

Optimización de la extracción de polifenoles del tallo de brócoli mediante una metodología de superficie de respuesta.

Aranza Nalleli Manríquez Zúñiga^{1,3}, Mariela Paola Vargas Rico^{2,3}, Ana Gabriela Díaz Rodríguez^{2,3}, Francisco Gabriel Martínez Iñiguez^{1,3}, Arturo de la Cruz Bosques^{2,3}, Christian Arenas Grimaldo^{2,3}, Carlos Eduardo Molina Guerrero^{2,3*}

¹División de Ingenierías, Universidad de Guanajuato, Avenida Juárez No.77. Col. Centro. C.P 36000, Guanajuato, México.

²Universidad de Guanajuato, Campus León, División de Ciencias e Ingenierías. Lomas del Bosque 103, Col. Lomas del Campestre, León, 37150, Guanajuato, México.

³Bioprocess and Bioeconomy Research Group, Campus León, División de Ciencias e Ingenierías. Lomas del Bosque 103, Col. Lomas del Campestre, León, 37150, Guanajuato, México.
ce.molina@ugto.mx

Resumen

El cultivo de brócoli (*Brassica oleracea var. italica*) es representativo de México siendo a nivel mundial el cuarto productor y, por su parte, el estado de Guanajuato es el primer productor nacional con más del 67% del volumen total. Considerando que la parte comercial del cultivo (floreta) corresponde al menor porcentaje de la planta se planteó el uso del tallo en la extracción de polifenoles para aplicaciones médicas. Con la obtención de productos agregados del cultivo, generalmente desechado, se pretende crear una economía circular y aprovechamiento de recursos para una segunda y tercera línea de producción. Esta investigación tiene como objetivo analizar las condiciones que maximizan la extracción de polifenoles del tallo, por medio de un diseño central compuesto (DCC). Se tomaron en cuenta dos variables; concentración de etanol (30,50, 70%) y tiempo (15, 30, 45 min). Se llevaron a cabo 13 extracciones, la máxima concentración obtenida fue de 0.453 mg EAG /mL a una concentración de 30:70 (etanol: agua) por 15 minutos. El análisis estadístico arrojó una R^2 máximo = 0.9396. Se determinó la concentración como factor importante, a una menor concentración etanol: agua promueve la extracción de polifenoles. Con respecto al tiempo, la relación es menor. Como perspectiva futura, se evaluará el efecto de la temperatura y otros solventes para incrementar la extracción de polifenoles. Nuestro trabajo promoverá la bioeconomía circular de la región.

Palabras clave: polifenoles; bioetanol; brócoli; antioxidante, economía circular.

Introducción

El brócoli (*Brassica oleracea var. Itálica*) es un cultivo de ciclo anual cuya planta mide de 60 a 90 centímetros de altura, y termina en una masa de flores de color verde que puede alcanzar un diámetro de hasta 35 centímetros. Pertenece a la familia de las Crucíferas y al género *Brassica oleracea* (Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera SIAP, 2018). Se considera como una hortaliza de alto valor alimenticio debido a su contenido en vitaminas, potasio, fósforo, minerales, glucosinolatos y ácidos fenólicos. Ha demostrado tener características anticancerígenas, antiinflamatorias, antimicrobianas, regulatorias del metabolismo, renales protectoras y neuro protectoras (Li et al., 2022). Un estudio reciente comprobó la eficacia de ciertos componentes del brócoli en la reducción de síntomas del COVID-19 (Bousquet et al., 2021)

En cuanto a su producción, tan sólo en 2020 se obtuvieron más de 583 mil toneladas de esta hortaliza, lo que colocó a México como el 4° productor de brócoli a nivel mundial (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2022). De acuerdo con el Panorama Agroalimentario 2019 generado por el SIAP, en México, uno de los mayores productores de Brócoli es Guanajuato, representando más del 67% de la producción a nivel nacional (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), 2020). Existe una problemática con respecto al cultivo del brócoli puesto que la parte comestible corresponde únicamente a la floreta, ésta representa el porcentaje menor en comparación con la hoja y el tallo. En consecuencia, la mayor parte de la biomasa es desechada. Se considera de gran importancia el desarrollo de productos agregados que permitan aprovechar los recursos invertidos en el cultivo para desarrollo de la bioeconomía circular.

Los polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas, se encuentran abundantemente en estas y se caracterizan por sus grupos fenólicos, son sintetizados por su actividad antimicrobiana y antioxidante en respuesta a factores de estrés en la planta como medio de protección para ataques tanto bióticos como abióticos (Thomas et al., 2018). Se clasifican en flavonoides y ácidos fenólicos.

El uso de los polifenoles como preservativos naturales de la comida se ha enfocado en extender la vida útil de la comida reduciendo o eliminando la carga microbiana por lo que incrementa la calidad y seguridad de los productos alimentarios (Baenas et al., 2018).

En el ámbito biomédico, los hidrogeles a base de polifenoles han demostrado combinar las ventajas de ambos agregando mejor adhesión y propiedades curativas por lo que sus aplicaciones cubren bastantes aspectos en el campo de la biomedicina (Li et al., 2022).

Este trabajo presenta la optimización de las condiciones de extracción de polifenoles del tallo del brócoli mediante una metodología de superficie de respuesta (MSR) a través de un diseño central compuesto (DCC) el cual evaluó tiempo y la relación etanol: agua.

Metodología

Reactivos

Los reactivos utilizados en esta investigación fueron: Ácido Gálico (97.5-102%) y Reactivo de Folin-Ciocalteu (2N) de Sigma Aldrich®, Carbonato de Sodio Anhidro (>99.5%) de Meyer® y Etanol (96%) de Alcoholera del Centro S.A. de C.V.

Muestra

El brócoli fue cosechado en el municipio de Dolores Hidalgo, Guanajuato, México. Las coordenadas no fueron especificadas.

Preparación de la muestra

El tallo se lavó con agua corriente y se refrigeró a -4°C por 24 h. Posteriormente, se cortó en pequeños trozos para facilitar su secado. El secado se llevó a cabo en un horno al vacío (DOV-E II Series) a 50°C hasta que el tallo perdió aproximadamente el 80% de su peso, se trituró en mortero y se almacenó hasta su uso posterior. La Figura 1 muestra una imagen del tallo de brócoli utilizado.



Figura 1. Tallo de brócoli antes del secado

Contenido de polifenoles totales

Los polifenoles se extrajeron en base al método seguido por Martínez-Hernández et al., (2011), con algunas modificaciones. Brevemente, se tomaron 0.05 g de muestra seca, se colocaron en tubos Falcon de 15 mL y se agregaron 3 mL de extractante, después se colocaron en un Agitador Mixer KJMR-V a temperatura ambiente. Se realizó un diseño de experimentos (Diseño central compuesto) para maximizar la extracción de polifenoles. Se consideraron las variables tiempo (15, 30 y 45 min.) y concentración de etanol (30, 50 y 70%). Al finalizar, se transfirieron 2 mL de la solución a un tubo Eppendorf y se centrifugó en una microcentrífuga (Labnet Prism™ R) a 22°C , $15000 \times g$, 10 minutos.

Para realizar la cuantificación se tomaron 19 μL del sobrenadante, se le agregaron 29 μL de reactivo de Folin-

Ciocalteu (2N) y se dejó reposar por 3 minutos, finalmente, se agregaron 192 μL de solución Na_2CO_3 (2mg/mL) y se dejó reaccionar por 1 hora en oscuridad a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 760 nm usando un espectrofotómetro de microplaca (Thermo ScientificTM MultiskanTM Go). El contenido de polifenoles totales se expresó en miligramos equivalentes de ácido Gálico por mililitro (mg EAG/mL).

Diseño Central compuesto.

Se realizó un diseño central compuesto con dos variables (temperatura/ tiempo), tres niveles, cinco puntos centrales y valor axial igual a uno; se usó el software estadístico JMP © Pro-16.0.0. La Tabla 1 muestra el diseño experimental (DCC) con los datos codificados.

Tabla 1. Datos codificados, de para concentración de etanol y tiempo (X_1 y X_2).

Experimento	Datos codificados	
	X_1	X_2
1	-1	1
2	0	1
3	0	0
4	1	-1
5	0	-1
6	1	1
7	1	0
8	-1	0
9	-1	-1

La ecuación 1 representa la relación entre las variables tiempo y concentración.

$$y = \beta_1 - \beta_2 X_1 + \beta_3 X_2 + \beta_4 X_1 X_2 + \beta_5 X_1^2 + \beta_6 X_2^2 \quad \text{Ec. 1.}$$

Resultados

La extracción de polifenoles frente al efecto de la concentración de etanol y el tiempo de residencia se evaluó en esta investigación. Se realizaron 13 experimentos, los parámetros y resultados se especifican en la Tabla 2.

El efecto de las diferentes combinaciones muestra que el valor máximo obtenido fue de 45 mg EAG/mL y el mínimo fue de 0.25 mg EAG/mL. El valor máximo se obtuvo con un tiempo de 15 minutos y una concentración etanol: agua de 30:70. La solución fue mínima. Se obtuvo un ajuste R^2 máximo 0.9396, lo que significa que el modelo estadístico es capaz de predecir el 93% de los datos experimentales obtenidos. Como es sabido, el valor R^2 debe aproximarse a 1 con el fin de describir mejor los datos experimentales. Se determinó que la variable "concentración" es más significativa ($p= 0.013694$) que el tiempo de exposición de la muestra para la extracción de polifenoles. La ecuación 2, la cual es una ecuación de regresión cuadrático, es una ecuación empírica de la cantidad de polifenoles respecto a las variables ensayadas.

$$mg \frac{AGE}{ml} = 0.5231 - 0.1510 X_1 - 0.05495 X_2 + 0.000045 X_1 X_2 + 0.00002 X_1^2 + 0.00011 X_2^2$$

Tabla 2. Resumen del total de extracciones realizadas para el análisis estadístico con sus respectivas condiciones.

Experimento	X1	X2	Y
	Relación Etanol: Agua (% v/v)	Tiempo (min)	Promedio Polifenoles (mg EAG/ mL)
1	30	45	0.39±0.12
2	50	45	0.32±0.02
3	50	30	0.32±0.06
4	70	15	0.25±0.02
5	50	15	0.29±0.03
6	70	45	0.28±0.02
7	70	30	0.28±0.03
8	30	30	0.30±0.03
9	30	15	0.45±0.02

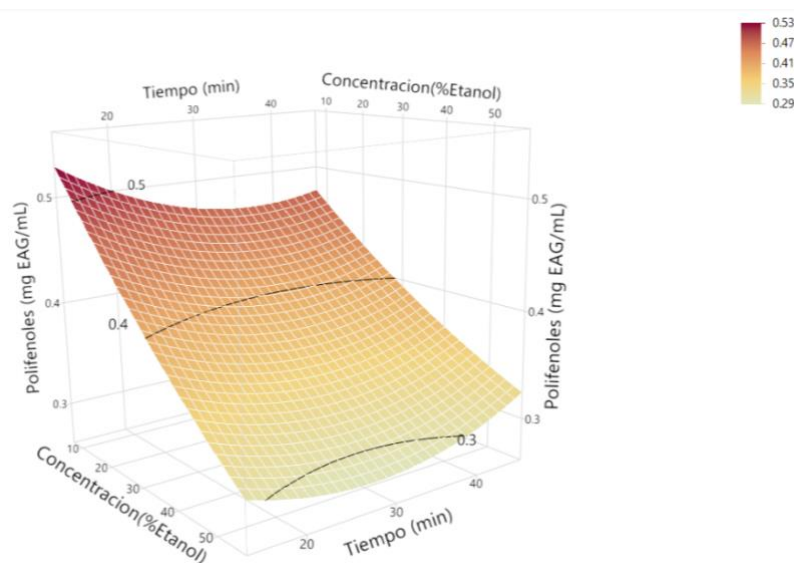


Figura 2. Superficie de respuesta concentración, tiempo / polifenoles

En la Figura 2, se observa el efecto de la concentración y el tiempo sobre la concentración de polifenoles. Se observa que la tendencia de la extracción de los polifenoles disminuye conforme la concentración de etanol aumenta. Respecto al tiempo de exposición, no se observa diferencias estadísticas significativa, sin embargo, se aprecia una mayor concentración a tiempos cortos, en este caso 15 minutos.

Conclusión

Se logró la cuantificación de polifenoles obtenidos de tallo de brócoli. Se evaluaron las variables de tiempo de exposición y concentración de solvente a temperatura ambiente. Se observó que la mayor influencia es asociada a la concentración de etanol. Es importante la evaluación de otros parámetros que permitan tener modelos más complejos para el escalamiento industrial.

Bibliografía

- Thomas, M., Badr, A., Desjardins, Y., Gosselin, A., & Angers, P. (2018). Characterization of industrial broccoli discards (*Brassica oleracea* var. *italica*) for their glucosinolate, polyphenol and flavonoid contents using UPLC MS/MS and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*, 245, 1204–1211. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.021>
- Li, H., Xia, Y., Liu, H. Y., Guo, H., He, X. Q., Liu, Y., Wu, D. T., Mai, Y. H., Li, H. bin, Zou, L., & Gan, R. Y. (2022). Nutritional values, beneficial effects, and food applications of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica* Plenck). In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 119, pp. 288–308). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.12.015>
- Y tú, ¿qué sabes del brócoli_ _ Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural _ Gobierno _ gob.mx. (n.d.).
- Bousquet, J., le Moing, V., Blain, H., Czarlewski, W., Zuberbier, T., de la Torre, R., Pizarro Lozano, N., Reynes, J., Bedbrook, A., Cristol, J. P., Cruz, A. A., Fiocchi, A., Haahtela, T., Iaccarino, G., Klimek, L., Kuna, P., Melén, E., Mullol, J., Samolinski, B., ... Anto, J. M. (2021). Efficacy of broccoli and glucoraphanin in COVID-19: From hypothesis to proof-of-concept with three experimental clinical cases. In *World Allergy Organization Journal* (Vol. 14, Issue 1). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.waojou.2020.100498>
- Martínez-Hernández, G. B., Gómez, P. A., Pradas, I., Artés, F., & Artés-Hernández, F. (2011). Moderate UV-C pretreatment as a quality enhancement tool in fresh-cut Bimi® broccoli. *Postharvest Biology and Technology*, 62(3), 327–337. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.06.015>
- Roy, M. K., Juneja, L. R., Isobe, S., & Tsushida, T. (2009). Steam processed broccoli (*Brassica oleracea*) has higher antioxidant activity in chemical and cellular assay systems. *Food Chemistry*, 114(1), 263–269. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.050>
- Rodríguez Hernández, M. del C. (2013). Respuestas fisiológicas, moleculares y fitoquímicas de variedades de *Brassica oleracea* (Grupo *italica*) sometidas a estrés abiótico. *Proyecto de Investigación*: <https://digitum.um.es/digitum/handle/10201/36741>
- El brócoli, casi un “Súper alimento” _ Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera _ Gobierno _ gob.mx. (n.d.).
- Baenas, N., Abellán, Á., Rivera, S., Moreno, D. A., García-Viguera, C., & Domínguez-Perles, R. (2018). Foods and supplements. In *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications* (pp. 327–362). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813572-3.00010-5>
- Li, Z., Chen, Z., Chen, H., Chen, K., Tao, W., Ouyang, X. kun, Mei, L., & Zeng, X. (2022). Polyphenol-based hydrogels: Pyramid evolution from crosslinked structures to biomedical applications and the reverse design. *Bioactive Materials*, 17, 49–70. <https://doi.org/10.1016/J.BIOACTMAT.2022.01.038>