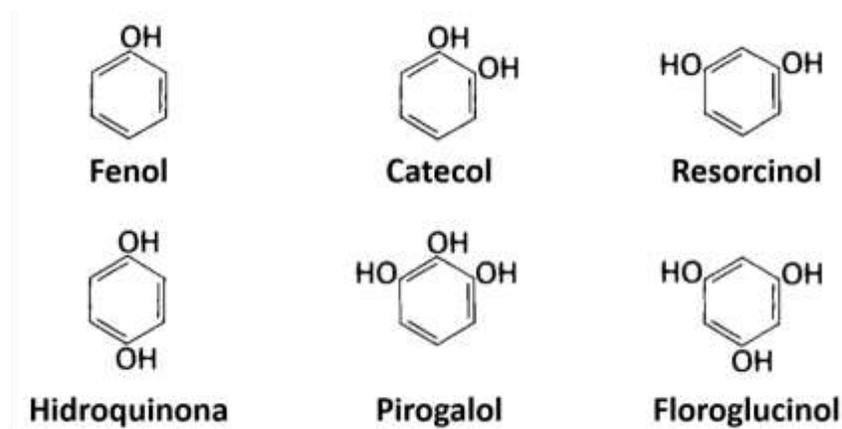


Figura 13. Estructura de seis fenoles simples (Harborne, 1989)

Los fenoles naturales de las plantas surgen biogenéticamente de dos vías principales; la vía del shikimato, que proporciona directamente fenilpropanoides tales como los ácidos hidroxicinámicos y cumarinas; y la vía del policétido (acetato), que puede producir fenoles simples (Figura 13) y también muchas quinonas. Por lejos, el grupo más grande de compuestos fenólicos, los flavonoides, se derivan biosintéticamente de una combinación de estas dos vías. Un esquema del origen de los compuestos fenólicos de las plantas a través de las vías del shikimato y fenilalanina se muestra en la Figura 14. Algunas estructuras representativas de las principales clases de polifenoles son ilustradas en la Figura 15. Las clases principales se enumeran por separado en la Tabla 8.

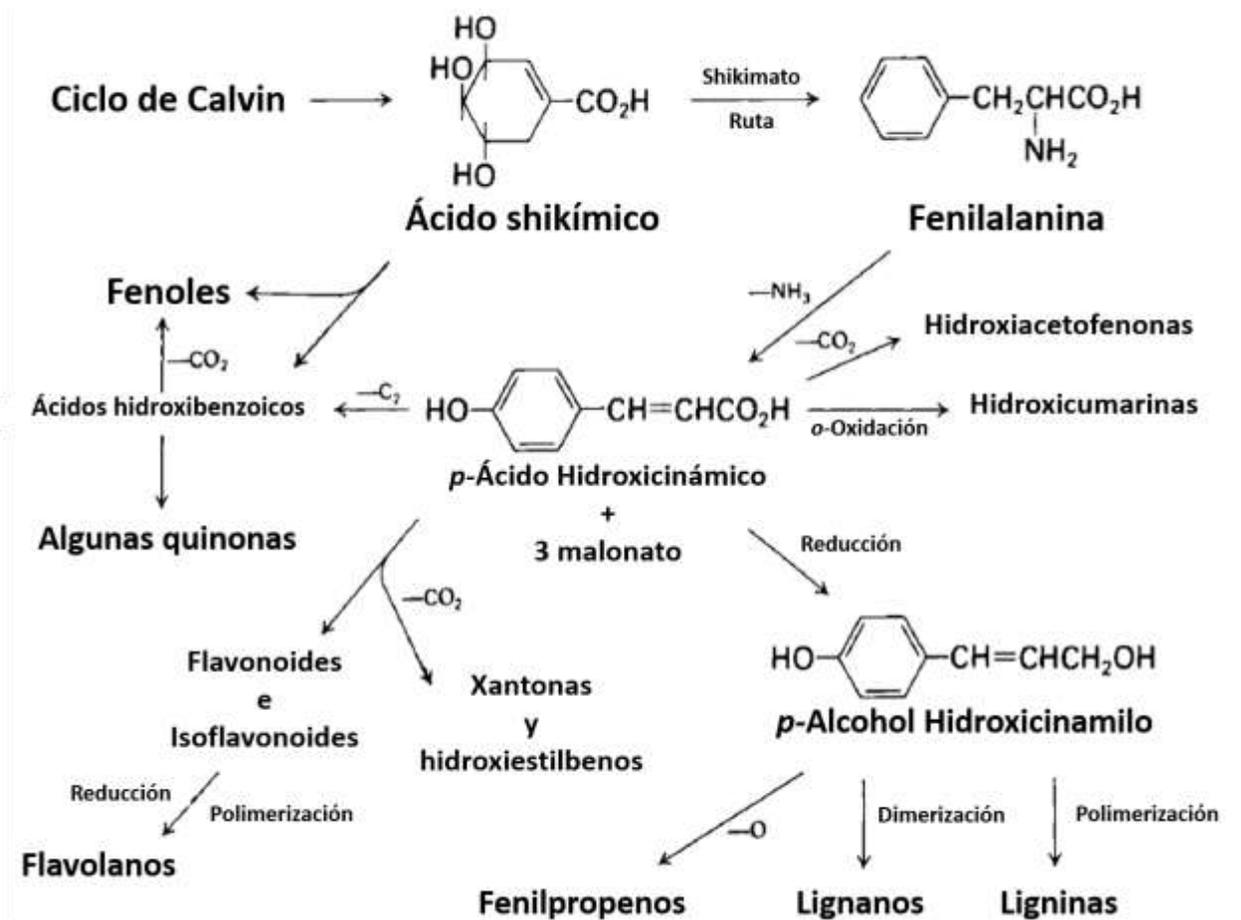
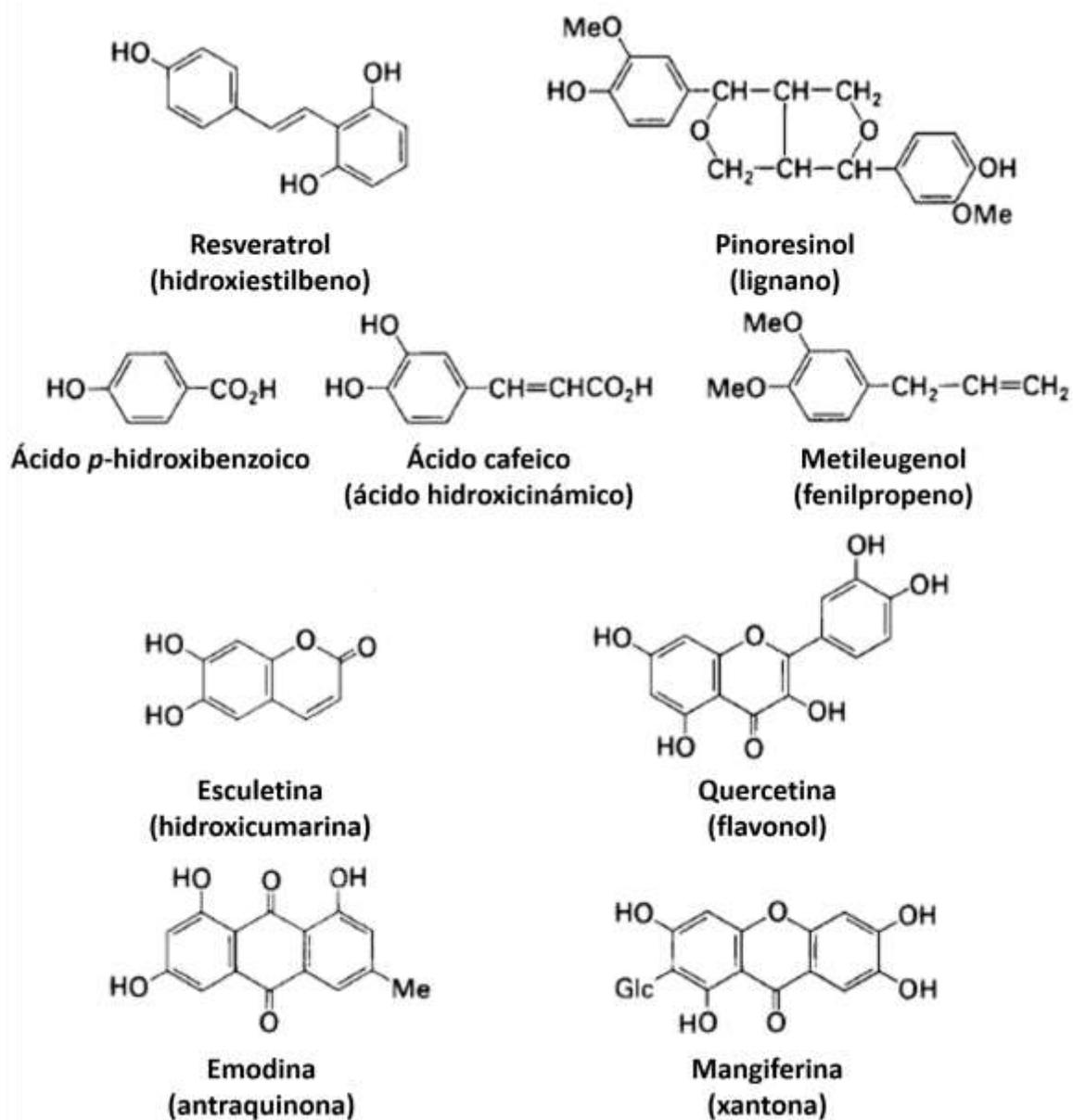


Figura 14. Origen biosintético de fenoles de plantas de las vías del shikimato y fenilalanina (Harborne, 1989)



**Figura 15. Estructuras de algunos fenólicos vegetales comunes (Harborne, 1989)**

Los compuestos fenólicos funcionan como antibióticos (la ingesta diaria promedio de polifenoles dietéticos es alrededor de 1 g/persona), pesticidas naturales, sustancias que sirven de señal para el establecimiento de la simbiosis con rizobios, atrayentes de polinizadores en la protección contra infecciones herbívoras y microbianas, alelopatía

(que se refiere a un efecto positivo o negativo, por ejemplo, el crecimiento de una planta en otra inducida por fitoquímicos), agentes protectores contra la radiación ultravioleta (UV), materiales aislantes para hacer las paredes celulares impermeables al gas y al agua, y como materiales estructurales para dar estabilidad a las plantas (Chemat, Rombaut, Fabiano-Tixier, Pierson, & Bily, 2015; Shahidi & Naczsk, 2004). Los compuestos fenólicos se encuentran en todo el reino vegetal, pero el tipo de compuesto presente varía considerablemente según el filo (*phylum*) considerado. Los compuestos fenólicos son poco comunes en bacterias, hongos y algas, y las clases de fenol registradas son pocas (Harborne, 1989).

**Tabla 8. Las principales clases de compuestos fenólicos en plantas**

Número de átomos de carbono	Esqueleto básico	Clase	Ejemplos
6	C <sub>6</sub>	Fenoles simples Benzoquinonas	Catecol, hidroquinona 2,6-Dimetoxibenzoquinona
7	C <sub>6</sub> – C <sub>1</sub>	Ácidos fenólicos	p-Hidroxibenzoico, salicílico
8	C <sub>6</sub> – C <sub>2</sub>	Acetofenonas Ácidos fenilacéticos	3-Acetil-6-metoxibenzaldehído p-Hidroxifenilacético
9	C <sub>6</sub> – C <sub>3</sub>	Ácidos hidroxicinámicos Fenilpropenos Cumarinas Isocumarinas Cromonas	Cafeico, ferúlico Miristicina, eugenol Umbelíferona, esculetina Bergenina Eugenina
10	C <sub>6</sub> – C <sub>4</sub>	Naftoquinonas	Juglona, plumbagina
13	C <sub>6</sub> – C <sub>1</sub> – C <sub>6</sub>	Xantonas	Mangiferina
14	C <sub>6</sub> – C <sub>2</sub> – C <sub>6</sub>	Estilbenos Antraquinonas	Ácido lunulárico Emodina
15	C <sub>6</sub> – C <sub>3</sub> – C <sub>6</sub>	Flavonoides Isoflavonoides	Quercetina, cianidina Genisteína
18	(C <sub>6</sub> – C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Lignanós Neolignanós	Pinoresinol Eusiderina
30	(C <sub>6</sub> – C <sub>3</sub> – C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> (C <sub>6</sub> – C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub> (C <sub>6</sub> ) <sub>6</sub> (C <sub>6</sub> – C <sub>3</sub> – C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Biflavonoides Ligninas Catecol melaninas Flavolanos (taninos condensados)	Amentoflavona

**Fuente: (Harborne, 1989)**

A parte de las clases de polifenoles mencionadas, los polifenoles polimerizados estructurales son constitutivos de las células. La lignina es una parte importante de la pared celular secundaria para las plantas y representa el 30% de todo el combustible de carbono no fósil en la tierra. Se encuentra en una mayor concentración en madera y estructuras de madera, pero como componente celular estructural también se encuentra en las hojas, flores y frutas. La lignina es una macromolécula compuesta de tres moléculas monolignol, nombradas, alcohol p-cumárico, alcohol coniferílico y

alcohol sinapílico, todos ellos, productos de reducción de fenilpropanoides, metoxilados a diferentes grados (Chemat et al., 2015; Shahidi & Naczk, 2004).

La química de los compuestos fenólicos naturales es complicada por el hecho de que la mayoría de los compuestos están presentes en la planta en forma conjugada, principalmente con un residuo de azúcar unido a través de uno o más de los grupos fenólicos. La gama y la variedad de formas conjugadas es muy considerable, y esto, obviamente, se suma a la tarea de la caracterización química. Los monosacáridos asociados con compuestos fenólicos incluyen glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa, xilosa, manosa, apiosa, alosa, ácidos glucurónicos y galacturónicos, y existe además la complejidad en que estos azúcares pueden estar presentes en forma di-, tri- o tetrasacárida (Harborne, 1989).

Cuando son puros, los fenoles sencillos son incoloros, pero tienden a ser sensibles a la oxidación y pueden volverse parduzcos u oscuros al exponerse al aire. A menos que estén completamente esterificados, eterificados o glicosilados, son normalmente solubles en disolventes orgánicos polares. Con pocas excepciones (por ejemplo, resorcinol y floroglucinol), la solubilidad en agua aumenta con el número de grupos hidroxilo presentes. Se disuelven en hidróxido de sodio y carbonato de sodio (unos pocos, por ejemplo, ácidos fenólicos, se disuelven en bicarbonato de sodio) pero en medio alcalino su oxidación se incrementa y por lo tanto el tratamiento con disolventes alcalinos debe ser realizado bajo  $N_2$  o preferiblemente evitado. La mayoría de los glucósidos fenólicos son solubles en agua, pero las agliconas correspondientes suelen ser menos. En comparación con los fenoles progenitores, los éteres y ésteres son aún menos solubles en agua. Los fenoles con sólo unos pocos grupos hidroxilo son solubles en éter, cloroformo, acetato de etilo, metanol y etanol. Los fenoles con una o más cadenas laterales alifáticas requieren disolventes menos polares para su extracción. Por último, las sustancias fenólicas son aromáticas y por lo tanto muestran una intensa absorción en la región UV del espectro. Además, el anillo benceno activado reacciona fácilmente con una variedad de reactivos cromogénicos para que puedan detectarse fácilmente durante el aislamiento y la purificación (Harborne, 1989).

La utilización de plantas para fines medicinales, industriales o alimentarios está relacionada con su composición biomolecular. Los metabolitos secundarios ocurren a concentraciones mucho menores y, debido a su función biológica, pueden ser específicos de una especie vegetal. Los metabolitos secundarios, sin embargo, se benefician de un fuerte interés ya que algunos compuestos afectan los sistemas biológicos. Esta característica permite calificar tales compuestos como bioactivos, y mientras que todos estos compuestos bioactivos son usados por sus específicos beneficios a la salud (fibras, ácidos orgánicos, ácidos grasos poliinsaturados, fitoesteroles y organosulfuros), algunos podrían también ser usados adicionalmente por una propiedad tecnológica: antioxidantes (fenólicos, tocoferoles) y colorantes (antocianinas, betalaínas) (Chemat et al., 2015).

#### **4.3.1 Pigmentos**

La categoría de agente colorante natural se refiere a tintes, pigmentos o cualquier sustancia que produzca color. Los colores naturales hallados en la naturaleza oscilan sobre amarillo, naranja, rojo, azul y verde. Los compuestos bioactivos responsables por la producción de tales colores difieren de acuerdo a su estructura química, propiedades físicas y localización en la planta (flores, hojas, frutos, etc.). Todos los compuestos tienen en común un cromóforo (estructura específica de la molécula), que absorbe luz en el rango de longitud de onda de la región visible, conocido como pigmento (Chemat et al., 2015). Esta estructura captura la energía y se produce la excitación de un electrón de una órbita externa a una órbita más alta; la energía no absorbida es reflejada y/o refractada para ser capturada por el ojo y, los impulsos neurales generados son transmitidos al cerebro donde pueden ser interpretados como un color (Delgado-Vargas, Jiménez, & Paredes-López, 2000).

El término pigmento es aplicado a un material de conocido o desconocido estado físico o a un material de color no analizado y desconocido. Sin embargo, un término más apropiado y científico es “biocromo”, que es definido como una sustancia química específica con una molécula de color, sintetizada por los organismos vivos (Hari, Patel, & Martin, 1994).

La característica estructural de un biocromo, que es responsable por la absorción de luz, es llamada el cromóforo; por ejemplo, en los carotenoides, el cromóforo es el sistema de doble enlace conjugado. Otros grupos funcionales o sustituyentes en la molécula que son capaces de modificar el máximo de absorción se llaman auxocromos; pueden extender la longitud del cromóforo o contribuir a la estabilidad del estado excitado (Hari et al., 1994). Algunos colorantes naturales tales como las clorofilas contienen iones metálicos (por ejemplo, Mg, Fe, Zn), responsables por el color general del complejo (Chemat et al., 2015).

Teniendo en cuenta la diversidad de color, se identificaron diferentes grupos de sustancias químicas responsables de la coloración: carotenoides (terpenos), clorofilas, antocianinas (polifenoles), betalainas (alcaloides) y curcuminoides. Estos grupos de moléculas son pigmentos naturales comercialmente disponibles y se usan como alternativa a los pigmentos sintéticos. Sin embargo, los colorantes naturales son menos estables que los sintéticos con respecto a los factores físicos (luz, temperatura y oxígeno), químicos (álcalis, ácidos, oxidantes y reductores) y biológicos (enzimas, microorganismos) (Chemat et al., 2015).

En los flavonoides, las antocianinas son los pigmentos más importantes; ellos producen colores de anaranjado a azul en pétalos, frutas, hojas y raíces. También contribuyen al color amarillo de las flores, donde están presentes con los carotenoides o solos en un 15% de las especies vegetales (Delgado-Vargas et al., 2000).

En la quinua, los colores básicos son verde, púrpura y rojo. Las plantas de color verde pueden llegar a ser blancas, amarillas, naranjas o rojas en la madurez; las plantas de color púrpura pueden tornarse amarillas o quedarse púrpuras en la maduración, mientras que las plantas de color rojo siguen siendo del mismo color a lo largo de sus vidas. La variabilidad en la coloración de las plantas y de las partes superiores de las plantas de quinua se debe a un amplio espectro de colores presentes en los órganos vegetativos y en el perigonio. El pericarpio, también, varía su color de blanco, amarillo, naranja y rojo, a marrón y negro. Las especies silvestres a menudo tienen pericarpios de color negro (Jacobsen & Stølen, 1993).

#### 4.4 Ensayos de Capacidad Antioxidante

Una definición de antioxidantes, desde un punto de vista biológicamente relevante, es presentada como las sustancias sintéticas o naturales añadidas a productos para prevenir o retrasar su deterioro por acción del oxígeno en el aire. En bioquímica y medicina, los antioxidantes son enzimas u otras sustancias orgánicas, tales como la vitamina E o  $\beta$ -caroteno, que son capaces de contrarrestar los efectos dañinos de la oxidación en tejidos animales (Huang, Ou, & Prior, 2005).

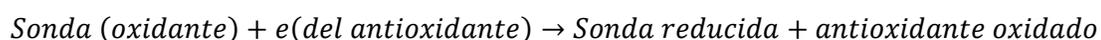
En la ciencia de alimentos, los antioxidantes tienen un alcance más amplio, ya que incluyen componentes que impiden que las grasas en los alimentos se vuelvan rancios, así como los antioxidantes dietéticos, que son sustancias en los alimentos que disminuyen significativamente los efectos adversos de las especies reactivas, tales como las especies reactivas al oxígeno y nitrógeno, en la función fisiológica normal en los seres humanos (Institute of Medicine, 2000).

Sobre la base de las reacciones químicas involucradas, los ensayos de capacidad antioxidante principales pueden dividirse aproximadamente en dos categorías: (1) ensayos basados en la reacción de transferencia de átomos de hidrógeno (TAH) y (2) ensayos basados en la reacción de transferencia de un solo electrón (TE). Los ensayos basados en TE implican una reacción redox con el oxidante como un indicador del punto final de la reacción. La mayoría de los ensayos basados en TAH monitorean la cinética competitiva de la reacción, y la cuantificación se deriva de las curvas cinéticas. Los métodos basados en TAH generalmente están compuestos de un generador sintético de radicales libres, una sonda molecular oxidable y un antioxidante (Huang et al., 2005).

En la categoría de los ensayos basados en TE, se encuentran el ensayo de fenoles totales por el reactivo de Folin Ciocalteu (RFC), ensayo de Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox (TEAC), ensayo de capacidad de barrido del radical 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), ensayo de Potencia Antioxidante Reductora de iones Férricos (PARF), ensayo de N, N-dimetil-p-fenilendiamina (DMFD) y el ensayo de Capacidad de Reducción de Cobre (II). Estos métodos implican dos componentes

en la mezcla de reacción, antioxidantes y oxidante (también la sonda) (Huang et al., 2005).

Aunque los ensayos TEAC y DPPH normalmente se clasifican como reacciones basadas en TE, estos dos radicales indicadores, de hecho, pueden ser neutralizados ya sea por reducción directa a través de la transferencia de electrones o por el aplacamiento de radicales mediante la transferencia de átomos de hidrógeno (Prior, Wu, & Schaich, 2005). La transferencia de electrones se basa en la siguiente reacción:

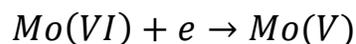


La propia sonda es un oxidante que abstrae un electrón del antioxidante, provocando cambios de color en la sonda. El grado del cambio de color es proporcional a las concentraciones del antioxidante. El punto final de la reacción es alcanzado cuando el cambio de color se detiene. El cambio de la absorbancia ( $\Delta A$ ) es graficado frente a la concentración de antioxidante para dar una curva lineal. La pendiente de la curva refleja la capacidad reductora del antioxidante, que se expresa como equivalencia de Trolox (ET) o equivalente de ácido gálico (EAG) (Huang et al., 2005).

#### **4.4.1 Ensayo de fenoles totales por el reactivo Folin Ciocalteu (TPC)**

Inicialmente, el método del reactivo Folin Ciocalteu fue aplicado para el análisis de proteínas aprovechando la actividad del reactivo hacia los residuos de la proteína tirosina (que contiene un grupo fenol). Muchos años después, Singleton y colaboradores extendieron este ensayo al análisis de fenoles totales en el vino; desde entonces el ensayo ha encontrado muchas aplicaciones (Huang et al., 2005). El ensayo basado en el reactivo del Folin Ciocalteu ganó popularidad y se considera el método de elección para estimar el contenido total de fenoles en productos vegetales complejos (Singleton & Rossi, 1965).

El RFC se hace típicamente hirviendo primero (durante 10 h) la mezcla de tungstato de sodio ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 100 g), molibdato de sodio ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 25 g), ácido clorhídrico concentrado (100 ml), ácido fosfórico al 85% (50 ml) y agua (700 ml). Después de la ebullición, se añade sulfato de litio ( $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 150 g) a la mezcla para dar una solución amarilla intensa, el reactivo del Folin Ciocalteu. El RFC tiene una incorporación mayor de molibdato en el complejo, haciéndola altamente sensible a la reducción (Singleton & Rossi, 1965). Las secuencias de reacciones de reducción reversibles de uno o dos electrones conducen a especies azules, posiblemente los complejos heteropolifosfotungstato-molibdatos ( $\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40}$ )<sup>4-</sup>. En esencia, se cree que el molibdeno es más fácil de reducir en el complejo y la reacción de transferencia de electrones ocurre entre los reductores y Mo (VI) (Huang et al., 2005):

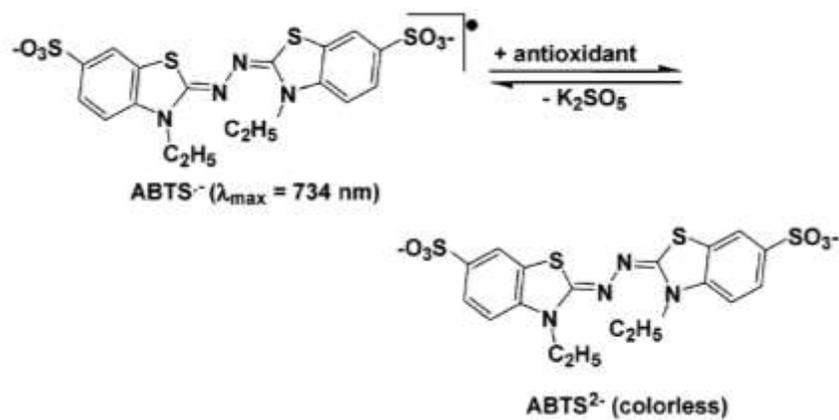


Obviamente, el RFC es inespecífico a los compuestos fenólicos ya que puede ser reducido por muchos compuestos no fenólicos (por ejemplo, vitamina C, Cu (I), etc.). Los compuestos fenólicos reaccionan con el RFC solo en condiciones básicas (ajustado por una solución de carbonato de sodio a pH ~ 10). La disociación de un protón fenólico conduce a un anión fenolato, que es capaz de reducir el RFC. Esto apoya el concepto de que la reacción ocurre a través del mecanismo de transferencia de electrones. Los compuestos azules formados entre el fenolato y RFC son independientes de la estructura de los compuestos fenólicos, descartando así la posibilidad de complejos de coordinación formados entre el centro metálico y los compuestos fenólicos (Huang et al., 2005).

A pesar de la naturaleza indefinida del RFC, el ensayo de fenoles totales por RFC es conveniente, simple y reproducible. Como un resultado, un gran conjunto de datos ha sido acumulado y se ha convertido en un ensayo rutinario en el estudio de antioxidantes fenólicos (Huang et al., 2005).

#### 4.4.2 Ensayo de Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox (TEAC)

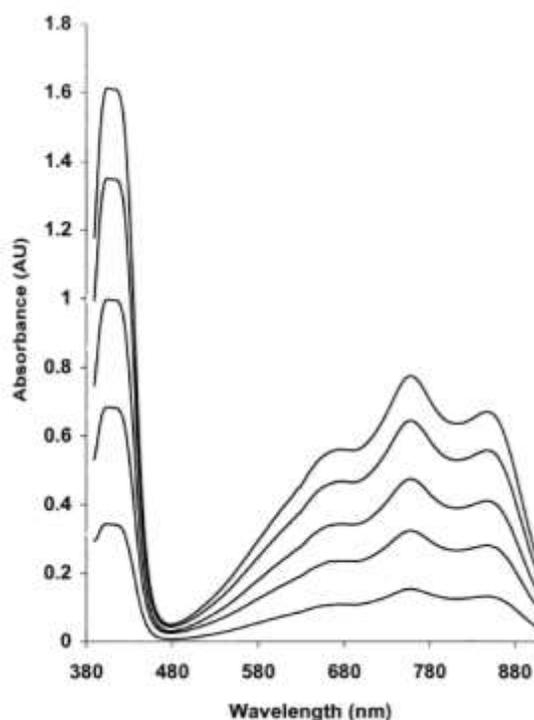
La generación del catión radical ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) forma la base de uno de los métodos espectrofotométricos que han sido aplicados a la medición de la actividad antioxidante total de soluciones de sustancias puras, mezclas acuosas y bebidas. El ensayo original de ABTS<sup>•+</sup> fue basado en la activación de metamioglobina con peróxido de hidrógeno en la presencia de ABTS para producir el catión radical, en la presencia o ausencia de antioxidantes. Esto ha sido criticado sobre la base de que los antioxidantes que reaccionan más rápido también pueden contribuir a la reducción del radical ferril-mioglobina. Un formato más apropiado para el ensayo es una técnica de decoloración en la que el radical es generado directamente en una forma estable previa a la reacción con antioxidantes putativos (Figura 16) (Re et al., 1999).



**Figura 16. Neutralización del radical ABTS<sup>•+</sup> por acción de antioxidantes (Huang et al., 2005)**

La técnica mejorada para la generación del ABTS<sup>•+</sup> implica la producción directa del cromóforo ABTS<sup>•+</sup> azul/verde a través de la reacción entre el ABTS y persulfato de potasio. Esto tiene máximos de absorción a longitudes de onda de 645 nm, 734 nm y 815 nm, así también como el más comúnmente utilizado máximo a 415 nm (Figura 17) (Re et al., 1999). Entre ellos, las longitudes onda de 415 nm y 734 nm fueron adoptadas por la mayoría de investigadores para monitorear espectrofotométricamente la

reacción entre los antioxidantes y el  $ABTS^{•+}$  (Prior et al., 2005). La adición de antioxidantes al catión radical pre-formado reduce el ABTS, en una extensión y escala de tiempo dependiente de la actividad antioxidante, la concentración del antioxidante y la duración de la reacción. Por lo tanto, el grado de decoloración como porcentaje de inhibición del catión radical  $ABTS^{•+}$  es determinado en función de la concentración y del tiempo, y se calcula en relación con la reactividad del Trolox como un estándar, en las mismas condiciones. El método es aplicable al estudio de antioxidantes hidrosolubles y liposolubles, compuestos puros y extractos de alimentos (Re et al., 1999).



**Figura 17. Espectro de absorción del radical catión ABTS  
(Re et al., 1999)**

Debido a su simplicidad operativa, el ensayo TEAC ha sido utilizado en muchos laboratorios de investigación para estudiar la capacidad antioxidante, y los valores TEAC de muchos compuestos y muestras de alimentos son informados. Los valores

TEAC para compuestos antioxidantes puros no muestran una clara correlación entre los valores TEAC y el número de electrones que un antioxidante puede dar. Los valores TEAC del ácido ascórbico (1.05),  $\alpha$ -tocoferol (0.97), glutatión (1.28) y ácido úrico (1.01) son casi los mismos, aunque el glutatión puede donar normalmente un electrón (para formar glutatión oxidado), mientras que los otros son reductores de dos electrones. El ácido ferúlico (1.90) y el ácido *p*-cumárico (2.00) tienen valores TEAC comparables. Sin embargo, el ácido cafeico tiene un valor TEAC de 1.00, aunque su estructura es similar a la del ácido ferúlico. La diferencia del valor TEAC entre la quercetina (3.00) y el kaempferol (1.00) es también bastante sorprendente ya que tienen estructuras químicas similares (Huang et al., 2005).

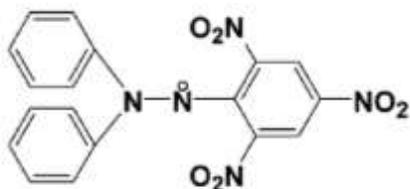
Aparentemente, las diferencias de velocidad de reacción entre antioxidantes y oxidantes no se reflejan en los valores TEAC porque éste es un ensayo de punto final (Huang et al., 2005). De acuerdo con Prior et al., (2005), la reacción TEAC no puede ser la misma para reacciones lentas, y puede tomar mucho tiempo alcanzar un punto final. Por lo tanto, usando un punto final de corta duración (4 o 6 min), uno puede tomar la lectura antes de que la reacción termine y resulte en valores TEAC bajos.

#### **4.4.3 Ensayo de Capacidad de Barrido del radical DPPH**

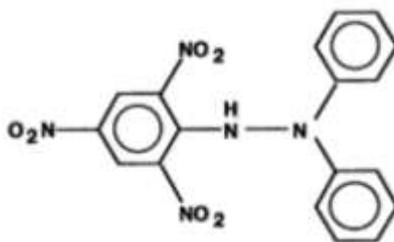
Este ensayo se basa en la medición de la capacidad reductora de antioxidantes hacia el DPPH<sup>•</sup>. La capacidad puede ser evaluada por resonancia de spin de electrones (RSE) o midiendo la disminución de su absorbancia. El ensayo de decoloración ampliamente utilizado se informó por primera vez por Brand-Williams y colaboradores (Prior et al., 2005).

La molécula de 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (Figura 18) es caracterizada como un radical libre estable en virtud de la deslocalización del electrón de reserva sobre la molécula en su conjunto, de modo que las moléculas no dimerizan, como sería el caso con la mayoría de los otros radicales libres. La deslocalización también da lugar al color violeta intenso, caracterizado por una banda de absorción en solución de etanol centrada a aproximadamente 520 nm (Molyneux, 2004). Por otro lado, Huang et al., (2005) y Prior et al., (2005) mencionan que el DPPH es uno de los pocos radicales de

nitrógeno orgánico estables y comercialmente disponibles que tiene una máxima absorción UV –Vis a 515 nm.



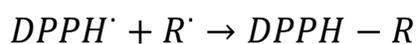
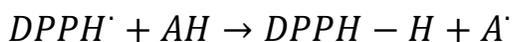
**Figura 18. DPPH (radical libre) (Huang et al., 2005)**



**Figura 19. Difenilpicrilhidrazina (no radical) (Molyneux, 2004)**

El ensayo no es una reacción competitiva porque el DPPH es a la vez sonda radical y oxidante. El color del DPPH se puede perder tanto por reacción radical (TAH) como por reducción (TE) (Prior et al., 2005).

Para evaluar la actividad antioxidante de compuestos o extractos específicos, estos últimos se dejan reaccionar con un radical estable (DPPH) en una solución de metanol. La reducción de DPPH controla la disminución de su absorbancia a una longitud de onda característica durante la reacción. En su forma radical, el DPPH se absorbe a 515 nm, pero tras la reducción mediante un antioxidante (*AH*) o una especie radical (*R'*), la absorción desaparece (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995).



Cuando una solución de DPPH es mezclada con aquella de una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno, entonces esto da lugar a la forma reducida (Figura 19) con la pérdida de este color violeta (aunque se esperaría que fuera un color amarillo pálido residual del grupo picril todavía presente). Representando el radical DPPH por  $Z^{\cdot}$  y la molécula donante por  $AH$ , la reacción primaria es:



Donde  $ZH$  es la forma reducida y  $A^{\cdot}$  es el radical libre producido en este primer paso. Este último radical experimentará entonces reacciones adicionales que controlarán la estequiometría global, es decir, el número de moléculas de DPPH reducidas (decoloradas) por una molécula del reductor (Molyneux, 2004).

Por lo tanto, la reacción [1] pretende proporcionar el enlace con las reacciones que tienen lugar en un sistema oxidante, tal como la auto oxidación de un lípido u otra sustancia insaturada; la molécula de DPPH ( $Z^{\cdot}$ ) pretende así representar los radicales libres formados en el sistema cuya actividad es suprimida por la sustancia  $AH$  (Molyneux, 2004).

El ensayo de DPPH se lleva a cabo típicamente mediante la mezcla de una solución de DPPH (3.9 ml, 25 mg/L) en metanol con la solución de muestra (0.1 ml). La absorbancia del progreso de reacción de la mezcla es monitoreada a 515 nm durante 30 min o hasta que la absorbancia sea estable. Tras la reducción, el color de la solución se desvanece. El porcentaje de DPPH remanente se calcula como:

$$\%DPPH_{rem} = 100 \times [DPPH]_{rem} / [DPPH]_{T=0}$$

El  $\% DPPH_{rem}$  es proporcional a las concentraciones del antioxidante, y la concentración que provoca una disminución en la concentración inicial de DPPH en un 50% se define como  $EC_{50}$  (Huang et al., 2005).

## Capítulo III MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Lugar de ejecución

La investigación se llevó a cabo en los laboratorios del Centro de Investigación en Tecnología de Alimentos (CITAL, Sede Juliaca y Lima) y Centro de Investigación en Ciencia de Alimentos (CICAL), pertenecientes a la Escuela Profesional de Ingeniería de Industrias Alimentarias, Facultad de Ingeniería y Arquitectura de la Universidad Peruana Unión (Carretera Central, Km 19.5, Ñaña – Lima).

### 4.2 Insumos químicos y equipos

Los insumos químicos utilizados fueron el 2,2 Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (HIMEDIA), 2,2 Azino-bis (3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfónico, sal diamonio (ABTS) (Sigma Aldrich), 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico (Trolox) (Sigma Aldrich), persulfato de potasio (CDH), ácido gálico monohidratado (HIMEDIA), reactivo del fenol según Folin Ciocalteu 2 N (HIMEDIA), carbonato de sodio (MERCK) y etanol absoluto (MTEDIA). Los equipos utilizados fueron una balanza analítica (OHAUS), estufa esterilizadora (Memmert, Mo.: UNB200), determinador de grasa (SZC – D), espectrofotómetro UV-Vis GENESYS10 (ThermoSpectronic, Mo.: Genesys 10UV), termoagitador magnético (Thermolyne, Mo.: SP18420 – 26), termoagitador orbital (Espacio & Tiempo, Mo.: ATC – 1) y un mezclador vortex múltiple (VWR, Mo.: 9453VWHDEUS).

### 4.3 Materia vegetal y preparación de la muestra

Las hojas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) variedad “INIA 420 Negra collana” (estado vegetativo en etapa de ramificación de aprox. 90 días, Cabana, Juliaca) fueron secadas en estufa a 50°C/24 horas. El material fue molido en un mortero y tamizado a 0.56 mm. Las hojas fueron almacenadas en un lugar oscuro a temperatura ambiente selladas al vacío en bolsas de polietileno de alta densidad hasta un posterior análisis (Świeca, Sęczyk, Gawlik-Dziki, & Dziki, 2014).

#### 4.4 Caracterización de la materia vegetal

##### 4.4.1 Contenido de humedad

La determinación del contenido de humedad (AOAC 930.15) fue realizada pesando 2 g. de hojas frescas que fueron secadas en estufa a 135°C por 2 h hasta peso constante. Luego, la muestra fue transferida a una campana de desecación hasta alcanzar la temperatura ambiente. El peso final fue registrado y se expresó el contenido de humedad (base húmeda, b.h.) mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido de humedad} \left( \frac{g \text{ H}_2\text{O}}{100 g} \right) = \left( \frac{W_{inicial} - W_{final}}{W_{inicial}} \right) \times 100$$

##### 4.4.2 Contenido de cenizas

Se determinó según el método oficial AOAC 923.03. Fueron pesados 2 g de hojas de quinua secas en un crisol. Luego, se ubicaron en una mufla a 550°C por aproximadamente 8 horas hasta que la muestra adoptó un color gris claro. Finalmente, se retiró, enfrió y registró el peso del crisol en una balanza analítica. El contenido de cenizas (b.h.) fue expresado mediante la fórmula:

$$\text{Contenido de cenizas} \left( \frac{g \text{ cenizas}}{100 g} \right) = \left( \frac{W_{cenizas}}{W_{muestra \text{ seca}}} \right) \times 100$$

##### 4.4.3 Contenido de lípidos

Se determinó según el método oficial AOAC 920.85 (Association of Official Analytical Chemists, 2000). Se pesaron 2 g de hojas de quinua secas que fueron contenidas en un cartucho de papel filtro N° 4. La muestra fue ubicada en el equipo Soxhlet y la extracción se llevó a cabo calentando 250 ml de éter de petróleo en un balón de vidrio por 5 h. El color transparente del éter de petróleo en el equipo Soxhlet durante la condensación será el indicador para finalizar la extracción. El balón con la muestra lipídica extraída fue retirado y colocado en una estufa a 100°C por 30 min.

Finalmente, se registró el peso del balón y el contenido de lípidos (b.h.) fue expresado mediante la fórmula:

$$\text{Contenido de lípidos } \left( \frac{g \text{ lípidos}}{100 g} \right) = \left( \frac{W_{\text{lípidos}}}{W_{\text{muestra seca}}} \right) \times 100$$

#### 4.4.4 Contenido de proteínas

Se determinó de acuerdo al método oficial AACC 46 – 13 (AACC, 2000). En un tubo de digestión fueron colocados 0.2 g de hojas de quinua, 1 g de catalizador (0.25 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  + 100 g de  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) y 3 ml de ácido sulfúrico. La digestión se llevó a cabo dentro de una campana de extracción a una temperatura de 350°C por 4 horas. La muestra catalizada y transparente fue ubicada en el vaso principal del destilador micro Kjeldahl, a la cual se adicionaron 10 ml de NaOH al 80%, 6 ml de agua destilada y 3 gotas de fenolftaleína al 1% para alcalinizar la muestra. En la base del destilador micro Kjeldahl fue ubicado un vaso graduado con 5 ml de ácido bórico al 4% para la recepción del amoniaco ( $\text{NH}_3$ ) de la muestra. Luego, se añadieron 3 gotas de indicador verde bromocresol a la solución de ácido bórico. Finalmente, la titulación fue realizada con solución de HCl 0.05 N y el gasto fue registrado. Los cálculos para el contenido de nitrógeno (b.h.) y proteína (Milton & Dintzis, 1981) fueron realizados mediante las siguientes fórmulas:

$$\text{Nitrógeno (\%)} = \frac{(\text{ml HCl} - \text{ml HCl blanco}) \times N \text{ HCl} \times \text{peso equivalente N} \times 100}{\text{peso de muestra (mg)}}$$

$$\text{Proteína cruda } \left( \frac{g}{100 g} \right) = \text{Nitrógeno (\%)} \times 4.4$$

#### 4.5 Extracción de la materia vegetal

La extracción se basó en el método propuesto por Świeca et al., (2014) con modificaciones. Fueron extraídos 0.5 g de muestra seca con 50 ml de solución hidroetanólica en un termoagitador orbital (Espacio & Tiempo) por 105 min a 150 rpm. La temperatura de extracción (25.85 – 54.14 °C) y la concentración de etanol (5.85 –

34.14 %) fueron predeterminadas de acuerdo al diseño experimental mostrado en la Tabla 10. Las alícuotas de los extractos fueron recolectadas en el tiempo (1 – 105 min) para monitorear la cinética de extracción de los compuestos fenólicos totales. Finalmente, los extractos se filtraron (0.45 µm) y almacenaron en oscuridad a –20°C.

## 4.6 Composición química del extracto vegetal

### 4.6.1 Determinación del contenido fenólico total (TPC)

La concentración de fenoles totales se determinó utilizando el reactivo Folin – Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965). A 100 µL de extracto de H.Q. se le añadieron 100 µL de H<sub>2</sub>O destilada, 400 µL de reactivo Folin – Ciocalteu (1:5 H<sub>2</sub>O destilada) y se agitó a 750 rpm por 8 min en un mezclador vortex (VWR) Luego, 2000 µL de carbonato de sodio al 10% fueron agregados y el contenido reposó 30 min. La absorbancia a 725 nm fue medida en un espectrofotómetro GENESYS10 UV-Vis. Finalmente, la concentración de fenoles totales (TPC) fue determinada utilizando una curva estándar de ácido gálico (0.04 – 0.25 mg/ml). El resultado fue expresado como mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100 g de H.Q. secas.

$$TPC \left( mg \frac{EAG}{100g} \right) = \frac{(D.O.muestra - Valor_{intercepto}) \times V_{muestra} \times F.D.}{Valor_{pendiente} \times W_{muestra}} \times 100$$

### 4.6.2 Ensayo de barrido del radical DPPH

La capacidad antioxidante fue evaluada utilizando el ensayo DPPH según Brand-Williams, Cuvelier, y Berset (1995), citado por Chirinos, Pedreschi, Rogez, Larondelle, y Campos (2013), con algunas modificaciones. La solución stock fue preparada disolviendo 24 mg de DPPH en 100 ml de etanol y almacenada a –20°C hasta su uso. La solución de trabajo se obtuvo mediante la mezcla de 10 ml de solución stock con 45 ml de etanol hasta obtener una absorbancia de  $1.1 \pm 0.02$  unidades a 515 nm. Para la reacción, el extracto (150 µL) fue mezclado con 2850 µL de solución DPPH<sup>+</sup> y la solución reposó por 30 min en oscuridad a temperatura ambiente. La absorbancia a 515 nm fue medida en un espectrofotómetro (ThermoSpectronic, Modelo Genesys 10 UV) utilizando etanol como blanco. La capacidad antioxidante fue

expresada como  $\mu\text{mol}$  equivalentes de Trolox (ET) por 100 g de H.Q. secas en base a una curva estándar de Trolox (150 – 750  $\mu\text{M}$ ).

$$\text{Inhibición}(\%) = \left( \frac{D.O.\text{blanco} - D.O.\text{muestra}}{D.O.\text{blanco}} \right) \times 100$$

$$AA \left( \text{mg} \frac{ET}{100g} \right) = \frac{(\text{Inhibición}\% - \text{Valor}_{\text{intercepto}}) \times V_{\text{solución}}}{\text{Valor}_{\text{pendiente}} \times W_{\text{muestra}}} \times 100$$

#### 4.6.3 Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox (TEAC)

El ensayo fue llevado a cabo por el método de ABTS<sup>•+</sup> mejorado por Re et al., (1999). El catión radical ABTS<sup>•+</sup> se generó por la reacción de ABTS (7mM) y persulfato de potasio (2.45mM) después de la incubación a temperatura ambiente en oscuridad por 16 h. La solución ABTS<sup>•+</sup> fue diluida con etanol absoluto a una absorbancia de  $0.7 \pm 0.02$  a 734 nm. La solución ABTS<sup>•+</sup> (2850  $\mu\text{l}$ ) se añadió a 150  $\mu\text{l}$  de extracto de H.Q. y la solución fue agitada por 6 min a temperatura ambiente en un mezclador vortex (VWR). La absorbancia de la solución se registró a 734 nm. Finalmente, el resultado fue expresado en términos de Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox (TEAC,  $\mu\text{mol}$  de equivalentes de Trolox por 100 g de H.Q. secas) utilizando una curva estándar de Trolox (50.12 – 400.18  $\mu\text{M}$ ).

$$\text{Inhibición}(\%) = \left( \frac{D.O.\text{blanco} - D.O.\text{muestra}}{D.O.\text{blanco}} \right) \times 100$$

$$TEAC \left( \text{mg} \frac{ET}{100g} \right) = \frac{(\text{Inhibición}\% - \text{Valor}_{\text{intercepto}}) \times V_{\text{solución}}}{\text{Valor}_{\text{pendiente}} \times W_{\text{muestra}}} \times 100$$

#### 4.7 Diseño experimental y análisis estadístico

Los efectos de las variables independientes “Temperatura de extracción” (35 – 75°C) y “Concentración de etanol” (30 – 90 % v/v) sobre la extracción de compuestos fenólicos totales fueron investigados usando inicialmente un diseño factorial 2<sup>2</sup> con un punto central (Tabla 9) y dos réplicas. Los experimentos fueron conducidos

aleatoriamente y los datos analizados por análisis de varianza y normalidad. Asimismo, se aplicó el análisis de Tukey para comparar los efectos de cada tratamiento sobre el contenido de TPC durante los tiempos de extracción de 1 – 90 min. La relación entre las variables independientes y la respuesta fue analizada a través de la curvatura.

**Tabla 9. Modelo de Diseño factorial 2<sup>2</sup>**

Temperatura de extracción (°C)	Concentración de etanol (%)	Tiempos de extracción						
		1 min	15 min	30 min	45 min	60 min	75 min	90 min
35 (-1)	30 (-1)	-	-	-	-	-	-	-
75 (+1)	30 (-1)	-	-	-	-	-	-	-
35 (-1)	90 (+1)	-	-	-	-	-	-	-
75 (+1)	90 (+1)	-	-	-	-	-	-	-
55 (0)	60 (0)	-	-	-	-	-	-	-

El diseño central compuesto rotativo (DCCR) consistió de cuatro puntos factoriales, cuatro puntos axiales y tres puntos centrales, totalizando en 13 experimentos. Los niveles para las variables independientes “Temperatura de extracción” (25.86 – 54.14°C) y “Concentración de etanol” (5.86 – 34.14%) fueron generadas a partir del diseño factorial 2<sup>2</sup>, con dos réplicas. Los rangos y niveles de las variables independientes utilizados en la forma codificada y no codificada en este estudio se muestran en la Tabla 10.

Los experimentos fueron conducidos en orden aleatorio y los datos analizados por análisis de varianza y normalidad. El análisis de Tukey fue aplicado para comparar el efecto de los tratamientos sobre el contenido fenólico total durante los tiempos de extracción de 1 – 105 min. La función de respuesta fue particionada en los componentes lineal, cuadrático e interactivo.

**Tabla 10. Modelo de Diseño Central Compuesto**

Tratamientos	Variables independientes				Contenido fenólico total (mg EAG/100 g H.Q.)							
	Codificado		No codificado		1 min	15 min	30 min	45 min	60 min	75 min	90 min	105 min
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Temperatura de extracción (°C)	Concentración de etanol (% v/v)								
1	-1	-1	30	10	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-1	1	30	30	-	-	-	-	-	-	-	-
3	1	-1	50	10	-	-	-	-	-	-	-	-
4	1	1	50	30	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-1.41421	0	25.86	20	-	-	-	-	-	-	-	-
6	1.41421	0	54.14	20	-	-	-	-	-	-	-	-
7	0	-1.41421	40	5.86	-	-	-	-	-	-	-	-
8	0	1.41421	40	34.14	-	-	-	-	-	-	-	-
9	0	0	40	20	-	-	-	-	-	-	-	-
10	0	0	40	20	-	-	-	-	-	-	-	-
11	0	0	40	20	-	-	-	-	-	-	-	-
12	0	0	40	20	-	-	-	-	-	-	-	-
13	0	0	40	20	-	-	-	-	-	-	-	-

De acuerdo con Rodrigues & lemma (2014), el ajuste de un modelo de segundo orden a los datos experimentales tiene la siguiente forma:

$$Y = \beta_0 + \sum_j \beta_j x_j + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \sum_j \beta_{jj} x_j^2 + e$$

Donde  $Y$  es la respuesta predicha medida;  $\beta_0$  es el intercepto;  $\beta_j$ ,  $\beta_{jj}$  y  $\beta_{ij}$  son los coeficientes del modelo (lineal, cuadrático e interacción, respectivamente) y  $X_i$  y  $X_j$  son los valores codificados de las variables independientes.

Los gráficos de contorno y superficie de respuesta fueron usados para mostrar la relación entre la respuesta y los niveles de cada variable independiente y deducir las condiciones de extracción óptimas. Los valores predichos fueron comparados con los valores experimentales para determinar la validez y adecuación del modelo. Por consiguiente, una ecuación polinomial de segundo orden fue generada a partir de los coeficientes de regresión del tratamiento óptimo para establecer un modelo de extracción predictivo.

Finalmente, se aplicó una prueba de correlación entre el contenido de compuestos fenólicos totales y la actividad antioxidante de los extractos de H.Q. obtenidos a los parámetros de temperatura de extracción, concentración de etanol y tiempo de extracción óptimos. Todos los análisis estadísticos se realizaron a un nivel de significancia de 5 % ( $p \leq 0.05$ ) usando el software STATISTICA versión 13.1 con licencia en la Universidad Peruana Unión.

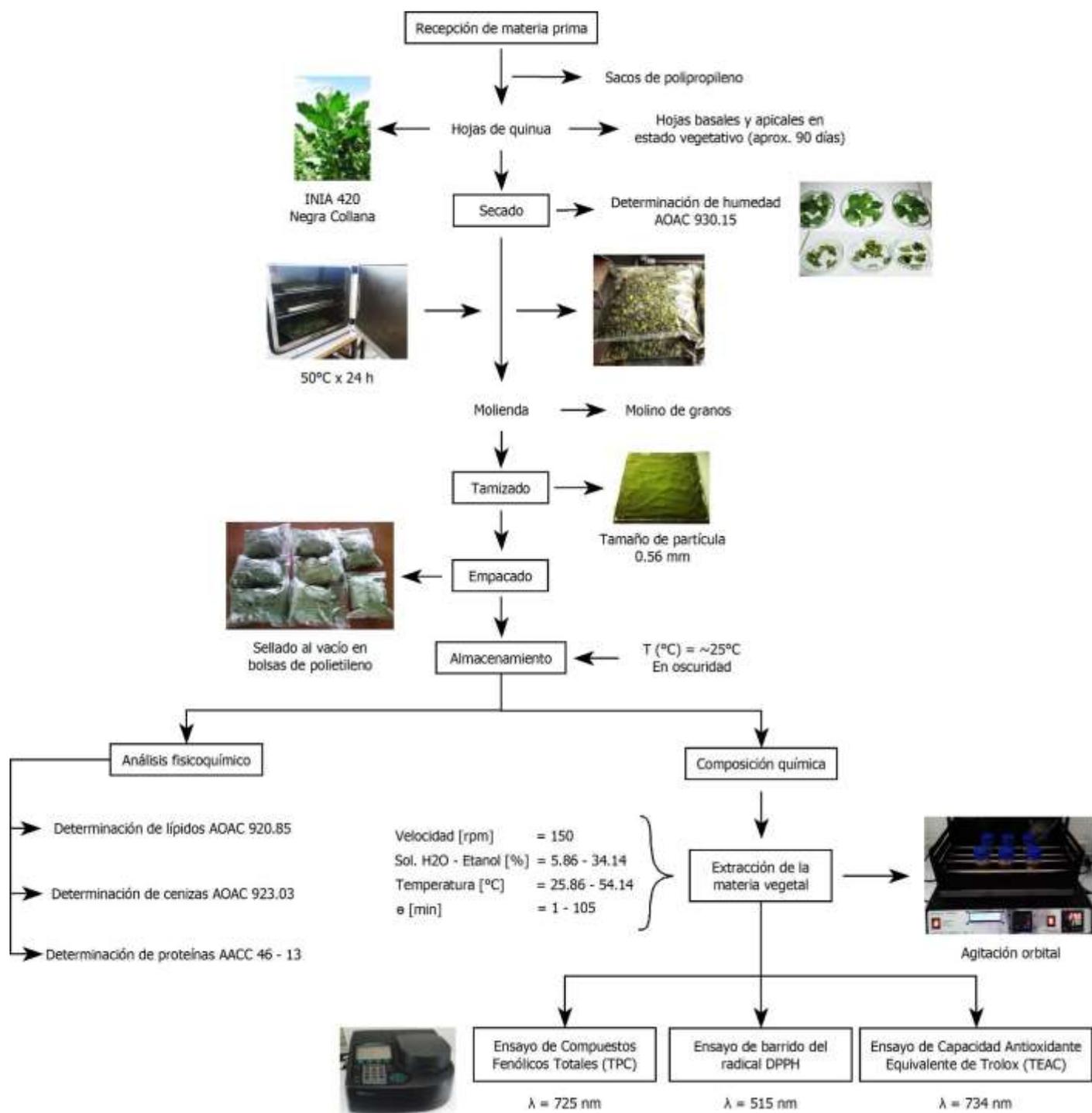


Figura 20. Diagrama de flujo general de análisis aplicados a las hojas de quinua

## Capítulo IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Caracterización de la materia vegetal

La composición físico – química de las hojas de quinua INIA 420 Negra Collana es mostrada en la Tabla 11. Los resultados fueron comparados con la composición fisicoquímica de hojas pertenecientes a la familia *Chenopodiaceae* (acelga, betarraga y espinaca), de acuerdo con Takhtajan (2009), y también con algunas hojas de vegetales empleados comúnmente en la dieta de los peruanos (Instituto Nacional de Salud, 2009) mostrados en la Tabla 12.

El contenido de humedad de las H.Q. se encuentra dentro de los valores reportados en la Tabla 3. En la fisiología vegetal, las plantas pierden agua continuamente mediante la evaporación y poseen mecanismos para evitar la desecación. El transporte del agua y minerales del suelo a los lugares donde se realiza la fotosíntesis, al igual que la distribución de los productos de la fotosíntesis a los órganos y tejidos no fotosintéticos son los mecanismos de las plantas, siendo el proceso de la fotosíntesis la función principal de las hojas (Taiz & Zeiger, 2002). Por lo tanto, las hojas de los vegetales poseen un alto contenido de humedad.

**Tabla 11. Composición fisicoquímica de las hojas de quinua INIA 420 Negra Collana**

<b>Muestra vegetal</b>	<b>Humedad (g/100 g)</b>	<b>Lípidos (g/100 g)</b>	<b>Proteína (g/100 g)</b>	<b>Cenizas (g/100 g)</b>
Hojas de quinua INIA 420 Negra Collana	84.49 ± 0.23	2.61 ± 0.17	1.71 ± 0.23	20.05 ± 0.31

**Tabla 12. Composición fisicoquímica de otros vegetales**

<b>Muestra vegetal</b>	<b>Humedad (g/100 g)</b>	<b>Lípidos (g/100 g)</b>	<b>Proteína (g/100 g)</b>	<b>Cenizas (g/100 g)</b>
Hojas de betarraga <sup>a</sup>	89.82	0.78	3.81	1.58
Hojas de espinaca blanca <sup>b</sup>	89.5	0.6	1.9	1.7
Hojas de espinaca negra <sup>b</sup>	90	0.9	2.8	1.4
Hojas de acelga <sup>b</sup>	90.7	0.3	2.2	1.5
Hojas de lechuga americana <sup>b</sup>	96.6	0.1	0.6	0.3
Hojas de col <sup>b</sup>	88.1	0.6	2.7	1

<sup>a</sup>Biondo et al. (2014), datos expresados de g/kg a g/100g de hojas en estado de desarrollo de 100 días; <sup>b</sup>Instituto Nacional de Salud (2009)

Respecto al contenido de lípidos, las H.Q. mostraron un contenido semejante al de otras variedades reportado por Koziol (1992) y Tapia, et al. (1979). Sin embargo, Wahli (1990) y el Instituto Nacional de Salud (2009) informaron de contenidos más bajos (< 1.0), al igual que los mencionados en la Tabla 11. La Association of Official Analytical Chemists (2000) menciona que los componentes hidrosolubles tales como carbohidratos, úrea, ácido láctico, glicerol y otros podrían interferir en la extracción de grasa. Por tanto, si una muestra presenta estos componentes, es recomendable el lavado con 5 porciones de 20 ml de agua destilada previo al secado para la extracción con éter. Además, Kiskini, Vissers, Vincken, Gruppen, & Wierenga (2016) reportaron que para la determinación de lípidos totales en hojas de betarraga, la masa de clorofila *a* fue removida con 1 ml de acetona al 90% del extracto lipídico después de la extracción por el método Folch. La Figura 21 muestra la presencia de clorofila en las H.Q. después de la extracción con éter de petróleo.



**Figura 21. Extracto etéreo de hojas de quinua INIA 420 Negra Collana**

El contenido de proteína de las H.Q. fue menor a los reportados en la Tabla 3. Jones (1931) menciona que las suposiciones en las cuales se basa la estimación del contenido proteico en alimentos son que el nitrógeno en el material alimenticio es nitrógeno proteico, y que todas las proteínas contienen 16% de nitrógeno. Sin embargo, estas suposiciones no son necesariamente ciertas. La Food and Agriculture Organization of The United Nations (2003) afirma que no todo el nitrógeno en los alimentos es hallado en las proteínas, también está presente en cantidades variables de otros compuestos, tales como aminoácidos libres, nucleótidos, creatina y colina, donde es referido como nitrógeno no proteico. Asimismo, el contenido de nitrógeno de aminoácidos específicos varía de acuerdo al peso molecular del aminoácido y el número de átomos de nitrógeno que contiene. Basado en estos hechos, y las diferentes composiciones de aminoácidos de las proteínas, es sugerido el reemplazo del factor 6.25 por uno más específico para el alimento en cuestión. En este caso, el factor 4.4, empleado para la estimación del contenido proteico de hojas de plantas tropicales, fue utilizado para expresar el contenido proteico de las H.Q. (Milton & Dintzis, 1981).

Finalmente, con respecto al contenido de cenizas, las H.Q. presentaron un valor mucho mayor a los reportados en la Tabla 3 y Tabla 11. En un estudio sobre la relación entre el contenido de celulosa, hemicelulosa, lignina y el comportamiento térmico de la biomasa residual de árboles de olivo, se encontró que la fracción de pérdida de

masa en las hojas de olivo a temperaturas de 30 – 1000°C fue menor a aquella en la madera del olivo debido a su bajo contenido de celulosa y hemicelulosa. Sin embargo, el contenido de cenizas fue más alto (14.17%) debido a la alta cantidad de lignina (39.81%) en las hojas de olivo (García-Maraver, Salvachúa, Martínez, Díaz, & Zamorano, 2013). Esto no significa que las H.Q. sean un alimento rico en lignina, sino que señala un tiempo de incineración mayor para descomponer la misma. Nielsen (2010) indica que los tallos y hojas frescas deberían ser secados primero a 55°C y luego a temperaturas mayores para prevenir la formación de artefactos de lignina. Además, la incineración a temperaturas menores de 500 – 525°C podría resultar en contenidos de cenizas mayores debido a la menor descomposición de carbonatos y pérdida de sales volátiles.

## **4.2 Análisis estadístico de la extracción de TPC**

### **4.2.1 Diseño factorial 2<sup>2</sup>**

El diseño factorial 2<sup>2</sup> fue aplicado para identificar los parámetros de extracción de TPC apropiados para la optimización. Los intervalos de los niveles para las variables independientes “Temperatura de extracción” y “Concentración de etanol” se muestran en la Tabla 14. La extracción de TPC de las H.Q. fue realizada en intervalos de 15 min. De acuerdo con Montgomery (2004), el diseño 2<sup>k</sup> es de particular utilidad en las etapas iniciales del trabajo experimental debido al menor número de corridas que proporciona. Por consiguiente, estos diseños son usados ampliamente en los experimentos de tamizado o selección de factores.

El análisis de varianza, mostrado en la Tabla 13, muestra el efecto principal de las variables independientes, al igual que su interacción, sobre el contenido de TPC durante los tiempos de extracción (1 – 90 min). Se determinó que los efectos de los modelos lineal e interactivo son significativos a todos los tiempos de extracción. Sin embargo, la falta de ajuste indicó que ninguno de los modelos especifica correctamente la relación entre la respuesta y los predictores. Por lo tanto, para

comprobar la relación lineal o curva de los factores y la respuesta, se verificó la significancia de la curvatura en el análisis de varianza (Anexo 4).

**Tabla 13. ANOVA del diseño factorial 2<sup>2</sup>**

	S.C.	G.L.	Valor F	Valor p		S.C.	G.L.	Valor F	Valor p
<b>1 min</b> – R <sup>2</sup> =0.74172; R <sub>ajustado</sub> =0.67128					<b>45 min</b> – R <sup>2</sup> =0.67741; R <sub>ajustado</sub> =0.58943				
T.E. (°C)	30338	1	18.566	0.001540	T.E. (°C)	644184	1	478.891	0.000000
C.E. (%)	3746015	1	2292.444	0.000000	C.E. (%)	830463	1	617.373	0.000000
1*2	471910	1	288.794	0.000000	1*2	1350508	1	1003.978	0.000000
Falta de ajuste	1463006	1	895.314	0.000000	Falta de ajuste	1331916	1	990.157	0.000000
Error puro	16341	10			Error puro	13452	10		
<b>15 min</b> – R <sup>2</sup> =0.62667; R <sub>ajustado</sub> =0.52486					<b>60 min</b> – R <sup>2</sup> =0.69242; R <sub>ajustado</sub> =0.60853				
T.E. (°C)	372489	1	99.1749	0.000002	T.E. (°C)	557821	1	402.601	0.000000
C.E. (%)	1476379	1	393.0852	0.000000	C.E. (%)	525015	1	378.924	0.000000
1*2	1409432	1	375.2605	0.000000	1*2	1462866	1	1055.807	0.000000
Falta de ajuste	1903488	1	506.8027	0.000000	Falta de ajuste	1116983	1	806.170	0.000000
Error puro	37559	10			Error puro	13855	10		
<b>30 min</b> – R <sup>2</sup> =0.65886; R <sub>ajustado</sub> =0.56582					<b>75 min</b> – R <sup>2</sup> =0.75187; R <sub>ajustado</sub> =0.68419				
T.E. (°C)	628622	1	1638.467	0.000000	T.E. (°C)	602387	1	53.0086	0.000027
C.E. (%)	1037528	1	2704.256	0.000000	C.E. (%)	555741	1	48.9039	0.000037
1*2	1386368	1	3613.487	0.000000	1*2	1251976	1	110.1710	0.000001
Falta de ajuste	1576686	1	4109.539	0.000000	Falta de ajuste	681753	1	59.9927	0.000016
Error puro	3837	10			Error puro	113639	10		
					<b>90 min</b> – R <sup>2</sup> =0.71631; R <sub>ajustado</sub> =0.63894				
					T.E. (°C)	489297	1	26.06147	0.000461
					C.E. (%)	13700	1	0.72971	0.412973
					1*2	1236434	1	65.85629	0.000010
					Falta de ajuste	501131	1	26.69182	0.000421
					Error puro	187747	10		

T.E.: Temperatura de extracción; C.E.: Concentración de etanol

Montgomery (2004), indica que el supuesto de la linealidad de los efectos de los factores es una preocupación potencial en el uso de diseños factoriales de dos niveles. Por lo tanto, la aplicación de la curvatura en el análisis de varianza fue útil para verificar esta relación. Por otro lado, la inclusión de los términos de interacción a un modelo de primer orden genera un modelo con la capacidad de representar cierta curvatura en la función de respuesta. Esto es causado por el torcimiento del plano inducido por  $\beta_{ij}X_iX_j$ .

En este caso, la curvatura ( $p < 0.05$ , Anexo 4) de la función del contenido fenólico total a los tiempos de extracción de 1 – 90 min no fue modelada adecuadamente por la ecuación de primer orden:

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j x_j + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

Por lo tanto, el modelo lógico por considerar fue:

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j x_j + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} x_j^2 + \varepsilon$$

Donde  $\beta_{jj}$  representa el efecto cuadrático o de segundo orden puros. A esta ecuación se le llama modelo de superficie de respuesta de segundo orden (Montgomery, 2004). La falta de ajuste fue significativa ( $p < 0.05$ ) debido a la relación curva de los factores con la respuesta a todos los tiempos de extracción. Por consiguiente, fue recomendable la adición de puntos axiales para modelar la curvatura.

Por otro lado, para comparar los efectos de los tratamientos sobre cada uno de los tiempos de extracción, la prueba de Tukey fue aplicada (Anexo 5). Rodrigues & lemma (2014), indica que el test de Tukey se basa en la diferencia entre los promedios de los resultados para verificar si existe diferencia significativa entre los tratamientos. La Tabla 14 muestra los contenidos de TPC de las H.Q. obtenidos a los tiempos de extracción de 1 – 90 min.

**Tabla 14. Diseño factorial 2<sup>2</sup> para la extracción de compuestos fenólicos totales (mg GAE/100 g H.Q.)**

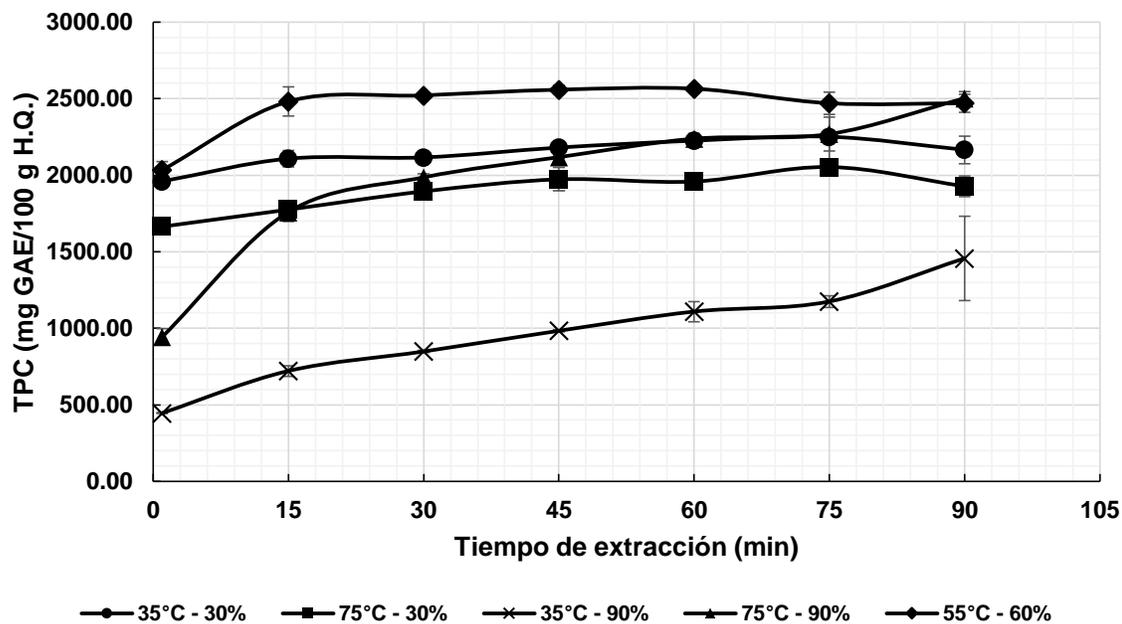
Temperatura de extracción (°C)	Concentración de etanol (%)	Tiempos de extracción						
		1 min	15 min	30 min	45 min	60 min	75 min	90 min
35 (-1)	30 (-1)	1960.23 ± 39.3 <sup>a</sup>	2108.25 ± 53.1 <sup>a</sup>	2116.30 ± 9.6 <sup>a</sup>	2180.66 ± 7.3 <sup>a</sup>	2225.71 ± 18.2 <sup>a</sup>	2251.45 ± 192.8 <sup>a</sup>	2166.18 ± 89.7 <sup>a</sup>
75 (+1)	30 (-1)	1664.17 ± 27.4 <sup>b</sup>	1775.19 ± 43.7 <sup>b</sup>	1894.26 ± 33.4 <sup>b</sup>	1973.10 ± 76.3 <sup>b</sup>	1958.62 ± 29.1 <sup>b</sup>	2053.55 ± 22.1 <sup>ac</sup>	1928.05 ± 66.3 <sup>ac</sup>
35 (-1)	90 (+1)	446.17 ± 4.8 <sup>c</sup>	721.31 ± 34.8 <sup>c</sup>	848.42 ± 7.3 <sup>c</sup>	983.57 ± 5.5 <sup>c</sup>	1109.07 ± 66.5 <sup>c</sup>	1175.04 ± 38.3 <sup>b</sup>	1456.61 ± 275.9 <sup>b</sup>
75 (+1)	90 (+1)	943.35 ± 54.3 <sup>d</sup>	1759.10 ± 60.2 <sup>b</sup>	1985.97 ± 22.1 <sup>d</sup>	2117.91 ± 7.3 <sup>a</sup>	2238.58 ± 33.9 <sup>a</sup>	2269.15 ± 111.8 <sup>a</sup>	2502.45 ± 42.9 <sup>acd</sup>
55 (0)	60 (0)	2034.24 ± 53.7 <sup>a</sup>	2481.54 ± 95.8 <sup>d</sup>	2521.76 ± 12.7 <sup>e</sup>	2558.77 ± 27.4 <sup>d</sup>	2565.20 ± 12.7 <sup>d</sup>	2470.27 ± 71.6 <sup>acd</sup>	2470.27 ± 58.3 <sup>ace</sup>

Letras diferentes en la misma columna indican que los valores reportados son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) por el test de Tukey.

La evolución del contenido de TPC (mg GAE/100 g H.Q. secas) durante el intervalo de 1 – 60 min de extracción mostró diferencias significativas entre los tratamientos. No obstante, se observó que los tratamientos 1 (T.E.: 35°C – C.E.: 30%) y 4 (T.E.: 75°C – C.E.: 90%) no mostraron diferencias significativas a los tiempos de extracción de 45 y 60 min. Esto quiere decir que los efectos del tratamiento 1 sobre la respuesta no difieren de aquellos del tratamiento 4.

En el minuto 75, todos los tratamientos, a excepción del tratamiento 3 (T.E.: 35°C – C.E.: 90%), no mostraron diferencias significativas entre sí. Esto podría traducirse como el punto de equilibrio de la extracción. Self (2005), indica que la adición de un líquido inmiscible a una muestra alimenticia, cortada en pequeñas partes, causará el hinchamiento de las partículas debido a la sorción y capilaridad durante la agitación. Luego, ocurrirá la difusión de los componentes solubles del sólido en el solvente hasta que las concentraciones de los mismos sean proporcionales a sus constantes de partición resultando en el equilibrio de la extracción.

Debido al efecto no significativo entre los tratamientos al minuto 75, las condiciones de extracción iniciales para la optimización fueron identificadas mediante la superposición de los gráficos de contorno (Figura 24). Por otro lado, el tratamiento 3, cuyos resultados difieren de las otras condiciones de extracción ( $p < 0.05$ ), demostró ser el tratamiento con el menor contenido de TPC durante el intervalo de tiempo de 90 min. Las curvas de extracción muestran la evolución del contenido de TPC en la Figura 22.



**Figura 22. Curva de extracción de TPC en el intervalo de 90 min**

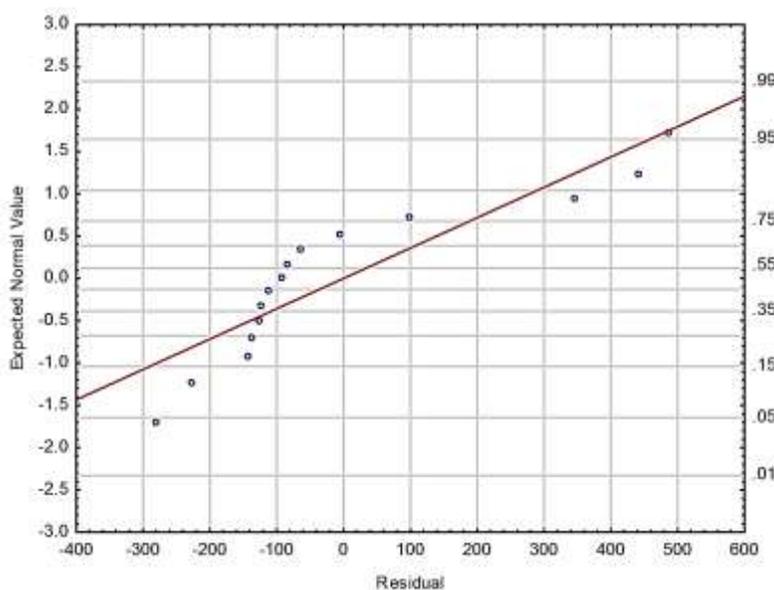
Los resultados en la Tabla 15 mostraron que la extracción de TPC fue afectada por la interacción ( $p = 0.000001$ ) de los factores. Un incremento de la concentración de etanol ( $p = 0.000037$ ) condujo a una disminución del contenido de TPC, mientras que un incremento en la temperatura ( $p = 0.000027$ ) provocó una mayor producción. La “Concentración de etanol” tuvo un efecto negativo, indicando que al pasar de 30% a 90% hubo una reducción del contenido fenólico en promedio de 430.403 mg GAE/100 g. Se observó que los demás tratamientos realizados en la condición de C.E. de 30% presentaron contenidos de TPC superiores como se muestra en la Figura 22.

**Tabla 15. Estimación de los efectos para el contenido de TPC a 75 min**

	Efecto (mg GAE/100 g)	Desviación estándar	t(10)	Valor p	Lim. Conf. - 95%	Lim. Conf. + 95%
Media	2043.893	27.52445	74.25735	0.000000	1982.565	2105.221
T.E. (°C)	448.102	61.54655	7.28070	0.000027	310.968	585.236
C.E. (%)	-430.403	61.54655	-6.99314	0.000037	-567.538	-293.269
T.E. * C.E.	646.007	61.54655	10.49624	0.000001	508.873	783.142

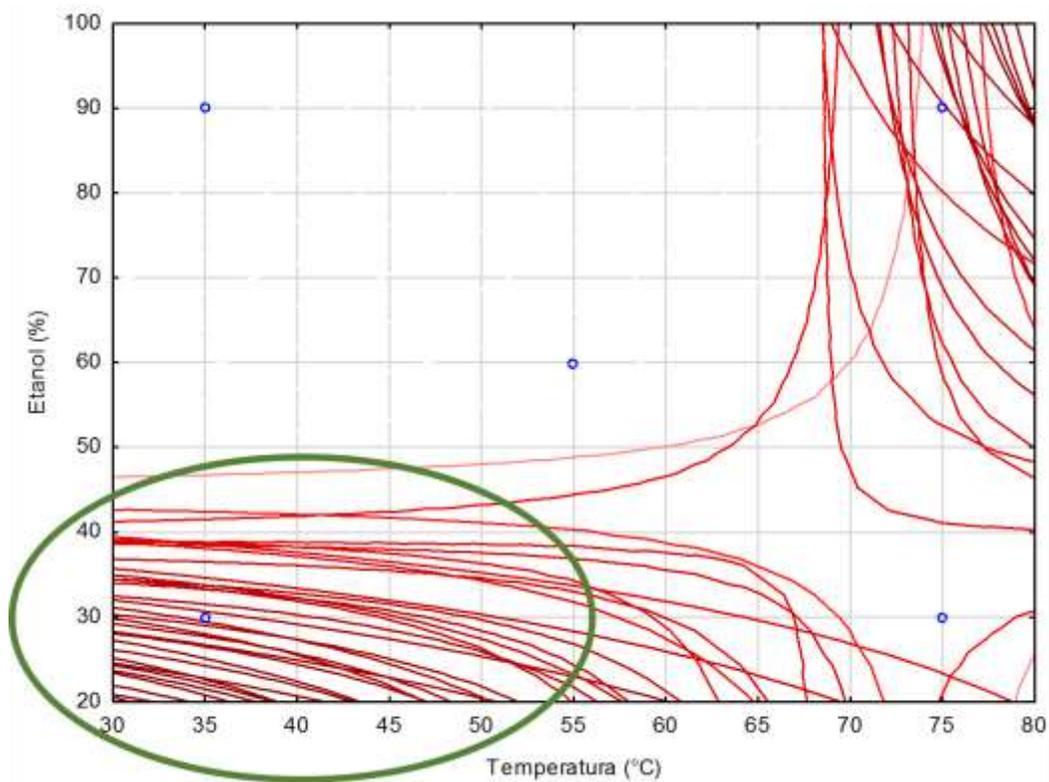
T.E.: Temperatura de extracción; C.E.: Concentración de etanol

A diferencia de los otros tratamientos, la distribución de los residuales del contenido fenólico total obtenido a los 75 min de extracción fue la que mostró una tendencia lineal más cercana a la recta (Figura 23). Las desviaciones estándar de los resultados mostrados en la Tabla 14 indicaron imprecisiones durante el proceso de extracción. La agitación fue realizada en un agitador magnético de una sola posición en la cual fueron ubicados tres tubos de ensayo con tapa rosca (Figura 25). Debido a esto, la velocidad de los agitadores no fue equilibrada, resultando en contenidos de TPC variables.



**Figura 23. Gráfico de probabilidad normal de la extracción de TPC a 75 min**

Finalmente, una superposición de los gráficos de contorno (Figura 24), en base a los tiempos de extracción de 1 – 90 min, permitió la identificación de las condiciones de extracción del contenido fenólico. Como se ha señalado anteriormente, el incremento del contenido de TPC fue debido a concentraciones de etanol menores a 90%. Analizando el gráfico, se verificó la existencia de una región adecuada para la variable dependiente, donde se encuentra un rango de combinaciones de “Temperatura de extracción” (30 – 55°C) y “Concentración de etanol” (20 – 40%).



**Figura 24. Superposición de gráficos de contorno de la extracción de TPC a los tiempos de 1 – 90 min**

Diversas investigaciones sobre la optimización de los parámetros de extracción de TPC en hojas fueron realizadas. Por ejemplo, Wan et al. (2011), reportó que las condiciones de extracción óptimas de TPC en hojas de *Gynura divaricata* se llevaron a cabo entre 90°C y 100°C con etanol al 45% por 30 min. Asimismo, Burri, Ekholm, Håkansson, Tornberg, & Rumpunen (2017), informaron que el análisis de TPC en hojas de betarraga y zanahoria fue realizado con etanol al 50% a temperatura ambiente por 15 min. En otra investigación, Gawlik-Dziki, Swieca, Dziki, Tomilo, & Baraniak (2012); Świeca, Sęczyk, Gawlik-Dziki, & Dziki (2014) reportaron el uso único de buffer PBS (solución salina tamponada con fosfato) a pH 7.4 para la extracción de hojas de quinua (Var. desconocida) por 60 min a temperatura ambiente. Finalmente, Chen et al. (2013) estableció que las condiciones óptimas de extracción para los TPC de *Ficus virens* fueron a una concentración de etanol al 50% por 37 min a 57°C.

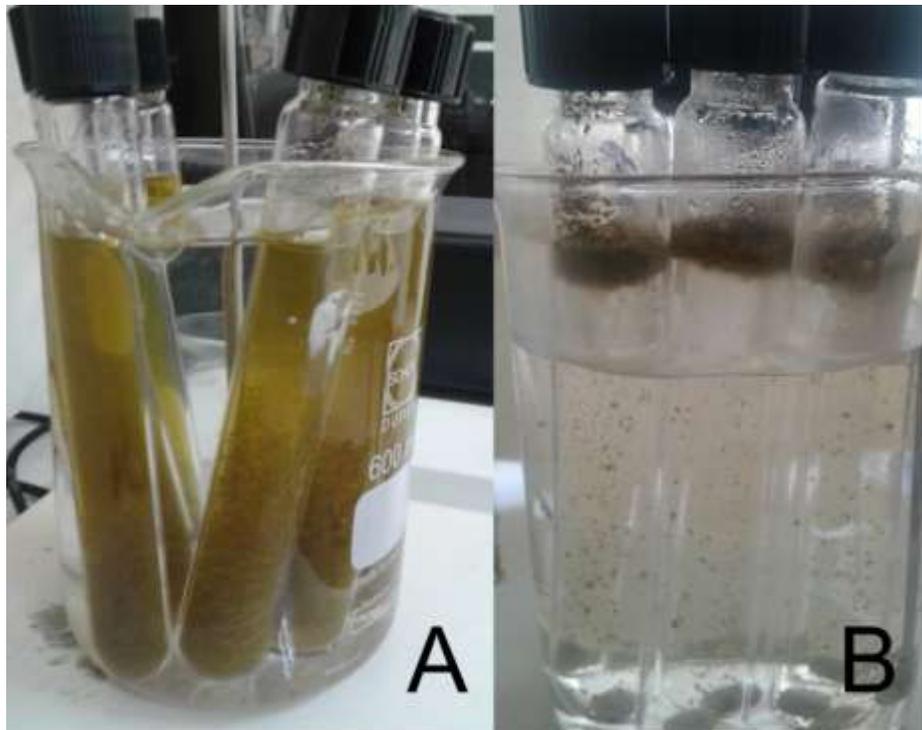
Por otro lado, Conde-Hernández & Guerrero-Beltrán (2014) informaron que el mayor contenido de TPC en hojas de “anisillo” (*Piper auritum*) y “tepalcasho” (*Porophyllum ruderale*), cultivados en América Central y del Sur, fue obtenido a una concentración de etanol al 85% a temperatura ambiente por 2 horas. No obstante, señalan que la concentración de etanol es específica cuando se caracterizan los tipos de compuestos fenólicos vegetales. Esto quiere decir, que la relación de etanol y agua podría disminuir o aumentar dependiendo del tipo de analito. Los metabolitos secundarios de las hojas de quinua serán mostrados posteriormente en la Tabla 24.

Arruda, Pereira, & Pastore (2016), menciona que los compuestos fenólicos vegetales son moléculas polares, y los solventes polares tales como la acetona, metanol y etanol, al igual que sus mezclas y soluciones acuosas, son típicamente usadas para su extracción. Además, el agua es un solvente fuertemente polar, mientras que el etanol posee una polaridad más baja. Sin embargo, ambos pueden ser mezclados en cualquier proporción y formar combinaciones mucho más efectivas para extraer los compuestos fenólicos a diferencia de utilizar un único solvente. Por lo tanto, las condiciones de extracción para las variables independientes “Temperatura de extracción” y “Concentración de etanol” fueron establecidas en 30 – 50°C y 10 – 30%, respectivamente.

#### **4.2.2 Diseño central compuesto**

La optimización de los parámetros de extracción de TPC fue realizada por medio de un Diseño Central Compuesto Rotativo (Tabla 16), en el cual la “Temperatura de extracción” fue establecida de 25.86 – 54.14 °C y la “Concentración de etanol” de 5.86 – 34.14 %. En un principio, la extracción de TPC se realizó por el método de termoagitación magnética utilizando tubos de ensayo con tapa rosca (Figura 25). El método fue aplicado para los tratamientos del diseño factorial 2<sup>2</sup> (Tabla 14). Sin embargo, la optimización involucró la disminución del volumen de etanol y el aumento del volumen de agua destilada, lo cual mostró una diferencia de densidades en relación a la muestra vegetal y el solvente, dificultando la agitación.

Chen et al. (2013), menciona que los cambios en la concentración de etanol modifican las propiedades físicas del solvente, incluyendo su densidad, viscosidad dinámica y constante dieléctrica. Por lo tanto, la polaridad de un solvente se determina por su concentración. De acuerdo con Self (2005), es importante que la estructura de un alimento sólido esté lo suficientemente disperso para permitir el contacto íntimo con el solvente de extracción. Una investigación sobre la optimización de extracción de antioxidantes de hojas de *Castanea sativa* reportó la aplicación del método de extracción sólido – líquido por agitación orbital a 120 rpm debido al empleo de agua acidificada (Díaz et al., 2012). Por consiguiente, la agitación orbital fue considerada como el principal método de extracción para la optimización del proceso.



**Figura 25. Diferencia de agitación de H.Q. en solución etanólica de mayor (A) y menor (B) concentración**

**Tabla 16. Diseño Central Compuesto para la extracción de TPC de hojas de quinua**

Temperatura de extracción (°C)	Concentración de etanol (% v/v)	Compuestos Fenólicos Totales (mg GAE / 100 g H.Q.)							
		Tiempos de extracción							
		1 min	15 min	30 min	45 min	60 min	75 min	90 min	105 min
30.00 (-1)	10.00 (-1)	2255.17 ± 31 <sup>a</sup>	4036.31 ± 24 <sup>a</sup>	4082.97 ± 12 <sup>a</sup>	4300.18 ± 84 <sup>a</sup>	4224.56 ± 29 <sup>a</sup>	4197.21 ± 41 <sup>a</sup>	4202.04 ± 22 <sup>a</sup>	4203.65 ± 38 <sup>a</sup>
30.00 (-1)	30.00 (+1)	2417.67 ± 25 <sup>b</sup>	4169.86 ± 55 <sup>ba</sup>	4324.32 ± 86 <sup>b</sup>	4459.47 ± 12 <sup>ba</sup>	4438.56 ± 64 <sup>b</sup>	4499.70 ± 14 <sup>b</sup>	4543.14 ± 2 <sup>b</sup>	4496.48 ± 5 <sup>b</sup>
50.00 (+1)	10.00 (-1)	3178.72 ± 14 <sup>c</sup>	4383.85 ± 7 <sup>c</sup>	4443.38 ± 19 <sup>cb</sup>	4353.28 ± 17 <sup>cab</sup>	4403.16 ± 127 <sup>cb</sup>	4519.01 ± 15 <sup>cb</sup>	4520.62 ± 15 <sup>cb</sup>	4507.74 ± 38 <sup>cb</sup>
50.00 (+1)	30.00 (+1)	3431.33 ± 104 <sup>d</sup>	4636.46 ± 2 <sup>d</sup>	4586.58 ± 34 <sup>d</sup>	4670.25 ± 7 <sup>db</sup>	4597.85 ± 14 <sup>d</sup>	4644.51 ± 19 <sup>d</sup>	4684.73 ± 16 <sup>dbc</sup>	4713.69 ± 12 <sup>d</sup>
25.86 (-1.41)	20.00 (0)	2092.66 ± 5 <sup>e</sup>	4036.31 ± 15 <sup>ea</sup>	4219.74 ± 24 <sup>eb</sup>	4245.48 ± 15 <sup>eabc</sup>	4190.77 ± 33 <sup>ea</sup>	4152.16 ± 48 <sup>ea</sup>	4300.18 ± 77 <sup>ea</sup>	4317.88 ± 53 <sup>ea</sup>
54.14 (+1.41)	20.00 (0)	3426.51 ± 8 <sup>d</sup>	4605.89 ± 33 <sup>fd</sup>	4472.35 ± 38 <sup>fd</sup>	4601.06 ± 16 <sup>fb</sup>	4589.80 ± 46 <sup>fb</sup>	4657.38 ± 30 <sup>fd</sup>	4710.48 ± 48 <sup>fb</sup>	4639.68 ± 12 <sup>bcd</sup>
40.00 (0)	5.86 (-1.41)	2623.62 ± 20 <sup>f</sup>	4293.75 ± 12 <sup>gbc</sup>	4313.06 ± 5 <sup>gbe</sup>	4305.01 ± 24 <sup>gabce</sup>	4296.97 ± 32 <sup>gabce</sup>	4308.23 ± 7 <sup>ga</sup>	4253.52 ± 63 <sup>gae</sup>	4346.85 ± 20 <sup>gabce</sup>
40.00 (0)	34.14 (+1.41)	2795.78 ± 19 <sup>g</sup>	4443.38 ± 57 <sup>hc</sup>	4530.27 ± 41 <sup>hcdf</sup>	4520.62 ± 53 <sup>habcdfg</sup>	4578.54 ± 50 <sup>hbdf</sup>	4528.66 ± 19 <sup>hbc</sup>	4449.82 ± 104 <sup>hbce</sup>	4498.09 ± 22 <sup>hbcefg</sup>
40.00 (0)	20.00 (0)	2815.09 ± 68 <sup>g</sup>	4351.67 ± 118 <sup>icgh</sup>	4383.85 ± 36 <sup>bcfg</sup>	4593.01 ± 195 <sup>ibdfh</sup>	4499.69 ± 26 <sup>ibcdfh</sup>	4422.46 ± 55 <sup>ibcgh</sup>	4469.12 ± 85 <sup>ibceh</sup>	4443.38 ± 153 <sup>ibcegh</sup>
40.00 (0)	20.00 (0)	2839.22 ± 2 <sup>g</sup>	4338.80 ± 17 <sup>icghi</sup>	4441.77 ± 32 <sup>ibcfhi</sup>	4477.17 ± 117 <sup>jabcdfghi</sup>	4480.39 ± 64 <sup>ibcdfhi</sup>	4564.05 ± 62 <sup>ibcdfh</sup>	4527.05 ± 4 <sup>ibcdhi</sup>	4417.64 ± 12 <sup>ibceghi</sup>
40.00 (0)	20.00 (0)	2827.96 ± 33 <sup>g</sup>	4338.80 ± 38 <sup>kcghij</sup>	4440.16 ± 67 <sup>kbcfhi</sup>	4391.89 ± 87 <sup>kabcefg hij</sup>	4433.73 ± 34 <sup>kbcghij</sup>	4459.47 ± 36 <sup>kbchij</sup>	4467.51 ± 90 <sup>kbcehij</sup>	4501.30 ± 82 <sup>kbcefg hij</sup>
40.00 (0)	20.00 (0)	2845.66 ± 7 <sup>g</sup>	4324.31 ± 36 <sup>lcghijk</sup>	4409.59 ± 37 <sup>lbcfghijk</sup>	4454.64 ± 33 <sup>labcefg hijk</sup>	4478.78 ± 26 <sup>lbcdfhijk</sup>	4576.92 ± 27 <sup>lbcdfhj</sup>	4494.87 ± 93 <sup>lbchijk</sup>	4473.95 ± 108 <sup>lbcefg hijk</sup>
40.00 (0)	20.00 (0)	2844.05 ± 16 <sup>g</sup>	4306.62 ± 26 <sup>mcgijkl</sup>	4470.73 ± 18 <sup>mcdhfijkl</sup>	4444.99 ± 36 <sup>mabcefg hijkl</sup>	4483.60 ± 8 <sup>mbcdfhijkl</sup>	4551.18 ± 63 <sup>mbcdfhijkl</sup>	4520.61 ± 26 <sup>mbcdhijkl</sup>	4475.56 ± 73 <sup>mbcefg hijkl</sup>

Letras diferentes en la misma columna indican que los valores reportados son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) por el test de Tukey.

El análisis de varianza (ANOVA), mostrado en la Tabla 17, muestra el efecto de los modelos lineales y cuadráticos de las variables independientes, al igual que la interacción de los mismos sobre la variable respuesta. La falta de ajuste y error puro también fueron considerados para evaluar la validez del modelo.

**Tabla 17. ANOVA de los tiempos de extracción sobre el TPC**

	S.C.	G.L.	Valor F	Valor p		S.C.	G.L.	Valor F	Valor p
<b>1 min</b> – R <sup>2</sup> =0.98305; R <sub>ajustado</sub> =0.98049					<b>60 min</b> – R <sup>2</sup> =0.85895; R <sub>ajustado</sub> =0.83758				
T. E. (°C) (L)	5482365	1	3955.358	0.000000	T. E. (°C) (L)	305235.3	1	118.0369	0.000000
T. E. (°C) (Q)	5269	1	3.801	0.060620	T. E. (°C) (Q)	36769.0	1	14.2189	0.000714
C. E. (%) (L)	162653	1	117.349	0.000000	C. E. (%) (L)	244149.0	1	94.4143	0.000000
C. E. (%) (Q)	34788	1	25.098	0.000023	C. E. (%) (Q)	6944.7	1	2.6856	0.111709
1L * 2L	6089	1	4.393	0.044627	1L * 2L	279.6	1	0.1081	0.744578
Falta de ajuste	56478	3	13.582	0.000009	Falta de ajuste	19290.9	3	2.4867	0.079611
Error puro	41582	30			Error puro	77578.0	30		
<b>15 min</b> – R <sup>2</sup> =0.93669; R <sub>ajustado</sub> =0.9271					<b>75 min</b> – R <sup>2</sup> =0.85065; R <sub>ajustado</sub> =0.82803				
T. E. (°C) (L)	983731	1	522.0506	0.000000	T. E. (°C) (L)	523120.5	1	162.9950	0.000000
T. E. (°C) (Q)	4711	1	2.4999	0.124344	T. E. (°C) (Q)	36207.4	1	11.2816	0.002143
C. E. (%) (L)	134000	1	71.1116	0.000000	C. E. (%) (L)	205198.1	1	63.9361	0.000000
C. E. (%) (Q)	1583	1	0.8399	0.366722	C. E. (%) (Q)	25294.8	1	7.8814	0.008695
1L * 2L	10632	1	5.6424	0.024120	1L * 2L	23493.6	1	7.3202	0.011134
Falta de ajuste	20214	3	3.5757	0.025352	Falta de ajuste	45283.4	3	4.7032	0.008297
Error puro	56531	30			Error puro	96282.8	33		
<b>30 min</b> – R <sup>2</sup> =0.86938; R <sub>ajustado</sub> =0.84958					<b>90 min</b> – R <sup>2</sup> =0.82841; R <sub>ajustado</sub> =0.80241				
T. E. (°C) (L)	360092.9	1	189.3270	0.000000	T. E. (°C) (L)	405918.9	1	112.6151	0.000000
T. E. (°C) (Q)	47537.1	1	24.9937	0.000023	T. E. (°C) (Q)	7959.3	1	2.2082	0.147716
C. E. (%) (L)	179435.3	1	94.3422	0.000000	C. E. (%) (L)	229806.1	1	63.7557	0.000000
C. E. (%) (Q)	2051.8	1	1.0788	0.307272	C. E. (%) (Q)	68520.7	1	19.0099	0.000141
1L by 2L	7224.8	1	3.7986	0.060701	1L * 2L	23493.6	1	6.5179	0.016005
Falta de ajuste	32277.0	3	5.6568	0.003403	Falta de ajuste	45813.0	3	4.2367	0.013060
Error puro	57058.9	30			Error puro	108134.4	30		
<b>45 min</b> – R <sup>2</sup> =0.65809; R <sub>ajustado</sub> =0.60629					<b>105 min</b> – R <sup>2</sup> =0.7792; R <sub>ajustado</sub> =0.74575				
T. E. (°C) (L)	220463.1	1	30.89512	0.000005	T. E. (°C) (L)	357509.3	1	87.76520	0.000000
T. E. (°C) (Q)	6463.3	1	0.90575	0.348850	T. E. (°C) (Q)	5109.7	1	1.25439	0.271603
C. E. (%) (L)	228834.6	1	32.06829	0.000004	C. E. (%) (L)	190465.9	1	46.75759	0.000000
C. E. (%) (Q)	10875.0	1	1.52399	0.226599	C. E. (%) (Q)	3266.0	1	0.80178	0.377692
1L by 2L	18647.4	1	2.61319	0.116447	1L * 2L	5661.8	1	1.38991	0.247686
Falta de ajuste	37052.7	3	1.73082	0.181821	Falta de ajuste	37397.2	3	3.06022	0.043239
Error puro	214075.6	30			Error puro	122204.2	30		

T. E.: Temperatura de extracción, C. E.: Concentración de etanol, S. C.: Suma de cuadrados.

Los puntos centrales agregados a un diseño factorial  $2^k$  permiten la estimación del error experimental puro. Por consiguiente, es posible la partición de la suma de cuadrados de los residuales  $SS_E$  en dos componentes:

$$SS_E = SS_{PE} + SS_{LOF}$$

Donde  $SS_{PE}$  es la suma de cuadrados debida al error puro y  $SS_{LOF}$  es la suma de cuadrados debida a la falta de ajuste. El error puro es definido por la variabilidad observada dentro de cada grupo que conforma una muestra, sin la interferencia de algún nivel de la variable independiente. Esto significa que el error puro solo puede ser calculado si existen grupos, es decir, si hay repeticiones (Montgomery, 2004; Rodrigues & lemma, 2014).

El diseño central compuesto fue utilizado para ajustar el modelo de segundo orden del diseño factorial  $2^2$  por efecto significativo de la curvatura, y para comprobar la especificidad del modelo con respecto a la relación entre la respuesta y los predictores, la falta de ajuste fue utilizada. Del análisis de varianza (Tabla 17), los tiempos de extracción a 1, 15, 30, 75, 90 y 105 min presentaron valores de falta de ajuste significativos, lo cual indica que el modelo no especifica correctamente la relación. Por otro lado, los análisis de varianza de los tiempos de extracción a 45 y 60 min presentaron falta de ajuste no significativo, por lo cual fueron considerados para la elección de un modelo cuadrático adecuado a los resultados.

En primer lugar, los valores de  $R^2$  y  $R^2$  ajustado fueron considerados para determinar el tiempo óptimo de extracción de TPC. Montgomery (2004), señala que el  $R^2$  mide la proporción de la variabilidad total explicada por el modelo y el  $R^2$  ajustado es un estadístico que está adaptado para el “tamaño” del modelo, es decir, para el número de factores. Los valores de  $R^2$  y  $R^2$  ajustado para el tiempo de extracción a 60 min son 0.85 y 0.83, respectivamente. Asimismo, el tiempo de extracción a 45 min presentó valores de  $R^2$  y  $R^2$  ajustado de 0.65 y 0.60, respectivamente. Estos últimos son menores considerando que el  $R^2$  ajustado puede decrecer si se agregan términos no significativos al modelo.

El efecto de los factores “Temperatura de extracción” y “Concentración de etanol” fueron significativos en la extracción de TPC de H.Q. a los 45 min de extracción. Sin embargo, esta significancia indicó que los resultados de TPC se ajustaron únicamente a un modelo lineal, mas no cuadrático (segundo orden). Además, el efecto de la interacción de las variables independientes no es significativo. Por lo tanto, estos resultados estadísticos reflejaron la baja proporción de la variabilidad total explicada por el modelo.

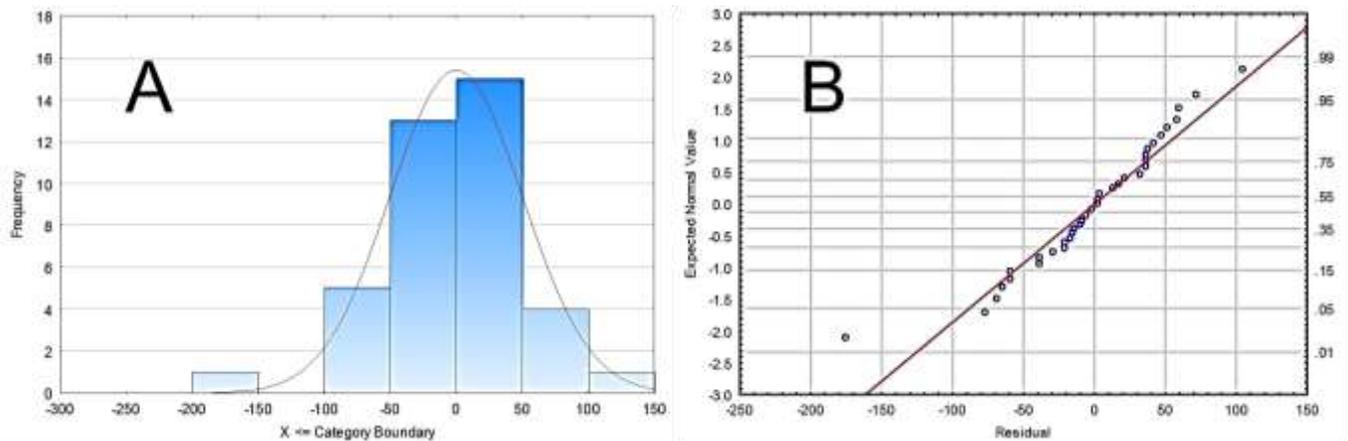
Con respecto al análisis de varianza del efecto de las variables independientes sobre la extracción de TPC a 60 min, el efecto cuadrático del factor “Temperatura de extracción” fue significativo, lo cual señaló que esta variable tiene una relación curva con la respuesta, sugiriendo que el modelo de segundo orden explicaría mejor los datos. Además, el error puro (77578) fue menor en el análisis, a comparación de aquel (214075) al tiempo de extracción a 45 min, indicando que el análisis de TPC en los puntos centrales fue controlado con precisión garantizando la repetibilidad del diseño experimental.

Asimismo, el efecto cuadrático de la “Concentración de etanol” no fue significativo ( $p = 0.1117$ ) a comparación de los efectos positivos en los tiempos de extracción de 1, 15, 75 y 90 min. El control de la temperatura durante la extracción podría haber alterado el proceso debido al error de  $\pm 5^{\circ}\text{C}$  entre cada intervalo de 15 min. Rodrigues & lemma (2014) señalan que en la selección de variables, es mejor aceptar el valor  $p < 0.1$  que dejar algún factor importante fuera.

La interacción de los factores no fue significativa ( $p = 0.7445$ ) a comparación de los demás tiempos de extracción. Rodrigues & lemma (2014), mencionan que el efecto de las variables independientes podría no ser significativo debido a que las respuestas en los niveles inferior (-1) y superior (+1) podrían ser aproximadamente iguales. Por lo tanto, recomendaron realizar algunos ensayos en el punto central para verificar la existencia o no de una curvatura en esta región. En este caso, la desviación estándar en los puntos centrales fue variable (Tabla 16), por lo que es recomendable tener un

mejor control del proceso y verificar nuevamente el efecto de la interacción a través del valor p.

Por otro lado, Montgomery (2004), menciona que el examen de los residuales es una parte automática de cualquier análisis de varianza. El estudio de los residuales permitirá conocer las violaciones de los supuestos básicos y la adecuación del modelo. Por lo tanto, un procedimiento bastante útil es construir una gráfica de probabilidad normal de los residuales. La Figura 26 muestra en primer lugar el histograma de residuales (A), que también es un método de verificación del supuesto de normalidad, en el cual se observa que existe una ligera desviación de la distribución normal en el lado izquierdo pero que no alteró la simetría de los datos. En el gráfico de probabilidad normal (B), la distribución de los errores en la parte central mostró una tendencia lineal a la recta, a excepción de la parte inferior izquierda donde se observó un valor lejano que implicaría un punto atípico, probablemente debido a un error experimental. Esto puede explicar la desviación en el histograma de residuales.



**Figura 26. Histograma de residuales (A) y gráfico de probabilidad normal (B) del contenido de TPC a 60 min**

La curva de extracción (Figura 27) de TPC de las H.Q. muestra la evolución del contenido fenólico durante los tiempos de extracción de 1 – 105 min. La variación de los datos fue explicada por el test de Tukey (Tabla 16), en la cual los promedios de los efectos de las variables independientes sobre las respuestas fueron comparados.

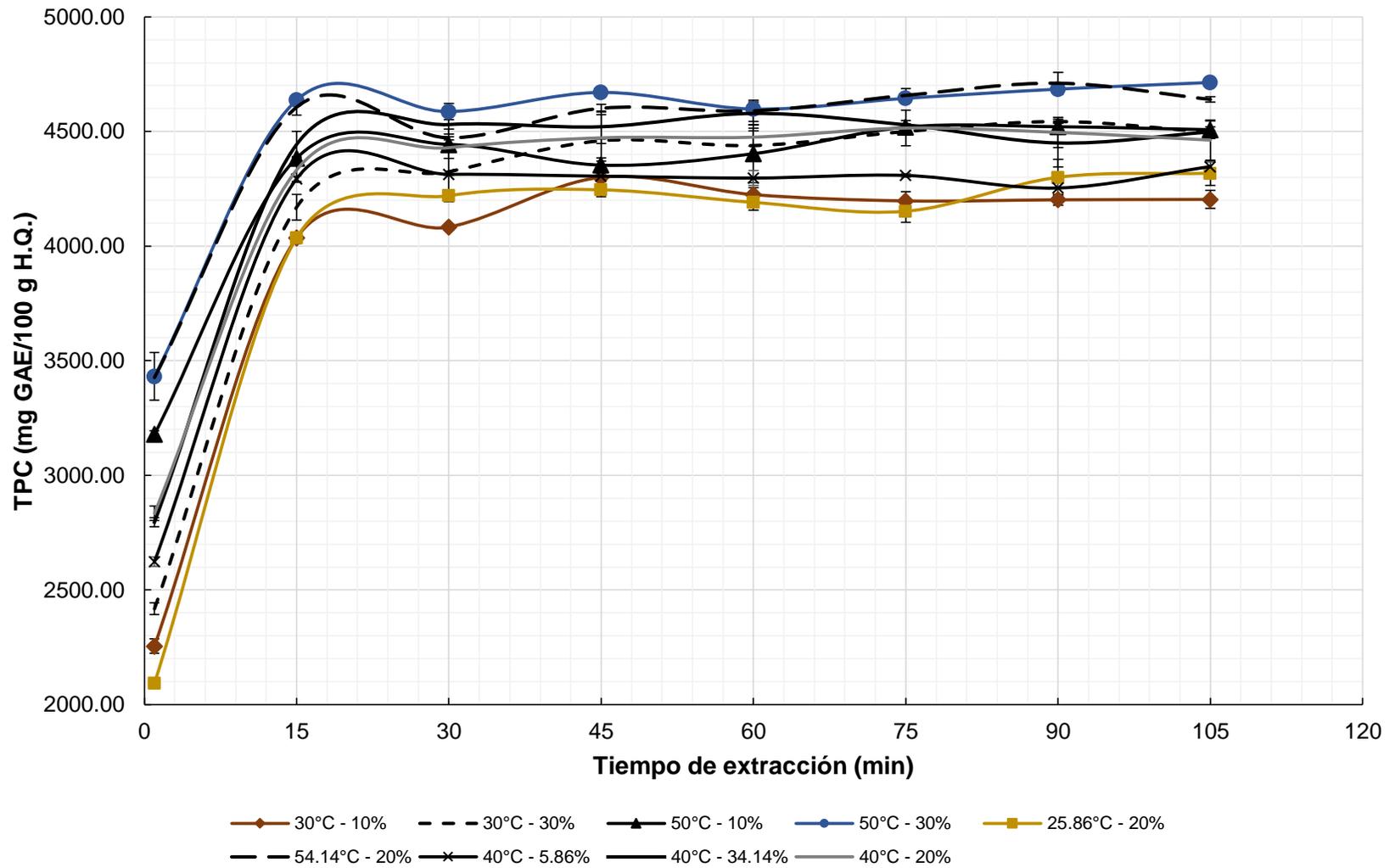


Figura 27. Curva de extracción de TPC por 105 min

El test de Tukey mostró que los efectos de los tratamientos sobre la variable respuesta no fueron significativos en el minuto 45. Es decir, los efectos de los 13 tratamientos sobre el contenido de TPC no difieren entre sí. Esto podría señalar que se alcanzó el punto de equilibrio. Sin embargo, en los tiempos de extracción posteriores (60, 75, 90, 105 min), los tratamientos mostraron nuevamente efectos significativos sobre las variables dependientes indicando la existencia de algunos errores de control de temperatura ( $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ). Por lo tanto, la extracción de TPC a 45 min no fue considerada como el tiempo óptimo.

Arruda, Pereira, & Pastore (2016), mencionan que la transferencia de masa (equilibrio de difusión del soluto entre la matriz sólida y el solvente) alcanza un valor máximo a un cierto tiempo, después de que la recuperación del compuesto bioactivo sea constante o incluso reducida debido a la degradación. Este fenómeno puede ser explicado por la segunda ley de difusión de Fick, la cual predice que después de un cierto tiempo (1 – 2 horas), un equilibrio final será alcanzado entre las concentraciones del soluto en la matriz sólida y en el solvente de extracción.

Los resultados en la Tabla 18 mostraron que la extracción de TPC no fue afectada por el modelo cuadrático. Por el contrario, el modelo de los efectos principales o de primer orden mostró la relación lineal de los datos con los factores. Los incrementos de temperatura ( $p = 0.000005$ ) y concentración de etanol ( $p = 0.000004$ ) condujeron a una mayor producción de TPC. No obstante, la interacción de los factores ( $p = 0.116447$ ) no tuvo efecto significativo sobre la respuesta.

**Tabla 18. Estimación de los efectos para el contenido de TPC a 45 min**

	Efecto (mg GAE/100 g)	Error estándar	t(30)	P	Lim. Conf. – 95%	Lim. Conf. + 95%
<b>Media</b>	<b>4472.346</b>	<b>21.81109</b>	<b>205.0492</b>	<b>0.000000</b>	<b>4427.802</b>	<b>4516.890</b>
<b>(1) T.E. (<math>^{\circ}\text{C}</math>) (L)</b>	<b>191.687</b>	<b>34.48636</b>	<b>5.5583</b>	<b>0.000005</b>	<b>121.256</b>	<b>262.117</b>
T.E. ( $^{\circ}\text{C}$ ) (Q)	-35.197	36.98250	-0.9517	0.348850	-110.725	40.332
<b>(2) C.E. (%) (L)</b>	<b>195.292</b>	<b>34.48636</b>	<b>5.6629</b>	<b>0.000004</b>	<b>124.862</b>	<b>265.723</b>
C.E. (%)	-45.655	36.98250	-1.2345	0.226599	-121.183	29.873
T.E (L) * C.E (L)	78.840	48.77108	1.6165	0.116447	-20.764	178.444

T.E.: Temperatura de extracción; C.E.: Concentración de etanol

Por otro lado, los resultados en la Tabla 19 mostraron que la extracción de TPC fue afectada por el modelo cuadrático de la “Temperatura de extracción” ( $p = 0.000714$ ). El incremento de la temperatura de 30°C a 50°C provocó una disminución del contenido de TPC en promedio de 83.94 mg GAE/100 g. Sin embargo, Chen et al. (2013), menciona que la temperatura de extracción tiene un impacto en la solubilidad, velocidad de transferencia de masa y estabilidad de los compuestos fenólicos. Este comportamiento se observa en la Figura 27, en la cual los tratamientos realizados en la condición de T.E. de 50°C presentaron contenidos de TPC superiores. Por lo tanto, el contenido de TPC se vería afectado negativamente si la temperatura de extracción supera los 50°C.

Con respecto al efecto cuadrático de la “Concentración de etanol”, no hubo significancia. Los resultados mostraron que un incremento en la concentración de etanol de 10% a 30% condujo a la reducción de los TPC en promedio de 36.484 mg GAE/100 g. Chen et al. (2013), reporta que la concentración ideal de etanol para la extracción del mayor contenido de TPC en hojas de *Ficus virens* fue a 50%. Además, señala que el rendimiento de los extractos naturales depende del solvente y temperatura usados para la extracción. La Figura 27 mostró que los tratamientos realizados en la condición de C.E. de 30% presentaron contenidos de TPC superiores.

**Tabla 19. Estimación de los efectos para el contenido de TPC a 60 min**

	Efecto (mg GAE/100 g)	Error estándar	t(30)	p	Lim. Conf. - 95%	Lim. Conf. + 95%
<b>Media</b>	4475.242	13.12995	340.8424	0.000000	4448.427	4502.057
<b>(1) T.E. (°C) (L)</b>	225.549	20.76027	10.8645	0.000000	183.151	267.948
<b>T.E. (°C) (Q)</b>	-83.949	22.26290	-3.7708	0.000714	-129.416	-38.482
<b>(2) C.E. (%) (L)</b>	201.721	20.76027	9.7167	0.000000	159.323	244.119
<b>C.E. (%) (Q)</b>	-36.484	22.26290	-1.6388	0.111709	-81.951	8.983
<b>T.E (L) * C.E (L)</b>	-9.654	29.35945	-0.3288	0.744578	-69.614	50.306

T.E.: Temperatura de extracción; C.E.: Concentración de etanol

Cabe resaltar que la sugerencia de extracción de TPC a niveles inferiores de concentración de etanol (Figura 24) fue entre 20 y 40%. Sin embargo, basado en la

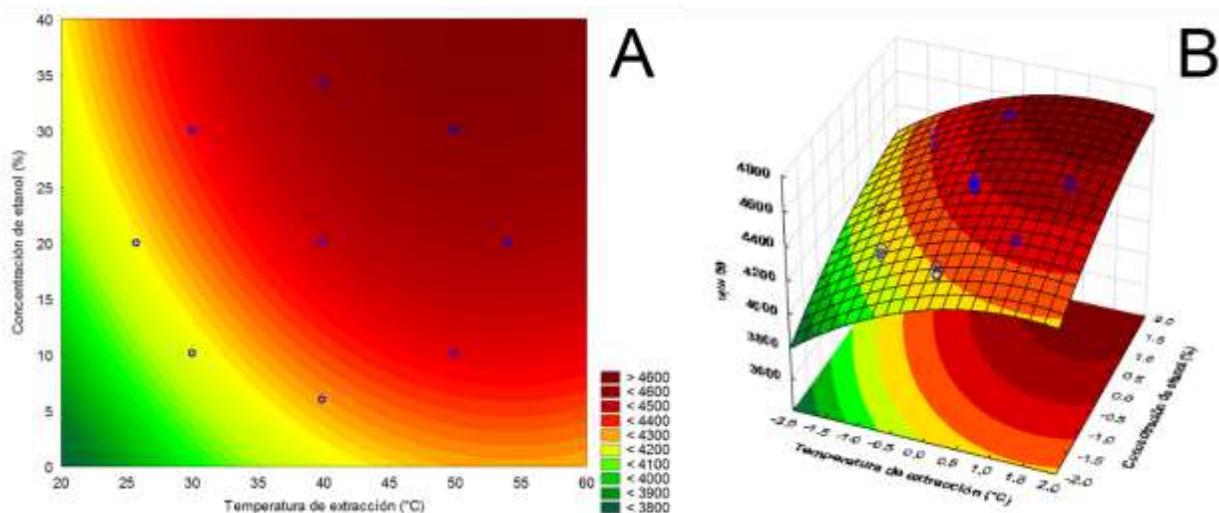
alta polaridad del agua y la menor polaridad del etanol (Arruda et al., 2016), el rango del factor fue establecido entre 10 y 30% a pesar de que la sugerencia de la superposición de los gráficos de contorno del diseño factorial  $2^2$  fue como mínimo 20%. Debido a esto, las estimaciones de los efectos a 45 y 60 min indican una disminución del contenido de TPC por el aumento del solvente. Por lo tanto, sería recomendable la extracción en un rango mayor de concentración.

Chen et al. (2013) menciona que las vacuolas de las células contienen la mayor parte de compuestos fenólicos libres, mientras que en la pared celular, gran parte de la lignina, flavonoides y polifenoles insolubles son conjugados a los azúcares, carbohidratos de la pared celular, ácidos orgánicos, proteínas y polisacáridos. Además, una concentración apropiada de etanol puede acceder a las células, mientras que altas concentraciones causarían la desnaturalización de las proteínas, lo cual impide la disolución de los polifenoles e influye en la velocidad de reacción.

Asimismo, Arruda, Pereira, & Pastore (2016) mencionan que el tiempo de contacto entre el solvente y la matriz sólida puede conducir a una liberación progresiva de los solutos de la matriz sólida al solvente. El tiempo de extracción para los compuestos fenólicos puede ser influenciado por su grado de polimerización, solubilidad y por la interacción de los mismos con la matriz. Por lo tanto, el tiempo de extracción apropiado es un parámetro extremadamente importante, y su impacto sobre la eficiencia, trabajo y costo de energía deberían ser considerados.

Analizando la superficie de respuesta y curvas de contorno (Figura 28), se verificó la existencia de una región óptima para la extracción del contenido de TPC, donde se encuentra un rango de combinaciones de “Temperatura de extracción” (45 – 60°C) y “Concentración de etanol” (35 – 40%). Evidentemente, una condición de cada variable independiente será fijada para el proceso de extracción. Sin embargo, Rodrigues & lemma (2014), mencionan que este resultado de rango óptimo de las variables es mucho más interesante que apenas un valor puntual debido a que ofrece información sobre la robustez del proceso. Es decir, el gráfico muestra la variación de “Concentración de etanol” ( $\pm 2.5\%$ ) que puede ser admitida alrededor de 37.5% (valor

óptimo) y de “Temperatura de extracción” de 50°C ( $\pm 5^\circ\text{C}$ ) que mantiene el proceso en la condición optimizada. Así, el contenido de TPC en las H.Q. resultaría en valores superiores a 4600 mg GAE/100 g de muestra vegetal.



**Figura 28. Gráficos de contorno (A) y superficie de respuesta (B) para el contenido TPC a 60 min**

Como fue mencionado anteriormente, las estimaciones de los efectos (Tabla 18 y Tabla 19) y la superposición de los gráficos de contorno (Figura 24) sugirieron el incremento del nivel de concentración de solvente para obtener un mayor contenido de TPC. Aunque la superficie de respuesta indicó una zona óptima de extracción, incluso mayor a 40 %, la condición de trabajo actual fue establecida en 30 %. Por lo tanto, las condiciones de extracción óptimas de los compuestos fenólicos totales de H.Q. fueron a 30 % de “Concentración de etanol”, 50°C de “Temperatura de extracción” y “Tiempo de extracción” de 60 min.

Los datos experimentales fueron ajustados a un modelo polinomial de segundo orden, y los coeficientes de regresión (Tabla 20) fueron generados para establecer el modelo de extracción predictivo. La significancia de cada coeficiente fue determinada por los valores  $t$  y  $p$ .

**Tabla 20. Coeficientes de regresión de los tiempos de extracción a 60 min**

Parámetros del modelo	Coeficiente de regresión	Error estándar	Valor t	Valor p
Intercepto	4475.242	13.129	340.842	0.0000
<b>Lineal</b>				
T. E. (°C)	112.775	10.380	10.864	0.0000
C. E. (%)	100.861	10.380	9.716	0.0000
<b>Cuadrático</b>				
T. E. (°C)	-41.974	11.131	-3.770	0.0007
C. E. (%)	-18.242	11.131	-1.638	0.1117
<b>Interacción</b>				
T. E. * C. E.	-4.827	14.679	-0.328	0.7445

T. E.: Temperatura de extracción; C. E.: Concentración de etanol

La ecuación de regresión en los niveles codificados relaciona el contenido de TPC en función de la “Temperatura de extracción” y “Concentración de etanol”.

$$TPC = 4475.242 + 112.775(T.E.) - 41.974(T.E.)^2 + 100.861(C.E.) - 18.242(C.E.)^2 - 4.827(T.E.)(C.E.)$$

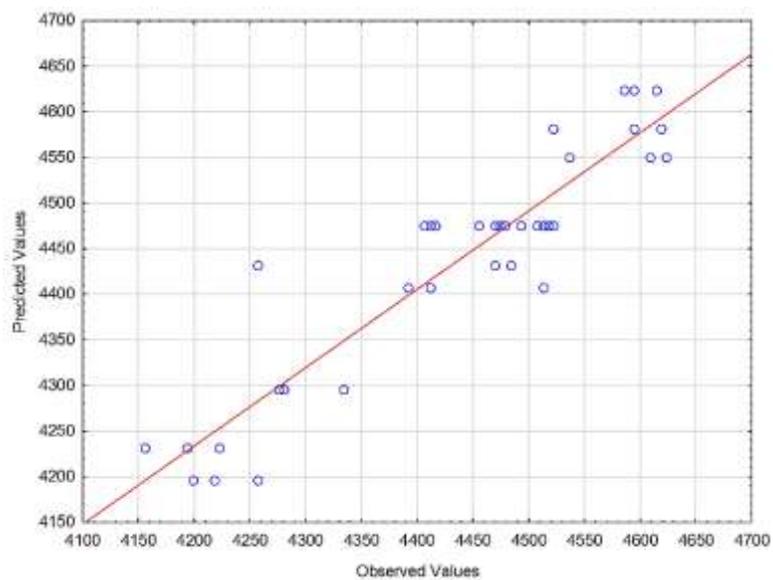
Arruda, Pereira, & Pastore (2016) menciona que otra forma de evaluar la calidad del ajuste de un modelo es a través de los errores relativos, los cuales miden el porcentaje de desviación entre los valores experimentales y predichos (Figura 29). Los datos de TPC obtenidos en el tiempo de extracción de 60 min en los 13 tratamientos fueron comparados con los valores predichos utilizando la ecuación anterior. Los valores se muestran en la Tabla 21.

Como se ha visto en la Tabla 16, la desviación estándar de los datos fue alta para la mayor parte de los tratamientos, lo cual demostró un bajo grado de ajuste del modelo a los valores experimentales. Sin embargo, un mejor control del proceso en la extracción disminuirá estas variaciones y proporcionará un modelo más apropiado para predecir los contenidos de TPC en las H.Q. INIA 420 Negra Collana.

**Tabla 21. Valores experimentales vs predichos de TPC de H.Q. a 60 min**

Temperatura de extracción (°C)		Concentración de etanol (% v/v)		60 min	
C	N. C.	C	N. C.	Valor experimental	Valor predicho
-1	30.00	-1	10	4224.56	4196.56
-1	30.00	1	30	4438.56	4407.94
1	50.00	-1	10	4403.16	4431.77
1	50.00	1	30	4597.85	4623.83
-1.41	25.86	0	20.00	4190.77	4232.78
1.41	54.14	0	20.00	4589.80	4550.81
0	40.00	-1.41	5.86	4296.97	4296.76
0	40.00	1.41	34.14	4578.54	4581.19
0	40.00	0	20.00	4475.24	4475.24

C: Codificado; N.C.: No codificado



**Figura 29. Valores experimentales vs predichos de TPC a 60 min**

### 4.3 Composición química de los extractos de hojas de quinua

Los extractos de H.Q. obtenidos a los parámetros de extracción óptimos fueron sometidos a los ensayos DPPH y TEAC (conocido también como ABTS). La Tabla 22 muestra la composición química de los extractos en base a 100 g de muestra vegetal seca. Los resultados fueron comparados con la composición química de extractos de hojas de otros vegetales (Tabla 23), tales como acelga, betarraga, y espinaca, pertenecientes a la familia de las *Chenopodiaceae* de acuerdo con Takhtajan (2009).

**Tabla 22. Composición química de los extractos de hojas de quinua INIA 420 Negra Collana**

Muestra	TPC (mg G.A.E./100 g)	DPPH ( $\mu$ mol T.E./100 g)	TEAC ( $\mu$ mol T.E./100 g)
Hojas de quinua INIA 420 Negra Collana	4597.85 $\pm$ 14.75	6414.35 $\pm$ 18.13	5009.97 $\pm$ 4.36

El extracto hidroetanólico de las H.Q. INIA 420 Negra Collana demostró un contenido de TPC de 4597 mg GAE/ 100 g, cuya actividad antioxidante demostró valores de 6414.35  $\mu$ mol T.E. y 5009.97  $\mu$ mol T.E. por 100 g para los ensayos DPPH y TEAC, respectivamente. Los valores de TPC para las hojas de betarraga fueron reportados entre 1625 y 1900 mg GAE/100 g, para las hojas de espinaca entre 32.54 y 217 mg GAE/100 g y para las hojas de acelga el valor fue de 192 mg GAE/100 g (Tabla 23). Estos resultados fueron bajos, lo cual demostró que las hojas de quinua poseen un contenido de TPC superior.

Sin embargo, Gawlik-Dziki, Swieca, Dziki, Tomilo, & Baraniak (2012) reportaron que los extractos de una variedad desconocida de hojas de quinua demostraron un contenido de TPC de 6310 mg GAE/100 g. Estas hojas fueron cosechadas en la etapa vegetativa de 90 días y los extractos obtenidos a través de buffer PBS. Se demostró que los compuestos bioactivos de las H.Q. inhibieron la actividad enzimática de la xantina oxidasa que cataliza la oxidación de hipoxantina a ácido úrico resultando en la

formación de un radical superóxido y peróxido de hidrógeno. Esta enzima es una fuente biológica de las especies reactivas de oxígeno involucradas en el daño oxidativo de las células que conducen al daño renal, arterioesclerosis, hipertensión, obesidad, cáncer, etc. Por lo tanto, se mencionó que la quinua fue considerada como una de las plantas que desempeñará un rol importante en la nutrición.

**Tabla 23. Composición química de extractos de hojas de otros vegetales**

Muestra	TPC (mg GAE/100 g)	DPPH ( $\mu\text{mol T.E./100 g}$ )	TEAC ( $\mu\text{mol T.E./100 g}$ )
Hojas de quinua <sup>a</sup>	6310	–	–
Hojas de betarraga – 1 <sup>b</sup>	1900	–	10000
Hojas de betarraga – 2 <sup>c</sup>	1625	–	–
Hojas de espinaca – 1 <sup>d</sup>	217	–	19800 <sup>h</sup>
Hojas de espinaca – 2 <sup>e</sup>	32.54	–	17000 <sup>i</sup>
Hojas de espinaca – 3 <sup>f</sup>	79.55	–	11600 <sup>j</sup>
Hojas de acelga	192	–	–

<sup>a</sup>Los datos fueron reportados por Gawlik-Dziki, Swieca, Dziki, Tomilo, & Baraniak (2012).

<sup>b</sup>Los datos fueron reportados por Burri et al. (2017). El contenido de TPC fue expresado en base a 100 g de peso seco y el contenido de TEAC fue expresado de mmol a  $\mu\text{mol}$ .

<sup>c</sup>Los datos fueron reportados por Biondo et al. (2014), el contenido de TPC fue aproximado y expresado en base a 100 g.

<sup>d</sup>Los datos fueron reportados por Wu et al. (2004). El contenido de TPC fue expresado en base a 100 g.

<sup>e</sup>Los datos fueron reportados por Chun et al (2005).

<sup>f</sup>Los datos fueron reportados por Chu, Sun, Wu, & Liu (2002).

<sup>g</sup>Los datos fueron reportados por Zein, Hashish, & Ismaiel (2015).

<sup>h</sup>Los datos fueron reportados por Jaime et al. (2014). El contenido TEAC fue expresado de mmol TE/g a  $\mu\text{mol TE/100g}$  para los extractos acuoso<sup>h</sup>, extracto etanólico<sup>i</sup> y extracto de hexano<sup>j</sup>.

Por otro lado, se reportó que la actividad antioxidante de los extractos de las H.Q. fue menor en comparación con la actividad antioxidante (TEAC) reportada para las hojas de betarraga (10000  $\mu\text{mol T.E. /100 g}$ ) y espinaca (11600 – 19800  $\mu\text{mol T.E. /100 g}$ ). Los valores superaron más de dos veces el resultado encontrado de las hojas de quinua (5009.97  $\mu\text{mol T.E. / 100 g}$ ). Zein, Hashish, & Ismaiel (2015) reportan una variedad de fracciones de compuestos fenólicos para las hojas de betarraga, tales como el ácido gálico, ácido vanílico, ácido ferúlico, ácido iso – ferúlico, ácido elágico, resveratrol, entre otros. Debido a la riqueza fitoquímica de estos compuestos fenólicos, la actividad antioxidante sería más considerable en las hojas de betarraga.

Un estudio sobre la actividad citotóxica de las hojas de acelga y betarraga demostró un efecto anticancerígeno de los extractos acuosos y metanólicos sobre el cáncer de mama (MCF7) e hígado (HEPG2). Se reportó que la actividad citotóxica más eficiente sobre el cáncer de mama fue a la concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) de 19.3 µg/ml para el extracto de hojas de acelga. Asimismo, los extractos de hojas de betarraga presentaron actividad citotóxica contra el cáncer de mama e hígado con IC<sub>50</sub> de 22.6 µg/ml y 30.4 µg/ml, respectivamente (Zein et al., 2015).

Sin embargo, la actividad antioxidante mediante el ensayo DPPH, reportado por Zein et al. (2015), fue expresada en porcentaje de inhibición para los extractos acuoso (73.3%) y metanólico (80.37%) de las hojas de acelga. Asimismo, el porcentaje de inhibición para los extractos acuoso y metanólico de las hojas de betarraga fue reportado en 86.6% y 82.4%, respectivamente. La actividad antioxidante de las H.Q. fue expresada en 6414.35 µmol T.E./100 g cuyo porcentaje de inhibición es 78.01%. Este último demostraría que las H.Q. poseen una actividad antioxidante similar a la de las hojas de acelga, pero menor a aquellas de betarraga.

Por otro lado, son escasos los estudios sobre la composición fitoquímica de las hojas de quinoa. Sin embargo, hallazgos más recientes informan que los amplios usos del género *Chenopodium* en la medicina tradicional han resultado en considerables análisis químicos de las plantas y sus principios activos. El género *Chenopodium* ha sido considerado desde hace tiempo un suplemento dietético potencial rico en compuestos fenólicos bioactivos. Por ejemplo, se han encontrado en *Chenopodium pallidicaule* (cañihua) compuestos fenólicos principales, identificados como resorcinol y 4-metil resorcinol, y ácidos fenólicos, como el ácido vanílico y ácido ferúlico (Kokanova-Nedialkova, Nedialkov, & Nikolov, 2009).

Se ha informado de la presencia de flavonoles, como el kaempferol, quercetina, isorhamnetina y herbacetina en las especies de *Chenopodium*. La quercetina fue encontrada en 7, el kaempferol en 5, la isorhamnetina en 2 y la herbacetina en 1 especie. El ácido cinámico, ácido sinápico, ácido ferúlico y sus derivados fueron aislados de las hojas de *C. album* (Kokanova-Nedialkova et al., 2009). Por otro lado,

Thoufeek-Ahamed et al., (1998), informa sobre la identificación de flavonoides en cinco especies de *Chenopodium*. La quercetina (flavonol) fue encontrada en todas las 5 especies, el kaempferol en 4, e isorhamnetina en 1. La función biológica de estos flavonoides podría ser la de proporcionar resistencia contra los virus.

El kaempferol fue encontrado en las partes aéreas de *C. album* y *C. murale*. También, se informó la existencia de quercetina en las partes aéreas y frutos de *C. ambrosioides*, así también como en *C. album*, *C. murale*, *C. pallidicaule* y *C. quinoa*. Finalmente, la herbacetina fue hallada en las partes aéreas de *C. murale* (Kokanova-Nedialkova et al., 2009). La distribución de algunas especies del género *Chenopodium* se muestran en la Tabla 1.

Un estudio sobre la actividad antioxidante y anticancerígena de los extractos de hojas de quinua comprueba la existencia de importantes metabolitos secundarios. Los análisis de la Cromatografía Líquida de Alto Desempeño (*High Performance Liquid Chromatography, HPLC*) permitieron la identificación de las agliconas de diez ácidos fenólicos importantes y cuatro flavonoides en la fracción polifenólica del extracto químico de hojas de quinua (Tabla 24). Los ácidos fenólicos principales fueron los ácidos ferúlico, sinapínico y gálico, mientras que el kaempferol y la isorhamnetina fueron los flavonoides más abundantes, así también como la rutina (Gawlik-Dziki et al., 2013).

**Tabla 24. Compuestos fenólicos de hojas de quinua**

<b>Compuestos fenólicos</b>	<b>µg/g peso seco</b>
Ácido gálico	162.85 ± 12.51
Ácido <i>p</i> -Hidroxibenzoico	10.28 ± 0.68
Ácido clorogénico	37.55 ± 2.15
Ácido vanílico	22.67 ± 1.65
Ácido siríngico	18.69 ± 0.98
Ácido <i>p</i> -cumárico	33.31 ± 2.65
Ácido ferúlico	762.29 ± 42.31
Ácido sinapínico	193.48 ± 11.34

Ácido benzoico	1.49 ± 0.25
Ácido o-cumárico	2.29 ± 0.21
Kaempferol	46.00 ± 5.21
Quercetina	6.88 ± 0.58
Isorhamnetina	3.06 ± 0.24
Rutina	62.12 ± 5.65

**Fuente: (Gawlik-Dziki et al., 2013)**

Las hojas de quinua pueden servir potencialmente como una fuente rica de compuestos fenólicos, caracterizados por un amplio espectro de actividades biológicas, incluyendo el potencial antioxidante y los efectos citostáticos. Por ejemplo, el efecto inhibitorio de las hojas de quinua sobre células cancerígenas indica que estas pueden servir como un suplemento valioso para la terapia de combinación sobre el cáncer de próstata. Finalmente, debido al potencial nutracéutico de los compuestos fenólicos, es sugerido introducir las hojas de quinua en la dieta estándar como un vegetal nutracéuticamente valioso (Gawlik-Dziki et al., 2013).

Finalmente, el contenido de TPC de las H.Q. fue correlacionado con su actividad antioxidante obtenidos por los ensayos DPPH y TEAC. Los resultados (Tabla 25), mostraron que el contenido de TPC presenta una alta correlación (0.94) con la actividad antioxidante por el ensayo TEAC y una correlación regular (0.75) con la actividad antioxidante por el ensayo DPPH.

Arruda, Pereira, & Pastore (2016), mencionan que los efectos benéficos de los compuestos fenólicos son a menudo atribuidos a su actividad antioxidante que puede ser mediada por una variedad de mecanismos tales como la eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS) o especies reactivas de nitrógeno (RNS), quelación de metales de transición e inhibición enzimática involucrada con el estrés oxidativo.

**Tabla 25. Correlación de análisis de TPC vs DPPH y TEAC**

	<b>DPPH</b>	<b>TEAC</b>
	$r(X, Y) = 0.7559$	$r(X, Y) = 0.9449$
<b>TPC - 60 min</b>	$p = 0.4543$	$p = 0.2122$
	$R^2 = 0.57$	$R^2 = 0.89$

## **Capítulo V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

La optimización de los parámetros de extracción de compuestos fenólicos totales de las hojas de quinua INIA 420 Negra Collana fue establecida a una temperatura de extracción de 50°C, concentración de etanol de 30% y tiempo de extracción de 60 min. Las hojas de quinua, desarrolladas en la fase vegetativa, demostraron una composición fisicoquímica similar a la de otros vegetales, lo cual la convierte en una fuente de nutrientes alternativa para niños, adolescentes y adultos, pero especialmente en contra de la desnutrición infantil en las zonas rurales. Asimismo, el alto contenido de compuestos fenólicos totales de las hojas de quinua, al igual que su capacidad antioxidante, favorece su consumo y la presentan como una fuente alimenticia opcional a otros vegetales, tales como las hojas de espinaca, betarraga y acelga, en contra de las enfermedades degenerativas inducidas por las especies reactivas de oxígeno. Por último, los resultados de la investigación contribuyen a la aplicación tecnológica de los compuestos bioactivos de las hojas de quinua en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética.

## REFERENCIAS

- AACC. (2000). American Association of Cereal Chemists. American Association of Cereal Chemists.
- Abugoch James, L. E. (2009). Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): Composition, chemistry, nutritional, and functional properties. In *Advances in Food and Nutrition Research* (1st ed., Vol. 58, pp. 1–31). Elsevier Inc.  
[http://doi.org/10.1016/S1043-4526\(09\)58001-1](http://doi.org/10.1016/S1043-4526(09)58001-1)
- Alandia B., S., Otazú M., V., & Salas T., B. (1979). Enfermedades. In *Quinoa y la kañiwa: Cultivos Andinos* (p. 228). Bogotá: Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo (CIID).
- Apaza, V., Cáceres, G., Estrada, R., & Pinedo, R. (2013). *Catálogo de variedades comerciales de quinua en el Perú* (1st ed.). Lima: Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA).
- Arruda, H. S., Pereira, G. A., & Pastore, G. M. (2016). Optimization of Extraction Parameters of Total Phenolics from *Annona crassiflora* Mart. (*Araticum*) Fruits Using Response Surface Methodology. *Food Analytical Methods*, 10(1), 100–110. <http://doi.org/10.1007/s12161-016-0554-y>
- Association of Official Analytical Chemists. (2000). *Official Methods of Analysis of AOAC International*. AOAC.
- Bhargava, A., Shukla, S., & Ohri, D. (2006). *Chenopodium quinoa* - An Indian perspective. *Industrial Crops and Products*, 23(1), 73–87.  
<http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2005.04.002>
- Biondo, F., Boeing, J. S., Barizão, É. O., Souza, N. E., Matsushita, M., Oliveira, C. C., ... Visentainer, J. V. (2014). Evaluation of beetroot (*Beta vulgaris* L.) leaves during its developmental stages: a chemical composition study. *Food Science*

*and Technology*, 34(1), 94–101.

- Bois, J. F., Winkel, T., Lhomme, J. P., Raffaillac, 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(4), 299–308. <http://doi.org/10.1016/j.eja.2006.06.007>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.
- Burri, S., Ekholm, A., Håkansson, Å., Tornberg, E., & Rumpunen, K. (2017). Antioxidant capacity and major phenol compounds of horticultural plant materials not usually used. *Journal of Functional Foods*, 38, 119–127. <http://doi.org/10.1016/j.jff.2017.09.003>
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., & Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, 74(17), 2157–2184. <http://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.09.047>
- Chemat, F., Rombaut, N., Fabiano-Tixier, A., Pierson, J. T., & Bily, A. (2015). Green Extraction: From Concepts to Research, Education, and Economical Opportunities. In F. Chemat & J. Strube (Eds.), *Green Extraction of Natural Products: Theory and Practice* (p. 381). Wiley-VCH.
- Chen, X., Wu, X., Chai, W., Feng, H., Shi, Y., Zhou, H., & Chen, Q. (2013). Optimization of extraction of phenolics from leaves of *Ficus virens*. *Journal of Zhejiang*, 14(10), 903–915.
- Chirinos, R., Pedreschi, R., Rogez, H., Larondelle, Y., & Campos, D. (2013). Phenolic compound contents and antioxidant activity in plants with nutritional and/or medicinal properties from the Peruvian Andean region. *Industrial Crops and Products*, 47, 145–152. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.02.025>

- Chu, Y.-F., Sun, J., Wu, X., & Liu, R. H. (2002). Antioxidant and Antiproliferative Activities of Common Vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(23), 6910–6916. <http://doi.org/10.1021/f020665f>
- Chun, O. K., Kim, D., Smith, N., Schroeder, D., Han, J. T., & Lee, C. Y. (2005). Daily consumption of phenolics and total antioxidant capacity from fruit and vegetables in the American diet. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 1715–1724. <http://doi.org/10.1002/jsfa.2176>
- Conde-Hernández, L. A., & Guerrero-Beltrán, J. Á. (2014). Total phenolics and antioxidant activity of *Piper auritum* and *Porophyllum ruderale*. *Food Chemistry*, 142, 455–460. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.078>
- Cruces, L. M. (2016). *Quinoa - Manejo integrado de plagas: Estrategias en el cultivo de la quinoa para fortalecer el sistema agroalimentario en la zona andina*. Santiago: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Cruces, L. M., & Callohuari, Y. (2016). *Guía de identificación y control de las principales plagas que afectan a la quinoa en la zona andina*. Santiago: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., & Paredes-López, O. (2000). Natural Pigments : Carotenoids , Anthocyanins , and Betalains — Characteristics , Biosynthesis , Processing, and Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 3(40), 173–289. <http://doi.org/10.1080/10408690091189257>
- Díaz, B., Couto, D., Moure, A., Fernandes, E., Domínguez, H., & Parajó, J. (2012). Optimization of antioxidants – Extraction from *Castanea sativa* leaves. *Chemical Engineering Journal*, 203, 101–109. <http://doi.org/10.1016/j.cej.2012.06.122>
- Fang, Y.-Z., Yang, S., & Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10), 872–879. [http://doi.org/10.1016/S0899-9007\(02\)00916-4](http://doi.org/10.1016/S0899-9007(02)00916-4)
- FAO. (1994). *Neglected Crops: 1942 from a different perspective*. (J. E. Hernández B. & J. León, Eds.). Rome: Food and Agriculture Organization of the United

Nations.

FAO, PROINPA, INIAF, & FIDA. (2013). *Descriptores para quinua y sus parientes silvestres*. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Food and Agriculture Organization of The United Nations. (2003). *Food energy – methods of analysis and conversion factors*. Rome.

Garcia-Maraver, A., Salvachúa, D., Martínez, M. J., Diaz, L. F., & Zamorano, M. (2013). Analysis of the relation between the cellulose , hemicellulose and lignin content and the thermal behavior of residual biomass from olive trees. *Waste Management*. <http://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.07.010>

Gawlik-Dziki, U., Dziki, D., Świeca, M., Sęczyk, Ł., Różyło, R., & Szymanowska, U. (2015). Bread enriched with Chenopodium quinoa leaves powder - the procedures for assessing the fortification efficiency. *LWT - Food Science and Technology*. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.02.007>

Gawlik-Dziki, U., Swieca, M., Dziki, D., Tomilo, J., & Baraniak, B. (2012). Leaves of quinoa as a source of natural inhibitors of xanthine oxidase. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 45(3), 482–487.

Gawlik-Dziki, U., Świeca, M., Sułkowski, M., Dziki, D., Baraniak, B., & Czyz, J. (2013). Antioxidant and anticancer activities of Chenopodium quinoa leaves extracts - In vitro study. *Food and Chemical Toxicology*, 57, 154–160. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2013.03.023>

Gómez P., L., & Aguilar C., E. (2016). *Guía de cultivo de la quinua*. (U. N. A. La Molina, Ed.) (2nd ed.). Lima: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Harborne, J. B. (1989). *Methods in plant biochemistry: Plant Phenolics*. (P. M. Dey & J. B. Harborne, Eds.). Academic Press.

Hari, R. K., Patel, T. R., & Martin, A. M. (1994). An overview of pigment production in biological systems : Functions , biosynthesis , and applications in food industry.

*Food Reviews International*, 10(1), 49–70.

<http://doi.org/10.1080/87559129409540985>

Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841–1856.

Hugh, W. (1990). Quinoa and Relatives (Chenopodium sect. Chenopodium subsect. Cellulata). *Economic Botany*, 44(3), 92–110.

INIA - Estación Experimental Agraria Illpa. (2013). Quinoa INIA 420 - Negra Collana. INIA - Estación Experimental Agraria Illpa.

Institute of Medicine. (2000). Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and  $\beta$ -Carotene and Other Carotenoids: Overview, Antioxidant Definition, and Relationship to Chronic Disease. In *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids* (pp. 35–57). National Academy Press.

Instituto Nacional de Estadística e Informática. (2017). Desnutrición crónica afectó al 13.1% de menores de cinco años disminuyendo en 1.3 puntos porcentuales en el último año. Retrieved December 10, 2017, from <https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/noticias/nota-de-prensa-n043-2017-inei.pdf>

Instituto Nacional de Salud. (2009). *Tablas peruanas de composición de alimentos* (8th ed.). Lima: Ministerio de Salud.

Jacobsen, S.-E., & Stølen, O. (1993). Quinoa - Morphology, phenology and prospects for its production as a new crop in Europe. *European Journal of Agronomy*, 2(1), 19–29. [http://doi.org/10.1016/S1161-0301\(14\)80148-2](http://doi.org/10.1016/S1161-0301(14)80148-2)

Jaime, L., Vázquez, E., Fornari, T., López-Hazas, M., García-Risco, M., Santoyo, S., & Reglero, G. (2014). Extraction of functional ingredients from spinach (*Spinacia oleracea* L.) using liquid solvent and supercritical CO<sub>2</sub> extraction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(4), 722–729. <http://doi.org/10.1002/jsfa.6788>

Jones, D. B. (1931). Factors for converting percentages of nitrogen in foods and

feeds into percentages of protein. *USDA Circ.*

- Kiskini, A., Vissers, A., Vincken, J., Gruppen, H., & Wierenga, P. A. (2016). Effect of plant age on the quantity and quality of the proteins extracted from sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(44), 8305–8314. <http://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03095>
- Kokanova-Nedialkova, Z., Nedialkov, P. T., & Nikolov, S. D. (2009). The genus *Chenopodium*: Phytochemistry, Ethnopharmacology and Pharmacology. *Pharmacognosy Reviews*, *3*(6), 280–306.
- Kozioł, M. J. (1992). Chemical composition and nutritional evaluation of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Journal of Food Composition and Analysis*, *5*(1), 35–68. [http://doi.org/10.1016/0889-1575\(92\)90006-6](http://doi.org/10.1016/0889-1575(92)90006-6)
- Letelier, M. E., Rodríguez-Rojas, C., Sánchez-Jofré, S., & Aracena-Parks, P. (2011). Surfactant and antioxidant properties of an extract from *Chenopodium quinoa* Willd seed coats. *Journal of Cereal Science*, *53*(2), 239–243. <http://doi.org/10.1016/j.jcs.2010.12.006>
- Liu, R. H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *The Journal of Nutrition*, *134*(12 Suppl), 3479S–3485S. <http://doi.org/10.1093/ajph/94/12/3479S> [pii]
- Mastebroek, H. D., Limburg, H., Gilles, T., & Marvin, H. J. P. (2000). Occurrence of saponin in leaves and seeds of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*, 152–156.
- Milton, K., & Dintzis, F. R. (1981). Nitrogen-to-protein conversion factors for tropical plant samples. *Biotropica*, *12*(3), 177–181.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, *26*(2), 211–219.
- Montgomery, D. (2004). *Diseño y análisis de experimentos* (2nd ed.). Mexico: Limusa

Wiley.

- Mujica, A. (1984). Andean grains and legumes. In J. E. Hernando Bermujo & J. Leon (Eds.), *Neglected Crops: 1492 from a Different Perspective* (pp. 131–148). Rome: FAO.
- National Academy of Sciences. (1998). *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic acid, Biotin, and Choline*. Washington, D.C.: National Academy Press.
- Nielsen, S. (2010). *Food Analysis* (4th ed.). Springer.
- Ortiz R., R., & Zanabria, E. (1979). Plagas. In *Quinoa y la kañiwa: Cultivos Andinos* (p. 228). Bogotá: Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo (CIID).
- Peng, X., Ma, J., Cheng, K. W., Jiang, Y., Chen, F., & Wang, M. (2010). The effects of grape seed extract fortification on the antioxidant activity and quality attributes of bread. *Food Chemistry*, 119(1), 49–53.  
<http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.083>
- Prakash, D., Nath, P., & Pal, M. (1993). Composition, Variation of Nutritional Contents in Leaves, Seed Protein, Fat and Fatty Acid Profile of Chenopodium Species. *Journal of Science Food Agriculture*, 62(2), 203–205.
- 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(10), 4290–4302.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9–10), 1231–1237.  
[http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Rodrigues, M. I., & Iemma, A. F. (2014). *Experimental Design and Process Optimization*. CRC Press.

- Self, R. (2005). *Extraction of Organic Analytes from Foods*. (P. Belton, Ed.). Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Shahidi, F., & Naczki, M. (2004). *Phenolics in Food and Nutraceuticals*. CRC Press.
- Siener, R., Hönow, R., Seidler, A., Voss, S., & Hesse, A. (2006). Oxalate contents of species of the Polygonaceae, Amaranthaceae and Chenopodiaceae families. *Food Chemistry*, 98(2), 220–224. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.059>
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.
- Smirnoff, N. (2005). *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. Chennai: Blackwell Publishing.
- Stikic, R., Glamoclija, D., Demin, M., Vucelic-Radovic, B., Jovanovic, Z., Milojkovic-Opsenica, D., ... Milovanovic, M. (2012). Agronomical and nutritional evaluation of quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.) as an ingredient in bread formulations. *Journal of Cereal Science*, 55(2), 132–138. <http://doi.org/10.1016/j.jcs.2011.10.010>
- Świeca, M., Sęczyk, Ł., Gawlik-Dziki, U., & Dziki, D. (2014). Bread enriched with quinoa leaves - The influence of protein-phenolics interactions on the nutritional and antioxidant quality. *Food Chemistry*, 162, 54–62. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.044>
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology* (3rd ed.). Sinauer Associates.
- Takhtajan, A. (2009). *Flowering Plants* (Second). Russia: Springer. <http://doi.org/10.1007/978-1-4020-9609-9>
- Tapia, M. E., & Fries, A. M. (2007). *Guía de Campo de los Cultivos Andinos* (1st ed.). Lima: FAO y ANPE.
- Tapia, M., Gandarillas, H., Mujica, A., Alandia, S., & Cardozo, A. (1979). *La quinua y la kañiwa: cultivos andinos*. (Instituto Interamericano de Cooperación para la

Agricultura, Ed.). Bogotá: Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo.

Thoufeek Ahamed, N., Singhal, R. S., Kulkarni, P. R., & Pal, M. (1998). A lesser-known grain, *Chenopodium quinoa*: Review of the chemical composition of its edible parts. *Food and Nutrition Bulletin*, 19(1), 61–70.

Wahli, C. (1990). *Quinoa: Hacia su cultivo comercial*. Quito: Latinreco S.A.

Wan, C., Yu, Y., Zhou, S., Liu, W., Tian, S., & Cao, S. (2011). Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of *Gynura divaricata* leaf extracts at different temperatures. *Pharmacognosy Magazine*, 7(25), 40–45.  
<http://doi.org/10.4103/0973-1296.75900>

World Health Organization, & Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2004). *Vitamin and mineral requirement in human nutrition* (2nd ed.). Bangkok: World Health Organization.

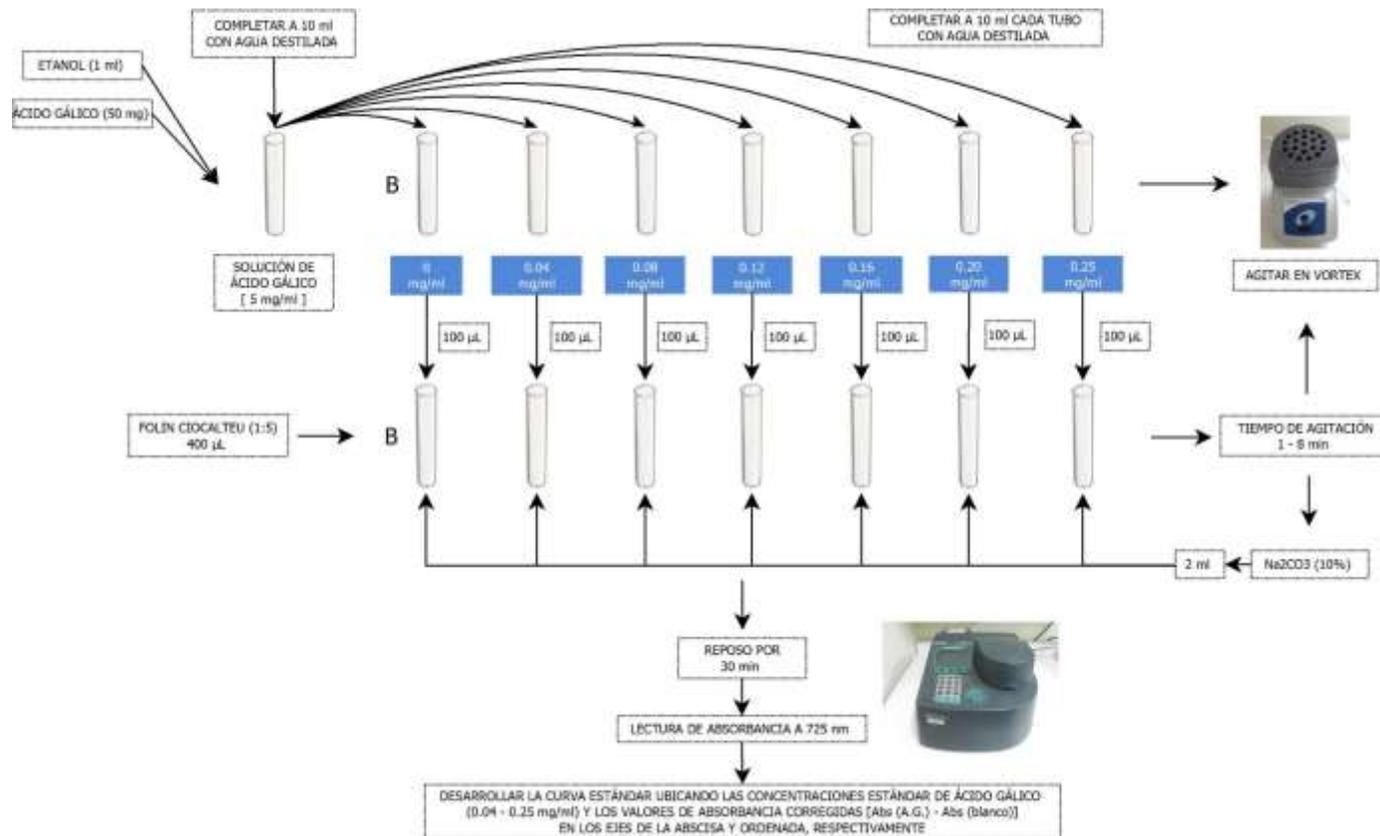
Wu, X., Beecher, G., Molden, J., Haytowitz, D., Gebhardt, S., & Prior, R. (2004). Lipophilic and Hydrophilic Antioxidant Capacities of Common Foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4026–4037.

Zein, H., Hashish, A. E., & Ismaiel, G. (2015). The antioxidant and Anticancer Activities of Swiss Chard and Red Beetroot Leaves. *Current Science International*, 04(04), 491–498.

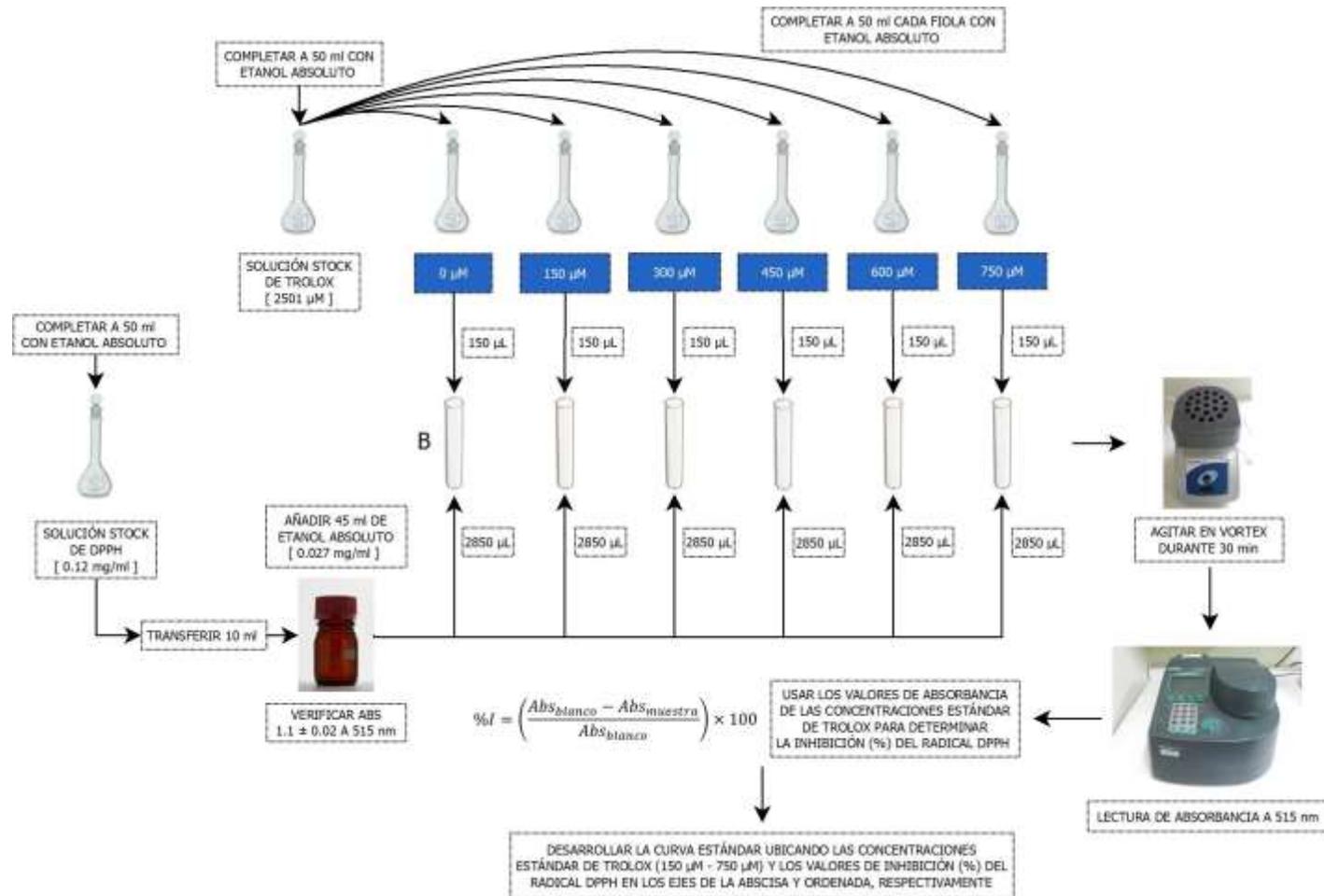
Zevallos, V. F., Herencia, L. I., Chang, F., Donnelly, S., Ellis, H. J., & Ciclitira, P. J. (2014). Gastrointestinal Effects of Eating Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) in Celiac Patients. *The American Journal of Gastroenterology*, 109(2), 270–278.  
<http://doi.org/10.1038/ajg.2013.431>

## ANEXOS

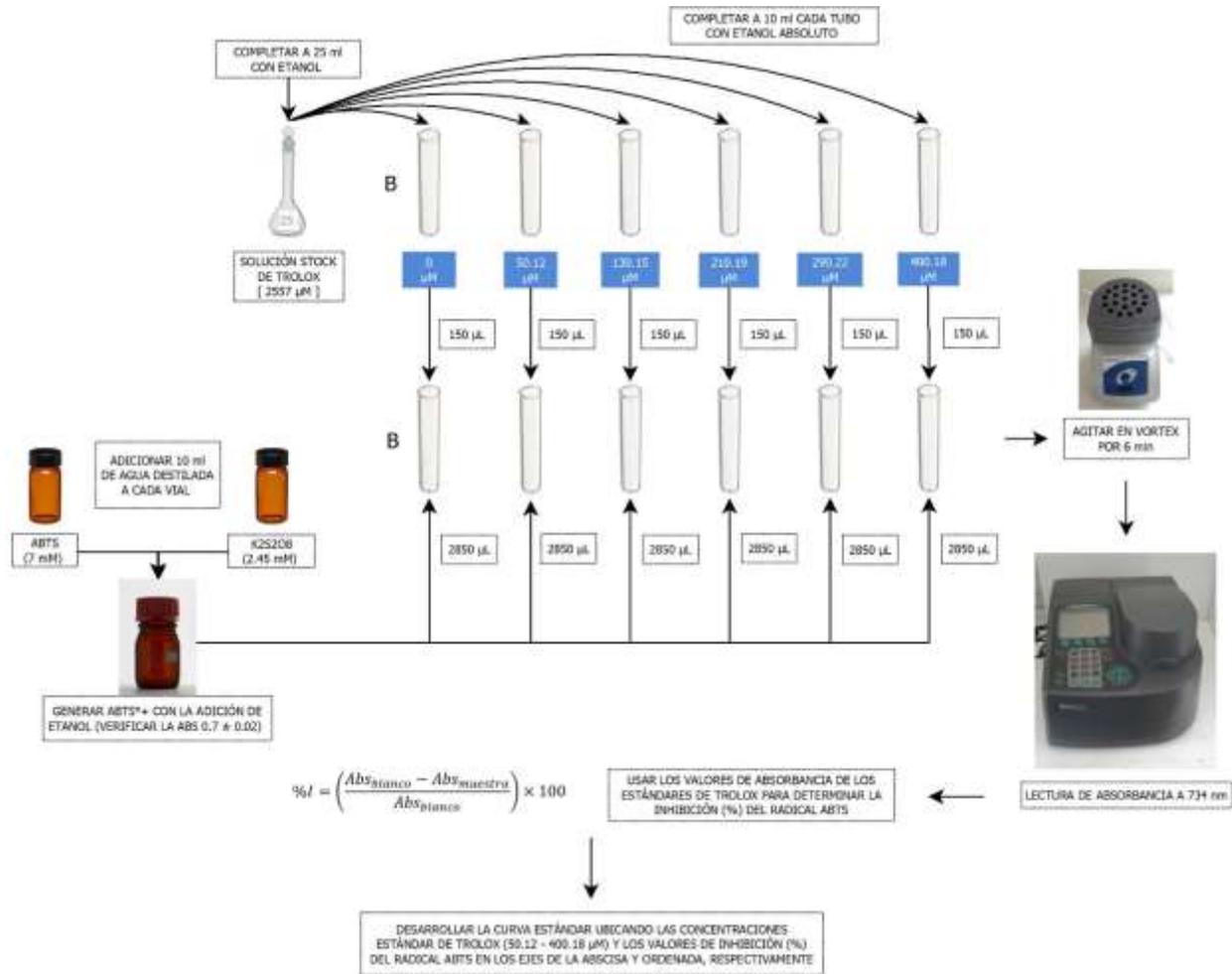
### Anexo 1. Desarrollo de la curva estándar de ácido gálico



## Anexo 2. Desarrollo de la curva estándar de Trolox (ensayo DPPH)



### Anexo 3. Desarrollo de la curva estándar de Trolox (ensayo TEAC)



### Anexo 4. Curvatura para el ANOVA del diseño factorial 2<sup>2</sup>

	Suma de cuadrados	G.L.	Valor F	Valor p		Suma de cuadrados	G.L.	Valor F	Valor p
<b>1 min</b> – R <sup>2</sup> =0.99715; R <sub>ajustado</sub> =0.99601					<b>45 min</b> – R <sup>2</sup> =0.99677; R <sub>ajustado</sub> =0.99548				
Curvatura	1463006	1	895.314	0.000000	Curvatura	1331916	1	990.157	0.000000
T.E. (°C)	30338	1	18.566	0.001540	T.E. (°C)	644184	1	478.891	0.000000
C.E. (%)	3746015	1	2292.444	0.000000	C.E. (%)	830463	1	617.373	0.000000
1*2	471910	1	288.794	0.000000	1*2	1350508	1	1003.978	0.000000
Error puro	16341	10			Error puro	13452	10		
<b>15 min</b> – R <sup>2</sup> =0.99278; R <sub>ajustado</sub> =0.98989					<b>60 min</b> – R <sup>2</sup> =0.99623; R <sub>ajustado</sub> =0.99472				
Curvatura	1903488	1	506.8027	0.000000	Curvatura	1116983	1	806.170	0.000000
T.E. (°C)	372489	1	99.1749	0.000002	T.E. (°C)	557821	1	402.601	0.000000
C.E. (%)	1476379	1	393.0852	0.000000	C.E. (%)	525015	1	378.924	0.000000
1*2	1409432	1	375.2605	0.000000	1*2	1462866	1	1055.807	0.000000
Error puro	37559	10			Error puro	13855	10		
<b>30 min</b> – R <sup>2</sup> =0.99917; R <sub>ajustado</sub> =0.99884					<b>75 min</b> – R <sup>2</sup> =0.96455; R <sub>ajustado</sub> =0.95037				
Curvatura	1576686	1	4109.539	0.000000	Curvatura	681753	1	59.9927	0.000016
T.E. (°C)	628622	1	1638.467	0.000000	T.E. (°C)	602387	1	53.0086	0.000027
C.E. (%)	1037528	1	2704.256	0.000000	C.E. (%)	555741	1	48.9039	0.000037
1*2	1386368	1	3613.487	0.000000	1*2	1251976	1	110.1710	0.000001
Error puro	3837	10			Error puro	113639	10		
					<b>90 min</b> – R <sup>2</sup> =0.92268; R <sub>ajustado</sub> =0.89176				
					Curvatura	501131	1	26.69182	0.000421
					T.E. (°C)	489297	1	26.06147	0.000461
					C.E. (%)	13700	1	0.72971	0.412973
					1*2	1236434	1	65.85629	0.000010
					Error puro	187747	10		

T.E.: Temperatura de extracción; C.E.: Concentración de etanol

## Anexo 5. Test de Tukey para el diseño factorial 2<sup>2</sup>

Tratamientos	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	Tratamientos	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
<b>(1 min)</b>	1960.2	1664.2	446.17	943.35	2034.2	<b>(45 min)</b>	2180.7	1973.1	983.57	2117.9	2558.8
35°C – 30%	-	0.000191	0.000176	0.000176	0.240152	35°C – 30%	-	0.000431	0.000176	0.293034	0.000176
75°C – 30%	0.000191	-	0.000176	0.000176	0.000177	75°C – 30%	0.000431	-	0.000176	0.004912	0.000176
35°C – 90%	0.000176	0.000176	-	0.000176	0.000176	35°C – 90%	0.000176	0.000176	-	0.000176	0.000176
75°C – 90%	0.000176	0.000176	0.000176	-	0.000176	75°C – 90%	0.293034	0.004912	0.000176	-	0.000176
55°C – 60%	0.240152	0.000177	0.000176	0.000176	-	55°C – 60%	0.000176	0.000176	0.000176	0.000176	-
Tratamientos	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	Tratamientos	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
<b>(15 min)</b>	2108.3	1775.2	721.31	1759.1	2481.5	<b>(60 min)</b>	2225.7	1958.6	1109.1	2238.6	2565.2
35°C – 30%	-	0.000544	0.000176	0.000411	0.000298	35°C – 30%	-	0.000195	0.000176	0.992263	0.000177
75°C – 30%	0.000544	-	0.000176	0.997344	0.000176	75°C – 30%	0.000195	-	0.000176	0.000186	0.000176
35°C – 90%	0.000176	0.000176	-	0.000176	0.000176	35°C – 90%	0.000176	0.000176	-	0.000176	0.000176
75°C – 90%	0.000411	0.997344	0.000176	-	0.000176	75°C – 90%	0.992263	0.000186	0.000176	-	0.000177
55°C – 60%	0.000298	0.000176	0.000176	0.000176	-	55°C – 60%	0.000177	0.000176	0.000176	0.000177	-
Tratamientos	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	Tratamientos	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
<b>(30 min)</b>	2116.3	1894.3	848.42	1986.0	2521.8	<b>(75 min)</b>	2251.5	2053.5	1175.0	2269.2	2470.3
35°C – 30%	-	0.000176	0.000176	0.000223	0.000176	35°C – 30%	-	0.229953	0.000176	0.999569	0.163167
75°C – 30%	0.000176	-	0.000176	0.001502	0.000176	75°C – 30%	0.229953	-	0.000179	0.172187	0.005255
35°C – 90%	0.000176	0.000176	-	0.000176	0.000176	35°C – 90%	0.000176	0.000179	-	0.000176	0.000176
75°C – 90%	0.000223	0.001502	0.000176	-	0.000176	75°C – 90%	0.999569	0.172187	0.000176	-	0.218376
55°C – 60%	0.000176	0.000176	0.000176	0.000176	-	55°C – 60%	0.163167	0.005255	0.000176	0.218376	-
-	-	-	-	-	-	<b>Tratamientos</b>	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
-	-	-	-	-	-	<b>(90 min)</b>	2166.2	1998.0	1456.6	2502.5	2470.3
-	-	-	-	-	-	35°C – 30%	-	0.280442	0.000744	0.077817	0.120530
-	-	-	-	-	-	75°C – 30%	0.280442	-	0.012171	0.003248	0.004836
-	-	-	-	-	-	35°C – 90%	0.000744	0.012171	-	0.000185	0.000189
-	-	-	-	-	-	75°C – 90%	0.077817	0.003248	0.000185	-	0.998276
-	-	-	-	-	-	55°C – 60%	0.120530	0.004836	0.000189	0.998276	-