



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Farmacia -Programa de Ciencias y Tecnología Analítica.

Revalorización de matrices lignocelulósicas como fuentes de lignanos

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias y Tecnología Analítica

JUAN PABLO INOSTROZA SALDÍAS
CONCEPCIÓN-CHILE
2018

Profesor Guía: Dra. Carola Vergara Rosales
Profesor Co-Guía: Dra. Claudia Mardones Peña
Dpto. de Análisis Instrumental, Facultad de Farmacia.
Universidad de Concepción



© 2018 JUAN PABLO INOSTROZA SALDÍAS

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.



TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---|-----------|
| RESUMEN | XII |
| CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN | 1 |
| LIGNANOS | 2 |
| BIOSÍNTESIS DE LIGNANOS..... | 6 |
| LIGNANOS EN LA NATURALEZA. | 8 |
| ENTEROLIGNANOS..... | 11 |
| EXTRACCIÓN DE LIGNANOS:..... | 14 |
| MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA EL ANÁLISIS DE LIGNANOS..... | 17 |
| <i>Métodos no hidrolíticos.</i> | 18 |
| <i>Métodos Hidrolíticos.</i> | 22 |
| Hidrólisis ácida..... | 23 |
| Hidrólisis básica. | 24 |
| Hidrólisis Enzimática..... | 25 |
| EXTRACCIÓN POR FLUIDOS SUPERCRÍTICOS. | 27 |
| <i>Teoría elemental de SFE</i> | 29 |
| <i>Pasos en el proceso SFE</i> | 34 |
| <i>Optimización de la extracción</i> | 35 |
| <i>Expansión del fluido y proceso de recolección en SFE</i> | 42 |
| <i>SFE para la extracción de compuestos fenólicos en matrices leñosas.</i> | 43 |
| SEPARACIÓN PREPARATIVA Y EL AISLAMIENTO DE LOS LIGNANOS PUROS. | 45 |
| IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LIGNANOS. | 48 |
| REFERENCIAS..... | 51 |
| CAPITULO 2: HIPOTESIS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO: | 63 |
| HIPÓTESIS..... | 64 |
| OBJETIVO GENERAL. | 64 |

| | |
|--|-----------|
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 64 |
| CAPITULO 3: ESTRATEGIA ANALÍTICA PARA DETERMINACIÓN DE LIGNANOS EN MATRICES | |
| LIGNOCELULÓSICAS..... | 65 |
| I. IMPLEMENTACION DE METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LIGNANOS:..... | 66 |
| II.- DETERMINACIÓN DE METODOLOGÍAS EXTRACTIVAS:..... | 67 |
| III.- IDENTIFICACIÓN DE LIGNANOS EN MATRICES LIGNOCELULÓSICAS:..... | 67 |
| IV.- OPTIMIZACIÓN DE METODOLOGÍAS EXTRACTIVAS:..... | 67 |
| V.- DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE METODOLOGÍA PARA DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y POLIFENOLES TOTALES EN EXTRACTOS:..... | 68 |
| CAPÍTULO 4: RESULTADOS..... | 69 |
| 4.1.- DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA ANALÍTICA POR HPLC-DAD-ESI-MS/MS PARA LA DETERMINACIÓN DE LIGNANOS EN MATRICES LIGNOCELULÓSICAS..... | 70 |
| <i>Resúmen.....</i> | <i>70</i> |
| <i>Materiales y métodos.....</i> | <i>71</i> |
| Muestreo y almacenamiento:..... | 71 |
| Reactivos y estándares..... | 72 |
| Método de extracción..... | 72 |
| Identificación de compuestos de interés..... | 72 |
| <i>Resultados.....</i> | <i>73</i> |
| Metodología HPLC-DAD-ESI-MS/MS para identificación de lignanos y de compuestos de interés en matrices de desecho..... | 73 |
| Screening de lignanos y otros compuestos de interés en matrices lignocelulósicas de desecho..... | 75 |
| <i>Conclusiones.....</i> | <i>80</i> |
| <i>Referencias.....</i> | <i>81</i> |
| 4.2.- OPTIMIZACIÓN MULTIVARIADA DE EXTRACCIONES PARA MATRICES DE DESECHO DE INDUSTRIA OLIVÍCOLA Y FORESTAL ... | 85 |
| <i>Resumen.....</i> | <i>85</i> |

| | |
|---|-----|
| <i>Introducción</i> | 86 |
| <i>Métodos de extracción:</i> | 87 |
| Extracción mediante Soxhlet | 87 |
| Extracción sólido líquido asistida por ultrasonido | 88 |
| Ensayo de extracción analítica mediante hidrólisis | 88 |
| <i>Optimización de extracción de lignanos en desechos de la industria olivícola</i> | 89 |
| <i>Optimización de extracción de lignanos en desechos de la industria forestal de P. radiata</i> | 92 |
| <i>Comparación de las tres metodologías extractivas</i> | 95 |
| 4.3.- DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE METODOLOGÍA PARA DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y POLIFENOLES | |
| TOTALES EN EXTRACTOS DE CUESCOS DE ACEITUNA Y DESECHOS DE <i>PINUS RADIATA</i> EN MICROPLACA. | 99 |
| <i>Resumen</i> | 99 |
| <i>Introducción</i> | 100 |
| <i>Métodos</i> | 101 |
| Polifenoles totales: | 101 |
| TEAC ABTS | 101 |
| TEAC CUPRAC | 102 |
| ORAC | 102 |
| <i>Resultados</i> | 103 |
| Validación de los métodos para determinación de polifenoles totales y capacidad antioxidante | 103 |
| <i>Conclusión</i> | 104 |
| <i>Referencias</i> | 105 |
| 4.4.- LIGNANS IN OLIVE STONES DISCARDED FROM THE OIL INDUSTRY. COMPARISON OF THREE EXTRACTION METHODS | |
| FOLLOWED BY HPLC-DAD-MS/MS AND ANTIOXIDANT CAPACITY DETERMINATION | 108 |
| <i>Abstract</i> | 108 |
| <i>INTRODUCTION</i> | 110 |
| <i>EXPERIMENTAL</i> | 112 |
| Samples | 112 |
| Reagents and standards | 113 |

| | |
|---|------------|
| Extraction methods | 113 |
| Soxhlet | 113 |
| Ultrasound assisted solid-liquid extraction with basic hydrolysis..... | 114 |
| Supercritical fluid extraction..... | 115 |
| Analytical methods | 115 |
| Determination of lignans by UHPLC-DAD-ESI-MS/MS in olive stone extracts | 115 |
| Total polyphenols and antioxidant capacity | 116 |
| RESULTS AND DISCUSSION..... | 118 |
| Analytical methods for determination of lignans in OS extracts | 118 |
| Lignan extraction | 121 |
| Antioxidant capacity of OS extracts..... | 125 |
| CONCLUSION..... | 126 |
| Acknowledgments | 127 |
| References..... | 127 |
| 4.5.- VALORIZATION OF PINUS RADIATA WASTES BY LIGNANS RECOVERY WITH DIFFERENT EXTRACTION METHODS: SOXHLET, ULTRASOUND-ASSISTED AND SUPERCRITICAL CO ₂ | 130 |
| Abstract | 130 |
| 1.- Introduction | 131 |
| 2.- Materials and methods: | 135 |
| 2.1.- Chemicals | 135 |
| 2.2.- Sample preparation | 135 |
| 2.3.- HPLC-DAD-ESI-MS analysis | 136 |
| 2.4.- Extractions..... | 137 |
| 2.4.1.- Soxhlet extraction..... | 137 |
| 2.4.2.- Liquid-solid extraction with basic hydrolysis assisted by ultrasound. | 137 |
| 2.4.3.- Supercritical Fluid extraction | 138 |
| 2.5.- Antioxidant capacity and total phenols assays..... | 139 |
| 3.- RESULTS AND DISCUSSION | 140 |
| 3.1.- Lignan determination by HPLC-DAD-ESI-MS/MS..... | 140 |

| | |
|--|------------|
| 3.2.- Determination of lignans in <i>P. radiata</i> knots and cones by different extraction methods..... | 143 |
| 3.3.- Antioxidant capacity and Total Polyphenols..... | 147 |
| 4.- Conclusions | 149 |
| Acknowledgments | 149 |
| 5. References | 149 |
| CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES FINALES | 157 |



Indice de figuras

| | |
|--|-----|
| Figura 1: Esquema de los principales órganos de una planta vascular dicotiledónea, imagen tomada desde Atlas de Histología animal y vegetal (Mejías M., 2009). | 2 |
| Figura 2: Estructura de fenilpropano (1), lignano (2) y neolignano (3). | 4 |
| Figura 3: Estructuras de algunos lignanos que se encuentran comúnmente en árboles y otras plantas, y los dos principales enterolignanos, enterodiol y enterolactona (Willfor S.M., 2006). | 5 |
| Figura 4: Biosíntesis de lignanos y lignina a partir del ácido shikímico (DeMartino M.P., 2005). | 7 |
| Figura 5: Metabolismo de lignanos vegetales (Abreviaciones en nota al pie de página) | 12 |
| Figura 6: Métodos de preparación de la muestra en análisis de lignanos usando la determinación de SECO en linaza. HMGA, ácido 3-hidroxi-3-metilglutarico (Gerstenmeyer E., 2013). | 23 |
| Figura 7: Variación de p_r para CO ₂ en función de p_r para diferentes valores de Tr. | 31 |
| Figura 8: Variación de la solubilidad de naftaleno (g/L) en CO ₂ como función de la densidad reducida ρ_r de un fluido a 45°C. | 32 |
| Figura 9: Estrategia analítica para la determinación de lignanos en matrices lignocelulósicas. | 66 |
| Figura 10: Cromatograma HPLC-DAD de extracto metanólico de zarzamora, identificado a 280nm. La identificación de los picos se encuentra desglosadas en la tabla 9. 78 | |
| Figura 11: Cromatograma HPLC-DAD a 280nm de extracto metanólico de cáscaras de semillas de piñón. Descripción de los picos detallados en la tabla 10. | 79 |
| Figura 12: Superficies de respuesta para metodos optimizados para extracción de lignanos totales cuescos de aceitunas (A) mediante extracción por CO ₂ supercritico con metanol como modificador y (B) mediante hidrólisis básica asistida por ultrasonido. | 91 |
| Figura 13: Superficies de respuesta para metodos optimizados para extracción de lignanos totales en piñas (A) y nudos (B) de pino mediante hidrólisis básica asistida por ultrasonido, y para piñas (C) y nudos (D) de pino mediante extracción por CO ₂ supercritico con metanol como modificador. | 95 |
| Figura 14: MS/MS spectra of targeted lignans screened in OS samples. Identification: A, pinosresinol diglucoside; B, lariciresinol; C, hydroxymatairesinol; D, secoisolariciresinol; E, pinosresinol; F, matairesinol. | 120 |
| Figura 15: chromatograms of OS extracts made with (US/B) ultrasound assisted solid liquid extraction with basic hydrolysis; Soxhlet extraction; (SFE) CO ₂ supercritical fluid extraction; (SFE10%) CO ₂ supercritical fluid extraction with 10% methanol. Standards identification in figura 14. | 122 |
| Figura 16: HPLC-DAD chromatograms of <i>P. radiata</i> Soxhlet extracts of knots, cones and bark. Identification in table 1. | 142 |
| Figura 17: Chromatograms of pine knot extracts by US-AH (ultrasound assisted with basic hydrolysis), SFE (supercritical CO ₂ with 20% of methanol) and Soxhlet. Identification in table 1. | 144 |

Indice de tablas

| | |
|--|-----|
| Tabla 1: Contenido de lignanos en alimentos (ug/100g de peso húmedo) (Adaptado de Landete J.M., 2012). | 9 |
| Tabla 2: Cantidad de lignanos (ug/g de peso seco) en duramen y nudos de árboles y su comparación con semilla de linaza (Willfor S.M., 2006). | 10 |
| Tabla 3. <i>Comparación de diferentes métodos de preparación de muestra para la determinación de lariciresinol y pinosresinol en semillas de sésamo (N=10) (Gerstenmeyer E., 2009).</i> Tabla 3: Comparación de diferentes métodos de preparación de muestra para la determinación de lariciresinol y pinosresinol en semillas de sésamo (N=10) (Gerstenmeyer E., 2009). | 27 |
| Tabla 4: <i>Propiedades críticas de algunos fluidos.</i> | 29 |
| Tabla 5: Rangos aproximados para densidad, viscosidad y coeficiente de difusión de líquidos, fluidos supercríticos y gases. | 30 |
| Tabla 6: Guía para la selección de parámetros de extracción en SFE. | 39 |
| Tabla 7: Longitud de onda de máxima absorción y fragmentación en modo negativo para polifenoles y lignanos más comunes. | 50 |
| Tabla 8: Screening de compuestos fenólicos y lignanos en matrices de desechos | 75 |
| Tabla 9: Identificación tentativa por HPLC-DAD-ESI-MS/MS de los extractos metanólicos de sarmientos y espinas de <i>Rubus umifolius</i> | 77 |
| Tabla 10: Identificación por HPLC-DAD-ESI-MS/MS de extracto metanólico de semillas de <i>Araucaria araucana</i> | 78 |
| Tabla 11: Cuantificación de Pinosresinol y Pinosresinol diglucósido en distintos extractos de cuescos de aceitunas | 88 |
| Tabla 12: Parámetros de optimización multivariada para métodos de extracción de lignanos en cuescos de aceituna. | 90 |
| Tabla 13: Parámetros de optimización multivariada para métodos de extracción de lignanos en desechos de <i>P. radiata</i> | 93 |
| Tabla 14: Parámetros analíticos del ensayo Folin- Ciocalteau | 103 |
| Tabla 15: Analytical parameters for used method for the analysis of OS extracts | 119 |
| Tabla 16: Pinosresinol concentration in olive stones by three extractive methodologies.. | 123 |
| Tabla 17: Antioxidant capacity in extracted OS samples by three methods. | 126 |
| Tabla 18: Identification of lignans in Soxhlet extracts of <i>P. radiata</i> knots, cones and bark extracts by HPLC-DAD-ESI-MS/MS | 141 |
| Tabla 19: Analytical parameters for the chromatographic determination at 280 nm of the main lignans identified in extracts of <i>P. radiata</i> knots, cones and bark. | 142 |
| Tabla 20: Concentration of lignans in pine knots and cones | 146 |

Tabla 21: Total polyphenols and Antioxidant Capacity of pine knots 148



RESUMEN

Los lignanos son metabolitos secundarios de las plantas que están relacionadas con su crecimiento y defensa. Su estructura química está compuesta por dos unidades fenilpropanoides enlazadas mediante el carbono β . La unidad fenilpropanoide es la misma que se utiliza como monómero de la lignina, por lo que lignano y lignina tienen una estrecha relación.

Los lignanos son fitoestrógenos, en donde se caracterizan por tener una estructura similar a los estrógenos.

Una vez ingeridos, los lignanos son transformados a enterolignanos mediante bacterias del tracto intestinal. Estos enterolignanos (principalmente enterodiol y enterolactona), poseen propiedades anticancerígenas, específicamente contra cáncer de mamas, próstata, colon y otros tipos de cáncer dependientes de hormonas, y también contra enfermedades cardiovasculares, osteoporosis y síndrome menopáusico.

Exceptuando a la linaza, las concentraciones de lignanos en vegetales son bajas, pero se ha descubierto que en algunas matrices leñosas, específicamente en los nudos de algunos árboles, se encuentran concentraciones altas de estos compuestos (5-30% p/p).

En este trabajo se evaluaron algunas matrices lignocelulósicas consideradas desechos, como los sarmientos de *vitís vinífera*, huesos de aceitunas (*olea europaea*) de la industria

olivícola, zarzamoras (*rubus ulmifolius*) y desechos de la industria forestal (*pinus radiata*), con el fin de obtener un extracto rico en lignanos.

Para llevar a cabo esto, se desarrollaron tres metodologías distintas de extracción: Extracción por Soxhlet, Extracción sólido-líquido asistida por ultrasonido y Extracción por fluido supercrítico.

Se optimizaron los métodos y se evaluó finalmente que matriz posee mayor cantidad de lignanos y que metodología extractiva es la que genera resultados más favorables. La identificación y cuantificación de los lignanos se realizó mediante HPLC-DAD-ESI-MS/MS.

Si bien algunas matrices no se detectaron lignanos en concentraciones importantes - como en la zarzamora o sarmientos-, en los desechos forestales se encontraron matairesinol y nortrachelogenina como los principales lignanos identificados en piñas y nudos, respectivamente. Los extractos producidos con Soxhlet y SFE produjeron 10 g de lignanos totales por 100 g de extracto seco. Aunque con ambos métodos se logran resultados similares, el uso de extracción de fluido supercrítico con CO₂ produjo un extracto con menos uso de solventes y tiempo. El extracto final también tiene una gran capacidad antioxidante, por lo que podría ser una excelente opción como producto dirigido a la industria nutracéutica.

SUMMARY

Lignans are secondary metabolites of plants that are related to their growth and defense. Its chemical structure is composed of two phenylpropanoid units linked by β -carbon, the phenylpropanoid unit is the same used as a monomer of lignin, so lignan and lignin have a close relationship.

Lignans are phytoestrogens, which are characterized by having a structure similar to estrogen.

Once ingested, the lignans are transformed into enterolignans by bacteria from the intestinal tract. These enterolignans (mainly enterodiols and enterolactone) have anticancer properties, specifically against breast, prostate, colon cancer and other hormone-dependent cancers, and also against cardiovascular diseases, osteoporosis and menopausal syndrome.

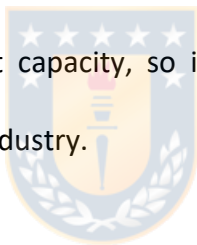
Except for flaxseed, the concentrations of lignans in vegetables are low, but it has been discovered that in some woody matrices, specifically in the knots of some trees, high concentrations of these compounds are found (5-30% w / w).

In this work, some lignocellulosic matrices considered waste were evaluated, such as grape canes, olive stones discarded from the olive industry, blackberries and woody waste from the forest industry, in order to obtain an extract rich in lignans.

To carry out this task, three different extraction methodologies were developed: Soxhlet extraction, ultrasound-assisted solid-liquid extraction and supercritical fluid extraction.

All methods were optimized and it was finally evaluated which matrix has the highest quantity of lignans and which extractive methodology generates the most favorable results. The identification and quantification of the lignans was performed by HPLC-DAD / ESI-MS / MS.

Although in some matrices no lignans were obtained in relevant concentrations - as in the blackberry or grapecanes -, in the forest waste, matairesinol and nortrachelogenin were found as the main lignans identified in pinecones and knots, respectively. The extracts produced with Soxhlet and SFE produced 10 g of total lignans per 100 g of dry extract. Although similar results are obtained with both methods, the use of supercritical fluid extraction with CO₂ produced an extract with less use of solvents and time. The final extract also has a great antioxidant capacity, so it could be an excellent option as a product aimed at the nutraceutical industry.



CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN



Lignanos

En el reino vegetal, dentro de las plantas pluricelulares, se pueden distinguir dos grupos bien diferenciados, las plantas vasculares y las no vasculares. Su diferencia se debe a la presencia de conductos o vasos que transportan el agua, las sales minerales o nutrientes.

Las plantas vasculares adultas están formadas por tres sistemas de tejidos, el sistema vascular, el cual está compuesto por el xilema (sistema conductor de agua y sales minerales desde la raíz al resto de la planta) y el floema (sistema conductor de los nutrientes sintetizados desde las hojas hasta el resto de la planta), un sistema de protección (epidermis y peridermis) y un sistema fundamental (formado por el parénquima y los tejidos de sostén) Fig.1.

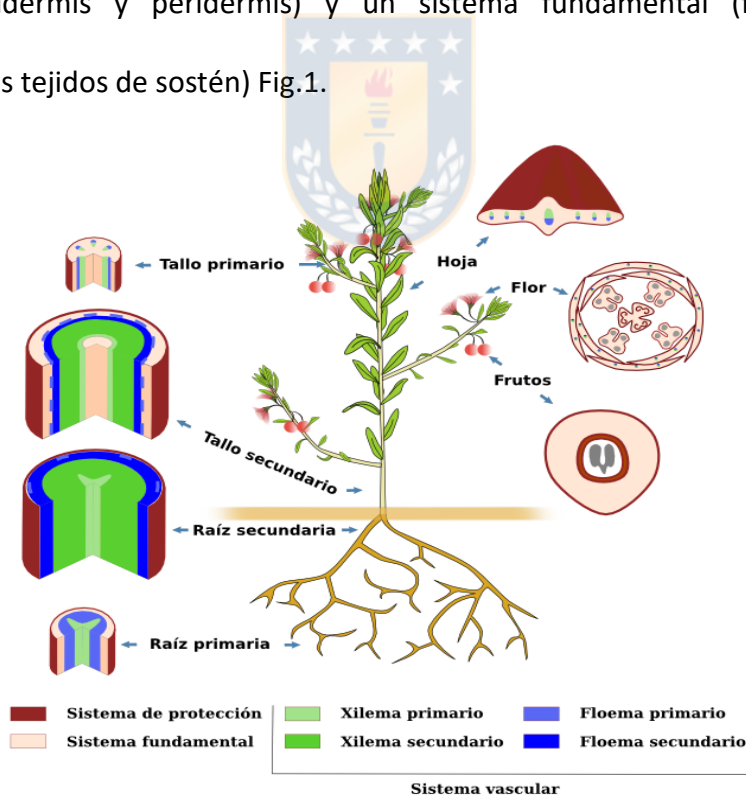


Figura 1: Esquema de los principales órganos de una planta vascular dicotiledónea, imagen tomada desde Atlas de Histología animal y vegetal (Mejías M., 2009).

Las plantas vasculares han evolucionado con formas notables para formar y proteger el aparato vascular. En ciertos arbustos leñosos, el xilema secundario puede tener en su centro una médula hueca, mientras que en la mayoría de los árboles hay un núcleo sólido de duramen, el cual tiene células inactivas. Ambos tipos de sistemas leñosos tienen en común la acumulación de los llamados metabolitos "secundarios", aunque en distintas proporciones, cuyas funciones son proteger y preservar el tejido vascular de las plantas (Kwon M., 2001).

Estos metabolitos secundarios son compuestos bioactivos capaces de inducir un rango diverso de efectos en la salud humana. Se han reportado efectos sobre enfermedades cardiovasculares, cáncer dependiente de hormonas, síntomas de la menopausia, densidad ósea, así como también propiedades antioxidantes, anti inflamatorias y efectos vasodilatadores (Schwartz H., 2009).

Los fitoestrógenos son un grupo de metabolitos polifenólicos no esteroideos de plantas que inducen respuestas biológicas y pueden imitar o modular la acción de estrógenos endógenos, mediante la unión de receptores de estrógeno (Kuhnle G.G.C., 2009).

Dependiendo de su estructura, los polifenoles pueden ser clasificados en flavonoides y no flavonoides, dentro de este último grupo se encuentran los lignanos (Tsao R., 2010)

Los lignanos se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, y se cree que funcionan como fitoalexinas, generando un mecanismo de protección contra enfermedades y pestes, tanto de bacterias como hongos (Pedras M.S.C., 2007; Großkinsky D.K., 2012). Además, los lignanos estarían participando en el control del crecimiento de las plantas (Raffaelli B., 2002).

Los lignanos constituyen un grupo importante dentro de los polifenoles, que están estructuralmente caracterizados por la dimerización oxidativa de dos unidades fenilpropanoides unidas mediante un enlace de las posiciones beta en la cadena lateral del propano (Fig.2). Cuando los lignanos están unidos por otro enlace carbono-carbono, la molécula es denominada neolignano (Willför S.M., 2006). Ellos varían en su nivel de oxidación, número de grupos hidroxilos fenólicos y grupos alcóxidos aromáticos, polaridad y en la estructura de la columna carbonada (Umezawa T., 2003).

Dependiendo de las especies vegetales, variedades, condiciones ambientales y del procesamiento extractivo, los lignanos pueden estar presentes como agliconas, glicósidos, glicosidos esterificados, o como bio-oligómeros (Kamal-Eldin A., 2001; Coran S.A., 1996).

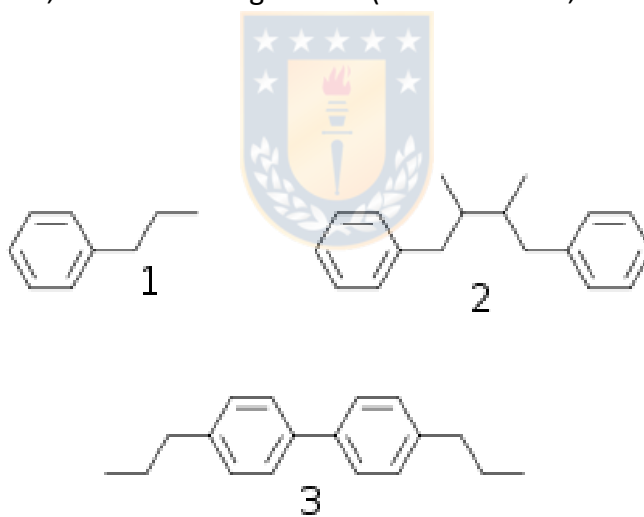


Figura 2: Estructura de fenilpropano (1), lignano (2) y neolignano (3).

Entre los lignanos más conocidos, se encuentran el secoisolariciresinol (SECO), matairesinol (MAT), pinoresinol (PINO), medioresinol (MED), lariciresinol (LARI), siringaresinol (SYR), sesamina (SES), hidroximatairesinol (HMR) e isolariciresinol (Fig. 3).

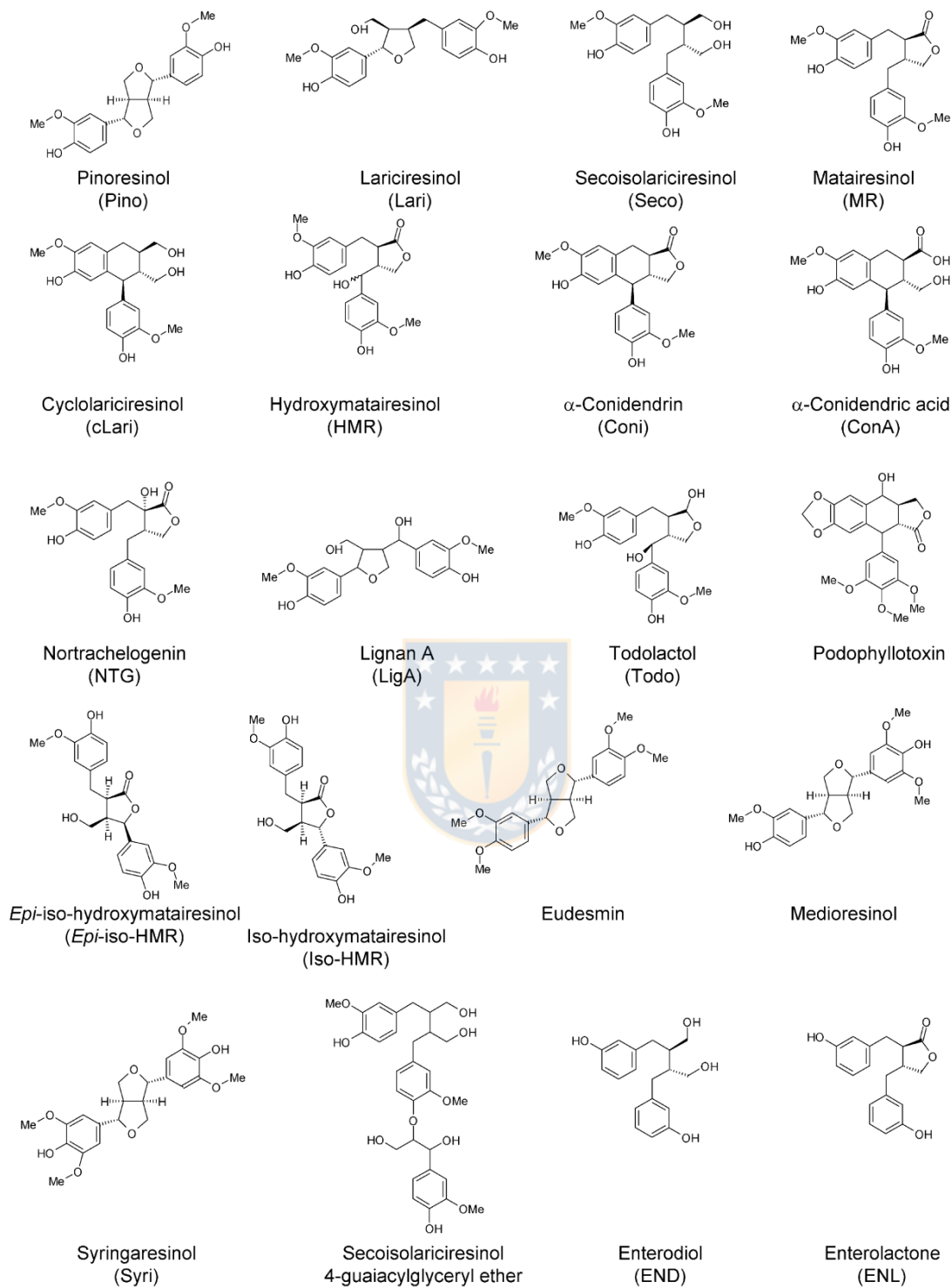


Figura 3: Estructuras de algunos lignanos que se encuentran comúnmente en árboles y otras plantas, y los dos principales enterolignanos, enterodiol y enterolactona (Willfor S.M., 2006).

Biosíntesis de lignanos.

Los fenoles de las plantas son sintetizados por 3 vías distintas: la vía del ácido shikímico (indispensable en la síntesis de lignanos), la vía del malonato (ruta de los policétidos) y ruta del acetatomevalonato (ruta del ácido mevalónico o ruta de la condensación isoprenica). La formación del ácido shikímico ocurre a partir del fosfoenolpiruvato (PEP) y la eritrosa 4-fosfato (E4P) por una condensación aldólica. Químicamente son sustancias polifenólicas, relacionadas con el metabolismo de la fenilalanina a través de la dimerización de alcoholes cinámicos sustituidos a partir del ácido shikímico. Se forman por acoplamiento oxidativo de alcoholes C6-C3, como los alcoholes cumarílico, sinapílico y coníferilico.

Los lignanos (y neolignanos) son dímeros de alcoholes hidroxicinámicos, en cambio, la lignina es un biopolímero aromático complejo que, si bien también está compuesto por alcoholes hidroxicinámicos, están conectados entre sí mediante varios enlaces formando complejos poliméricos (Fig. 4). Posee una estructura tridimensional y presenta enlaces covalentes a la celulosa, hemicelulosas y proteínas, formando la pared celular.

La vía general de síntesis corresponde a: Carbohidratos --> Vía del ácido Shikímico --> Aminoácidos aromáticos --> Ácido cinámico --> Lignanos.

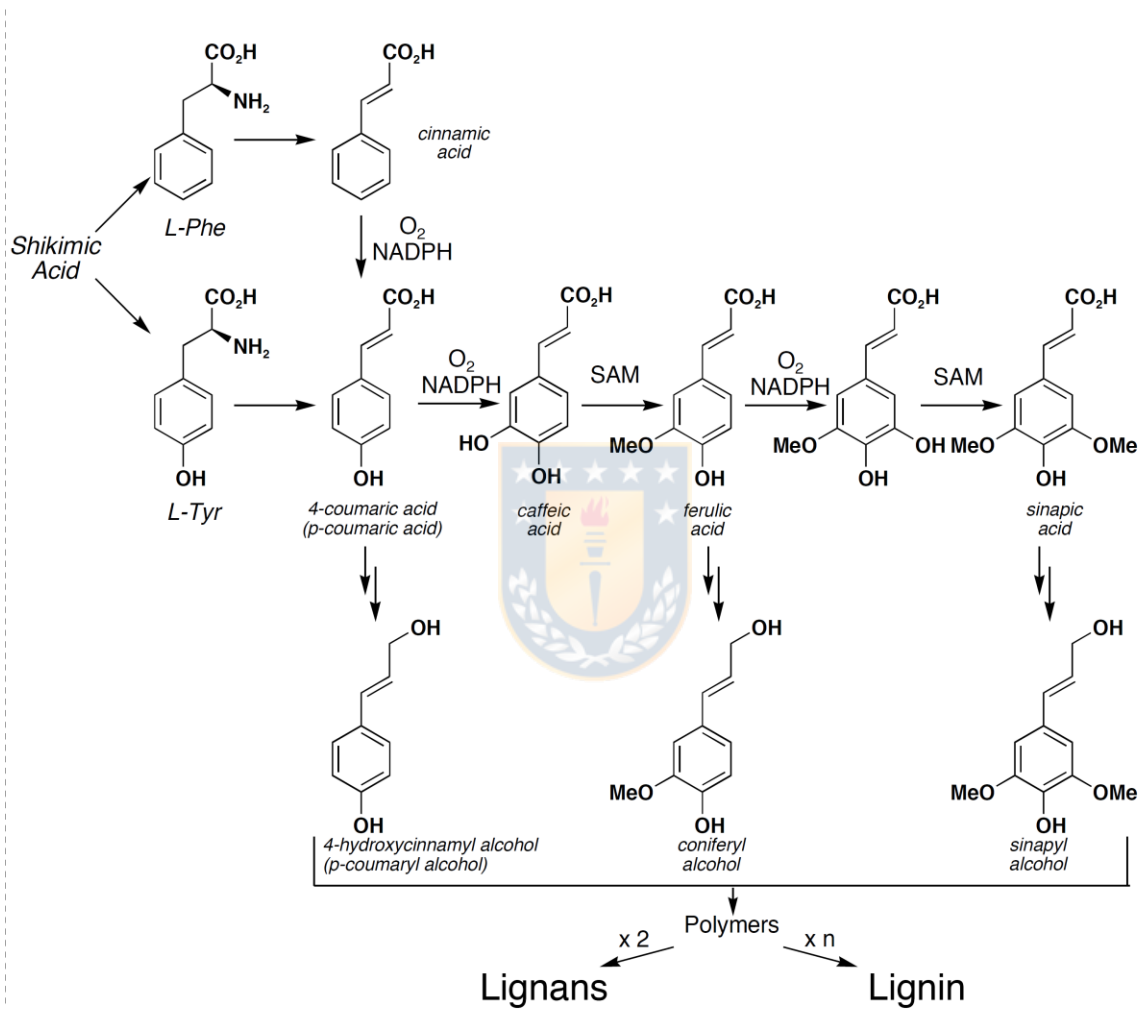


Figura 4: Biosíntesis de lignanos y lignina a partir del ácido shikímico (DeMartino M.P., 2005).

Lignanos en la naturaleza.

Los lignanos se encuentran en concentraciones considerables en alimentos ricos en fibra, como productos con granos enteros, seguido de nueces y aceites de semillas, cereales, pan y legumbres, y en concentraciones menores en frutas, vegetales, productos de soya, productos cárnicos y otros productos procesados, bebidas alcohólicas y no alcohólicas (Thompson, 2006). Un resumen de sus concentraciones se presenta en la Tabla 1. La cantidad de lignanos en la naturaleza varía ampliamente, en alimentos vegetales analizados por Milder y cols. (2005), usando un HPLC-MS, encontraron que las concentraciones de lignanos varían desde no detectado para plátanos, a 301mg/100g de peso fresco para la linaza. Peñalvo y cols. (2008) usando GC-MS, cuantificaron las cantidades de lignanos en plantas comúnmente consumidas en Japón y las concentraciones variaron desde no detectado en algunos hongos, a 1724 ug/100g (base húmeda) para el perejil japonés.

Tabla 1: Contenido de lignanos en alimentos (ug/100g de peso húmedo) (Adaptado de Landete J.M., 2012).

| ALIMENTO | SECO | PINO | LARI | MAT | SYR | MED | TOTAL | REFERENCIA |
|----------------------------|----------------|-----------|-----------|---------|----------|-----|-----------|---------------------------|
| Linaza | 294210 | 3324 | 3041 | 553 | | | 301129 | Milder y cols., 2005 |
| | 369900 | | | 1087 | | | | Mazur y Adlercreutz, 1998 |
| | 385000-670000 | | | | | | | Jhonsson y cols., 2000 |
| | 1261700 | | | | | | | Liggins y cols., 2000 |
| | 495700-1006200 | | | | 700-2850 | | | Kraushofer y Sontag, 2002 |
| | 81700 | | | | | | | Obermeyer y cols., 1995 |
| | 379012.3 | 729.6 | 2807.5 | 153.3 | | | 379012.3 | Thompson y cols., 2006 |
| Semillas de sésamo | 66 | 29331 | 9470 | 481 | | | 39348 | Milder y cols., 2005 |
| | 7.3 | 6814.5 | 1052.4 | 123.1 | | | 7997.2 | Thompson y cols., 2006 |
| Semillas de girasol | 53 | 167 | 671 | 0 | | | 891 | Milder y cols., 2005 |
| | 26.2 | 33.9 | 149.7 | 0.5 | | | 210.3 | Thompson y cols 2005 |
| | 127.8 | | | 0 | | | 629 | Milder y Freskens, 2005 |
| Castañas de cajú | 133 | 0 | 496 | 0 | | | 629 | Milder y Freskens, 2005 |
| Maní | 53 | 0 | 41 | 0 | | | 94 | Milder y Freskens, 2005 |
| Centeno | 462 | 1547 | 1505 | 729 | 3540 | 858 | | Smeds y cols., 2007 |
| Trigo | 868 | 138 | 672 | 410 | 882 | 232 | | Smeds y cols., 2007 |
| Maíz | 125 | 33 | 69 | 21 | 2.4 | | | Smeds y cols., 2007 |
| Té negro | 5.0-6.2 | 27.0-40.6 | 28.9-30.8 | 1.1-1.5 | | | 63.6-77.1 | Milder y cols., 2005 |
| Té verde | 12.9 | 5.7 | 18.7 | 2.0 | | | 39.2 | Milder y cols., 2005 |
| Tomate | 1.2 | 1.9 | 6.0 | | | | 9.1 | Thompson y cols., 2006 |
| Tomate cherry | 16 | 19 | 38 | | 3 | 3 | 80 | Peñalvo y cols., 2008 |

En la madera, los lignanos se encuentran dimerizados, acompañados por pequeñas cantidades de trímeros y tetrámeros comúnmente llamados sesquilignanos y dilignanos respectivamente, y éstos, como clase, se denominan oligolignanos (Willfor S.M., 2004).

En la madera, los lignanos y otros polifenoles se encuentran comúnmente en su duramen o parte central del tronco (Kwon M., 2001). Se ha descubierto que los nudos de los árboles, es decir, las bases de ramificación dentro del tallo, contienen una concentración excepcionalmente alta de lignanos (Tabla 2). Según lo descrito por Willfor S.M. (2004), los nudos de madera blanda tienen típicamente 5-15% (p/p) de lignanos, e incluso en algunos casos extremos, los nudos pueden contener incluso hasta 30% (p/p) de lignanos (Willför S.M., 2006).

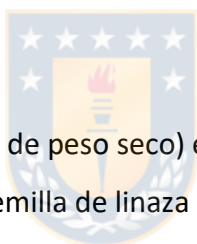


Tabla 2: Cantidad de lignanos (ug/g de peso seco) en duramen y nudos de árboles y su comparación con semilla de linaza (Willfor S.M., 2006).

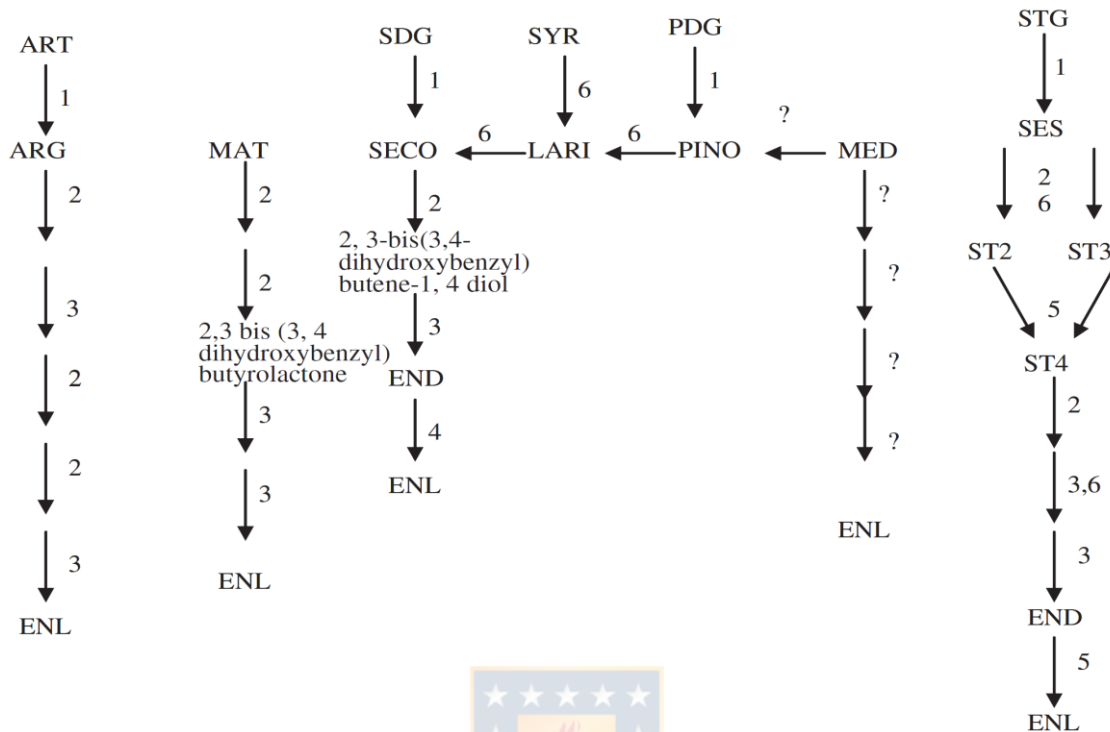
| MATRIZ | SECO | PINO | LARI | MAT | HMR | REFERENCIA |
|---|-----------------------|----------|------------|---------------------|-------------|--|
| Duramen de <i>Picea abies</i> (Picea de Noruega) | 3-370 | 10.0-20 | 17-370 | 10-520 | | Willfor y cols., 2004a |
| Nudos de <i>Picea abies</i> (Picea de Noruega) | 1400-6800 | trazas | 1000-2500 | 1700-5500 | 36000-88000 | Willfor y cols., 2004a |
| Duramen de <i>Abies alba</i> (Abeto blanco) | 140 | 20 | 180 | 250 | 150 | Willfor y cols., 2004b |
| Nudos de <i>Abies alba</i> (Abeto blanco) | 29000-36000 | 360-1000 | 4600-10000 | 2500-2600 | 7000-7800 | Willfor y cols., 2004b |
| Semilla de linaza | 3700 2900 12600 | 33.2 | 30.4 | 10.9 5.5 58.6 | | Mazur y cols., 1996 Milder y cols., 2005 Liggins y cols., 2000 |

Enterolignanos.

Gran parte del interés en los lignanos se debe a su posible aplicación en el campo de la farmacia y la nutrición. Se ha encontrado que los lignanos poseen una variedad de propiedades biológicas (Schwartz H., 2009). Como ejemplo, los derivados semisintéticos del lignano podofilotoxina, presente de forma natural en las plantas *Podophyllum*, han encontrado aplicaciones definidas en la medicina como un potente compuesto anticancerígeno (Arroo R.R.J., 2002).

Investigaciones recientes reportan propiedades anticancerígenas, antioxidantes, antitumorales, anticitotóxicas y antioxidantes (Pietrofesa R.A., 2018), además de protección contra la disfunción metabólica (Chan K.W. y cols., 2018), propiedades inhibitorias de la proliferación de células cancerígenas inducidas por estradiol (Muhit A., 2018), efectos antitumorales en células cancerígenas de colon (Moura A.F., 2018) y otros tipos de cáncer (Masoudi N., 2018), actividad contra el cáncer de mamas (Lineberger C.G., 2017), efectos antiinflamatorios y neuroprotectores (Won se suh, 2018), además de efectos antimicrobianos (Al-Ani M.K. y Aziz M., 2017).

Algunos de los lignanos vegetales son hidrolizados y metabolizados por la microflora del colon a los "enterolignanos" enterolactona (ENL) y enterodiol (END) (Fig.5). Estos enterolignanos, también llamados lignanos de mamíferos, están presentes en los fluidos corporales de los seres humanos y los animales.



ST2 [4-(((3R,4R)-5-(6-hydroxybenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-4-(hydroxymethyl) tetrahydrofuran-3-yl)methyl)benzene-1,2-diol]

ST3 [4-(((3S,4R,5S)-5-(6-hydroxybenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-4-(hydroxymethyl) tetrahydrofuran-3-yl)methyl)benzene-1,2-diol]

ST4 [(Z)-6-(4-(3,4-dihydroxybenzylidene)-3-(hydroxymethyl) tetrahydrofuran-2-yl)benzo[d][1,3]dioxol-5(7aH)-one] (ST4).

Figura 5: Metabolismo de lignanos vegetales, *pinoresinol diglucósido (PDG)*, *lariciresinol(LARI)*,

secoisolariciresinol diglucósido (SDG), *matairesinol (MAT)*, *syringaresinol (SYR)*, *sesamin triglucósido (STG)*, *arctiin (ART)* a *enterodiol (END)* y/o *enterolactona (ENL)* (Ford y col., 2001; Jan y col., 2009; Touré & Xueming, 2010; Xie, Akao, y col., 2003).

Las reacciones son: (1) O-deglucosilación, (2) O-demetilación, (3) deshidroxilación, (4) deshidrogenación, (5) oxidación, (6) reducción y (?) desconocido. Intermediarios de interés: *secoisolariciresinol (SECO)*, *artigenin (ARG)*, *sesaminol (SES)*, (ST2-4).

Landete y cols. 2012.

Los enterolignanos tienen una estructura similar a la hormona estrógeno humano y por lo tanto pueden producir efectos estrogénicos o antiestrogénicos (Raffaelli B., 2002). Estos enterolignanos son producidos por la microbiota gastrointestinal, y la biodisponibilidad de lignanos es dependiente de la presencia de ciertos microorganismos como

Peptostreptococcus sp. cepa SDG-1 y *Eubacterium sp.* cepa SDG-2 (Wang L.-Q., 2002), los cuales son requeridos para realizar las conversiones químicas necesarias (Heinonen y col, 2001). Las bacterias intestinales metabolizan los lignanos de los vegetales por variados procesos, entre los que destacan la deglucosilación, demetilación, la escisión de anillos, desmetilación, deshidroxilación y oxidación (Clavel, Borrmann, Braune, Doré, & Blaut, 2006a; Clavel et al., 2005; Jin & Hattori, 2009; Xie, Akao, Hamasaki, Deyama & Hattori, 2003).

Presumiblemente los enterolignanos una vez sintetizados, vuelven a conjugarse con glucurónidos y sulfatos en la pared intestinal y en el hígado (Durazzo A., 2013).

Estudios epidemiológicos y farmacológicos han demostrado que END y el producto de su oxidación, la ENL, ofrecen protección contra la osteoporosis, enfermedades cardiovasculares, hiperlipidemia, cáncer de mamas, cáncer de colon, cáncer de próstata y síndrome menopáusico (Adlercreutz, 2007; Feng y cols, 2008; Adolphe y cols., 2010; Ayella y cols., 2010; Zaineddin y cols., 2011).

Debido a las características estructurales que comparten con los estrógenos de mamíferos, los lignanos pueden unirse a los receptores de los estrógenos (RE) y de ese modo evitar la unión de los estrógenos endógenos. Esto puede resultar en un aumento de la globulina unida a hormonas sexuales y una subsiguiente inhibición de la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, que conduce a un aumento de la depuración de los esteroides de la circulación sanguínea y menor estimulación del crecimiento de las células de cáncer de mama (Sirotkin A.V., 2014). En estudios con animales, también se ha demostrado que los lignanos ejercen mecanismos independientes a los receptores de

estrógeno tales como la inhibición de la angiogénesis, el crecimiento tumoral y la metástasis, así como la estimulación de la apoptosis (Buck K., 2011).

Los fitoestrógenos pueden proporcionar a las mujeres posmenopáusicas una alternativa práctica contra la terapia hormonal, y muchas mujeres ya han comenzado a utilizar suplementos de fitoestrógenos. La investigación actual general demuestra que los fitoestrógenos son eficaces en la reducción de la intensidad de los sofocos, y algunas combinaciones de fitoestrógenos dan como resultado una disminución en su frecuencia (Sirotkin A.V., 2014). Ciertos fitoestrógenos también han demostrado disminuir la atrofia vaginal, mejorar el sueño y la cognición, y afectar positivamente la salud ósea. Por otra parte, a diferencia de la terapia hormonal, los lignanos no aumentan el riesgo de coagulación en mujeres posmenopáusicas, por lo tanto, los suplementos pueden servir como una opción de tratamiento para los pacientes que tienen contraindicaciones para la terapia hormonal. Los fitoestrógenos pueden proporcionar una alternativa segura y parcialmente eficaz para terapia hormonal (Bedel S., 2012).

Extracción de lignanos:

Slanina J. (2004) sugiere que algunas maderas nudosas podrían tener cantidades elevadas de lignanos, por lo que es atractivo determinar éstos polifenoles en algunos materiales que son considerados desechos o plagas, como es el caso de los sarmientos de las vides, las zarzamoras y los huesos de aceituna de la industria olivícola.

Los sarmientos son residuos que se producen producto de la poda de vides (*vitis vinifera*) en la industria vitivinícola, la cual se realiza anualmente en Chile entre fines de mayo y agosto, los sarmientos son normalmente reincorporados al suelo del viñedo y en algunos casos se utilizan para la obtención de carbón vegetal o simplemente se queman (Herrera C., 2013). Desde los últimos años se comenzó a investigar la presencia de polifenoles en los sarmientos. Vergara y cols. (2012), y Karacabey y cols. (2012), han determinado la presencia de concentraciones considerables de *E-resveratrol* y *E-ε-viniferina* en este residuo. El método extractivo incluyó variaciones en la relación etanol-agua y distintas temperaturas, sin embargo, la presencia de lignanos no fue observada, esto debido probablemente a que el método de extracción no es un método drástico, además, la extracción de lignanos no era el objetivo de dichos estudios.

Para las zarzas (*rubus ulmifolius*), no hay investigaciones respecto a la presencia de lignanos en algún constituyente de la planta, solo existen estudios de polifenoles totales, como, por ejemplo, los estudios de Martini y cols. (2008), quienes estudiaron el efecto anti-*Helicobacter pylori* de las hojas de zarzamoras, en donde se destacan las propiedades antioxidantes, antimicrobianas, relajante muscular y anticonvulsionante de esta planta.

Otros investigadores evidencian la alta concentración de polifenoles en la zarzamora, aunque no se enfocan en la búsqueda de lignanos, esto puede ser producto de que los métodos extractivos son poco agresivos y se enfocan exclusivamente en las hojas, donde predominan hidroxycinamatos y catequinas (Dall'Acqua S., 2008; Oszmianski J., 2011). Los motivos de la búsqueda de lignanos en esta matriz, es debido a su gran vascularización en

los tallos de la planta, la cual posiblemente posea una importante reserva de metabolitos secundarios en el xilema lignificado.

En el caso de los estudios realizados en aceitunas y aceites de oliva, las concentraciones de lignanos encontradas son relativamente bajas (Valsta L.M., 2003), pero debido a su estrecha asociación con la lignina, sería posible encontrar mayores niveles de lignanos en el hueso de la aceituna, el cual hoy en día es considerado como desecho, utilizándose principalmente como combustible en calderas de biomasa.

Los polifenoles existen como compuestos fácilmente extraíbles (libres) y también como polifenoles no extraíbles (Arranz S., 2010). Ya hace algunos años se ha demostrado que el contenido de polifenoles en los alimentos de origen vegetal han sido subestimados; cantidades significantes de compuestos bioactivos han quedado remanentes en los residuos de extracción como polifenoles no extraíbles (Perez-Jimenez J. y Saura-Calixto F., 2005).

Para determinar la composición y cantidad de lignanos desde vegetales, es necesario separarlos desde su matriz. Inicialmente, esto implica varias etapas, muchas veces tediosas, y cada una con riesgos de contaminación, pérdida de la muestra, y reacciones inesperadas de los lignanos (González G.B., 2014). Sin embargo, los métodos analíticos y los instrumentos disponibles han evolucionado, y hoy en día es posible aplicar métodos más seguros de extracción y pretratamiento de muestras vegetales.

Los procedimientos de toma de muestra, almacenamiento y pretratamiento de la muestra son cruciales para un resultado óptimo. Por ejemplo, la obtención de una muestra representativa de la madera de ciertas especies de árboles involucra aspectos como lugar

de crecimiento, edad, características y condiciones físicas del árbol muestreado y la altura de muestreo (Ekman R., 2002; Vivas N., 2006). Las muestras deben colocarse en un congelador inmediatamente después del muestreo para evitar reacciones no deseadas, tales como la oxidación, polimerización, y reacciones enzimáticas. La oxidación de extractos lipofílicos también puede causar problemas más adelante en el análisis de los lignanos (Willfor S.M., 2006).

Los pretratamientos necesarios para la mayoría de muestras vegetales antes de la extracción son el secado, y molienda o pulverización (Sarker S.D. y Nahar L., 2012). Para evitar la oxidación o polimerización de compuestos sensibles, es recomendable utilizar una técnica de secado suave tal como liofilización o, si no está disponible, el secado a temperatura ambiente. La molienda también puede causar reacciones no deseadas ya que la temperatura en el molino puede elevarse demasiado. Agregando un poco de hielo seco puro al molino puede eliminar este problema. Las muestras molidas o pulverizadas son más susceptibles a la oxidación y la degradación y por lo tanto deben ser almacenados en un lugar frío, oscuro y seco (Tura D. y Robards K., 2002).

Métodos de preparación de la muestra para el análisis de lignanos.

Las técnicas de preparación de la muestra se encuentran divididas en métodos hidrolíticos y no hidrolíticos. El problema con los métodos no hidrolíticos en el análisis de lignanos, es que dependiendo de la matriz a estudiar, algunos lignanos se encuentran en complejos

glicosilados o esterificados asociados a azúcares estructurales, de las que solo una parte se encuentra disponible como compuesto libre. Por lo tanto, la mayoría de los métodos utilizados en el análisis de lignanos incluyen al menos un paso de deconjugación (Schwartz H., 2009).

Métodos no hidrolíticos.

En este tipo de métodos, la extracción es realizada con la subsiguiente fase hidrolítica. Los métodos descritos para la extracción de lignanos son la agitación magnética (Popova L., 2009), reflujo (Oliveras López M.J., 2009), agitación por homogenización (Jhonsson P., 2000), extracción por ultrasonido (Schwartz H., 2006), extracción acelerada por solvente (ASE)(Smeds 2007). Para la determinación de lignanos hidrofóbicos en aceites, las muestras sólo deben ser diluidas (Wu W.-H., 2007).

La polaridad de los lignanos varía en función de la cantidad de grupos hidroxilos que presente en su estructura, la extracción Soxhlet o percolación con un disolvente polar son los métodos tradicionales para la extracción de lignanos de plantas. Sin embargo, compuestos menos polares están presentes en diversas cantidades en la mayoría de los tejidos de las plantas y pueden interferir el análisis de lignanos posterior si se utiliza la extracción directa con un disolvente polar. Por lo tanto, es aconsejable hacer la extracción secuencial, en donde primero se eliminan los compuestos hidrofóbicos con un disolvente

orgánico no polar tal como hexano, pentano, éter de petróleo, o diclorometano. Algunos lignanos hidrofóbicos también pueden ser extraídos mediante soxhlet con solventes apolares como diclorometano, con buenos rendimientos (>80%) (Domingues R.M.A., 2012)

Los lignanos hidrofílicos pueden posteriormente ser extraídos con un disolvente polar tal como acetona, metanol, o etanol. La adición de agua facilita la penetración del disolvente y promueve la extracción de los compuestos más polares, tales como glucósidos no estructurales unidos a lignanos (Willfor S.M., 2003).

La extracción directa con un disolvente polar caliente o a temperatura ambiente también se ha utilizado para la extracción de lignanos vegetales (Hiltunen E., 2004). Esto también puede ser el enfoque apropiado para los lignanos de baja polaridad, que no contienen o contienen solamente un grupo hidroxilo libre, ya que una extracción selectiva de extractos de éstos lignanos puede ser imposible (Opletal L., 2004). Sin embargo, los pasos posteriores de limpieza para separar los lignanos a partir del extracto polar, generalmente consumen mucho tiempo y son laboriosos.

Los lignanos en algunos materiales vegetales pueden requerir pretratamientos especiales antes de la extracción y análisis. Secoisolariciresinol diglucósido (SDG) en la linaza (*Linum usitatissimum*) está presente como oligómeros unidos a éster, o incluso polímeros, que constan de SDG y ácido hidroximetil glutárico (HMGA) (Ford J.D., 2001). Este derivado lignano oligomérico parece ser fácilmente soluble en metanol acuoso o etanol, pero se necesita posteriormente de una hidrólisis alcalina para liberar el SDG. Por otra parte, se debe añadir un paso de hidrólisis ácida adicional si se desea estudiar el SECO libre como

aglicona (Johnsson P., 2000). Varios procedimientos analíticos, incluyendo diversas etapas y combinaciones de hidrólisis enzimática, ácida, y alcalina, antes o después de la extracción, se han desarrollado para el análisis de SDG y SECO en alimentos. La hidrólisis a menudo también se hace para simplificar el análisis cromatográfico posterior de extractos que contienen lignanos glucósidos (Thompson L.U., 2003).

El uso de extracción en fase sólida (SPE) de lignanos no es tan extendido como otras técnicas de extracción de disolventes. Sin embargo, SPE se ha aplicado para el análisis de lignanos en linaza o fluidos biológicos, donde se ha utilizado como una etapa de purificación después de un paso de hidrólisis alcalina o enzimática en un extracto crudo o para el fraccionamiento de oligómeros de un extracto crudo no hidrolizado. (Tura D. y Robards K., 2002).

Durante los últimos años, las técnicas amigables con el ambiente son cada vez más atractivas, por lo tanto, las investigaciones van encaminadas a la optimización de la forma más ecológica de extracción. Así, se han añadido a los métodos convencionales de extracción, nuevos métodos tales como la extracción por fluido supercrítico (SFE), extracción asistida por microondas, extracción de campo eléctrico pulsado, la extracción asistida por enzimas y la extracción asistida por ultrasonido, los cuales reducen el tiempo de extracción y por lo tanto la energía consumida (Boukroufa M. y cols., 2014).

El ultrasonido (18-40 kHz) es una técnica ecológica, limpia y eficiente que acelera enormemente el proceso de extracción y puede reducir el consumo de energía. El extracto final es más concentrado en material soluble, que hace que sea más fácil de manejar y reduce la necesidad de etapas de proceso adicionales (Seidel V., 2002). El ultrasonido

introducido en líquidos, genera ondas sonoras que se propagan resultado una alternancia de ciclos de alta y baja presión. Durante el ciclo de baja presión, las ondas ultrasónicas de alta intensidad crean pequeñas burbujas de vacío o huecos en el líquido, colapsando violentamente durante un ciclo de alta presión. Este fenómeno se denomina cavitación. La implosión de la burbuja de cavitación resulta también en chorros líquidos de hasta velocidad de 280 m/s. Estas fuerzas extremas rompen las paredes celulares y se extrae material intracelular.

La extracción asistida por ultrasonido (UAE), tanto en barra como en baño, si se trabaja a baja temperatura y con una rápida ejecución, por lo general no se degrada el extracto. UAE no deja residuos en el extracto y no utiliza piezas mecánicas en movimiento en el interior del extracto, evitando así la aparición de cualquier tipo de contaminación. También ofrece ventajas en términos de productividad, rendimiento y selectividad, mejora el tiempo de procesamiento, mejora la calidad, reduce los riesgos químicos y físicos, y genera una disminución del volumen de solvente utilizado (Alexandru L., 2014; Corbin C., 2015). Oliveras-López y colaboradores han utilizado con éxito el ultrasonido para la extracción de pinoresinol, acetoxipinoresinol e OH-pinoresinol desde drupas de aceituna, así como Corbin C. y colaboradores (2015), en donde extrajeron SDG desde linaza utilizando extracción asistida por ultrasonido y la compararon con otras técnicas como extracción asistida por microondas, extracción asistida por enzimas y extracción alcalina mediante reflujo, en donde UAE obtuvo los mejores rendimientos.

Métodos Hidrolíticos.

Diferentes matrices vegetales tienen distintos patrones y diferentes perfiles de conjugación de los lignanos (esterificación, glicosilación) (Schwartz H., 2006). Además, diferentes lignanos se producen en diferentes formas conjugadas en el mismo producto alimenticio y se ha sugerido que el patrón de conjugación de lignanos individuales puede incluso variar en diferentes variedades del mismo vegetal (Smeds A.I., 2007).

Los enlaces éster pueden escindirse por hidrólisis ácida o básica (o metanólisis), mientras que la escisión de enlaces glicosídicos requiere hidrólisis ácida o enzimática. Sin embargo, algunos lignanos son lábiles al ácido (por ejemplo, secoisolariciresinol, lariciresinol, 7-hidroximatairesinol), y otros son de estabilidad limitada en condiciones alcalinas (por ejemplo, matairesinol, 7-hidroximatairesinol) (Ecklund P.C., 2004). Por lo tanto, el establecimiento de un método universal, aplicable para el análisis de un amplio rango de lignanos en diversos productos alimenticios es imposible y es necesario emplear métodos de preparación de muestras complementarias. La figura 6 resume los métodos comúnmente empleados en el análisis de lignanos utilizando linaza y su principal lignano secoisolariciresinol, que se produce en la forma de unidades de diglucósidos esterificados con ácido 3-hidroxi-3-metilglutárico (Gerstenmeyer E., 2013).

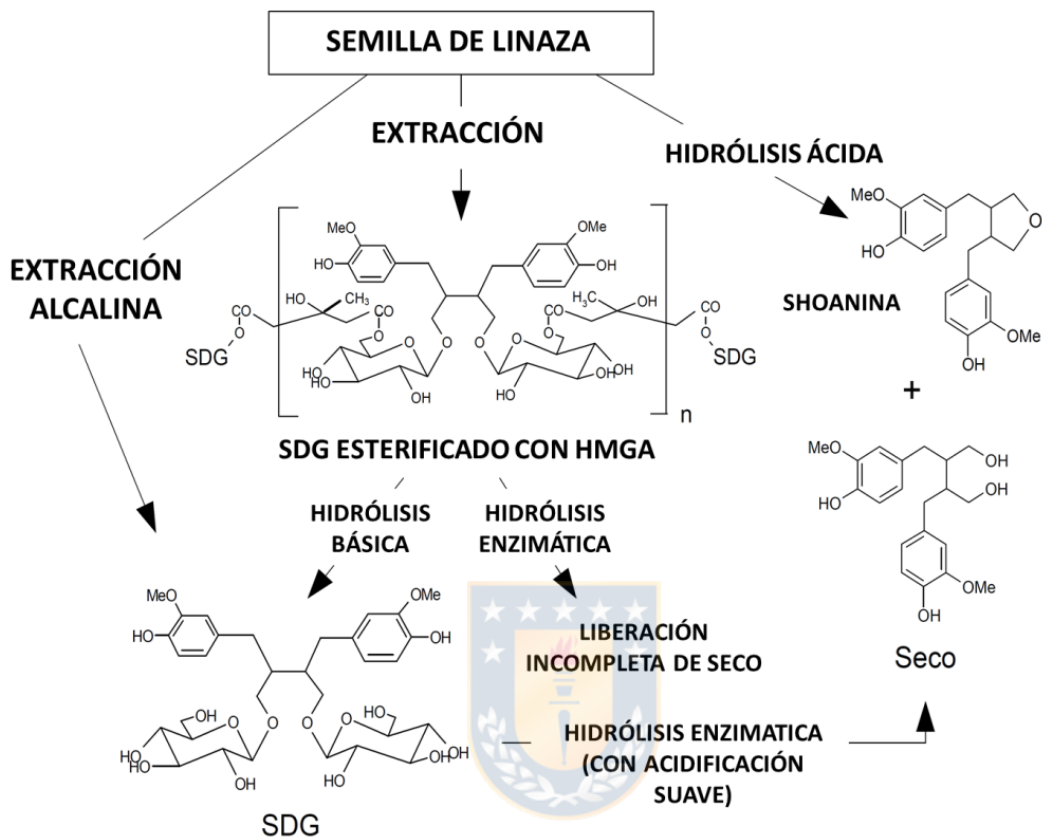


Figura 6: Métodos de preparación de la muestra en análisis de lignanos usando la determinación de SECO en linaza. HMGA, ácido 3-hidroxi-3-metilglutarico (Gerstenmeyer E., 2013).

Hidrólisis ácida.

La principal ventaja de la hidrólisis ácida, es que puede romper tanto los enlaces esteres como los enlaces glicosídicos, siempre que las condiciones de hidrólisis no sean demasiado suaves. Como se encontró que la hidrólisis enzimática no era suficiente para la

hidrólisis cuantitativa de los conjugados de secoisolariciresinol (Mazur W., 1996), se desarrollaron algunos métodos basados en la hidrólisis ácida realizada por calentamiento a reflujo en ácido clorhídrico o ácido sulfúrico 1,5 a 2,4 M durante 1-3 h para el análisis de secoisolariciresinol (Coran S.A., 1996; Charlet S., 2002; Kraushofer T., 2002a) y matairesinol (Kraushofer T., 2002b). Sin embargo, mientras que matairesinol ha demostrado ser estable, secoisolariciresinol se convierte parcialmente en anhidrosecoisolariciresinol, también llamado shonanina. Hoy en día, la hidrólisis se lleva a cabo principalmente con baja molaridad de ácido clorhídrico utilizándose en combinación con otras técnicas de hidrólisis, como la hidrólisis básica y enzimática (Smeds A.I., 2007).



Hidrólisis básica.

Una alternativa a la hidrólisis ácida en términos de escindir enlaces éster es el tratamiento alcalino. Existen varios métodos que incluyen la hidrólisis alcalina del bio-oligómero de linaza, desde donde se produce secoisolariciresinol (Kamal-Eldin A., 2001). Éstos métodos se han desarrollado y aplicado con éxito en la cuantificación de secoisolariciresinol diglucósido (SDG) (Eliasson C., 2003; Jhonsson P., 2000; Coran S.A., 2004). Sin embargo, estos métodos difieren en varios aspectos: En la molaridad de la solución de hidróxido de sodio usado (0,1 a 1 M), la duración de la hidrólisis (desde 1 hora a 2 días), la temperatura de hidrólisis (20 - 60 ° C), si la hidrólisis básica se llevó a cabo durante o después de la extracción de la semilla de linaza y si el desgrasado era necesario antes de comenzar la extracción. La escisión de los enlaces éster del bio-oligómero se puede lograr también por

metanólisis de la muestra en solución de metóxido de sodio bajo sonicación (Kraushofer T., 2002; Schwartz H., 2006). Esta es una alternativa más suave a la hidrólisis alcalina con respecto a la estabilidad de los lignanos.

Hidrólisis Enzimática.

La efectividad de la hidrólisis enzimática depende mucho de la elección de la enzima. Preparaciones enzimáticas no específicas como la de *Helix pomatia* (β -glucuronidasa y arilsulfatasa) o celulasa, liberan mayores concentraciones de agliconas que las enzimas específicas como β -glucosidasa (Mazur W.M., 1998). Gerstenmeyer y cols. (2009), informaron que la selección de la enzima influencia el contenido medido de lariciresinol y pinoresinol en semillas de sésamo. La aplicación de celulasa generó concentraciones alrededor del 25% más bajas que *Helix pomatia*. Se obtuvieron las concentraciones más elevadas cuando se aplicaron *Helix pomatia* y celulasa juntas. Resultados similares fueron obtenidos por Kuhnle y cols. (2009), que investigaron un gran número de muestras de alimentos por sus contenidos de lignanos e isoflavona, realizando una extracción no destructiva con 0,1 M acetato de sodio / metanol (90:10, v: v) y a continuación la hidrólisis enzimática, utilizando un reactivo de hidrólisis que consiste en *Helix pomatia* purificada, celulasa y β -glucosidasa.

Es muy probable que el contenido de lignanos en los alimentos se subestimen debido a la escisión incompleta de enlaces éster cuando la hidrólisis enzimática es elegida como el único método de deconjugación (Smeds A.I., 2007). Aún no se ha determinado si los

lignanós esterificados son extraídos cuantitativamente sin adición de ácido o base. Sin embargo, la hidrólisis enzimática es necesaria cuando se requiere determinar directamente los lignanos sensibles a ácidos o bases, como el 7-hidroximatairesinol (es decir, no a través de sus productos de degradación).

Otro argumento para el uso de hidrólisis enzimática es que podría dar una estimación más realista de las cantidades de agliconas de lignanos liberados en el sistema digestivo. Se ha visto que la hidrólisis enzimática después de la extracción por ASE generó mayores contenidos de syringaresinol en el centeno (Smeds A.I., 2007) y de lariciresinol en semillas de sésamo (Gerstenmeyer E., 2009) y que la hidrólisis enzimática de extractos de semillas de sésamo obtenidos por ASE o extracción ultrasónica arrojaron mayores concentraciones de pinoresinol (Gerstenmeyer E., 2009) (Tabla 3) destacando la importancia de la hidrólisis enzimática como método complementario a métodos más destructivos como la hidrólisis ácida o básica.

Hace algunos años, se han desarrollado y utilizado para analizar en un gran número de matrices, métodos que consisten en una hidrólisis ácida y enzimática en conjunto (Draganezcu D., 2017) y también la combinación de hidrólisis alcalina o metanólisis y la hidrólisis enzimática (Milder I.E.J., 2005; Peñalvo J.L., 2008; Thompson L.U., 2006). Incluso, una combinación de base, ácido suave e hidrólisis enzimática se ha utilizado con éxito (Smeds A.I., 2007).

Tabla 3. Comparación de diferentes métodos de preparación de muestra para la determinación de lariciresinol y pinoresinol en semillas de sésamo (N=10) (Gerstenmeyer E., 2009). Tabla 3: Comparación de diferentes métodos de preparación de muestra para la determinación de lariciresinol y pinoresinol en semillas de sésamo (N=10) (Gerstenmeyer E., 2009).

| EXTRACCIÓN/HIDRÓLISIS | LARI (mg/kg) | PINO (mg/kg) |
|------------------------------|--------------|--------------|
| USE | 34.6 ± 2.6 | 196 ± 9 |
| USE + EH | 42.5 ± 1.6 | 407 ± 9 |
| ASE | 37.2 ± 1.5 | 166 ± 8 |
| ASE + EH | 49.5 ± 3.3 | 386 ± 18 |
| BH (hidróxido de sodio) | 24.0 ± 2.1 | 79.8 ± 6 |
| BH (hidróxido de sodio) + EH | 29.5 ± 2.1 | 253 ± 9 |
| BH (metóxido de sodio) | 39.8 ± 2.6 | 139 ± 1 |
| BH (metóxido de sodio) + EH | 42.7 ± 2.4 | 319 ± 9 |

Abreviaciones: USE, extracción mediante ultrasonido con etanol/agua (70/30 v/v);
 EH, Hidrólisis enzimática con b-glucuronidasa y celulasa;
 ASE, Extracción acelerada por solvente con etanol/agua (70/30 v/v);
 BH, Hidrólisis básica.

Extracción por fluidos supercríticos.

Este tipo de extracción, utiliza solventes en estado supercrítico, por lo que se denomina extracción mediante fluido supercrítico (SFE).

Varias ventajas están relacionadas con la extracción por SFE, como el uso de un agente de extracción respetuoso con el medio ambiente y la facilidad para recuperar el extracto. Similar a otras operaciones de extracción sólido-líquido, SFE requiere dos pasos básicos, que son el contacto del fluido supercrítico con la muestra y la separación del fluido que contiene los componentes extraídos del resto de la muestra. Además de esto, SFE incluye

un paso de intercambio de fluido o una etapa de precipitación donde los compuestos extraídos se recuperan del fluido supercrítico que no se puede utilizar directamente en la mayoría de los sistemas cromatográficos.

SFE se realiza con una instrumentación necesaria para generar un fluido supercrítico y también para controlar el movimiento del fluido. La instrumentación para SFE se desarrolla principalmente para el uso de CO₂ supercrítico porque el CO₂ tiene ventajas significativas con respecto al rango de temperaturas (desde ambiente hasta 100-120°C) y presiones utilizadas (desde aproximadamente 60 bar hasta más de 350 bar), no genera toxicidad, carece de reactividad no deseada, en comparación con las técnicas convencionales de extracción. SFE se aplica típicamente en muestras sólidas o semisólidas y se puede usar cuando la muestra tiene una matriz problemática, como materiales pegajosos o alquitranables. Además, SFE es útil para extraer sólidos en los que los analitos se encuentran en la mayor parte de la muestra o fuertemente adsorbidos en la superficie, materiales de origen vegetal o animal que contienen analitos encapsulados, etc. El SFE también se aplica cuando los analitos de interés son sensibles a la temperatura. También es posible la separación de compuestos no deseados que se pueden extraer mediante SFE de un material específico, mientras que los compuestos de interés permanecen en la muestra.

Teoría elemental de SFE

Un fluido se vuelve supercrítico cuando su temperatura y presión están por encima del punto crítico (temperatura crítica T_c y presión crítica p_c).

Los valores para T_c y p_c son característicos de cada compuesto. Algunos valores críticos para compuestos que pueden usarse en SFE se dan en la Tabla 4. Entre los compuestos que se pueden usar como fluidos supercríticos para la extracción, el CO_2 es el más común. En un fluido supercrítico, las fuerzas intermoleculares son menores que la energía cinética molecular y, por lo tanto, son insuficientes para la condensación del compuesto en un líquido.



Tabla 4: *Propiedades críticas de algunos fluidos.*

| Solvente | T_c (°C) | P_c (atm) |
|-----------------------------------|------------|-------------|
| CO_2 | 31.1 | 72.9 |
| N_2O | 36.5 | 71.1 |
| CHClF_2 (Freon-22) | 96 | 48.5 |
| CHF_3 (Freon-23) | 25.9 | 46.9 |
| CH_3OH | 240 | 78.5 |
| $i\text{-C}_3\text{H}_7\text{OH}$ | 235.2 | 47 |
| H_2O | 374.1 | 218.3 |
| SF_6 | 45.6 | 37 |
| C_3H_8 | 96.7 | 41.9 |
| $n\text{-C}_6\text{H}_{14}$ | 234.7 | 29.9 |

Sin embargo, el número de moléculas por unidad de volumen (en consecuencia, la densidad) puede ser el de un líquido, mientras que la tendencia a expandirse a medida que aumenta el volumen es similar a un gas. La densidad, viscosidad y coeficiente de difusión de los fluidos supercríticos son intermedios entre líquidos y gases, como se puede ver en la Tabla 5.

Tabla 5: Rangos aproximados para densidad, viscosidad y coeficiente de difusión de líquidos, fluidos supercríticos y gases.

| Fluido | Densidad (g/cm ³) | Viscosidad (g/cm/s) | Coefficiente de difusión (cm ² /s) |
|---------------------|-------------------------------|---|---|
| Gas | 0.6 - 2x10 ³ | 1 - 3x10 ⁻⁴ | 0,1 – 1 |
| Fluido Supercrítico | 0.2 - 0.9 0.6 - 1.6 | 1 - 3x10 ⁻³ | 0.1 - 5x10 ⁻⁴ |
| Líquido | (excepto metales) | 2x10 ⁻³ - 3x10 ⁻² | 0.2 - 3x10 ⁻⁵ |

La característica más importante para la utilización de cualquier disolvente en un procedimiento de extracción es su capacidad de solvatación. Por debajo de la temperatura crítica, las fases gaseosa y líquida coexisten, la energía del solvente para el gas es mínima y solo el líquido se usa como solvente. Para los fluidos supercríticos, la capacidad de solvatación está altamente relacionada con la densidad del fluido, mostrando un aumento significativo a medida que la densidad aumenta hacia la densidad crítica. La densidad

crítica para CO₂ es $\rho_c = 0.468$ g/mL, y el volumen crítico $V_c = 94$ mL/mol. La densidad de los fluidos supercríticos se puede variar en un rango relativamente amplio variando la presión.

Es común expresar las propiedades de un fluido supercrítico usando parámetros reducidos tales como temperatura reducida $T_r = T/T_c$, presión reducida $p_r = p/p_c$, volumen reducido $V_r = V/V_c$, y densidad reducida $\rho_r = \rho/r_c$. Como se muestra en la figura 7, a medida que aumenta la presión (expresada como presión reducida, p_r), la densidad (ρ) del fluido también aumenta.

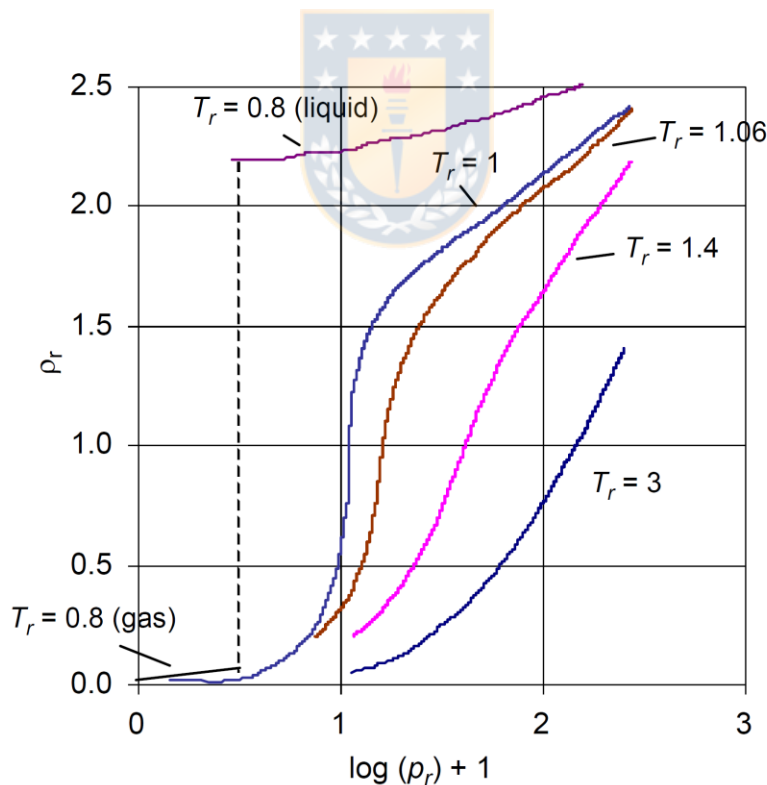


Figura 7: Variación de p_r para CO₂ en función de p_r para diferentes valores de T_r .

Sin embargo, para $T_r=0.8$ (Temperatura menor a la $T_{crítica}$), la formación de líquido es posible y un gran aumento en la presión no afecta significativamente la densidad (los líquidos no son compresibles).

Para $T_r=1$ (la temperatura es igual a la $T_{crítica}$), se observa un aumento significativo en la densidad con pequeños aumentos de presión por encima del valor de p_c .

Se desarrollaron varios modelos teóricos para proporcionar una guía con respecto a la solubilidad de un compuesto en fluidos supercríticos. Muy poco soluto se disuelve en un fluido supercrítico similar a un gas.

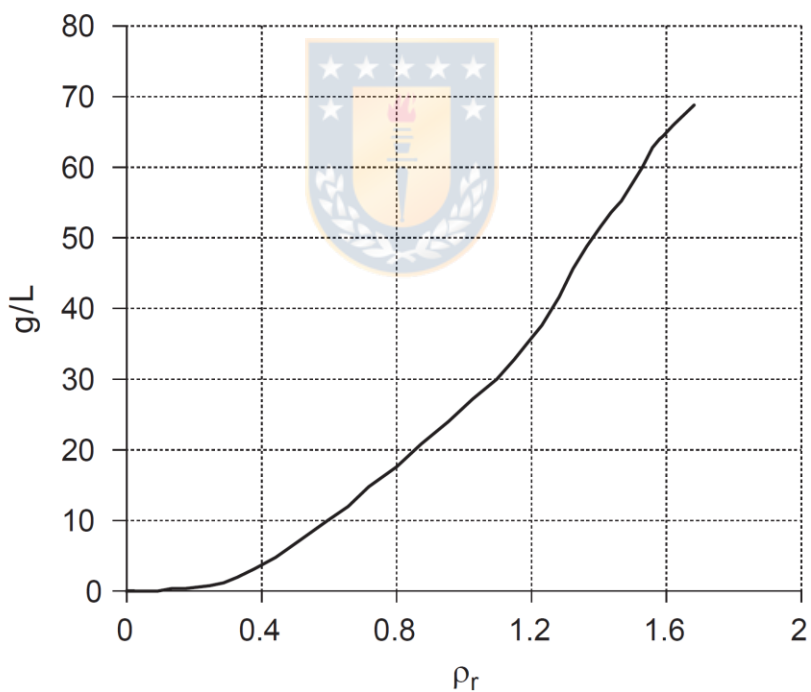



Figura 8: Variación de la solubilidad de naftaleno (g/L) en CO₂ como función de la densidad reducida ρ_r de un fluido a 45°C.

Solo cuando las propiedades de un fluido comienzan a ser líquidas, comienza a aumentar la solubilidad. El comportamiento líquido para el CO₂, por ejemplo, comienza solo cuando la densidad del fluido, ρ es 0.2-0.3 veces mayor que la del fluido supercrítico (densidad reducida $\rho_r > 0.2$). Esto se ilustra por la variación en la solubilidad del naftaleno en CO₂ a 45 °C como una función de la reducción de la densidad del fluido, que se muestra en la figura 8.

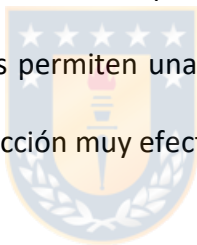
Por encima de la temperatura crítica, la potencia del disolvente de un fluido puede ajustarse modificando la densidad. La variación en la densidad de un fluido supercrítico influye directamente en la solubilidad para un compuesto dado, y también modifica la polaridad del disolvente. Se ha demostrado que el parámetro δ de solubilidad de Hildebrand varía con la densidad del fluido ρ según la relación:


$$\text{Ec.1} \quad \delta = 1.25\sqrt{p_c} \left(\rho / \rho_{\text{liq}} \right)$$

donde ρ_{liq} es la densidad común del líquido (que prácticamente no varía con la presión).

La ecuación 1 muestra que con el aumento en la densidad del fluido, el parámetro de solubilidad δ aumenta proporcionalmente. En consecuencia, se obtienen curvas similares a las que se muestran en la figura 7 cuando la variación del parámetro de solubilidad se traza con la presión ($\log p_r + 1$).

En base a la ecuación anterior, el valor resultante de δ para el CO₂ líquido es de alrededor de 10, mostrando propiedades de solubilidad similares a CS₂. La polaridad P' de CS₂ es 0.3, y el CO₂ líquido también es apolar. Esta característica ha sido probada experimentalmente para CO₂ líquido, y cuando se necesita un fluido de extracción más polar, se utiliza un fluido supercrítico diferente (como acetona supercrítica, metanol o amoníaco) o se agregan modificadores al CO₂ para aumentar su polaridad. Estos modificadores pueden ser disolventes polares tales como agua, metanol, etanol, acetona, dioxano, éter, etc., que típicamente se agregan en el intervalo de 5-30% v/v para la modificación de la polaridad. Debido a que el SFE se realiza con agentes líquidos que tienen propiedades de solvatación ajustables, y que los fluidos supercríticos tienen propiedades más parecidas al transporte gaseoso (viscosidad y difusión), éstos permiten una penetración eficiente de la muestra, volviendo a SFE una técnica de extracción muy efectiva.



Pasos en el proceso SFE

El SFE se utiliza en instrumentos que permiten las siguientes operaciones: (1) extracción de la muestra, (2) recolección del extracto en una trampa, y (3) enjuague de la trampa para generar un extracto que se utiliza adicionalmente para un análisis cromatográfico o para otros pasos de preparación de muestras. Los parámetros específicos de cada paso son interdependientes. La muestra (preferiblemente molida) se coloca en una celda de extracción.

La celda que contiene la muestra molida se introduce en una cámara de extracción. En la etapa de extracción, el CO₂ líquido se obtiene de un cilindro de gas comprimido y se mezcla adicionalmente con un modificador apropiado. Este líquido se introduce en la cámara de extracción a la presión y temperatura deseadas.

El fluido supercrítico se deja equilibrar. Después de esto, la muestra se expone a un flujo continuo del fluido de extracción. Después del proceso de extracción, el fluido supercrítico se transfiere a través de un restrictor a una trampa donde se recogen los analitos. Desde la trampa, los analitos normalmente se enjuagan con un disolvente apropiado para análisis cromatográficos adicionales o pasos de preparación de muestras (Moldovenau S., y David V., 2014).



Optimización de la extracción

La optimización de la extracción se realiza cambiando un número de parámetros de acuerdo con el objetivo del proceso de extracción. Este objetivo puede ser la extracción exhaustiva de analitos específicos, la extracción selectiva de analitos específicos en una matriz compleja, la recuperación de la muestra inicial "limpia", etc.

El término diseño experimental puede utilizarse en el contexto de la aplicación para determinar de una forma eficaz los valores óptimos de las condiciones experimentales que afecten a la obtención de un determinado producto o al desarrollo de un proceso concreto.

En este sentido, a las condiciones experimentales que se presentarán a continuación se les llama factores, que se pueden definir como las variables que se cambian de manera controlada para estudiar el efecto que tienen (o pueden tener) en las características de interés del producto o procesos en estudio. Los factores pueden ser tanto cuantitativos como cualitativos. Como en este diseño se toman en cuenta varios factores, el diseño experimental es una aproximación multivariante. Las características del producto o proceso que se quieren optimizar se llaman respuesta, mientras que el modelo que relaciona la respuesta con el efecto de los factores se llama función respuesta o superficie de respuesta. Dependiendo del objetivo de la extracción, los parámetros se ajustan para realizar una extracción de compuestos polares, apolares, extracción exhaustiva, etc. Los principales parámetros que se deben decidir para el paso de extracción son (1) la naturaleza y concentración del solvente de extracción (generalmente CO₂) y la del modificador, (2) la presión del fluido supercrítico, (3) la temperatura del fluido supercrítico introducido en el extractor, (4) el tiempo de extracción, y (5) la cantidad de muestra en el extractor. Se define una "densidad umbral" para la densidad del disolvente como la densidad mínima a la que el fluido supercrítico puede disolver un nivel detectable de soluto. La densidad umbral del fluido supercrítico necesario para un soluto, aumenta a medida que aumentan el punto de fusión del soluto y su peso molecular. La presión para cualquier extracción se selecciona de manera que la densidad del fluido esté por encima de la densidad umbral.

En muchos instrumentos que se controlan por computadora, en lugar de seleccionar una presión para la extracción, es posible seleccionar directamente una densidad, ajustando automáticamente la presión en consecuencia.

El poder de solvatación del CO₂ puro y el aumento de la presión de CO₂ generalmente se mejoran usando modificadores químicos añadidos al solvente. La naturaleza del modificador utilizado en SFE con CO₂ debe elegirse en función de la interacción del tipo de disolvente con la muestra (Al-Jabari M., 2002).

Se espera que los compuestos apolares se disuelvan bien en CO₂ supercrítico, y las mejoras en la extracción deben realizarse mediante la modificación de la densidad y la temperatura del disolvente. Para compuestos con moléculas polares sin grupos funcionales específicos, generalmente son necesarios modificadores polares. Los modificadores se eligen típicamente para que coincidan con el carácter del soluto, siendo los modificadores ácidos apropiados para los solutos básicos y los modificadores básicos para los solutos ácidos. Los alcoholes (como el metanol) o incluso el agua se usan con frecuencia como modificadores, aumentando tanto la polaridad como la capacidad de formar enlaces de hidrógeno del disolvente. La cantidad de modificador también es un elemento importante a considerar durante la extracción.

La variación en la solubilidad con la adición de un modificador no es lineal, y la cantidad generalmente se establece experimentalmente. Por ejemplo, se puede agregar hasta 20-30% de metanol al fluido supercrítico de CO₂, aunque la fracción molar del modificador generalmente se recomienda como máximo 15% para evitar la difusividad líquida y otras propiedades demasiado cerca de un líquido. Otro efecto de agregar modificadores polares

puede ser la hinchazón de la matriz, que puede ser necesaria con ciertas muestras (Fahmy T.M. y cols., 2009).

Además de la densidad y el modificador, la temperatura del disolvente también es importante para determinar la capacidad de solvatación de un fluido supercrítico. Un aumento en la temperatura típicamente aumenta la solubilidad. Además, los materiales fundidos se disuelven mejor que los sólidos, y si la temperatura es superior al punto de fusión de la sustancia a extraer (sin producir modificaciones químicas), la disolución se produce mejor. Sin embargo, para los solventes supercríticos, la temperatura también afecta la densidad del solvente (disminuyéndolo), y la influencia de la temperatura es más complicada.



En algunos casos, el aumento de temperatura afecta favorablemente el proceso de disolución. En otros casos, un soluto puede disolverse en un solvente supercrítico a una densidad dada, y con el aumento de la temperatura, la densidad disminuye de tal forma que el soluto puede precipitar del fluido. El aumento de la presión para mantener constante la densidad cuando aumenta la temperatura favorece el proceso de disolución. Para solutos con $MW > 350$ g/mol, es común que además de la elección de un modificador de fluido supercrítico apropiado, sea necesario aumentar la temperatura para una mejor solubilidad. El aumento de las temperaturas en el proceso de extracción afecta no solo la solubilidad de los analitos, sino también la eficacia al extraer los analitos de una matriz compacta. Esto se puede aplicar con éxito principalmente para compuestos volátiles y

semivolátiles que pueden tener extracciones significativamente mejores a temperaturas elevadas. Las temperaturas altas también aumentan la difusividad del fluido.

Este efecto puede ser beneficioso para extraer muestras con matrices encapsulantes. El aumento de la temperatura, aunque favorable para la disolución de la muestra, debe mantenerse por debajo de un valor que puede causar la formación de artefactos o incluso la descomposición de la muestra (del Valle, J.M. 2015).

En la Tabla 6 se brindan algunas pautas para la elección de los parámetros de extracción (Taylor L.T., 1996).

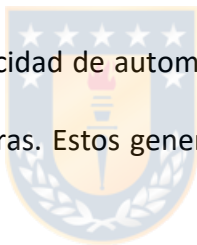
Tabla 6: Guía para la selección de parámetros de extracción en SFE.

| Volatilidad Intermedia (presión de vapor $p^0 \approx 1\text{mm}$ para $T^\circ = 35-145^\circ\text{C}$) | No volátiles (presión de vapor $p^0 < 1\text{mm}$ para $T^\circ = 35-145^\circ\text{C}$, apolar, bajo T_f , $MW < 300$) | No volátiles apolares, alto T_f , $MW > 300$) | No volátiles (polares) |
|---|---|--|---|
| *Baja densidad de CO2 *La temperatura es dominante | *La densidad puede ser dominante *Incremento de la T° puede ayudar (verificar formación de artefactos) *Modificador apolar | *CO2 alta densidad *Incremento de T° (verificar la formación de artefactos) *Modificador apolar | *CO2 de alta densidad *Incremento de T° (verificar formación de artefactos) *Modificador polar |

p^0 , presión de vapor; T_f , temperatura de fusión del soluto.

(Adaptado de Taylor LT, 1996).

Otro parámetro relacionado con la extracción es la cantidad de muestra seleccionada para la extracción. Esta cantidad depende del nivel de analitos a analizar en la muestra, la cantidad de muestra disponible y el volumen de la celda de extracción disponible para un modelo de instrumento específico. La celda se puede llenar completamente con la muestra y, si no hay suficiente muestra, con un material inerte (arena, sílice, tierra de diatomeas, sulfato de sodio, alúmina, relleno de columna de HPLC o GC, o incluso varillas de acero inoxidable) para rellenar el volumen no ocupado por la muestra. De esta forma, el consumo de dióxido de carbono es menor. También es posible dejar la celda parcialmente llena. Este enfoque tiene la desventaja de un mayor consumo de CO₂, pero el riesgo de contaminación es bajo y el flujo de fluido supercrítico está más disperso. Algunos instrumentos tienen la capacidad de automatización usando varias celdas que se pueden cargar con diferentes muestras. Estos generalmente se extraen secuencialmente (de Melo M.M.R., 2014).



Si se utiliza CO₂ puro como disolvente de extracción de SFE, se transfiere con una bomba a la cámara de extracción. Si se agrega un modificador al solvente, existen varios procedimientos para agregarlo. Algunos modificadores se proporcionan directamente en los cilindros de gas (en una concentración constante).

Se puede obtener una composición fluida mezclando en la línea de transferencia CO₂ puro y CO₂ con el modificador, la cual podría generar diferencias en la composición que ingresa a la celda, generando irreproducibilidad en la extracción. Una adición diferente del

modificador es el uso de una bomba separada (una bomba LC) que agrega continuamente el modificador puro al flujo de CO₂. Este procedimiento también permite la adición de una mezcla de disolventes como modificadores empleando bombas binarias o ternarias. La aplicación manual del modificador también es común. Este tipo de aplicación se realiza directamente en la muestra antes de la extracción (de Haan, A.B. y de Graauw, J. 1991).

Otro aspecto operacional es el de agregar el solvente directamente a la muestra. La adición se puede hacer en modo estático, en modo dinámico o mediante una combinación de ambos. Además, el volumen del fluido y el tiempo son parámetros importantes para la extracción. Una extracción típica comienza con el llenado de la celda de extracción con el fluido a la presión, composición y temperatura deseadas. Una vez que se completa el llenado al punto establecido, la muestra se mantiene estática en estas condiciones durante un período de tiempo indicado como "tiempo de equilibrio". El tiempo de equilibrio se elige dependiendo de la composición de la muestra y las dimensiones de la partícula. Un tiempo de 2-5 min es típico para el equilibrio. Al finalizar el tiempo de equilibrio, la muestra se expone a un flujo continuo del fluido de extracción mantenido a la densidad y temperatura de extracción. La cantidad de líquido nuevo necesario para barrer la muestra (expresada como flujo de masa de CO₂ en la bomba o el número de veces que se barre el solvente fresco a través de la muestra) depende de la eficiencia de la extracción (Aizpurua-Olaizola y cols, 2015).

Tiempos entre 5 y 10 minutos y flujos de alrededor de 2 g/min (en la bomba de CO₂) son típicos para una celda de 7 ml. Sin embargo, dependiendo de la densidad del fluido, la cantidad de volúmenes de barridos en la celda por el fluido varía considerablemente para la misma tasa de flujo de masa. El número de volúmenes llenados de la celda es un parámetro calculado que depende no solo del flujo de CO₂ y su densidad, sino también del volumen libre que queda en el cartucho después de la adición de la muestra (Dunford N. T., y cols., 2003).

Expansión del fluido y proceso de recolección en SFE



Después de realizar la extracción, el fluido supercrítico fluye a través de un restrictor hacia una trampa.

Un extremo del restrictor está a la presión elegida para la extracción, y el otro extremo está típicamente a presión atmosférica. El restrictor (boquilla) tiene una geometría especial tal que la expansión tiene lugar dentro de una región muy estrecha. De diferentes fabricantes, están disponibles varias construcciones para los restrictores, incluidos capilares, fritas, aberturas variables, etc. Durante la expansión, el CO₂ se convierte en gas, y los solutos se aíslan del fluido y se llevan a la trampa de recolección. Dado que los solutos pueden ser gases, líquidos o sólidos, el proceso de aislamiento se lleva a cabo de forma diferente, los sólidos que se depositan, los líquidos depositados o vaporizados y los

gases que permanecen en forma de gas. La temperatura del restrictor juega un papel importante en la forma en que se deposita el material y en el control del proceso. Es común que los instrumentos SFE tengan la capacidad de restringir el control de temperatura. El proceso de expansión está asociado a un proceso de enfriamiento debido a la evaporación de CO₂. Una baja temperatura del restrictor puede provocar la obstrucción del restrictor debido a la formación de hielo. Una temperatura que es demasiado alta también es indeseable debido a descomposiciones potenciales y debido a deposiciones rápidas de sólidos que pueden taponar el restrictor. Una selección apropiada de la temperatura del restrictor puede permitir la deposición adecuada de los solutos. Al ajustar la temperatura del restrictor ligeramente por debajo del punto de ebullición del modificador, también es posible obtener algo de condensación de disolvente en la salida del restrictor de manera que los solutos se disuelvan y se lleven adecuadamente a la trampa. Con el fin de evitar la deposición de los solutos en el restrictor, se han aplicado algunos otros procedimientos tales como la mezcla del efluente supercrítico en expansión con un disolvente orgánico sobrecalentado (Clifford A.A., 1998).

SFE para la extracción de compuestos fenólicos en matrices leñosas.

Los extractos de madera de pino están dominados por componentes apolares (Poncsak, S. y cols., 2009). Existe escasa información de la extracción de la madera de *Pinus* usando SC-

CO₂. Se ha reportado el uso de extracción de fluido supercrítico y extracción por líquidos presurizados para extraer antioxidantes de corteza de abedul (Krasutsky, P.A., 2006) y corteza de abeto (Co M. y cols., 2012), además, se ha caracterizado el contenido de flavonoides mediante SC-CO₂ de cortezas de pinos de diferentes regiones de Turquía y Alemania. Los extractos de la corteza de *P. pinea* cultivados en la ubicación más meridional y soleada presentaron los mayores contenidos de flavan-3-oles y la mayor actividad de eliminación de radicales (Yesil-Celiktas O. y cols., 2009a). La corteza de *Pinus brutia* se extrajo con SC-CO₂ con y sin etanol en el laboratorio y a escala piloto (Yesil-Celiktas O. y cols., 2009b), mientras que se empleó un proceso de dos etapas basado en el mismo enfoque para recuperar extractos antioxidantes de la corteza de *Pinus pinaster* (Braga M.E.M., y cols., 2008).



Conde y colaboradores (2013), evaluaron exitosamente la recuperación de compuestos fenólicos y lipofílicos a partir de muestras de madera de *Pinus pinaster*, utilizando CO₂ comprimido (puro o modificado con etanol). Los experimentos se llevaron a cabo en diferentes condiciones operativas para medir los efectos sobre el rendimiento y la composición de los extractos causados por las variables operativas más influyentes.

Extracción SFE con dióxido de carbono parece funcionar satisfactoriamente para los lignanos de baja a media polaridad tales como los obtenidos a partir *Schizandra chinensis*, para la extracción de arctigenina desde semillas y hojas. Además, la adición de metanol o etanol al dióxido de carbono mejora considerablemente la eficiencia de la extracción de

ciertos lignanos, en donde la adición de un 10% de etanol, mejora la extracción de lignanos en hasta un 87% (Lin C.-H., 2015). Además, SFE es un método conveniente para la eliminación de extractos hidrofóbicos, por ejemplo, de la linaza antes de una extracción adicional de lignanos con un disolvente polar (Willfor 2006). Un ejemplo es la extracción de Secoisolariciresinol diglucósido desde semillas de linaza desgrasadas usando CO₂ con etanol como modificador de polaridad (Comín L.M., 2011).

Separación preparativa y el aislamiento de los lignanos puros.



La preconcentración y la separación de los lignanos individuales en forma pura a menudo se desean para fines analíticos, y se exige para la caracterización estructural de lignanos desconocidos. El descubrimiento de que los nudos de varias especies de árboles contienen grandes cantidades de lignanos libres de agliconas ha proporcionado la oportunidad de aislar lignanos puros, incluso en cantidades de gramo. Es especialmente interesante el aislamiento a gran escala de HMR a partir de diferentes especies de abeto, ya que HMR se puede utilizar como un material de partida para la fabricación de otros lignanos (por ejemplo, MR, 7-hidroxi-Seco, Lari, cicolariciresinol (cLARI), ENL, END, 7-oxo-MR, e iso-HMR) (Smeds A., 2012). Los lignanos puros extraídos son valiosos no sólo como nuevos compuestos estándar para fines de análisis, sino también para bioensayos. El principio básico para el aislamiento de diferentes lignanos de nudos de árboles, es como sigue: La

madera nudosa se astilla, se seca mediante liofilización, y se muele (Willför S.M., 2004). Después se elimina la fracción hidrofóbica utilizando extracción con disolvente (hexano), los extractos hidrófilos se extraen con una mezcla de acetona-agua o con etanol. Los lignanos puros pueden ser obtenidos por cromatografía flash sobre columnas de sílice de fase normal y / o por cristalización en un disolvente adecuado (por ejemplo, diluir 2-propanol, metanol, o ciclohexano / etanol). HMR también puede precipitarse a partir de una solución de etanol por adición de acetato de potasio, logrando una pureza de 90-95% (Freudenberg K. y Knof L., 1957).

La cromatografía FLASH es un método de purificación de compuestos que se basa en la cromatografía líquida de media presión, a diferencia de los sistemas tradicionales por gravedad en columna que son mucho más lentos e ineficientes.

La cromatografía FLASH difiere de la cromatografía tradicional en columna abierta, básicamente por el tamaño de las partículas del soporte, que es menor, y en la mayor contrapresión causada por las mismas que obliga al uso de una fuente de presión para generar el caudal de fase móvil necesario en columna.

Las cromatografías de columna abierta de baja (LPLC), media (MPLC) y alta (HPLC) presión se pueden diferenciar esencialmente sobre la base del tamaño de partícula de la fase estacionaria y la consiguiente presión de funcionamiento de la columna de relleno. La LPLC se ejecuta con partículas de 40-200 μ m a una velocidad de flujo que no genera ninguna presión significativamente mayor que la presión atmosférica. La cromatografía de media presión (MPLC) utiliza partículas 25-40 μ m con presiones entre 75 y 600 psi, y la HPLC, se utiliza con partículas 3-12 μ m con presiones entre 500 y 3000 psi. La resolución de

la separación lograda por estas técnicas cromatográficas sigue el orden, HPLC>MPLC>LPLC. El tiempo de ejecución también se reduce considerablemente en el siguiente orden LPLC> MPLC> HPLC.

El diclorometano y el etanol en diferentes proporciones (por ejemplo, DCM / EtOH 98: 2; 95: 5) se ha utilizado exitosamente para la purificación de lignanos libres de aglicona tales como HMR y también para sesquilignanos (Eklund P.C., 2002). Otras mezclas de disolventes adecuados se pueden encontrar a partir de experimentos con cromatografía en columna y TLC.

Varias combinaciones y aplicaciones de la cromatografía de columna abierta, cromatografía líquida de presión media (MPLC), HPLC semipreparativa, HPLC preparativa y TLC preparativa también se han utilizado para aislar los lignanos. Por ejemplo, Owen y cols. (2000), aislaron lignanos a partir de aceite de oliva por TLC preparativa seguido por HPLC semipreparativa. Willför y cols. (2004) combinaron cromatografía flash (columnas de sílice de fase normal), MPLC (fase normal), y de HPLC semipreparativa de fase inversa polar (fenil unido a éter con capping terminal polar) para aislar varios sesquilignanos y lignanos de nudos de abeto.

Kawamura y cols. (1997) aislaron lignanos y sesquilignanos de madera de Tsuga del oeste por TLC preparativa y HPLC semipreparativa tanto en columnas de sílice de fase normal y de fase inversa. Takaku y cols. (2001) aislaron varios lignanos de brotes y hojas de ciprés hinoki usando cromatografía en columna con diferentes mezclas de disolventes: DCM / metanol, acetato de etilo / n-hexano y acetona / DCM, seguido por TLC (mismos

disolventes) y HPLC de fase inversa usando elución isocrática con acetonitrilo / agua (37:63 v/v).

En la separación preparativa de lignanos, se ha ocupado exitosamente tanto columnas en fase normal como de fase inversa (RP) C18. Sin embargo, Willför y colaboradores han demostrado que columnas de fase inversa C8, en algunos casos, les proporciona una mejor separación que C18 (Eklund P.C., 2004). El mismo trabajo sugiere, además, que el material de cadena aún más corto, como el C5, no mejora la separación. Las mezclas de disolventes adecuadas pueden ser, por ejemplo, metanol / agua, acetonitrilo / agua, acetonitrilo / metanol / agua, etanol / agua, n-hexano / cloroformo / metanol, o n-hexano / acetato de etilo en diferentes proporciones. También hacen mención que la elución isocrática y en gradiente pueden funcionar bien, dependiendo de la complejidad del extracto.



Identificación y cuantificación de lignanos.

Para la identificación y cuantificación de lignanos, tradicionalmente se ha utilizado HPLC con diferentes detectores (UV, fluorescencia, etc) las cuales pueden ser acopladas con MS y NMR. Smeds y cols. (2007) describió un método para cuantificar lignanos basado en LC-MS/MS. El método demostró ser preciso y exacto y podría ser usado para la determinación cuantitativa directa de SDG tanto en matrices simples como complejas. Hano y cols. (2006), utilizó LC-NMR-MS para identificar y caracterizar lignanos durante el crecimiento de la linaza. LC-MS ha sido ampliamente aceptada como la principal

herramienta de identificación, caracterización estructural y análisis cuantitativo de compuestos fenólicos. Usando un espectrómetro de masa para la detección, se generan una serie de ventajas, como la independencia de un cromóforo o fluoróforo, bajos límites de detección que el UV en la mayoría de los casos, la posibilidad de obtener información estructural y una fácil separación de picos coeluyentes usando la información de masa como segunda dimensión (Herchi W., 2014; Bendini A., 2007).

La sensibilidad de la respuesta de MS depende de la interfase utilizada. En el análisis de compuestos fenólicos mediante LC-MS, las interfaces de ionización a presión atmosféricas, como APCI y ESI, son las más utilizadas, en donde es posible utilizarlas con ionización positiva y negativa. En general, los compuestos fenólicos son detectados con gran sensibilidad en modo negativo, pero los resultados desde los modos de ionización positivo y negativo son complementarios y el modo positivo muestra fragmentos estructurales significativos (Stasevich O.V., 2009). Por otro lado, una ionización óptima no depende solamente de los parámetros de la interface, sino también de la fase móvil utilizada en la cromatografía. La composición de la fase móvil y su pH necesitan ser optimizados, ya que influyen directamente en la eficiencia de la ionización de los analitos.

En la mayoría de los casos, MS es usado en combinación con un detector UV para facilitar la identificación de compuestos con la ayuda de estándares y/o datos de referencia. MS/MS y MSⁿ involucran dos o más etapas de análisis de masa, separadas por un paso de fragmentación. En la tabla 7, se muestran los lignanos más estudiados, con sus respectivos patrones de fragmentación.

Tabla 7: Longitud de onda de máxima absorción y fragmentación en modo negativo para polifenoles y lignanos más comunes.

| Nº | COMPUESTO | MÁX. ABSOR. (nm) | [M-H] ⁻ | MS ² | MATRIZ | REFERENCIA |
|----|--|------------------|--------------------|---|---------------------------|----------------------|
| 1 | PINORESINOL | | 357 | 151 | CUESCOS ACEITUNA | Oliveras López, 2008 |
| 2 | ACETOXIPINORESINOL | | 415 | | CUESCOS ACEITUNA | Oliveras López, 2008 |
| 3 | HIDROXIPINORESINOL | | 373 | | CUESCOS ACEITUNA | Oliveras López, 2008 |
| 4 | HIDROXITIRO SOL | | 153 | 123 | ACEITE OLIVA | Oliveras López, 2014 |
| 5 | TIRO SOL | | 137 | 119 | ACEITE OLIVA | Oliveras López, 2014 |
| 6 | ALCOHOL HOMO VANÍLICO | | 167 | 137 | ACEITE OLIVA | Oliveras López, 2014 |
| 7 | ÁCIDO 4-OH-FENILACÉTICO | | 151 | 107 | ACEITE OLIVA | Oliveras López, 2014 |
| 8 | ÁCIDO 3,4-DI OH-FENILACÉTICO | | 167 | 123 | ACEITE OLIVA | Oliveras López, 2014 |
| 9 | ÁCIDO HOMO VANÍLICO | | 181 | 137 | ACEITE OLIVA | Oliveras López, 2014 |
| 10 | ÁCIDO 4-METOXI-FENILACÉTICO | | 165 | 137 | ACEITE OLIVA | Oliveras López, 2014 |
| 11 | OLEUROPEINA AGLICONA | | 539 | 377, 307, 275 | HOJAS OLIVO | Oliveras López, 2014 |
| 12 | OLEUROPEINA | | 377 | | HOJAS OLIVO | Oliveras López, 2014 |
| 13 | oleuropeína pentosa | | 690 | 149 (M-H-CH ₂ CH ₂ ph(OH) ₂ -CH ₃ COOH-CH ₃ OH)-, 177 (M-HCH ₂ CH ₂ ph(OH) ₂ -CH ₃ COOH,3H)-, 212 (M-H-CH ₂ CH ₂ ph(OH) ₂ -CH ₂ O)-, 259 (M-H-CH ₂ CH ₂ phOH)-, 377 (M-H-Glu-Pent)-, 539 (M-H-pent)- | HOJAS OLIVO | Lamzira, 2014 |
| 14 | hidroxioleuropeína | | 555 | 590 (M-H+Cl)-, 1110 (2M-H)- | HOJAS OLIVO | Lamzira, 2014 |
| 15 | hidroxioleuropeína (isomero) | | 555 | 590 (M-H+Cl)-, 1111 (2M-H)- | HOJAS OLIVO | Lamzira, 2014 |
| 16 | hidroxioleósido trimetil ester (isomero) | | 447 | 390 (M-3(CH ₃)-OH)-, 404 (M-2(CH ₃)-OH)-, 433 (M-CH ₃ -OH)-, 482 (M-H+Cl)-, 507 (M-H+CH ₃ COOH)-, 895 (2M-H)- | HOJAS OLIVO | Lamzira, 2014 |
| 17 | oleuropeína | | 539 | 574 (M-H+Cl)-, 599 (M-H+CH ₃ COOH)- | HOJAS OLIVO | Lamzira, 2014 |
| 18 | oleuropeína (isomer 1) | | 539 | 575 (M-H+Cl)- | HOJAS OLIVO | Lamzira, 2014 |
| 19 | oleuropeína (isomer) | | 539 | 575 (M-H+Cl)-, 1178 (2M-H)- | HOJAS OLIVO | Lamzira, 2014 |
| 20 | Hidroxitirosol hexosido | | 315 | 153 | DRUPAS, PASTA OLIVA | Kanakis, 2013 |
| 21 | Hidroxitirosol | | 153 | 123 | TODO OLIVA | Kanakis, 2013 |
| 22 | Tirosol | | 137 | | TODO OLIVA | Kanakis, 2013 |
| 23 | Tirosol hexosido | | 299 | | DRUPAS, PASTA OLIVA | Kanakis, 2013 |
| 24 | Hidroxitirosol acetato | | 195 | | ACEITE OLIVA | Kanakis, 2013 |
| 25 | Oleuropeína | | 539 | 377.1239 (C ₁₉ H ₂₁ O ₈ , 9.5) 307.0821 (C ₁₅ H ₁₅ O ₇ , 8.5) 275.0923 (C ₁₅ H ₁₅ O ₅ , 8.5) | DRUPAS, PASTA OLIVA | Kanakis, 2013 |
| 26 | Apigenin-7-O-hexosido | | 431 | 269 | DRUPAS OLIVA | Kanakis, 2013 |
| 27 | Apigenin-7-O-hexosil rhamnosido | | 577 | 269 | DRUPAS, PASTA OLIVA | Kanakis, 2013 |
| 28 | Luteolin | | 285 | 217.0515 (C ₁₂ H ₉ O ₄ , 8.5) 199.0401 (C ₁₂ H ₇ O ₃ , 9.5) 175.0398 (C ₁₀ H ₇ O ₃ , 7.5) | TODO OLIVA | Kanakis, 2013 |
| 29 | Apigenin | | 269 | | TODO OLIVA | Kanakis, 2013 |
| 30 | b-Metoxilforfostosido E | 282 | 491 | MS2[491]: 459(100), 441(1), 325(30), 265(4), 235(2), 163(8), 151(2) | FRUTOS <i>F. suspensa</i> | Hui Guo, 2007 |
| 31 | Rutin O-hexosido | | 771 | MS2[771]: 609(100) | FRUTOS <i>F. suspensa</i> | Hui Guo, 2007 |
| 32 | Pinoresinol diglucosido | 284 | 681 | MS2[681]: 519(100), 357(20) | FRUTOS <i>F. suspensa</i> | Hui Guo, 2007 |
| 33 | (+)-1-Hidroxi pinoresinol-4'-O-glucósido | 230 | 535 | MS2[535]: 373(100), 343(8), 313(6) | FRUTOS <i>F. suspensa</i> | Hui Guo, 2007 |
| 34 | (+)-Pinoresinol O-glucosido | 230 | 519 | MS2[519]: 357(100) | FRUTOS <i>F. suspensa</i> | Hui Guo, 2007 |
| 35 | Matairesinosido | 232 | 519 | MS2[519]: 357(100) | FRUTOS <i>F. suspensa</i> | Hui Guo, 2007 |
| 36 | Arctiin | 234 | 593 | MS2[593]: 533(28), 371(100) | FRUTOS <i>F. suspensa</i> | Hui Guo, 2007 |
| 37 | Matairesinol | | 357 | MS2[357]: 342(60), 313(100), 298(30), 209(80) | PREP. SINTÉTICA | Ecklund, 2008 |
| 38 | 7-oxomatairesinol | | 371 | MS2[371]: 356(100), 327(50), 205(60) | PREP. SINTÉTICA | Ecklund, 2008 |
| 39 | Enterolactona | | 297 | MS2[297]: 253(100), 187(17) | PREP. SINTÉTICA | Ecklund, 2008 |
| 40 | 7-Hidroxi matairesinol | | 373 | MS2[373]: 355(100), 311(13) | PREP. SINTÉTICA | Ecklund, 2008 |
| 41 | Secoisolariciresinol | | 361 | MS2[361]: 346(90), 331(14), 313(30), 165(100), 179(30) | PREP. SINTÉTICA | Ecklund, 2008 |
| 42 | Enterodiol | | 301 | MS2[301]: 271(15), 253(100) | PREP. SINTÉTICA | Ecklund, 2008 |
| 43 | Lariciresinol | | 359/329 | MS2[329]: 299(35), 284(20), 192(30), 178(100), 160(30) | PREP. SINTÉTICA | Ecklund, 2008 |

Referencias

Adlercreutz, H. (2007). Lignans and human health. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 44(5-6), 483–525. <http://doi.org/10.1080/10408360701612942>

Adolphe, J. L., Whiting, S. J., Juurlink, B. H. J., Thorpe, L. U., Alcorn, J. (2010). Health effects with consumption of the flax lignan secoisolariciresinol diglucoside. *The British Journal of Nutrition*, 103(7), 929–938. <http://doi.org/10.1017/S0007114509992753>

Aizpurua-Olaizola O., Ormazabal M., Vallejo A., Olivares M., Navarro P., Etxebarria N., Usobiaga A. (2015). Optimization of supercritical fluid consecutive extractions of fatty acids and polyphenols from *Vitis vinifera* grape wastes. *Journal of Food Science*. 80, 101–107.

Alexandru, L., Binello, A., Mantegna, S., Boffa, L., Chemat, F., Cravotto, G. (2014). Efficient green extraction of polyphenols from post-harvested agro-industry vegetal sources in Piedmont. *Comptes Rendus Chimie*, 17(3), 212–217. <http://doi.org/10.1016/j.crci.2013.09.012>

Al-Jabari M. (2002). Kinetic models of supercritical fluid extraction. *Journal of Separation Science*. 25, 477–489.

Arranz, S., Saura-Calixto, F., Shaha, S., Kroon, P. A. (2009). High contents of nonextractable polyphenols in fruits suggest that polyphenol contents of plant foods have been underestimated. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(16), 7298–7303. <http://doi.org/10.1021/jf9016652>

Atkinson, D. A., Hill, H. H., Shultz, T. D. (1993). Quantification of mammalian lignans in biological fluids using gas chromatography with ion mobility detection. *Journal of Chromatography*, 617(2), 173–179. [http://doi.org/10.1016/0378-4347\(93\)80485-M](http://doi.org/10.1016/0378-4347(93)80485-M)

Ayella, A., Lim, S., Jiang, Y., Iwamoto, T., Lin, D., Tomich, J., Wang, W. (2010). Cytostatic inhibition of cancer cell growth by lignan secoisolariciresinol diglucoside. *Nutrition Research*, 30(11), 762–769. <http://doi.org/10.1016/j.nutres.2010.10.002>

Bedell, S., Nachtigall, M., Naftolin, F. (2014). The pros and cons of plant estrogens for menopause. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 139, 225–236. <http://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2012.12.004>

Bendini, A., Cerretani, L., Carrasco-Pancorbo, A., Gómez-Caravaca, A. M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Lercker, G. (2007). Phenolic molecules in virgin olive oils: A survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and

analytical methods. An overview of the last decade. *Molecules*, 12(8), 1679–1719. <http://doi.org/10.3390/12081679>

Boukroufa, M., Boutekedjiret, C., Petigny, L., Rakotomanomana, N., Chemat, F. (2015). Bio-refinery of orange peels waste: A new concept based on integrated green and solvent free extraction processes using ultrasound and microwave techniques to obtain essential oil, polyphenols and pectin. *Ultrasonics Sonochemistry*, 24, 72–79. <http://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.11.015>

Braga, M.E.M., Santos, R.M.S., Seabra, I.J., Facanali, R., Marques, M.O.M., de Sousa, H.C. (2008). Fractioned SFE of antioxidants from maritime pine bark. *Journal of Supercritical Fluids*, 47, 37-48.

Buck, K., Vrieling, A., Zaineddin, A. K., Becker, S., Hušing, A., Kaaks, R., Chang-Claude, J. (2011). Serum enterolactone and prognosis of postmenopausal breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 29(28), 3730–3738. <http://doi.org/10.1200/JCO.2011.34.6478>

Chan J.K.W., Bittner S., Bittner A., Atwal S., Shen W.-J., Inayathullah M., Rajada J., Nicolls M.R., Kraemer F.B., Azhar S. (2018) Nordihydroguaiaretic acid, a lignan from *Larrea tridentata* (Creosote bush) protects against ALIOS diet-induced metabolic dysfunction in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 365 (2) 281-290.

Charlet, S., Bensaddek, L., Raynaud, S., Gillet, F., Mesnard, F., Fliniaux, M. A. (2002). An HPLC procedure for the quantification of anhydrosecoisolariciresinol. Application to the evaluation of flax lignan content. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(3), 225–229. [http://doi.org/10.1016/S0981-9428\(02\)01368-2](http://doi.org/10.1016/S0981-9428(02)01368-2)

Choi, Y. H., Kim, J., Yoo, K.-P. (2003). High Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization MS-MS Analysis of *Forsythia koreana* Fruits, Leaves, and Stems. Enhancement of the Efficiency of Extraction of Arctigenin by Use of Supercritical-Fluid Extraction. *Chromatographia*, 57, 73–79.

Clavel, T., Henderson, G., Alpert, C. A., Philippe, C., Rigottier-Gois, L., Doré, J., Blaut, M. (2005). Intestinal bacterial communities that produce active estrogen-like compounds enterodiol and enterolactone in humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10), 6077–6085. <http://doi.org/10.1128/AEM.71.10.6077-6085.2005>

Clavel, T., Henderson, G., Engst, W., Doré, J., Blaut, M. (2006). Phylogeny of human intestinal bacteria that activate the dietary lignan secoisolariciresinol diglucoside. *FEMS Microbiology Ecology*, 55(3), 471–478. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2005.00057.x>

Clifford, A.A.(auth.), Ramsey E.D.(eds.). (1998). *Analytical Supercritical Fluid Extraction Techniques*. Springer Science+Business Media Dordrecht. DOI 10.1007/978-94-011-4948-8.

Co, M., Fagerlund, A., Engman, L., Sunnerheim, K., Sjöberg, P.J.R., Turner, C. (2012). Extraction of antioxidants from spruce (*Picea abies*) bark using eco-friendly solvents. *Phytochemical Analysis*, 23, 1-11.

Comin, L.M., Temelli, F., Saldaña, M.A. (2011). Supercritical CO₂ extraction of flax lignans. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88, 707-715.

Coran, S., Giannellini, V., Bambagiotti-Alberti, M. (1996). A Novel Monitoring Approach for Mammalian Lignan Precursors in Flaxseed. *Pharmaceutical Sciences*, 529–532.

Corbin, C., Fidel, T., Leclerc, E. a., Barakzoy, E., Sagot, N., Falguières, A., Hano, C. (2015). Development and validation of an efficient ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from flax (*Linum usitatissimum L.*) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*. <http://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.02.008>

Dall'Acqua, S., Cervellati, R., Loi, M. C., Innocenti, G. (2008). Evaluation of in vitro antioxidant properties of some traditional Sardinian medicinal plants: Investigation of the high antioxidant capacity of *Rubus ulmifolius*. *Food Chemistry*, 106(2), 745–749. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.055>

de Haan A.B., de Graauw J. (1991). Mass transfer in supercritical extraction columns with structured packings for hydrocarbon processing. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 30, 2463–2470.

de Melo M.M.R., Silvestre A.J.D., and Silva C. (2014). Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. *The Journal of Supercritical Fluids*. 92, 115–176.

De Melo, M. M. R., Silvestre, a. J. D., Silva, C. M. (2014). Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. *The Journal of Supercritical Fluids*, 92, 115–176. <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.04.007>

del Valle J.M. (2015). Extraction of natural compounds using supercritical CO₂: Going from the laboratory to the industrial application. *The Journal of Supercritical Fluids*. 96, 180–199.

Demartino, M. (2005). Lignan Natural Products. In Baran Group Meeting.

Domingues, R. M. a, Oliveira, E. L. G., Freire, C. S. R., Couto, R. M., Simões, P. C., Neto, C. P., Silva, C. M. (2012). Supercritical fluid extraction of *Eucalyptus globulus* bark-A promising approach for triterpenoid production. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(6), 7648–7662. <http://doi.org/10.3390/ijms13067648>

Draganescu D., Dodi G., Stoica I. Popa M.I. (2017). Hydrolysis studies of flaxseed extract by High Performance Liquid Chromatography. *Cellulose Chem. Technol.*, 51 (9-10), 803-811.

Dunford, N.T., King, J.W., List, G.R. (2003). Supercritical fluid in food engineering, in: Tzia, C., Liadakis, G. (editors). *Extraction Optimization in Food Engineering*, cap. 3, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Durazzo, A., Turfani, V., Azzini, E., Maiani, G., Carcea, M. (2013). Phenols, lignans and antioxidant properties of legume and sweet chestnut flours. *Food Chemistry*, 140(4), 666–671. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.062>

Eklund, P. C., Willför, S. M., Smeds, A. I., Sundell, F. J., Sjöholm, R. E., Holmbom, B. R. (2004). A new lariciresinol-type butyrolactone lignan derived from hydroxymatairesinol and its identification in spruce wood. *Journal of Natural Products*, 67(6), 927–931. <http://doi.org/10.1021/np0340706>

Eklund, P., Lindholm, A., Mikkola, J., Smeds, A., Lehtila, R. (2003). from the Natural Lignan Hydroxymatairesinol, 0–2.

Ekman, R., Willför, S., Sjöholm, R., Reunanen, M., Mäki, J., Lehtilä, R., Eckerman, C. (2002). Identification of the lignan nortrachelogenin in knot and branch heartwood of scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Holzforschung*, 56(3), 253–256. <http://doi.org/10.1515/HF.2002.041>

Eliasson, C., Kamal-Eldin, A., Andersson, R., Åman, P. (2003). High-performance liquid chromatographic analysis of secoisolariciresinol diglucoside and hydroxycinnamic acid glucosides in flaxseed by alkaline extraction. *Journal of Chromatography A*, 1012(2), 151–159. [http://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)01136-1](http://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)01136-1)

Fahmy, T.M., Paulaitis, M.E., Johnson, D.M., McNally, M.E.P. (1993). Modifier effects in the supercritical fluid extraction of solutes from clay, soil, and plant materials. *Analytical Chemistry*, 65, 1462-1649.

Feng, J., Shi, Z., Ye, Z. (2008). Effects of metabolites of the lignans enterolactone and enterodiol on osteoblastic differentiation of MG-63 cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 31(6), 1067–1070. <http://doi.org/10.1248/bpb.31.1067>

Ford, J. D., Huang, K. S., Wang, H. B., Davin, L. B., Lewis, N. G. (2001). Biosynthetic pathway to the cancer chemopreventive secoisolariciresinol diglucoside - Hydroxymethyl glutaryl ester-linked lignan oligomers in flax (*Linum usitatissimum*) seed. *Journal of Natural Products*, 64(11), 1388–1397. <http://doi.org/10.1021/np010367x>

Gaya P.; Peirotén A.; Medina M.; Landete J.M. (2017) *Bifidobacterium adolescentis* INIA P784: The first probiotic bacterium capable of producing enterodiol from lignan extracts. *Journal of Functional Foods*, 29: 269-274.

Gerstenmeyer, E., Reimer, S., Berghofer, E., Schwartz, H., Sontag, G. (2013). Effect of thermal heating on some lignans in flax seeds, sesame seeds and rye. *Food Chemistry*, 138(2-3), 1847–1855. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.117>

Gonzales, G. B., Smagghe, G., Raes, K., Camp, J. Van. (2014). Combined Alkaline Hydrolysis and Ultrasound-Assisted Extraction for the Release of Nonextractable Phenolics from Cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) Waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

Großkinsky, D. K., van der Graaff, E., Roitsch, T. (2012). Phytoalexin transgenics in crop protection-Fairy tale with a happy end? *Plant Science*, 195, 54–70. <http://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.06.008>

Halstead, C. W., Lee, S., Khoo, C. S., Hennell, J. R., Bensoussan, a. (2007). Validation of a method for the simultaneous determination of four schisandra lignans in the raw herb and commercial dried aqueous extracts of *Schisandra chinensis* (Wu Wei Zi) by RP-LC with DAD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45(1), 30–37. <http://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.05.016>

Hano, C., Martin, I., Fliniaux, O., Legrand, B., Gutierrez, L., Arroo, R. R. J., Lainé, E. (2006). Pinoresinol-lariciresinol reductase gene expression and secoisolariciresinol diglucoside accumulation in developing flax (*Linum usitatissimum*) seeds. *Planta*, 224(6), 1291–1301. <http://doi.org/10.1007/s00425-006-0308-y>

Heinonen, S., Nurmi, T., Liukkonen, K., Poutanen, K., Wähälä, K., Deyama, T., Adlercreutz, H. (2001). In vitro metabolism of plant lignans: New precursors of mammalian lignans enterolactone and enterodiol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(7), 3178–3186. <http://doi.org/10.1021/jf010038a>

Herchi, W., Arráez-Román, D., Trabelsi, H., Bouali, I., Boukhchina, S., Kallel, H., Fernández-Gutierrez, A. (2014). Phenolic compounds in flaxseed: a review of their properties and analytical methods. An overview of the last decade. *Journal of Oleo Science*, 63(1), 7–14. <http://doi.org/10.5650/jos.ess13135>

Herrera, C. (2014). Tesis para optar al grado de Bioquímico de la Universidad de Concepción.

Hiltunen, E., Pakkanen, T. T., Alvila, L. (2004). Phenolic extractives from wood of birch (*Betula pendula*). *Holzforschung*, 58(3), 326–329. <http://doi.org/10.1515/HF.2004.050>

Jin, J. S., Hattori, M. (2011). A new mammalian lignan precursor, asarinin. *Food Chemistry*, 124(3), 895–899. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.015>

Johnsson, P., Kamal-Eldin, A., Lundgren, L. N., Åman, P. (2000). HPLC method for analysis of secoisolariciresinol diglucoside in flaxseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5216–5219. <http://doi.org/10.1021/jf0005871>

Kamal-Eldin, A., Peerlkamp, N., Johnsson, P., Andersson, R., Andersson, R. E., Lundgren, L. N., Åman, P. (2001). An oligomer from flaxseed composed of secoisolariciresinoldiglucoside and 3-hydroxy-3-methyl glutaric acid residues. *Phytochemistry*, 58(4), 587–590. [http://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00279-5](http://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00279-5)

Kanakis, P., Termentzi, A., Michel, T., Gikas, E., Halabalaki, M., Skaltsounis, A. L. (2013). From olive drupes to olive Oil An HPLC-orbitrap-based qualitative and quantitative exploration of olive key metabolites. *Planta Medica*, 79(16), 1576–1587. <http://doi.org/10.1055/s-0033-1350823>

Karacabey, E., Mazza, G., Bayindirli, L., Artik, N. (2012). Extraction of Bioactive Compounds from Milled Grape Canes (*Vitis vinifera*) Using a Pressurized Low-Polarity Water Extractor. *Food and Bioprocess Technology*, 5(1), 359–371. <http://doi.org/10.1007/s11947-009-0286-8>

Kawamura, F., Kawai, S., Ohashi, H. (1997). SESQUILIGNANS AND LIGNANS FROM TSUGA HETEROPHYLLA. *Pergamon*, 44(7), 1351–1357.

Krasutsky, P.A. (2006). Birch bark research and development. *Natural Product Reports*, 23, 919-942.

Kraushofer, T., Sontag, G. (2002). Determination of some phenolic compounds in flax seed and nettle roots by HPLC with coulometric electrode array detection. *European Food Research and Technology*, 215(6), 529–533. <http://doi.org/10.1007/s00217-002-0606-y>

Kuhnle, G. G. C., Dell'Aquila, C., Runswick, S. a., Bingham, S. a. (2009). Variability of phytoestrogen content in foods from different sources. *Food Chemistry*, 113(4), 1184–1187. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.004>

Kuijsten, A., Arts, I. C. W., Hollman, P. C. H., Van't Veer, P., Kampman, E. (2006). Plasma enterolignans are associated with lower colorectal adenoma risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 15(6), 1132–1136. <http://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0991>

Kuijsten, A., Arts, I. C. W., van't Veer, P., Hollman, P. C. H. (2005). The relative bioavailability of enterolignans in humans is enhanced by milling and crushing of flaxseed. *The Journal of Nutrition*, 135(12), 2812–2816.

Kwon, M., Davin, L. B., Lewis, N. G. (2001). In situ hybridization and immunolocalization of lignan reductases in woody tissues: Implications for heartwood formation and other forms

of vascular tissue preservation. *Phytochemistry*, 57(6), 899–914. [http://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00108-X](http://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00108-X)

Lamzira, Z., Ghabbour, N., Rokni, Y., Thonart, P., Chihib, N. E., Berrabah, M., Asehrou, A. (2014). Characterization of phenolic profile of moroccan picholine olive variety. *Journal of Materials and Environmental Science*, 5(2), 490–497.

Landete, J. M. (2012). Plant and mammalian lignans: A review of source, intake, metabolism, intestinal bacteria and health. *Food Research International*, 46(1), 410–424. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.12.023>

Liggins, J., Grimwood, R., Bingham, S. a. (2000). Extraction and quantification of lignan phytoestrogens in food and human samples. *Analytical Biochemistry*, 287(1), 102–109. <http://doi.org/10.1006/abio.2000.4811>

Lin, C.-H., Lin, H.-W., Wu, J.-Y., Houg, J.-Y., Wan, H.-P., Yang, T.-Y., Liang, M.-T. (2015). Extraction of lignans from the seed of *Schisandra chinensis* by supercritical fluid extraction and subsequent separation by supercritical fluid simulated moving bed. *The Journal of Supercritical Fluids*, 98, 17–24. <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.12.025>

Lin, X., Switzer, B. R., Demark-Wahnefried, W. (2001). Effect of mammalian lignans on the growth of prostate cancer cell lines. *Anticancer Research*, 21(6 A), 3995–3999.

Lineberger C.G., Bowers L.W., Ford N.A., Rossi E., Kimler B., Fabian C., Hursting S.D. (2017) The polyphenolic plant lignan secoisolariciresinol diglycoside reduces mammary tumor growth, possibly via inhibition of local inflammatory signaling. *Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting 2017; 2017 Apr 1-5; Washington, DC. Philadelphia (PA): AACR:Abstract nr 231. doi:10.1158/1538-7445.AM2017-231.*

Martini, S., D'Addario, C., Colacevich, A., Focardi, S., Borghini, F., Santucci, A., Rossi, C. (2009). Antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* strains and antioxidant properties of blackberry leaves (*Rubus ulmifolius*) and isolated compounds. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 34(1), 50–59. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.01.010>

Masoudi N., Tabarrai M., Niktabe Z., Dehghan S., Khodadoost M. (2018) Antitumor Effects of Flaxseed in Iranian Traditional Medicine and Contemporary Medicine; a Brief Review. *Research Journal of Pharmacognosy*, 5(1)71-77.

Mazur, W. M., Wähälä, K., Rasku, S., Salakka, a, Hase, T., Adlercreutz, H. (1998). Lignan and isoflavonoid concentrations in tea and coffee. *The British Journal of Nutrition*, 79(1), 37–45. <http://doi.org/10.1079/BJN19980007>

Mazur, W., Fotsis, T., Wähälä, K., Ojala, S., Salakka, a, Adlercreutz, H. (1996). Isotope dilution gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of isoflavonoids, coumestrol, and lignans in food samples. *Analytical Biochemistry*, 233(2), 169–180. <http://doi.org/10.1006/abio.1996.0025>

Mazzaferro, L. S., Breccia, J. D. (2012). Quantification of hesperidin in citrus-based foods using a fungal diglycosidase. *Food Chemistry*, 134(4), 2338–2344. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.107>

Milder, I. E. J., Arts, I. C. W., van de Putte, B., Venema, D. P., Hollman, P. C. H. (2005). Lignan contents of Dutch plant foods: a database including lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol and matairesinol. *The British Journal of Nutrition*, 93(3), 393–402. <http://doi.org/10.1079/BJN20051371>

Moldoveanu, S. and David, V. (2014). *Modern Sample Preparation for Chromatography*. Elsevier Science.

Moura A.F., Lima K.S.B., Sousa T.S., Marinho-Filho J.D.B., Pessoa C., Silveira E.R., Pessoa O.D.L., Costa-Lotufu L.V., Moraes M.O., Araújo A.J. (2018) In vitro antitumor effect of a lignan isolated from *Combretum fruticosum*, trachelogenin, in HCT-116 human colon cancer cells. *Toxicology in Vitro*, 47:129-136, ISSN 0887-2333.

Muhit M.A., Umehara K., Noguchi H. (2018). α -Keto tetrahydrofuran lignan glucosides from the Bangladeshi medicinal plant *Terminalia citrina* inhibit estradiol (E2) induced proliferation in cancer cells. *Phytochemistry*. 145:161-167.

Nurmi, T., Heinonen, S., Mazur, W., Deyama, T., Nishibe, S., Adlercreutz, H. (2003). Lignans in selected wines. *Food Chemistry*, 83(2), 303–309. [http://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00222-X](http://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00222-X)

Oliveras López, M. J., Innocenti, M., Ieri, F., Giaccherini, C., Romani, A., Mulinacci, N. (2008). HPLC/DAD/ESI/MS detection of lignans from Spanish and Italian *Olea europaea* L. fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(1), 62–70. <http://doi.org/10.1016/j.jfca.2007.04.012>

Oliveras-López, M.-J., Berná, G., Jurado-Ruiz, E., López-García de la Serrana, H., Martín, F. (2014). Consumption of extra-virgin olive oil rich in phenolic compounds has beneficial antioxidant effects in healthy human adults. *Journal of Functional Foods*, 10, 475–484. <http://doi.org/10.1016/j.jff.2014.07.013>

Opletal, L., Sovová, H., Bártlová, M. (2004). Dibenzo[a,c]cyclooctadiene lignans of the genus *Schisandra*: Importance, isolation and determination. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 812(1-2 SPEC. ISS.), 357–371. <http://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.07.040>

Oszmiański, J., Wojdyło, A., Gorzelany, J., Kapusta, I. (2011). Identification and characterization of low molecular weight polyphenols in berry leaf extracts by HPLC-DAD and LC-ESI/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(24), 12830–12835. <http://doi.org/10.1021/jf203052j>

Owen, R. W., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W. E., Spiegelhalder, B., Bartsch, H. (2000). Identification of lignans as major components in the phenolic fraction of olive oil. *Clinical Chemistry*, 46(7), 976–988.

Peñalvo, J. L., Adlercreutz, H., Uehara, M., Ristimaki, A., Watanabe, S. (2008). Lignan content of selected foods from Japan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(2), 401–409. <http://doi.org/10.1021/jf072695u>

Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F. (2005). Literature data may underestimate the actual antioxidant capacity of cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(12), 5036–5040. <http://doi.org/10.1021/jf050049u>

Pietrofesa RA, Chatterjee S, Park K, Arguiri E, Albelda SM, Christofidou-Solomidou M. (2018) Synthetic Lignan Secoisolariciresinol Diglucoside (LGM2605) Reduces Asbestos-Induced Cytotoxicity in an Nrf2-Dependent and -Independent Manner. *Antioxidants*; 7(3):38.

Poncsak, S., Kocaefe, D., Simard, F., Pichette, A. (2009). Evolution of extractive composition during thermal treatment of Jack pine. *Journal of Wood Chemistry and Technology* 29, 251-264.

Popova, I. E., Hall, C., Kubátová, a. (2009). Determination of lignans in flaxseed using liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(2), 217–229. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.11.063>

Raffaelli, B., Hoikkala, a, Leppälä, E., Wähälä, K. (2002). Enterolignans. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 777(1-2), 29–43.

Ramos-Jerz, M. D. R., Villanueva, S., Jerz, G., Winterhalter, P., Deters, A. M. (2013). *Persea americana* Mill. Seed: Fractionation, Characterization, and Effects on Human Keratinocytes and Fibroblasts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, 2013, 391247. <http://doi.org/10.1155/2013/391247>

Sarker, S. D., Nahar, L. (2012). An Introduction to Natural Products Isolation. In *Natural Products Isolation, Methods in Molecular Biology* (Vol. 864, pp. 1–25). <http://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1>

Schwartz, H., Sontag, G. (2011). Analysis of Lignans in Food Samples-Impact of Sample Preparation. *Current Bioactive Compounds*, 7(3), 156–171. <http://doi.org/10.2174/157340711796817904>

Schwartz, H., Sontag, G., Plumb, J. (2009). Inventory of phytoestrogen databases. *Food Chemistry*, 113(3), 736–747. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.051>

Se Suh W., Kwon O.K., Lee T.H., Subedi L., Kim S.Y., Lee K.R. (2018) Secoiridoid Glycosides from the Twigs of *Ligustrum obtusifolium* Possess Anti-inflammatory and Neuroprotective Effects. *Chem. Pharm. Bull.* 66(1):78-83.

Seidel, V., Windhövel, J., Eaton, G., Alfermann, a. W., Arroo, R. R. J., Medarde, M., Woolley, J. G. (2002). Biosynthesis of podophyllotoxin in *Linum album* cell cultures. *Planta*, 215(6), 1031–1039. <http://doi.org/10.1007/s00425-002-0834-1>

Sirotkin, A. V., Harrath, A. H. (2014). Phytoestrogens and their effects. *European Journal of Pharmacology*, 741, 230–236. <http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.057>

Slanina, J., Glatz, Z. (2004). Separation procedures applicable to lignan analysis. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 812(1-2 SPEC. ISS.), 215–229. <http://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.06.047>

Smeds, A. I., Eklund, P. C., Willför, S. M. (2012). Content, composition, and stereochemical characterisation of lignans in berries and seeds. *Food Chemistry*, 134(4), 1991–1998. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.133>

Smeds, A. I., Eklund, P. C., Sjöholm, R. E., Willför, S. M., Nishibe, S., Deyama, T., Holmbom, B. R. (2007). Quantification of a broad spectrum of lignans in cereals, oilseeds, and nuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(4), 1337–1346. <http://doi.org/10.1021/jf0629134>

Stasevich, O. V., Mikhalenok, S. G., Kurchenko, V. P. (2009). Isolation of secoisolariciresinol diglucoside from lignan-containing extract of *Linum usitatissimum* seeds. *Chemistry of Natural Compounds*, 45(1), 21–23. <http://doi.org/10.1007/s10600-009-9217-1>

Takaku, N., Choi, D. H., Mikame, K., Okunishi, T., Suzuki, S., Ohashi, H., Shimada, M. (2001). Lignans of *Chamaecyparis obtusa*. *Journal of Wood Science*, 47(6), 476–482. <http://doi.org/10.1007/BF00767901>

Taylor L.T. (1996) *Supercritical Fluid Extraction*. John Wiley & Sons Ltd., New York.

Thompson, L. U., Rickard, S. E., Cheung, F., Kenaschuk, E. O., Obermeyer, W. R. (1997). Variability in anticancer lignan levels in flaxseed. *Nutrition and Cancer*, 27(1), 26–30. <http://doi.org/10.1080/01635589709514497>

Toure, A., Xueming, X. (2010). Flaxseed Lignans: Source, Biosynthesis, Metabolism, Antioxidant Activity, Bio-Active Components, and Health Benefit. *COMPREHENSIVE REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND FOOD SAFETY*, 9, 261–269.

Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231–1246. <http://doi.org/10.3390/nu2121231>

Tura, D., Robards, K. (2002). Sample handling strategies for the determination of biophenols in food and plants. *Journal of Chromatography A*, 975(1), 71–93. [http://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00879-8](http://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00879-8)

Umezawa, T. (2003). Diversity in lignan biosynthesis. *Phytochemistry Reviews*, 2(3), 371–390. <http://doi.org/10.1023/B:PHYT.0000045487.02836.32>

Valsta, L. M., Kilkkinen, A., Mazur, W., Nurmi, T., Lampi, A.-M., Ovaskainen, M.-L., Pietinen, P. (2003). Phyto-oestrogen database of foods and average intake in Finland. *The British Journal of Nutrition*, 89 Suppl 1, S31–S38. <http://doi.org/10.1079/BJN2002794>

Vergara, C., Von Baer, D., Mardones, C., Wilkens, A., Wernekinck, K., Damm, A., Winterhalter, P. (2012). Stilbene levels in grape cane of different cultivars in southern Chile: Determination by HPLC-DAD-MS/MS method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(4), 929–933. <http://doi.org/10.1021/jf204482c>

Vivas, N., Nonier, M. F., Pianet, I., Vivas de Gaulejac, N., Fouquet, É. (2006). Structure of extracted lignins from oak heartwood (*Quercus petraea* Liebl., *Q. Robur* L.). *Comptes Rendus Chimie*, 9(9), 1221–1233. <http://doi.org/10.1016/j.crci.2006.02.005>

Wang, C.-Z., Ma, X.-Q., Yang, D.-H., Guo, Z.-R., Liu, G.-R., Zhao, G.-X., Liu, S.-L. (2010). Production of enterodiol from defatted flaxseeds through biotransformation by human intestinal bacteria. *BMC Microbiology*, 10, 115. <http://doi.org/10.1186/1471-2180-10-115>

Weltje, G. J., Tjallingii, R. (2008). Calibration of XRF core scanners for quantitative geochemical logging of sediment cores: Theory and application. *Earth and Planetary Science Letters*, 274(3-4), 423–438. <http://doi.org/10.1016/j.epsl.2008.07.054>

Willför, S., Hemming, J., Reunanen, M., Eckerman, C., Holmbom, B. (2003). Lignans and lipophilic extractives in Norway spruce knots and stemwood. *Holzforschung*, 57(1), 27–36. <http://doi.org/10.1515/HF.2003.005>

Willför, S., Reunanen, M., Eklund, P., Sjöholm, R., Kronberg, L., Fardim, P., Holmbom, B. (2004). Oligolignans in Norway spruce and Scots pine knots and Norway spruce stemwood. *Holzforschung*, 58(4), 345–354. <http://doi.org/10.1515/HF.2004.053>

Wu, W. H. (2007). The contents of lignans in commercial sesame oils of Taiwan and their changes during heating. *Food Chemistry*, 104(1), 341–344. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.11.055>

Xie, L.-H., Ahn, E.-M., Akao, T., Abdel-Hafez, A. A.-M., Nakamura, N., Hattori, M. (2003). Transformation of arctiin to estrogenic and antiestrogenic substances by human intestinal bacteria. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 51(4), 378–384. <http://doi.org/10.1248/cpb.51.378>

Yesil-Celiktas, O., Otto, F., Gruener, S., Parlar, H.(2009b). Determination of extractability of pine bark using supercritical CO₂ extraction and different solvents: Optimization and prediction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 341-347.

Yesil-Celiktas, O., Otto, F., Parlar, H. (2009a). A comparative study of flavonoid contents and antioxidant activities of supercritical CO₂ extracted pine barks grown in different regions of Turkey and Germany. *European Food Research and Technology*, 229, 671-677.



CAPITULO 2: HIPOTESIS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO:



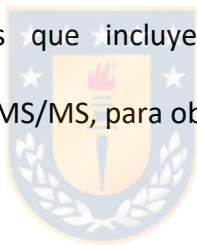
En base a los antecedentes planteados y discutidos en la sección precedente, se plantea la siguiente hipótesis para la presente Tesis:

Hipótesis

“Es posible revalorizar los desechos leñosos de las industrias olivícola (huesos de aceituna), vitivinícola (sarmientos), zaramoras y forestal, como fuente potencial de lignanos de actividad farmacológica”.

Objetivo general.

Desarrollar metodologías analíticas que incluyen diversos sistemas extractivos y caracterización mediante HPLC-DAD-MS/MS, para obtener un extracto rico en lignanos.



Objetivos específicos.

1. *Establecer un método HPLC-DAD-MS/MS para la identificación y cuantificación de lignanos.*
2. *Desarrollo y optimización de métodos exhaustivos para la extracción de lignanos (Soxhlet, Extracción sólido-líquido asistido por ultrasonido y Extracción por fluido supercrítico).*
3. *Desarrollo y validación de metodologías para evaluación de capacidad antioxidante de extractos producidos*
4. *Comparar diversos métodos de extracción en matrices de interés para obtención de extractos ricos en lignanos*
5. *Desarrollo y validación de metodología para determinación de capacidad antioxidante y polifenoles totales en extractos ricos en lignanos.*

CAPITULO 3: ESTRATEGIA ANALÍTICA PARA DETERMINACIÓN DE LIGNANOS EN MATRICES LIGNOCELULÓSICAS.



De acuerdo a los objetivos planteados, la estrategia se puede dividir en 5 etapas (figura 9).

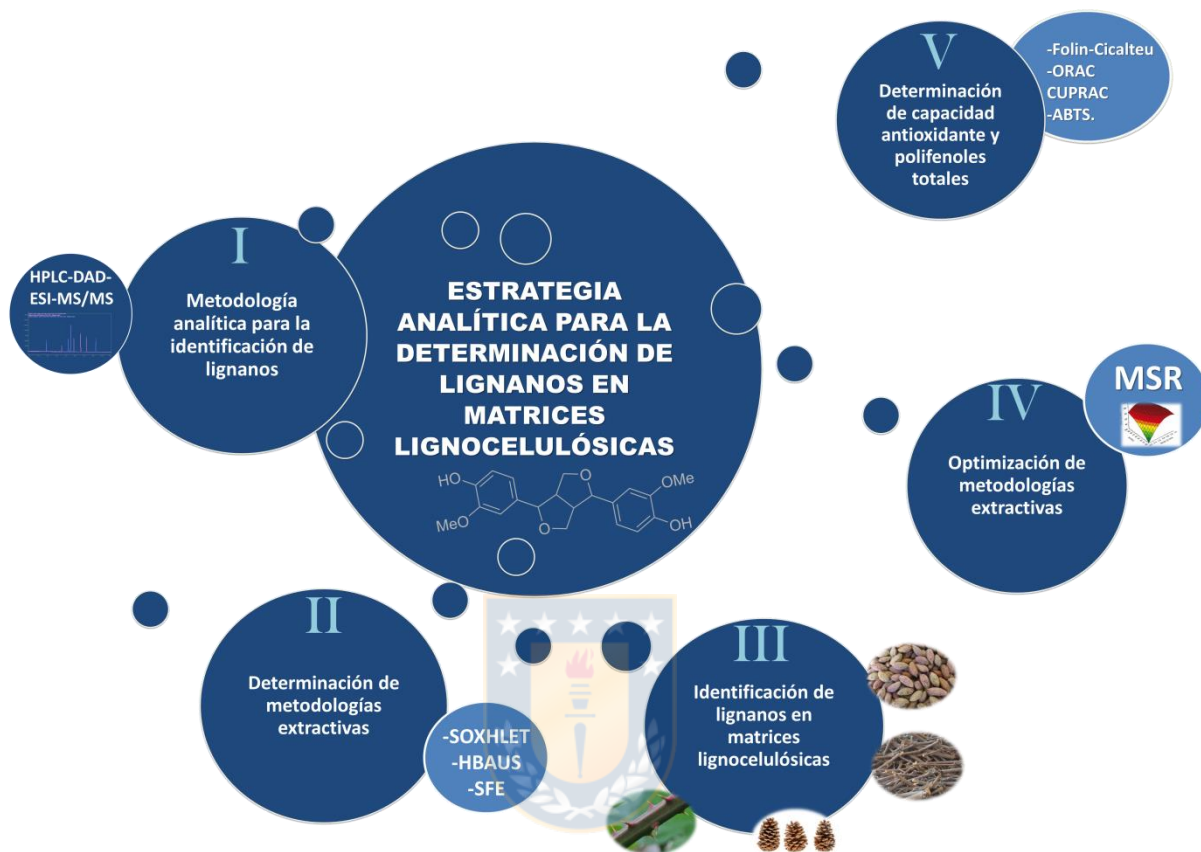


Figura 9: Estrategia analítica para la determinación de lignanos en matrices lignocelulósicas.

I. Implementación de metodología analítica para la identificación de lignanos:

Se implementará una metodología basada en HPLC-DAD-ESI-MS/MS para la separación e identificación de los lignanos presentes en las muestras, con el fin de determinar su identidad y concentración. Para esto, se determinarán las condiciones óptimas de separación e identificación.

II.- Determinación de metodologías extractivas:

Se tomarán en cuenta la implementación de metodologías clásicas ampliamente utilizadas para la extracción de lignanos, como la extracción por Soxhlet y extracción por hidrólisis (básica y ácida) acoplada a ultrasonido, las que se compararán con la extracción por fluido supercrítico, en donde se determinarán sus cualidades.

III.- Identificación de lignanos en matrices lignocelulósicas:

Para la búsqueda de lignanos, se tomará como criterio, matrices lignocelulósicas que sean consideradas desechos, como, por ejemplo, la mazorca del maíz, cuercos de aceituna, sarmientos de vides, tallos y hojas de zarzamoras, paja de trigo, cascara de avena, cáscara de piñón, borra de café y desechos de la industria forestal, principalmente nudos, corteza y conos de *Pinus radiata*. Para esto se realizarán screening con las tres metodologías extractivas propuestas anteriormente en búsqueda de lignanos, con el fin de optimizar las que generen mejores resultados.

IV.- Optimización de metodologías extractivas:

Una vez identificadas las matrices con mejores resultados en las pruebas preliminares, se procederá a realizar una optimización de las metodologías extractivas tomando como objetivo la mayor concentración de lignanos totales, utilizando modelos matemáticos de superficie de respuesta.

V.- Desarrollo y validación de metodología para determinación de capacidad antioxidante y polifenoles totales en extractos:

Se caracterizará el potencial antioxidante in vitro de los extractos a través de distintos ensayos de capacidad antioxidante (ORAC, CUPRAC Y Folin-Ciocalteu).



CAPÍTULO 4: RESULTADOS



4.1.- Desarrollo de una metodología analítica por HPLC-DAD-ESI-MS/MS para la determinación de lignanos en matrices lignocelulósicas.

Resumen

Los lignanos son una clase de metabolitos secundarios de plantas producidos por la dimerización oxidativa de dos unidades fenilpropanoides. Se han encontrado en muchas plantas de la medicina oriental, por lo que, como consecuencia del conocimiento reciente, se sostiene que los lignanos son responsables de las principales actividades farmacológicas de estas plantas, lo que ha aumentado el interés, estos últimos años en sus propiedades. En el presente capítulo, se describen los avances en el montaje de la metodología HPLC-DAD-ESI-MS/MS, para la búsqueda de lignanos en matrices lignocelulósicas como punto de partida, en donde se logra la identificación y cuantificación de algunos lignanos. Dentro de las matrices ensayadas, se utilizaron cuescos y alperujo de industria olivícola; sarmientos de vides, paja de trigo, borra de café, cascara de avena, mazorca de maíz; nudos, conos y corteza de pino radiata; sarmientos y espinas de zarzamora y cascara de piñón. De las matrices ensayadas, solo se encontraron lignanos en los desechos de aceitunas y de pino radiata. Si bien los resultados para estas matrices no son relevantes en lo que respecta la concentración de lignanos, son igualmente interesantes debido a que se identificaron otros compuestos que pueden tener un alto potencial debido a sus propiedades biológicas y no se encuentran reportados en literatura, como es el caso de los extractos de sarmientos y espinas de zarzamora (*Rubus ulmifolius*) y cáscara de piñón (semilla de *Araucaria araucana*).

Materiales y métodos.

Muestreo y almacenamiento:

Los sarmientos fueron obtenidos de la poda de viñedos provenientes de la región del Biobío y almacenados a 4°C, luego de ser cortados, triturados y molidos a un tamaño de partícula inferior a 20 mesh.

Las muestras de desechos de la industria olivícola, se obtuvieron de la empresa Indugras S.A., la cual entregó los huesos de aceituna molida, los cuales se liofilizaron y almacenaron a -20°C.

La borra de café, paja de trigo y cascara de avena fueron entregados por la Unidad de Desarrollo Tecnológico (UDT), los cuales fueron triturados, secados y luego pasados por un molino hasta obtener un tamaño menos a 20 mesh. Las muestras se liofilizaron y almacenaron a -20°C.

La zarzamora se recolectó de terrenos cercanos a la Universidad de Concepción, los cuales fueron cortados y almacenados a -20°C. Luego se trituraron y molieron hasta un tamaño inferior a 20 mesh, para luego ser liofilizados y almacenados a -20°C.

Las muestras de pino radiata (conos, corteza y nudos) fueron recolectadas desde bosques de la zona de Bulnes en la región del Biobío. Las muestras se trituraron y molieron hasta un tamaño inferior a 20 mesh, para luego ser liofilizados y almacenados a -20°C.

Las muestras de piñon, fueron compradas en el comercio local, las cuales fueron almacenadas a -20°C para su posterior utilización.

Reactivos y estándares

Todas las soluciones para análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se prepararon en agua desionizada a 18 MΩ. Se obtuvieron acetonitrilo de grado HPLC, etanol p.a., metanol p.a., ácido fórmico, de Merck (Darmstadt, Alemania). Los estándares de pinosinol, matairesinol, pinosinol diglucósido, lariciresinol, hidroximatairesinol, secoisolariciresinol se obtuvieron de Phytolab (Vestenbergsgreuth, Alemania).

Método de extracción

Para el screening de lignanos en las matrices en estudio, se utilizaron las muestras secas y molidas, se tomaron 2 gramos de muestra por cada ensayo y se realizó la extracción mediante un sistema Soxhlet tradicional con metanol y se dejó en reflujo por 12 horas. Cada extracto se analizó por triplicado y se identifican los principales compuestos mediante HPLC-DAD-MS/MS.

Identificación de compuestos de interés

Para identificar los compuestos fenólicos, y específicamente lignanos, se adaptó un HPLC-DAD con detección a múltiples longitudes de onda, tomando especial atención a 280 nm. Se emplearon columnas C18, de 250mm x 4.6mm y 5µm de tamaño de partícula, con el fin de encontrar una óptima separación. Se evaluaron varios gradientes utilizando dos fases móviles: A (0.1% de ácido fórmico en agua) y B (acetonitrilo). Las condiciones finales de operación serán acopladas a un método de detección por espectrometría de masas

utilizando un triple cuadrupolo con trampa de iones en modo negativo (ESI-MS/MS). La optimización de la metodología de detección de lignanos se realizó mediante ESI-MS/MS, se desarrolló en primer lugar con la creación de un método de ionización mediante infusión directa de los estándares comerciales disponibles. Con un flujo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ en una jeringa de 4,6 mm de diámetro interno se optimizaron parámetros asociados al compuesto cómo, diferencia de potencial entre el Skimmer y orifice plate, potencial de entrada a Q0, potencial de entrada a celda de colisión, gases y energía de colisión. En una segunda etapa se procede mediante análisis por inyección en flujo (FIA) a inyector 20 μL de los mismos estándares en un flujo de 0.5 ml/min de fase móvil, en su composición inicial, y se procede a optimizar los parámetros asociados a la Fuente de ionización, como, voltaje de electrodo, flujo de N_2 en el gas nebulizador, flujo y temperatura del gas auxiliar, así como el flujo del gas Cortina.

Para la cuantificación de lignanos, se utilizarán patrones disponibles comercialmente, en caso de no encontrar algunos de importancia, se procederá a utilizar equivalentes disponibles o se recurrirá, en última instancia, a la búsqueda bibliográfica.

Resultados

Metodología HPLC-DAD-ESI-MS/MS para identificación de lignanos y de compuestos de interés en matrices de desecho.

Los extractos fueron analizados utilizando un sistema UHPLC/HPLC Shimadzu Nexera equipado con una bomba de elusión cuaternaria (LC-30AD), una unidad desgasificadora

(DGU-20A5R), un horno de columna Prominence CTO-20 AC, un autosampler SIL-30AC y un detector de arreglo de diodos UV-vis acoplado en serie con un detector espectrométrico de masa de triple cuadrupolo (QTrap 3200, Applied Biosystems MDS Sciex, Dublin, CA, USA). El control de los instrumentos y la adquisición e los datos se realizo mediante los softwares Class-VP DAD Shimadzu Chromatography Data System y Analyst MS/MS analysis. Las condiciones de separación, utilizando una columna de núcleo sólido Kinetex C18 (150 × 4.6 mm, 2.6 μm) con su precolumna (Phenomenex, Torrance, CA, USA), fueron a 25 °C, con un volumen de inyección de 50 μL. Las fases móviles consistían en 0.1% v/v ácido fórmico en agua (solvente A) y acetonitrilo (solvente B). Los gradientes fueron optimizados dependiendo de la matriz en estudio. El flujo de fase móvil fue de 0.5 mL/min.

Las condiciones finales para la detección por (ESI)-MS/MS se realizó mediante ionización negativa a -3500 V, temperatura de secado a 350 °C, flujo de gas nebulizador a 40 a.u. y auxiliar a 20 a.u., y rango de barrido de masas entre m/z 100 and 1500.

La identificación de los compuestos se realizó mediante la comparación de espectros de masas y UV-vis con los encontrados en referencias bibliográficas, o comparando con los estándares comercialmente disponibles.

Screening de lignanos y otros compuestos de interés en matrices lignocelulósicas de desecho

Como se puede observar en la tabla N°8, de las matrices estudiadas, solo en desechos de la industria olivícola y forestal se encontraron lignanos de interés mediante espectrometría de masas.

Tabla 8: Screening de compuestos fenólicos y lignanos en matrices de desechos

| Matrices | Principales compuestos detectados por HPLC-DAD-MS/MS | |
|---|--|--|
| | Compuestos fenólicos | Lignanos |
| Desechos de industria olivícola | | |
| Cuscos y alperujo | Derivados de oleurósidos y oleorupeína Ácidos fenólicos | Pinoresinol hidroxipinoresinol hidroximatairesinol |
| Desechos de industria vitivinícola | | |
| Sarmientos de vides | Proantocanidinas Estilbenos | No detectado |
| Desechos varios de industria agrícola | | |
| Paja de trigo | Ácidos hidroxicinámicos | No detectado |
| Cascara de avena | Ácidos hidroxicinámicos | No detectado |
| Mazorca de maíz | Antocianinas | No detectado |
| Sarmientos de zarza | Flavonoles Ácidos fenólicos Flavan-3-oles | No detectado |
| Borra de café | | No detectado |
| Cascaras de piñón | Flavonoles Flavan-3-oles Flavona | No detectado |
| Desechos de industria forestal <i>P. radiata</i> | | |
| Nudos, piñas, corteza | Estilbenos Flavonoides Ácidos fenólicos Taninos | Nortrachelogenina, matairesinol Hidroximatairesinol Lariciresinol,Secoisolariciresinol |

Dentro de las matrices ensayadas que no se lograron identificar lignanos, dos en particular llaman la atención por su composición. La primera son los sarmientos y espinas de zarza (*Rubus ulmifolius*), de la cual existen reportes de su caracterización a nivel de flores y hojas, pero nada del sarmiento, lo cual nos permitirá comprender de manera más globalizada la distribución de los metabolitos secundarios de la planta, con el fin de enfocar y maximizar la extracción de analitos de interés biológico. La tabla 9 y figura 10 resume los analitos identificados tentativamente por HPLC-DAD-ESI-MS. En el análisis de compuestos presentes en el extracto resalta la alta presencia de ácidos fenólicos y flavonoides, principalmente quercetina, rhamnetina y kaempferol, lo cual se respalda con lo encontrado en literatura para hojas y flores (Mertz C., 2007, Tallinni L.R., 2015, Martins A., 2014), es necesario acotar que los picos analizados corresponden exclusivamente a compuestos mayoritarios, por lo que se podría inferir que los extractos poseen una alta concentración de flavonoides. A futuro se plantea la cuantificación de estos polifenoles y la determinación de su capacidad antioxidante, lo que permitiría tomarlo en cuenta como una posible fuente de materia prima para la obtención de antioxidantes naturales.

La otra matriz de interés, es la semilla de *Araucaria araucana* (piñón), de la cual no existe hasta el momento algún trabajo que caracterice sus compuestos, sólo se ha realizado un análisis químico proximal al fruto, pero sin entrar más en detalles de las moléculas presentes. Las semillas de piñón están compuestas por almidón (64%), fibra dietética (25%), azúcar total (7%) y muy bajas concentraciones de compuestos fenólicos, lípidos, proteínas y fibra cruda (Henriquez C., 2008). Si bien la semilla en si no presenta cantidades importantes de polifenoles, es en su cáscara, donde hemos podido identificar compuestos

que son de interés (Tabla 10 y figura 11), principalmente catequinas, epicatequinas, galocatequinas, quercetina y miricetina, los cuales fueron encontrados tanto en los extractos metanólicos, como en el agua de la cocción del piñón. Otro compuesto interesante de profundizar, es la presencia de Amentoflavona, biflavonoide con actividad quimiopreventiva antiinflamatoria, antiviral y contra el cáncer. Inhibe la vascularización de los tumores al bloquear la actividad de los VEGF angiogénicos. Bloquea la inducción de COX-2 y regula por incremento PPAR- γ . Es un modulador negativo del receptor GABAA en el sitio de unión de las benzodiazepinas (Cao Q., 2017; . Lee C.G., 2017; Chien K.J., 2018).

Tabla 9: Identificación tentativa por HPLC-DAD-ASI-MS/MS de los extractos metanólicos de sarmientos y espinas de *Rubus umifolius*.

| N° | Tr' | Compuesto | [M-H] ⁻ | MS ² |
|----|-------|---------------------------------------|--------------------|--|
| 1 | 6.25 | Ac. Cafeoil shikimico | 353 | 191 179 173 135 111 |
| 2 | 10.18 | Catequina | 289 | 271 245 203 179 161 146 123 |
| 3 | 11.78 | Procianidina B1 | 577 | 555 451 425 407 381 339 289 281 245 203 161 151 137 |
| 4 | 13.34 | Epicatequina | 289 | 271 245 227 212 203 187 161 137 129 123 115 |
| 5 | 14.28 | N.D. | 355 | 255 229 185 179 161 151 133 117 |
| 6 | 17.11 | N.D. | 305 | 273 245 229 217 201 161 145 |
| 7 | 18.37 | Quercetina | 433 | 300 283 272 229 |
| 8 | 19.38 | Qercetin 3-O-Rhamnosido | 447 | 300 284 303 257 |
| 9 | 20.80 | Ac. Ellagico | 301 | 284 229 185 157 |
| 10 | 21.72 | Quercetin-O-Glucósido | 463 | 323 300* 271 255 243 179 161 151 |
| 11 | 23.23 | Ac. Ellagico | 301 | 284 257 185 157 |
| 12 | 26.61 | Isorhamnetin-3-Rhamnósido | 461 | 315 300 271 |
| 13 | 29.83 | N.D. | 341 | 326 311 298 283 |
| 14 | 32.20 | Kaempferol | 575 | 431 394 347 327 287 271 243 229 217 175 161 125 |
| 15 | 33.04 | N.D. | 695 | 487 469 427 407 353 323 |
| 16 | 36.93 | Kaempferol-3-O-glucosido-7-Rhamnosido | 593 | 447 327 307 285* 255 227 145 |

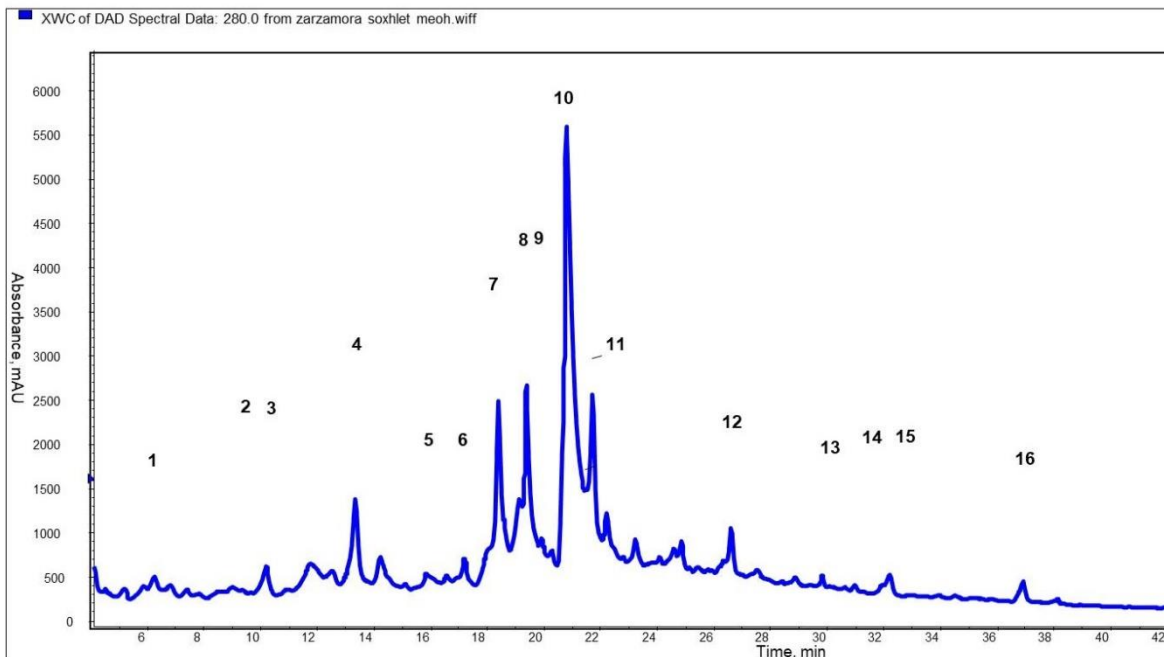


Figura 10: Cromatograma HPLC de extracto metanólico de zarzamora, identificado a 280nm. La identificación de los picos se encuentra desglosadas en la tabla 9.

Tabla 10: Identificación por HPLC-DAD-ESI-MS/MS de extracto metanólico de semillas de *Araucaria araucana*.

| N° | Tr' | Compuesto | [M-H] ⁻ | MS ² |
|----|-------|----------------------------------|--------------------|---|
| 1 | 6.88 | N.D. | 443 | |
| 2 | 8.1 | Galocatequina | 305 | 261 219 167 137 125 |
| 3 | 10.26 | Catequina | 289 | 271 245 227 203 161 137 125 |
| 4 | 12.4 | Epicatequina | 577 | 451 425 407 381 339 289 245 255 203 161 |
| 5 | 13.5 | Procianidina B1 | 289 | 271 245 227 203 161 125 |
| 6 | 14.9 | N.D. | 319 | 259 239 180 |
| 7 | 18.03 | N.D. | 359 | - |
| 8 | 25.5 | N.D. | 551 | |
| 9 | 28.3 | Dimero Catequina/Epicatequina | 573 | 285 447 325 555 529 485 429 385 377 293 281 255 175 161 133 125 |
| 10 | 29.1 | Miricetina | 317 | 271 192 179 151 137 |
| 11 | 36.8 | Quercetina | 301 | 284 273 229 179 163 151 137 |
| 12 | 39.7 | N.D. | 299 | 282 271 199 151 |
| 13 | 49.4 | Amentoflavona | 537 | 375 443 417 345 331 317 281 |

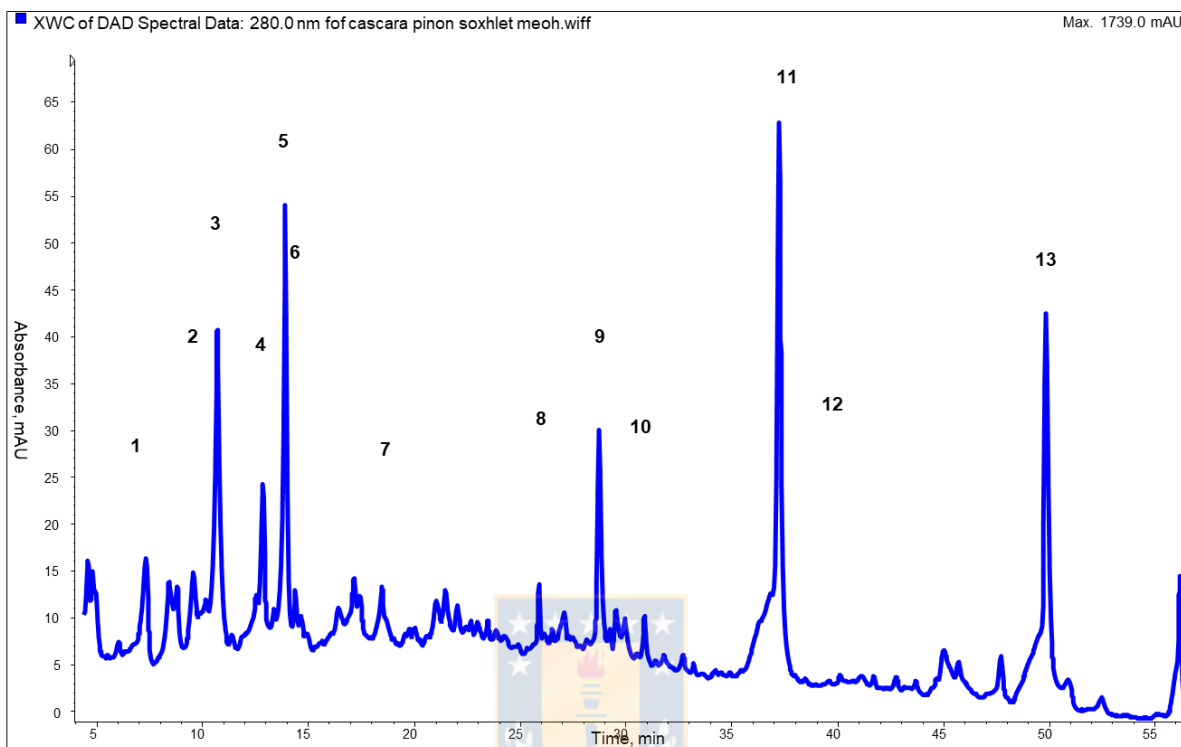


Figura 11: Cromatograma HPLC-DAD a 280nm de extracto metanólico de cáscaras de semillas de piñón. Descripción de los picos detallados en la tabla 10.

De los ensayos preliminares, las matrices más exitosas en la búsqueda de lignanos correspondió a los desechos de la industria olivícola (cuescos de aceituna) y de la industria forestal (nudos de pino radiata), donde se identificó pinoresinol, hidroxipinoresinol e hidroximatairesinol, lo cual es auspicioso para poder encontrar otros tipos de lignanos, como pinoresinol, acetoxipinoresinol, lariciresinol, etc. Lo interesante es que los lignanos fueron encontrados al utilizar la metodología de extracción con etanol/agua/NaOH 1M

(4:1:1), pero no en la mezcla acetona/agua (95:5), por lo que se podría inferir que la hidrólisis alcalina estaría efectivamente extrayendo lignanos que mediante otra metodología no aparecería. Esto reafirma el uso de hidrólisis básica para la extracción de lignanos.

Como punto de partida, es alentador encontrar hidroxipinoresinol e hidroximatairesinol en los huesos de aceituna, ya que la presencia de hidroxipinoresinol permite presumir la presencia de pinoresinol y acetoxipinoresinol en la matriz (Oliveras-López y cols, 2008), esto nos demuestra que es posible mejorar la metodología extractiva y que la hidrólisis básica utilizada en el proceso extractivo podría estar modificando la estructura de los analitos de interés.

Mientras que en la corteza de pino no se detectaron lignanos a niveles cuantificables, en el nudo de pino se encontró nortraquelogenina como lignano más abundante, además de lariciresinol y secoisolariciresinol. Para el cono de pino, se encontraron matairesinol, nortraquelogenina y Pinoresinol.

Conclusiones

Se formuló una metodología analítica para la identificación y cuantificación de lignanos mediante HPLC-DAD-ESI-MS/MS, que permitió el screening de estos compuestos en varias matrices de desecho, así como identificar compuestos polifenólicos mayoritarios presentes en estas.

De las matrices consideradas desechos, como mazorca de maíz, paja de trigo, cascara de avena, borra de café, sarmientos de vid, tallos de zarza y cascara de piñón de araucaria,

los cuales después de analizar los extractos por HPLC-DAD-ESI-MS/MS, no se identificaron lignanos dentro de sus compuestos mayoritarios. De los anteriormente ensayados resultó interesante caracterizar los extractos de zarzamora, ya que se encontraron flavonoides y otros tipos de polifenoles dentro de los compuestos mayoritarios, lo cual no se encuentra reportado en literatura.

Para los extractos de piñón, tampoco ha aparecido alguna investigación sobre la caracterización de sus extractos, por lo que es interesante profundizar más en el tema, más aún habiéndose encontrado compuestos de alto interés, como flavonoides, en particular amentoflavona.

Las matrices más exitosas en la búsqueda de lignanos correspondió a los desechos de la industria olivícola (cuescos de aceituna) y de la industria forestal (nudos de pino radiata), donde se identificó pinoresinol, hidroxipinoresinol e hidroximatairesinol en la primera, y principalmente nortrachelogenina en la segunda familia de desechos. Esto da pie para desarrollar metodologías extractivas particulares para estas matrices, que permitan modificar la selectividad y el rendimiento de la extracción.

Referencias.

Cao Q., Qin L., Huang F., Wang X., Yang L., Shi H. & Wu X. (2017). Amentoflavone protects dopaminergic neurons in MPTP-induced Parkinson's disease model mice through PI3K/Akt and ERK signaling pathways. *Toxicology and applied pharmacology*, 319, 80-90.

Chien K. J., Su C. H., Ho Y. C., Lee S. S., Horng C. T., Yang M. L. & Kuan Y. H. (2018). MAPKs-NF-kappaB Pathway Plays a Crucial Role in the Antiinflammatory Effects of Amentoflavone in Lipopolysaccharide-treated BV2 Microglia. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 80(1), 204-210.

Choi, Y. H., Kim, J., & Yoo, K.-P. (2003). High Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization MS-MS Analysis of Forsythia koreana Fruits, Leaves, and Stems. Enhancement of the Efficiency of Extraction of Arctigenin by Use of Supercritical-Fluid Extraction. *Chromatographia*, 57, 73–79.

Corbin, C., Fidel, T., Leclerc, E. a., Barakzoy, E., Sagot, N., Falguières, A., ... Hano, C. (2015). Development and validation of an efficient ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from flax (*Linum usitatissimum* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*. <http://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.02.008>

Johnsson, P., Kamal-Eldin, A., Lundgren, L. N., & Åman, P. (2000). HPLC method for analysis of secoisolariciresinol diglucoside in flaxseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5216–5219. <http://doi.org/10.1021/jf0005871>

Kanakis, P., Termentzi, A., Michel, T., Gikas, E., Halabalaki, M., & Skaltsounis, A. L. (2013). From olive drupes to olive Oil An HPLC-orbitrap-based qualitative and quantitative exploration of olive key metabolites. *Planta Medica*, 79(16), 1576–1587. <http://doi.org/10.1055/s-0033-1350823>

Karacabey, E., Mazza, G., Bayindirli, L., & Artik, N. (2012). Extraction of Bioactive Compounds from Milled Grape Canes (*Vitis vinifera*) Using a Pressurized Low-Polarity

Water Extractor. *Food and Bioprocess Technology*, 5(1), 359–371.

<http://doi.org/10.1007/s11947-009-0286-8>

Lee C. G., Lee E. H., Pan C. H., Kang K. & Rhee K. J. (2017). Data on the anti-tumor effects of *Selaginella tamariscina* extract and amentoflavone combined with doxorubicin in mice. *Data in brief*, 13, 162.

Liggins, J., Grimwood, R., & Bingham, S. a. (2000). Extraction and quantification of lignan phytoestrogens in food and human samples. *Analytical Biochemistry*, 287(1), 102–109. <http://doi.org/10.1006/abio.2000.4811>

Lin, C.-H., Lin, H.-W., Wu, J.-Y., Houng, J.-Y., Wan, H.-P., Yang, T.-Y., & Liang, M.-T. (2015). Extraction of lignans from the seed of *Schisandra chinensis* by supercritical fluid extraction and subsequent separation by supercritical fluid simulated moving bed. *The Journal of Supercritical Fluids*, 98, 17–24. <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.12.025>

Martins A., Barros L., Carvalho A.M., Santos-Buelga C., Fernandes I.P., Barreiro F., Ferreira I.C. (2014). Phenolic extracts of *Rubus ulmifolius* Schott flowers: characterization, microencapsulation and incorporation into yogurts as nutraceutical sources. *Food Funct.* (6):1091-100. doi: 10.1039/c3fo60721f.

Mertz C., Cheynier V., Günata Z., and Brat P. (2007). Analysis of Phenolic Compounds in Two Blackberry Species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55 (21), 8616-8624. DOI: 10.1021/jf071475d.

Oliveras López, M. J., Innocenti, M., Ieri, F., Giaccherini, C., Romani, A., & Mulinacci, N. (2008). HPLC/DAD/ESI/MS detection of lignans from Spanish and Italian *Olea europaea* L. fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(1), 62–70. <http://doi.org/10.1016/j.jfca.2007.04.012>

Oliveras-López, M.-J., Berná, G., Jurado-Ruiz, E., López-García de la Serrana, H., & Martín, F. (2014). Consumption of extra-virgin olive oil rich in phenolic compounds has beneficial antioxidant effects in healthy human adults. *Journal of Functional Foods*, 10, 475–484. <http://doi.org/10.1016/j.jff.2014.07.013>

Pérez-Jiménez, J., & Saura-Calixto, F. (2005). Literature data may underestimate the actual antioxidant capacity of cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(12), 5036–5040. <http://doi.org/10.1021/jf050049u>

Tallini L.R., Pedrazza G., Bordignon S., Costa A., Steppe M., Fuentefria A., Zuanazzi J. (2015). Analysis of flavonoids in *Rubus erythrocladus* and *Morus nigra* leaves extracts by liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Revista Brasileira de Farmacognosia* (25):219–227.

4.2.- Optimización multivariada de extracciones para matrices de desecho de industria olivícola y forestal

Resumen.

Los cuescos de aceituna, los conos y nudos de pino son considerados desechos de las industrias olivífera y forestal, respectivamente, en los cuales hemos podido identificar la presencia de lignanos, lo que permitiría descubrir nuevos usos y aplicaciones a estas matrices, que hoy en día solo se utilizan como biomasa en calderas para la producción de calor y electricidad. Se optimizaron dos metodologías extractivas, extracción sólido-líquido asistido por ultrasonido con hidrólisis básica, y extracción por fluido supercrítico.

Las condiciones finales seleccionadas para la extracción de lignanos desde cuescos de aceituna obtuvieron un rendimiento teórico de 3,24 mg de pinoresinol /g de extracto y un rendimiento práctico de 3,08 mg/g de extracto. Para la extracción mediante HBAUS, se obtuvo un rendimiento teórico de 2,57 mg de pinoresinol /g de extracto, lo cual es distinto al rendimiento práctico, el cual fue de 1,96 mg/g de extracto.

Las condiciones finales seleccionadas para la extracción de lignanos desde nudos de pino generaron un rendimiento teórico de 114,1 mg de lignanos totales/g de extracto y un rendimiento práctico de 111,7 mg/g de extracto. Para las piñas, el rendimiento teórico fue de 26.6mg/g de extracto y el práctico fue de 22.7 mg/g de extracto.

Introducción

Los lignanos son sustancias polifenólicas que mantienen un esqueleto característico, conformado por dos unidades fenilpropanoides, que se encuentran unidas entre si generalmente mediante el carbono beta. La diferencia entre los lignanos radica principalmente en los sustituyentes que la molécula posea, generando una amplia variedad de lignanos, con polaridades muy distintas, esta diferencia influye de manera importante en la extracción de estos compuestos, siendo necesario definir inicialmente que molécula es la de interés y que metodología de extracción es la óptima, tomando en cuenta la matriz en que se encuentra.

Los cuescos de la aceituna son un subproducto importante generado en la extracción de aceite de oliva y en las industrias productoras de aceituna para consumo. Sus principales componentes son el material lignocelulósico, la hemicelulosa, celulosa y lignina, así como también proteínas, grasas fenoles, otros carbohidratos, etc. El uso principal de esta biomasa es como combustión para producir energía, por lo que es interesante plantear su uso como fuente de polifenoles de interés, en especial de los lignanos, donde podemos encontrar principalmente Pinoresinol, hidroxipinoresinol e hidroximatairesinol.

En la madera, los lignanos y otros polifenoles se encuentran comúnmente en su duramen o parte central del tronco (Kwon M., 2001). Se ha descubierto que los nudos de los árboles, es decir, las raíces de ramificación dentro del tallo, contienen una concentración excepcionalmente alta de lignanos. Según lo descrito por Willfor S.M. (2004), los nudos de madera blanda tienen típicamente 5-15% (p/p) de lignanos, e incluso en algunos casos

extremos, los nudos pueden contener incluso hasta 30% (p/p) de lignanos (Willför S.M., 2006).

En este trabajo se plantea la optimización de las condiciones de extracción tomando como respuesta la concentración de lignanos totales.

Métodos de extracción:

Los procedimientos de extracción se optimizaron y se realizaron a escala analítica por triplicado, y cada extracto se analizó por triplicado y todos los resultados se corrigieron en base al peso seco. Se evaluaron los siguientes métodos de extracción: la extracción Soxhlet y extracción sólido-líquido asistido por ultrasonido con el uso de hidrólisis básica.



Extracción mediante Soxhlet.

Se pesaron 2g (peso seco) de muestras liofilizadas, en donde se procedió a la eliminación de compuestos hidrofóbicos mediante el uso de n-hexano por un sistema Soxhlet. A continuación, se realizó la extracción mediante un sistema Soxhlet tradicional con metanol y se dejó por 12 horas. A la vez, se evaluó el uso del sistema sin eliminación de compuestos hidrofílicos, eliminando el paso de la extracción con hexano. Se midió como respuesta la concentración total de lignanos extraídos, mediante HPLC-DAD.

Extracción sólido líquido asistida por ultrasonido

Se pesaron 2g (peso seco) de muestras liofilizadas, en donde se procedió a la extracción sólido-líquido, utilizando como referencia la metodología realizada en Vergara y col. (2012), en donde se optimizó la metodología mediante el diseño Box Behnken, variando las condiciones de temperatura, porcentaje de metanol y concentración (10 a 100%v/v) de solventes, tiempo de aplicación de ultrasonido, más el tiempo de extracción y el uso de hidrólisis básica.

Ensayo de extracción analítica mediante hidrólisis

Se evaluó la extracción mediante hidrólisis para cuscus de aceituna, como una matriz prometedora por la presencia de lignanos. Se evaluó la hidrólisis ácida, básica y sin hidrólisis, lo que se presenta en la tabla 11.

Tabla 11: Cuantificación de Pinoresinol y Pinoresinol diglucósido en distintos extractos de cuscus de aceitunas

| Metodología | Pinoresinol ($\mu\text{g/g}$ de muestra) | Pinoresinol Diglucósido (mg/g de muestra) |
|--------------------|--|--|
| Sin hidrólisis | 24,1 | 9,5 |
| Hidrólisis ácida | 28,4 | 16 |
| Hidrólisis básica | 44 | 9,2 |

Estos resultados concuerdan con el trabajo de Oliveras-López (2008), en donde extrae desde cuescos, concentraciones de pinoresinol entre 16 y 37 mg/g de muestra seca, lo que nos demuestra que es posible realizar una mejor extracción para obtener mejores rendimientos.

Optimización de extracción de lignanos en desechos de la industria olivícola

Anteriormente se describieron las diferencias para las tres metodologías de extracción asistida por ultrasonido, las cuales involucraban hidrólisis básica, ácida y sin hidrólisis. De éstas, la que generó mejores resultados fue la hidrólisis básica, de la cual se describe a continuación los parámetros utilizados para la optimización mediante metodología de superficie de respuesta. También se optimizó la extracción mediante Fluido supercrítico con modificador químico, el cual al igual que la hidrólisis básica, están detallados en la tabla 12.

Tabla 12: Parámetros de optimización multivariada para métodos de extracción de lignanos en cuescos de aceituna.

VARIABLES EVALUADAS ECUACIÓN DEL MODELO Y PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

Hidrólisis básica asistida por ultrasonido

$$Y=1,704-0,048X_1+0,14X_2+0,39X_3+0,35X_4-0,03X_{12}-0,08X_{14}-0,26X_{24}+0,20X_{34}$$

| | | | |
|-------------------------------|--------------|----------------------|--------------------------------------|
| 1- Volumen de extracción (mL) | N=17 DF=6 | R2=0.998 Q2=0.981 | R2 AJUST= 0.995 RSD=0.038 |
| 2- metanol (%) | | P=0 | LoF=0.648 NIVEL DE CONFIANZA 0.95 |
| 3- temperatura(°C). | | | |
| 4- conc. NaOH(M) | | | |

Extracción con CO₂ supercrítico con metanol como modificador



| | | | |
|---------------------|--------------|----------------------|--|
| 1- temperatura (°C) | | | |
| 2- presión (MPa) | | | |
| 3- metanol(%) | N=15 DF=5 | R2=0.978 Q2=0.896 | R2 AJUST= 0.938 RSD=0.0244 NIVEL DE CONFIANZA 0.95 |

En la optimización del método de extracción sólido líquido asistido por ultrasonido con hidrólisis básica, se puede identificar que la variable que menos afecta a la extracción es la correspondiente al volumen del modificador químico, en este caso metanol, esto producto de que el proceso se realiza en un sistema abierto a alta temperatura, la cual genera la volatilización del solvente, las condiciones óptimas para este ensayo fueron 20mL de solución, 80°C de temperatura, 0% metanol y 1M de NaOH. La figura 12 nos

indica que podría ser posible mejorar la extracción, aumentando la temperatura y la concentración de NaOH. Con las variables ensayadas se obtuvo un rendimiento teórico de 2,57 mg de pinosinol /g de extracto, lo cual es distinto al rendimiento práctico, el cual fue de 1,96 mg/g de extracto.

En la optimización de la extracción mediante fluido supercrítico, se obtiene una cantidad mayor de pinosinol que lo observado en las otras metodologías ensayadas, sin tomar en cuenta el tiempo destinado al proceso el cual es mucho menor, la principal ventaja es la capacidad de modificar el solvente variando la temperatura y la presión, para hacerla específica para el analito de interés, lo que evita la coextracción de otros compuestos no deseados. Las condiciones óptimas para la extracción fueron 90°C, 40 Bar de presión y 10% Metanol. El rendimiento teórico fue de 3,24 mg de Pinosinol / g de extracto y el práctico fue de 3,08 mg/g extracto.

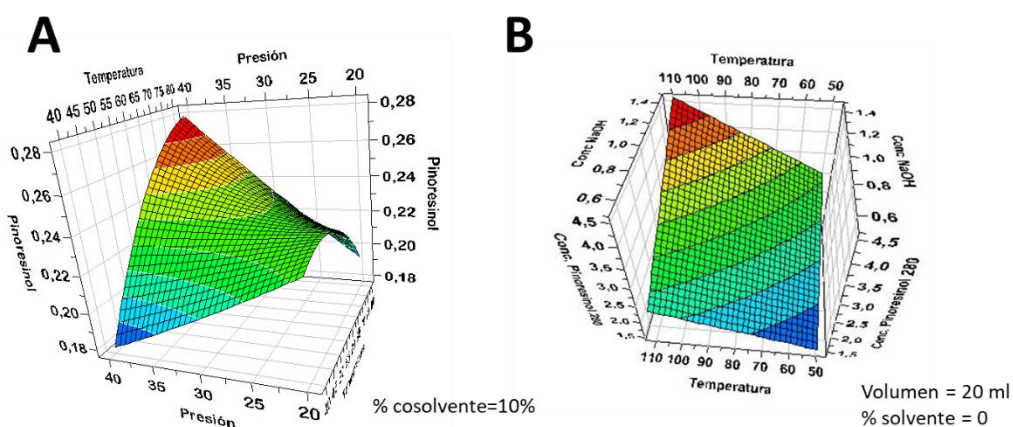


Figura 12: Superficies de respuesta para metodos optimizados para extracción de lignanos totales cuercos de aceitunas (A) mediante extracción por CO2 supercritico con metanol como modificador y (B) mediante hidrólisis básica asistida por ultrasonido.

Optimización de extracción de lignanos en desechos de la industria forestal de *P. radiata*

Siguiendo los pasos del proceso anterior se procedió a optimizar las extracciones mediante hidrolisis básica asistida por ultrasonido y mediante fluido supercrítico, en las matrices de desechos de pino con mayor potencial, como son las piñas y nudos de pino radiata. En la corteza se observa una mayor concentración de compuestos polifenólicos, pero no de los lignanos de interés para este trabajo.

La optimización de lignanos totales encontrados en pino radiata, se realizó utilizando la metodología de superficie de respuesta mediante un diseño Box-Benhken, estudiando las variables temperatura (°C), Presión (Bar) y porcentaje de cosolvente (%Metanol). La respuesta corresponde a lignanos totales presentes en la muestra. Las variables y los parámetros de validación se resumen en la tabla 13.



Tabla 13: Parámetros de optimización multivariada para métodos de extracción de lignanos en desechos de *P. radiata*

| Variables evaluadas | Ecuación del modelo y parámetros de validación | | |
|--|---|----------------------|--|
| Hidrólisis básica asistida por ultrasonido | | | |
| | Piña | | |
| | $Y=17,67+0,12X_1-3,44X_2-0,18X_3-2,36X_1^2-1,75X_2^2-1,09X_{12}+0,95X_{13}$ | | |
| 1- metanol (%) | N=14 DF=6 | R2=0.901 Q2=0.275 | R2 AJUST= 0.786 RSD=1.9929 NIVEL DE CONFIANZA 0.95 |
| 2- temperatura(°C) | Nudo | | |
| 3- conc. NaOH(M). | $y=49,79-3,71X_1+5,64 X_2-0,61X_3- 7,39X_1^2 +2,15X_2^2 +5,55X_{12}$ | | |
| | N=14 DF=7 | R2=0.826 Q2=0.413 | R2 AJUST= 0.863 RSD=3.9330 NIVEL DE CONFIANZA 0.95 |
| Extracción con CO₂ supercrítico con metanol como modificador | | | |
| | Piña | | |
| | $Y=16,22+0,83X_1+0,55X_2+7,20X_3-1,53X_3^2+1,07X_{12}$ | | |
| 1- temperatura (°C) | N=15 DF=9 | R2=0.990 Q2=0.900 | R2 AJUST= 0.984 RSD=0.454 NIVEL DE CONFIANZA 0.95 |
| 2- presión (MPa) | Nudo | | |
| 3- metanol(%) | $y=50,51+5,58X_1+4,64X_2+6,06X_3+14,69X_1^2+7,62X_2^2-8,54X_{23}$ | | |
| | N=14 DF=6 | R2=0.942 Q2=0.629 | R2 AJUST= 0.874 RSD=7.8976 NIVEL DE CONFIANZA 0.95 |

En la optimización del método de extracción sólido-líquido con hidrólisis básica asistido por ultrasonido en piñas y nudos de pino radiata, se observó que hay poco efecto del NaOH en la extracción, los efectos de la temperatura y tipo de solvente fueron variables más relevantes en el modelo (Figura 13). A pesar de que las mejores condiciones se obtuvieron trabajando con una concentración de NaOH de 2.5 M, la diferencia que genera bajar esta concentración a 0.8 M no es significativa. Las condiciones finales de trabajo

fueron 90°C, 50% de metanol y NaOH 0.8M, obteniendo un rendimiento teórico de 59.7 mg de lignanos totales/g de extracto de nudo, el rendimiento práctico evaluado fue de 59 mg/g de extracto. Para piñas de pino radiata el rendimiento teórico fue de 19.6 mg/g de extracto y el práctico fue de 20.0 mg/g de extracto.

En la optimización de la extracción con fluido supercrítico se observó que, con 2 horas de extracción, se obtenía una cantidad de lignanos similar con un día de extracción por Soxhlet.

Todas las variables evaluadas en la optimización tenían una relevancia estadística similar y un mismo peso sobre el modelo. Se debe considerar que el resultado evaluado fue la concentración total de lignanos, sin tomar en cuenta las posibles variaciones que algún determinado compuesto pueda haber tenido durante el proceso de optimización. Las condiciones finales seleccionadas para la extracción de lignanos desde nudos de pino fueron 80°C, 20% de metanol y una presión de 40 MPa, obteniendo un rendimiento teórico de 114,1 mg de lignanos totales/g de extracto y un rendimiento práctico de 111,7 mg/g de extracto. Para las piñas el rendimiento teórico fue de 26.6mg/g de extracto y el práctico fue de 22.7 mg/g de extracto.

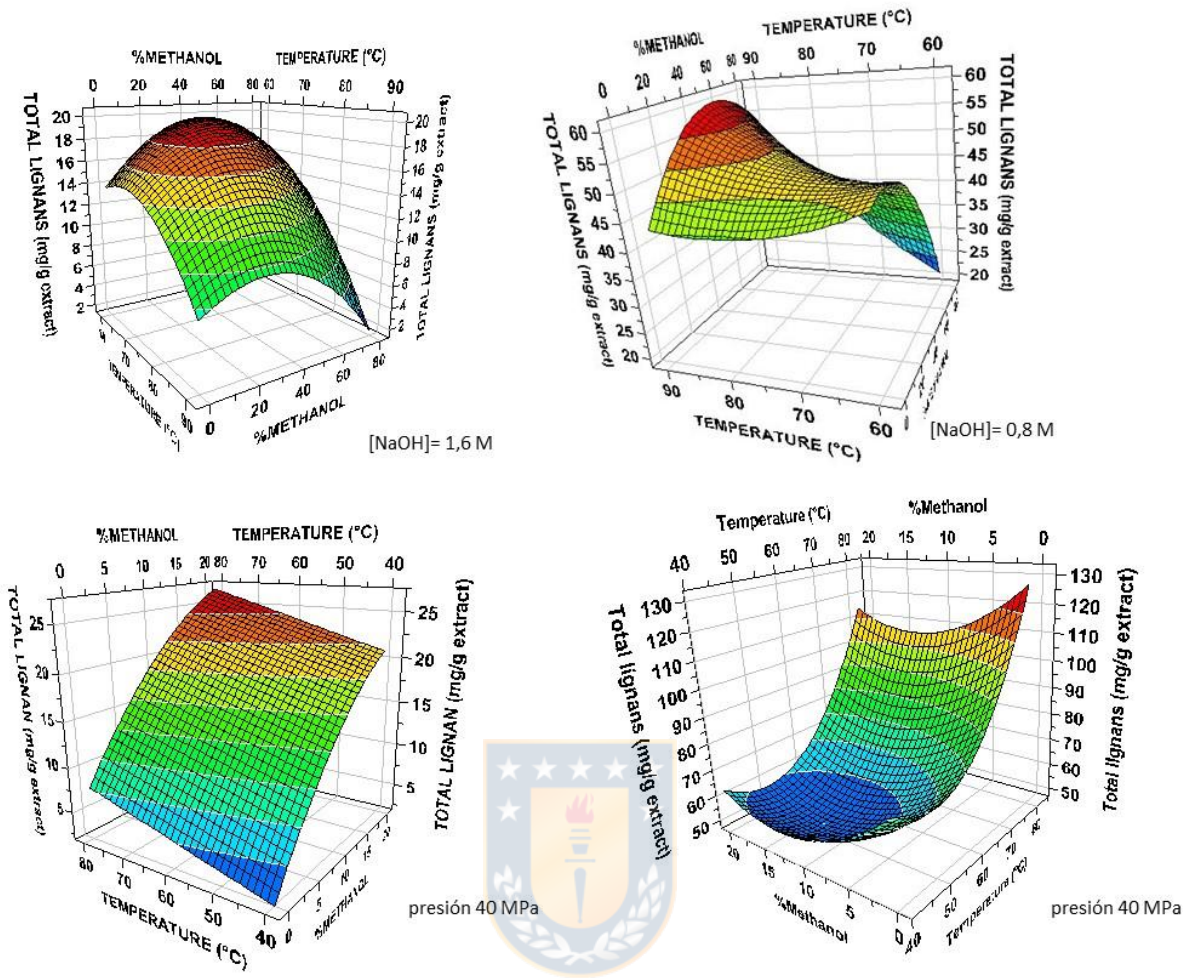


Figura 13: Superficies de respuesta para metodos optimizados para extracción de lignanos totales en piñas (A) y nudos (B) de pino mediante hidrólisis básica asistida por ultrasonido, y para piñas (C) y nudos (D) de pino mediante extracción por CO2 supercritico con metanol como modificador.

Comparación de las tres metodologías extractivas

Una vez optimizadas las metodologías SFE y BHAUS, se comparó la concentración de lignanos totales, tomando como referencia también la extracción por soxhlet.

La cuantificación de lignanos totales se expresó en mg / g de muestra de peso seco, que corresponde a la cantidad total de lignanos por peso seco de la matriz, y en mg / g de extracto seco, que corresponde a la cantidad de lignanos presentes en el extracto seco.

Con estos dos valores es posible estimar la cantidad presente en cada muestra, y también tener una idea de la selectividad de cada técnica para la extracción de lignanos, como se puede ver en la extracción por soxhlet en nudos de pino, donde una gran cantidad de lignanos se obtiene, pero esta extracción no es muy selectiva, en comparación con SFE, donde la extracción es más pequeña, pero su selectividad es mayor, alcanzando niveles comparables con la extracción soxhlet.

BHAUS tiene concentraciones más bajas de lignanos, tanto en la matriz como en el extracto, lo que indica que es una técnica poco selectiva para los lignanos estudiados.

Discusión

Para todos los ensayos de optimización, los valores p de la regresión, dieron menores a 0,05 lo que valida los modelos estadísticos con un 95% de confianza.

Los valores p de lack of fit (falta de ajuste) para todos los ensayos fueron mayores a 0,05, por lo que los modelos no presentan falta de ajuste con un 95% de confianza.

El valor R^2 corresponde a fueron todos cercanos a 1, lo que indica que el modelo presenta un buen ajuste a los datos experimentales. Por otro lado el valor Q^2 también estuvo sobre

0,5, lo que indica que el modelo puede predecir nuevos datos dentro de la región de estudio.

En cuanto a la validación del modelo, el valor entregado en todos los modelos fueron superiores a 0,90, en donde un valor sobre 0,25 indica que no hay falta de ajuste en el modelo.

Los valores para evaluar la reproducibilidad del modelo también fueron mayores a 0,8 indicando que el modelo presenta buena reproducibilidad.

En el caso del cono de pino, las concentraciones de lignanos que se extrajeron con Soxhlet y SFE fueron similares cuando se expresaron en mg / g de muestra seca, pero cuando se expresaron en mg / g de extracto seco, el SFE generó mejores rendimientos, lo que indica que el SFE es técnica más selectiva, porque extrae menos compuestos no deseados, y esto es posible gracias a la flexibilidad de la técnica, donde se puede optimizar de acuerdo a la concentración de lignanos totales. El BH-US, aunque también se puede optimizar, los rendimientos fueron menores, especialmente cuando se expresa la concentración en mg / g de extracto DW, lo que indica que para los lignanos totales, la técnica no es muy selectiva, a pesar de que se realizó una extracción de SPE posterior a eliminar la mayoría de los interferentes polares que se extrajeron con NaOH.

Es importante destacar que las condiciones óptimas de extracción descritas anteriormente, toman como respuesta la concentración de lignanos totales presentes en las matrices, lo cual genera un rango amplio de polaridades presentes en los lignanos, variando las condiciones de extracción para favorecer a algún lignano frente a otro. Si nos

enfocáramos en un lignano en particular, deberíamos modificar las condiciones con el fin de maximizar su extracción.



4.3.- Desarrollo y validación de metodología para determinación de capacidad antioxidante y polifenoles totales en extractos de cuescos de aceituna y desechos de *Pinus radiata* en microplaca.

Resumen

El presente estudio tuvo como objetivo investigar la actividad antioxidante y polifenoles totales de extractos de diferente polaridad de cuescos de aceituna, nudos y conos de pino radiata, evaluando por diferentes métodos espectrofotométricos: Folin Ciocalteau, ABTS, CUPRAC y ORAC.

Los resultados obtenidos en los parámetros sensibilidad, linealidad, repetibilidad y exactitud muestran que las metodologías propuestas son confiables para evaluar el efecto de las condiciones de extracción sobre los extractos ensayados.

Introducción

La determinación de la capacidad antioxidante y polifenoles totales de los extractos de matrices de desechos se realizan mediante ensayos químicos fluorimétrico y colorimétricos, y estos son el ensayo de Folin-Cicalteu para polifenoles totales y los ensayos CUPRAC, ABTS y ORAC para capacidad antioxidante (Huang, 2005). Dependiendo de la naturaleza de estos métodos se pueden clasificar en reacciones de transferencia de electrones (ET) y reacciones de transferencia de átomos de hidrogeno (HAT). En los ET se encuentra el ensayo de Folin-Cicalteu que utiliza una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato (reactivo Folin-Cicalteu) más carbonato de sodio al 6% p/v para que ocurra la reacción redox. Los ensayos HAT son aquellos en que la sonda y el polifenol entran en competencia para reaccionar con el radical libre basándose en reacciones de competitividad cinética en los cuales se encuentran en primer lugar, ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity, o Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno) donde su sonda es la fluoresceína y el radical es el 2,2'-azobis(2-amidino-propano) dihidrocloruro (AAPH). En segundo lugar, está el ensayo de CUPRAC (CUPric Reducing Antioxidant Capacity) que utiliza la reducción del complejo quelato bis-(neocuproina)cobre(II) se reduce a bis-(neocuproina)cobre(I) en que a medida que aumenta la cantidad de polifenoles en la muestra, aumenta la coloración azul. Y por último, el ensayo ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)), que en forma de radical reacciona con los polifenoles, observándose una disminución en el color azul a incoloro en la medida que se consuman los radicales del medio. Para todos estos

ensayos nombrados se utiliza ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) como solución patrón para las curvas de calibración (Huang, 2005).

Métodos

La capacidad antioxidante y el contenido total de polifenoles de los extractos se determinarán mediante ensayos realizados en microplacas de 96 pocillos, utilizando un espectrofotómetro de microvolumen (Epoch Biotek System, Winooski, VT, EUA).

Polifenoles totales:

Se mezclaron 50 µl de muestra en la microplaca en pocillos con 50 µl de reactivo Folin-Ciocalteu y 100 µl de carbonato sódico al 6%. La microplaca se mantuvo en la oscuridad a temperatura ambiente durante 1 h. La absorbancia de las muestras y las normas de calibración se midieron a 760 nm en triplicado donde se usó el reactivo en la misma proporción como blanco y también ácido gálico para calibrar.

TEAC ABTS

Se prepara ABTS^{•+} mezclando ABTS 7 mM y K₂S₂O₈ 2,45 mM en agua desionizada durante 16 h bajo oscuridad. Esta solución se diluye para obtener una absorbancia de 0,7 a 734 nm en que la solución diluida (170 µl) se mezcló con Trolox o muestra (30 µl) durante 20 minutos a 30 ° C y la absorbancia se midió a la misma longitud de onda. El cálculo de

capacidad antioxidante se obtiene como la diferencia entre la absorbancia, expresada como equivalentes Trolox y considerando el factor de dilución (Re, 1999).

TEAC CUPRAC

Se incuba una mezcla de cobre (II) 10 mM, neocuproína 7,5 mM y tampón acetato de amonio (pH 7) a 37°C durante 15 min. Se añadió Trolox o muestra (100 µl) y se midió la absorbancia a 450 nm después de la incubación durante 30 minutos a 37°C (solución 1). Se utilizó una muestra preparada sin cobre (II) y neocuproína para corregir la absorbancia intrínseca de la muestra (solución 2). La actividad antioxidante se calcula midiendo el aumento de la absorbancia corregida, $A_{sol1} - A_{sol2}$. Los resultados se expresan como equivalentes Trolox (Ribeiro, 2011).



ORAC

Se prepara un buffer de trabajo 75 mM con una disolución de K_2HPO_4 0,75M y KH_2PO_4 0,75 M a temperatura ambiente. A esto, se realiza una curva de concentraciones con Trolox. También se utilizó fluoresceína $11,15 \times 10^{-2}$ µM, y AAPH de concentración 152 mM. En placa oscura, en cada pocillo se agregará 150 µl de fluoresceína $11,15 \times 10^{-2}$ µM, 25 µl de muestra o curva de Trolox, se incuba a 37 °C por 30 minutos, se registra la primera lectura y luego se agrega 25 µl de AAPH de concentración 152 mM en microplaca, se realizan lecturas λ excitación: 485/20 y λ emisión: 528/20. Posteriormente se obtiene el área bajo la curva (Ou, 2013).

Resultados

Validación de los métodos para determinación de polifenoles totales y capacidad antioxidante

Los parámetros de validación para los métodos desarrollados para las determinaciones de capacidad antioxidante y polifenoles totales, se encuentra resumido en la tabla 14

Tabla 14: Parámetros analíticos en el ensayo Folin- Ciocalteau basados en los datos de absorbancia para la curva de calibración con ácido gálico

| Parámetro | Folin- Ciocalteau | CUPRAC | ABTS | ORAC |
|---------------------------------|--|--|---|--|
| Ecuación | $A = 0,016C + 0,042$ $R^2 = 0,9912$ | $A = 0,0034C - 0,0007$ $R^2 = 0,9998$ | $A = 0,0006C + 0,006$ $R^2 = 0,9875$ | $\text{área} = 1,6774C - 2.107$ $R^2 = 0,994$ |
| Error típico [$S_{(Y/X)}$] | 0,0640 | 0,00252 | 0,00558676 | 7,09 |
| Límite de Detección | 12,0 [ppm] | 2,23 [μM] | 27,9 [μM] | 12,7 [μM] |
| Límite de cuantificación | 40,0 [ppm] | 7,42 [μM] | 93,1 [μM] | 42,3 [μM] |
| Sensibilidad | 0,016 | 0,0034 | 0,0006 | 1,68 |
| Rango lineal de respuesta | (12-100) [ppm] | (0-100) [μM] | (27,9-200) [μM] | 12,7 -150 [μM] |

En relación a los parámetros analíticos de los métodos, se observa que el ensayo ORAC tiene una sensibilidad mayor que los otros métodos, pero aumenta el error en el análisis.

Esto se debe a que su pendiente es mayor que en otros métodos incrementando bruscamente la señal a medida que aumenta la concentración. En contraste con ABTS que tiene una pendiente de 0,0006 obteniendo pequeñas variaciones en las señales al cambiar la concentración. Para análisis de bajas concentraciones el más indicado es el CUPRAC, ya que, tiene el límite de detección de 2,22 μM siendo el más bajo entre los ensayos. En cambio, para concentraciones altas el ensayo indicado será ABTS porque tiene un límite de cuantificación de 93,10 μM . El ensayo con menor error aleatorio en la señal es Cuprac con un erro típico de 0,00252 y un r^2 de 0,9998.

Conclusión

Los resultados obtenidos para la los parámetros de validación expuestos demuestran que la metodología propuesta es confiable, a un nivel del 95%, para cuantificar polifenoles totales de los extractos con el reactivo de Folin–Ciocalteu. Los ensayos ABTS, CUPRAC y ORAC también tienen resultados aceptables, permitiendo su utilización para la determinación de la capacidad antioxidante de los extractos. De esta manera, pueden ser empleados para evaluar la influencia de las condiciones de extracción, de los extractos de aceitunas y pino radiata, sobre la cantidad de polifenoles extraídos y su capacidad antioxidante.

Referencias

- Antonini, E., Fariña, A., Leone, A., Mazzara, E., Urbani, S., Selvaggini, R., Sirvili, M., Ninfali, P. (2015). Phenolic compounds and quality parameters of family farming versus protected designation of origin extra virgin olive oils. *Food Comp. Anal.*, 43, 75-81.
- D'Ándrea, Gabrielle. (2010). Pycnogenol: A blend of procyanidinis with multifaceted therapeutic applications?. *Fitoterapia* 81(2010) 745-736.
- García-Pérez, M., RoyerGaëtan, M., Desjardins, Y., Pouliot, R., Stevanovic, T. (2012). *Picea mariana* bark: A new source of trans-resveratrol and other bioactive polyphenols. *Food Chem.*, 135(3), 1173–1182.
- Garrido, J., y Borges, F. (2013). Wine and grape polyphenols — A chemical perspective. *Food Res. Int.*, 54, 1844–1858.
- Gerstenmeyer, E., Reimer, S., Berghofer, E., Schwartz, He., Sontag, G. (2013). Effect of Thermal Heating on some Lignan in Flax Seeds, Sesame Seeds and Rye. *Food Chem.*, 138, 1847–1855.
- Goo, T. and Li, Y-H. (2015). Determination of four Lignanoids in Roots, Steams and Leaves of *Zanthoxylum Armatum* DC by HPLC-DAD with HPLC-ESI-QTOF-MS Confirmation. *J. Anal. Chema.*, 71(5), 527-533.
- Haworth, R.D. (1942). The Chemistry of the Lignan Group of Natural Products. *J. Am. Chem. Soc.*, 448-456.
- Huang, D., Our, B. and Prior, R.L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 1841–1856.

Kim, J.H., Morimoto, E., Yamasaki, T., Okazawa, A., Kobayashi, A. and Stake, H. (2009). Metabolic Engineering of Lignan Biosynthesis in Forsythia Cell Culture. *Plant Cell Physiol.* 50(12), 2200–2209.

Kwon, M., Davin, L. B. and Lewis, N. (2001). *In situ* Hybridization and Immunolocalization of Lignan Reductases in Woody Tissues: Implications for Heartwood Formation and Other Forms of Vascular Tissue Preservation. *Phytochemical.*, 57, 899–914.

Norma IRAM 301: vigente-Norma ISO/IEC 17025: vigente

Our, B.X., Chang, T., Huang, D.J. and Prior, R.L. (2013). Determination of Total Antioxidant Capacity by Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)

Pietarinen, S., Willför, S.M., Ahotupa, M.O., Hemming, J.E., Bjarne, R. (2006). Knotwood and Bark Extracts: Strong Antioxidants from Waste Materials. *J. Wood Sci.*, 52, 436–444.

Re, R., Pellegrini, A., Protegerte, A., Pannalā, M., Yang, M. and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolonization Assay. *Free Radica. Biol. Med.*, 26(9-10), 1231-1237.

Ribeiro, J., Malgalhaes, L.M., Reis, S., Lima, J.L.F. and Segundo, M. (2011). High-throughput Total Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity of Biological Samples Determined Using Flow Injection Analysis and Microplate-based Methods. *Anal. Sci.*, 27, 483-488.

Selvajina, R., Servili, M., Urbani, S., Esposto, S., Taticchi, A. and Montedoro, G. (2006). Evaluation of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil by Direct Injection in High-Performance Liquid Chromatography with Fluorometric Detection. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 2832–2838.

Using Fluorescein as the Fluorescence Probe: First Action 2012.23 *J. AOAC Int.*, 96, 1372-1376.

Walsh, C. and Fischbach, M.A. (2010). Natural Products Version 2.0: Connecting Genes to Molecules *J. Am. Chem. Soc.*, 132, 2469–2493.

Willet, W.C. (2001). Eat, Drink, and be Healthy the Harvard Medical School Guide to Healthy Eating. New York: Simon and Schuster.



4.4.- Lignans in olive stones discarded from the oil industry. Comparison of three extraction methods followed by HPLC-DAD-MS/MS and antioxidant capacity determination ¹

Abstract

Lignans are secondary metabolites with diverse chemical structure, and are frequent in food grains. A lignan rich diet have a positive health impact over chronic diseases and protection against certain types of cancer. To enhance the intake of lignans the addition of this compound in processed food could be a solution, so the best approach is to find a source of lignans, especially one that is discarded as waste. In the olive oil production there is a large volume of phytotoxic waste generated, among these is the olive stone (OS), that it is generally burned for fuel. It has been reported the presence of lignans in olive stones extracted with methanol reflux.

Three extraction methods for lignans and polyphenolic compounds were assessed: solid-liquid ultrasound assisted extraction with basic hydrolysis, methanolic extraction with Soxhlet, and CO₂ supercritical fluid extraction with methanol as a modifier. The determination of lignan content in OS samples were evaluated by HPLC with a core shell C18 column and the detection was in tandem with DAD and MS/MS. The extracts were

¹ Manuscrito Publicado: Inostroza, Troncoso, Mardones y Vergara (20018) Lignans in olive stones discarded from the oil industry. Comparison of three extraction methods followed by HPLC-DAD-MS/MS and antioxidant capacity determination. Journal of the Chilean Chemical Society, 63(2) 3918-3922.

also evaluated in their antioxidant capacity with ABTS, CUPRAC and ORAC assays and total polyphenol concentration.

The aim of this work is to evaluate different methods to extract lignans from OS discarded from the olive oil industry. The main lignan identified in OS extract was pinoresinol. The SFE method to extract pinoresinol was more efficient than Soxhlet and ultrasound assisted solid liquid extractions, producing a higher amount of pinoresinol in the extract in less time and with less amount of co-extracted interferents. The extract produced with Soxhlet had a higher antioxidant capacity.

Keywords: lignans, pinoresinol, olive stones, Soxhlet, supercritical fluid extraction, HPLC.



INTRODUCTION

The constant and steady consumption of lignan rich food have a positive impact over human health especially in chronic diseases, and protection against certain types of cancer [Erro! Fonte de referência não encontrada.]. These effects are attributed principally to the transformation of lignans in to enterolactone and enterodiol, called mammalian or enterolignans by microflora in the proximal colon [Erro! Fonte de referência não encontrada.]. Lignans are secondary metabolites with diverse chemical structure that mainly consist of phenol groups and aromatic rings. This compounds are more frequent in grains such as flaxseed or sesame, and in the bark of several types of trees such as olive trees or some *Pinus* species [Erro! Fonte de referência não encontrada.]. Lignans such as pinoresinol (PIN), acetoxypinoresinol (AC-PIN) have been reported in the phenolic fraction of virgin olive oil [Erro! Fonte de referência não encontrada.,Erro! Fonte de referência não encontrada.,Erro! Fonte de referência não encontrada.,Erro! Fonte de referência não encontrada.] and in olive mill wastewater [Erro! Fonte de referência não encontrada.].

In the olive oil production there is a large volume of waste generated by olive mills that can signify in an important environmental problem, due to the high concentration of phenols, lipids and organic acids that are phytotoxic [Erro! Fonte de referência não encontrada.]. Among the solid residues generated from this industry, the olive stone (OS), that makes between the 13 and 30% of the fruit weight, it is composed primarily from hemicellulose (24%), cellulose (32%) and lignin (22%) and the main use for this waste is

as fuel, production of activated carbon and resin, among others [Erro! Fonte de referência não encontrada.].

In four olive varieties three main lignans were identified; acetoxypinoresinol (AC-PIN), pinoresinol (PIN) and hydroxypinoresinol (OH-PIN). Oliveras-Lopez et al [Erro! Fonte de referência não encontrada.] reported an average concentration of total lignan of 0.17 mg/g dried olive stones extracted with methanol reflux. Other authors have shown that in OS methanolic extracts the main phenolic compounds are secoiroids such as nuezhenide and its derivates [Erro! Fonte de referência não encontrada.].

To extract other phenolic compounds, such as lignans a more exhaustive or drastic methodology may be needed. There are difficulties in the lignan extraction in foods because of the high diversity in polarities which inevitably signifies that there will not be a single optimal conditions for all the main lignans. Among the different extraction methods for phenolic compounds from olive pomace there are most commonly used solid-liquid extraction with polar protic solvents or Soxhlet, however both of them involves a long extraction times [Erro! Fonte de referência não encontrada.].

The extraction of lignans assisted by the use of alkaline hydrolysis which can increase the lignan extraction yield from flaxseed by the rupture of links between lignans and other compounds via ester bonds [Erro! Fonte de referência não encontrada.,Erro! Fonte de referência não encontrada.,Erro! Fonte de referência não encontrada.]. The use of acid can lead to artefacts such as the formation of isolaricitin and anhydrosecoisolariciresinol [Erro! Fonte de referência não encontrada.]. To improve the extraction the use of ultrasound assistance could shorten the time necessary due to the aid that the

cavitation force can provide to improve the extractability of the phenolic compounds [Erro! Fonte de referência não encontrada.].

Supercritical fluid extraction (SFE) with carbon dioxide (CO₂) is a technique that has been successfully used for the extraction of phenolic compounds. The use of SFE for lignan extraction have some advantages for low to medium polarity compounds from seeds, which can also be improved by the addition of methanol as modifier [Erro! Fonte de referência não encontrada.]. From olive leaves, using methanol as a modifier, high recoveries of tyrosol was achieved avoiding the coextraction of elevated quantities of other compounds [Erro! Fonte de referência não encontrada.].

Phenolic compounds obtained from natural sources with high antimicrobial, antitumor or antioxidant effects may have economic interest [Erro! Fonte de referência não encontrada.,Erro! Fonte de referência não encontrada.] especially if they can be obtained from an unutilized waste. Mansour et al. [Erro! Fonte de referência não encontrada.] indicated that OS have potential as a source of phenolic compound due to the high antioxidant capacity of the extracts.

The aim of this work is to extract lignans from discarded olive stones and to evaluate the best method to produce an extract with interesting concentration of lignans and high antioxidant capacity.

EXPERIMENTAL

Samples

A large sample of solid olive mill waste was collected from the industry. The solids were air dried and the stones were separated from the skins and remnant pulp. The olive stones (OS) were washed with deionized water, dried and then grinded to a fine powder. The powdered sample was homogenized and divided into subsamples to evaluate the different extraction methods. The samples were kept at room temperature (average 20°C) and protected from direct sun light until extraction. Once the samples were processed, the extracts were kept at -20°C until analysis.

Reagents and standards

All solutions for high-performance liquid chromatography (HPLC) analyses were prepared in 18 MΩ deionized water. HPLC-grade acetonitrile, ethanol, cupric chloride dihydrate, ammonium acetate, calcium carbonate, formic acid, were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Pinoresinol, matairesinol, pinoresinol diglucoside, lariciresinol, hydroxymatairesinol, secoisolariciresinol standards were obtained from Phytolab (Vestenbergsgreuth, Germany). 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), neocuproine hemihydrate, 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic (ABTS), potassium persulfate, were purchased from the Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Extraction methods

The final extraction methods were employed after a multivariate optimization process at analytical scale in triplicate. Each extract was performed and analyzed in triplicate and all the results were corrected on dry weight basis.

Soxhlet

For the Soxhlet extraction the method from Oliveras-Lopez et al [Erro! Fonte de referência não encontrada.] was used with modification. In a 250 mL Soxhlet equipment 5 g of sample were placed in a cellulose thimble with hexane (250 mL) to eliminate any lipophilic compounds for 12 h. The defatted sample was extracted with methanol in reflux for 24h to ensure the highest content of extractable compounds in the final extract, in order to have a point of comparison for the other two methods. The collected extract was evaporated to eliminate the methanol and diluted up to 25 mL in mobile phase and filtered through a GV Durapore filter (0.22 µm pore size, 13 mm diameter, Millipore, Bedford, MA, USA) previous to HPLC-DAD-MS/MS analysis.

Ultrasound assisted solid-liquid extraction with basic hydrolysis

The solid-liquid ultrasound assisted extraction with basic hydrolysis (US-B) was based in the previously described methods by Vergara et al. [Erro! Fonte de referência não encontrada.] and Alu'datt et al. [Erro! Fonte de referência não encontrada.] with

modifications. To 2 g of sample were added 20 mL of 80% methanol with NaOH 1N for the hydrolysis treatment. The sample was homogenized with an ultrasound probe in three 1 minute pulses at 65 Hz, then it was left to macerate for 30 minutes, until a second round of ultrasound treatment. The sample was then centrifuged at 4000 rpm for 5 minute and the supernatant was collected and the exhausted solid was re-extracted under the same conditions. The methanol in the extracts was removed using a rotaevaporator at 35°C and then neutralized. A cleanup step was performed with a C18 SPE cartridge eluting with three volumes of methanol. The resulting extract was evaporated and adjusted to 25 mL with mobile phase and filtered through a GV Durapore filter (0.22 µm pore size, 13 mm diameter, Millipore, Bedford, MA, USA) before chromatographic analysis.

Supercritical fluid extraction



The optimized extraction was carried out with a CO₂ supercritical fluid extractor Applied Separations, model Spe-ed™ SFE-2 (Allentown, PA, USA), in a temperature of 80 °C and 40 MPa of pressure. Methanol 10% (v/v) was used to modify the polarity of the extraction by means of a co-solvent pump. In each experiment the OS (5 g) was loaded into a 50 mL extraction cell and the remaining volume was filled with glass beads. The outlet valve was maintained at 120 °C and the extraction time was 120 min. The outflow was maintained at 5 L/min CO₂. The extract was collected in 25 mL of methanol and diluted with mobile phase up to 25 mL, and then stored until analysis at -20 °C in amber bottles to protect

them from light. Previous to chromatographic analysis the samples were filtered through a GV Durapore filter (0.22 μm pore size, 13 mm diameter, Millipore, Bedford, MA, USA).

Analytical methods

Determination of lignans by UHPLC-DAD-ESI-MS/MS in olive stone extracts

The lignans in the extracts were analyzed using a Shimadzu Nexera UHPLC/HPLC system (Kyoto, Japan), equipped with a quaternary LC-30AD pump, a DGU-20A5R degasser unit, a Prominence CTO-20 AC oven, a SIL-30AC autosampler, and an SPD-M20A ultraviolet-visible (UV-vis) diode array detector (DAD) coupled in tandem with a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) detector (QTrap 3200, Applied Biosystems MDS Sciex, Dublin, CA, USA). Instrument control and data collection were performed using a Class-VP DAD Shimadzu Chromatography Data System and Analyst software for MS/MS analysis (Version 1.5.2, Shimadzu Co., Kyoto, Japan). The separation conditions using a Kinetex C18 core-shell column (150 \times 4.6 mm, 2.6 μm) with a guard column (Phenomenex, Torrance, CA, USA) were at 25 $^{\circ}\text{C}$, with a 50 μL injection volume. The mobile phase gradient consisted of 0.1% v/v formic acid in water (solvent A) and acetonitrile (solvent B). The flow rate was 0.4 mL/min. The gradient program was from 15 % to 45 % solvent B in 42 min, then raised and maintained at 100 % for 3 min, followed by 5 min of stabilization at 15.0 % B.

Electrospray ionization (ESI)–MS/MS was performed using negative ionization mode (-3500 V), drying temperature 350 °C, nebulizer gas at 40 a.u., auxiliary gas at 20 a.u., and scanning range between m/z 100 and 1200. Compounds were identified by comparison of their retention times with those of available standards and analyzing their UV and MS/MS spectra. Quantifications using a DAD were performed at 280 nm using external calibration curves. All results were expressed in a dry matter basis.

Total polyphenols and antioxidant capacity

The antioxidant capacity and Total Polyphenol content of the OS extracts were performed in 96-well microplates, using a micro-volume spectrophotometer (Epoch Biotek System, Winooski, VT, USA). Standard solutions were prepared mixed and individually, at the same concentration level found in the extract with the objective to compare their antioxidant capacities present in the extract obtained with the different extractive methods. The samples and standards were diluted in order to fit the linear range and were analyzed by triplicated.

Total Polyphenol: 50 µL of sample were mixed in the 96-well microplate with 50 µL Folin Ciocalteu reactive and 100 µL of 6% sodium carbonate. The microplate was kept in the dark at room temperature for 2 h. The absorbance of samples and calibration standards were measured at 760 nm in triplicated. The reagents in the same proportion were used as blank and gallic acid was used to calibrate.

ABTS assay: the 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid radical (ABTS^{•+}) was prepared by mixing 7 mM ABTS and 2.45 mM K₂S₂O₈ in deionized water for 16 h under

darkness. This solution was diluted to obtain an absorbance of 0.7 at 734 nm. The diluted solution (170 μ L) was mixed with Trolox or sample (30 μ L) for 20 min at 30 °C and the absorbance was measured at the same wavelength. The antioxidant capacity was calculated as the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) difference between blank and sample measurement, expressed as Trolox equivalents and considering the dilution factor [**Erro! Fonte de referência não encontrada.**].

Cupric ion reducing antioxidant capacity assay (CUPRAC): A mixture of 10 mM copper(II), 7.5 mM neocuproine, and ammonium acetate buffer (pH 7) was incubated at 37 °C for 15 min. Trolox or sample (100 μ L) was added and the absorbance was measured at 450 nm after incubation for 30 min at 37 °C (solution 1). A sample prepared without copper (II) and neocuproine was used to correct the intrinsic absorbance of the sample (solution 2). The antioxidant activity was calculated by measuring the increase in the corrected absorbance ($A_{sol1} - A_{sol2}$). The results were expressed as Trolox equivalents [**Erro! Fonte de referência não encontrada.**].

Oxygen radical absorbance capacity - *fluorescein assay* (ORAC-FL): were performed as a modification of the method detailed by Ou et al. [**Erro! Fonte de referência não encontrada.**]. Analyses were conducted in pH 7.0 phosphate buffer (K_2HPO_4 75mM and KH_2PO_4 75m M) at 37°C. Peroxyl radical was generated using 25 μ L of AAPH 152 mM, and 150 μ L of fluorescein 0.011 μ M was used as the substrate. Samples and standards (25 μ L) were mixed with the reaction solution for 30 min. Trolox was used as a standard and the fluorescence conditions of detection were 485 nm for excitation and 528 nm for emission.

RESULTS AND DISCUSSION

Analytical methods for determination of lignans in OS extracts

The identification of main lignans present in an OS extract was performed by comparison of the retention times and UV and MS spectra of the main lignans screened in the samples (figure 14). The fragmentation patterns are consistent with those previously reported in literature and there were confirmed by comparison with the available commercial standards.

In order to explore for the presence of another compounds found in the extracts a two experiment analysis was performed in the mass spectrometer. First a full scan mode analysis using the ion trap (EMS) was linked with a product ion analysis (EPI) of the highest mass found in the first experiment (EMS-IDA-EPI). In all of the OS extracts, pinoresinol was the main lignan identified. The analytical properties for the chromatographic analysis are summarized in table 15.

Tabla 15: Analytical parameters for used method for the analysis of OS extracts
Analytical parameters for used method for the analysis of OS extracts

| | Equation | R ² | Typical error | LOD | LOQ |
|------------------------------------|------------------------|----------------|---------------|-------------|------------|
| Pinoresinol (HPLC-DAD) | $y=11679x-4288.3$ | 0.9984 | 2149.61 | 0.55 mg/L | 1.84 mg/L |
| Total polyphenols (Folin-Cicalteu) | $y= 0.0268x + 0.0274$ | 0.989 | 0.01748 | 12 mg/L | 40 mg/L |
| TEAC (CUPRAC) | $y = 0.0034x - 0.0007$ | 0.9998 | 0.00252 | 2.2 μ M | 7.4 Mm |
| TEAC (ABTS) | $y = 0.0268x + 0.0878$ | 0.9729 | 0.018997 | 2.1 Mm | 7.1 Mm |
| TEAC (ORAC) | $y = 1.6774x - 2.107$ | 0.994 | 7.092 | 13 Mm | 42 μ M |



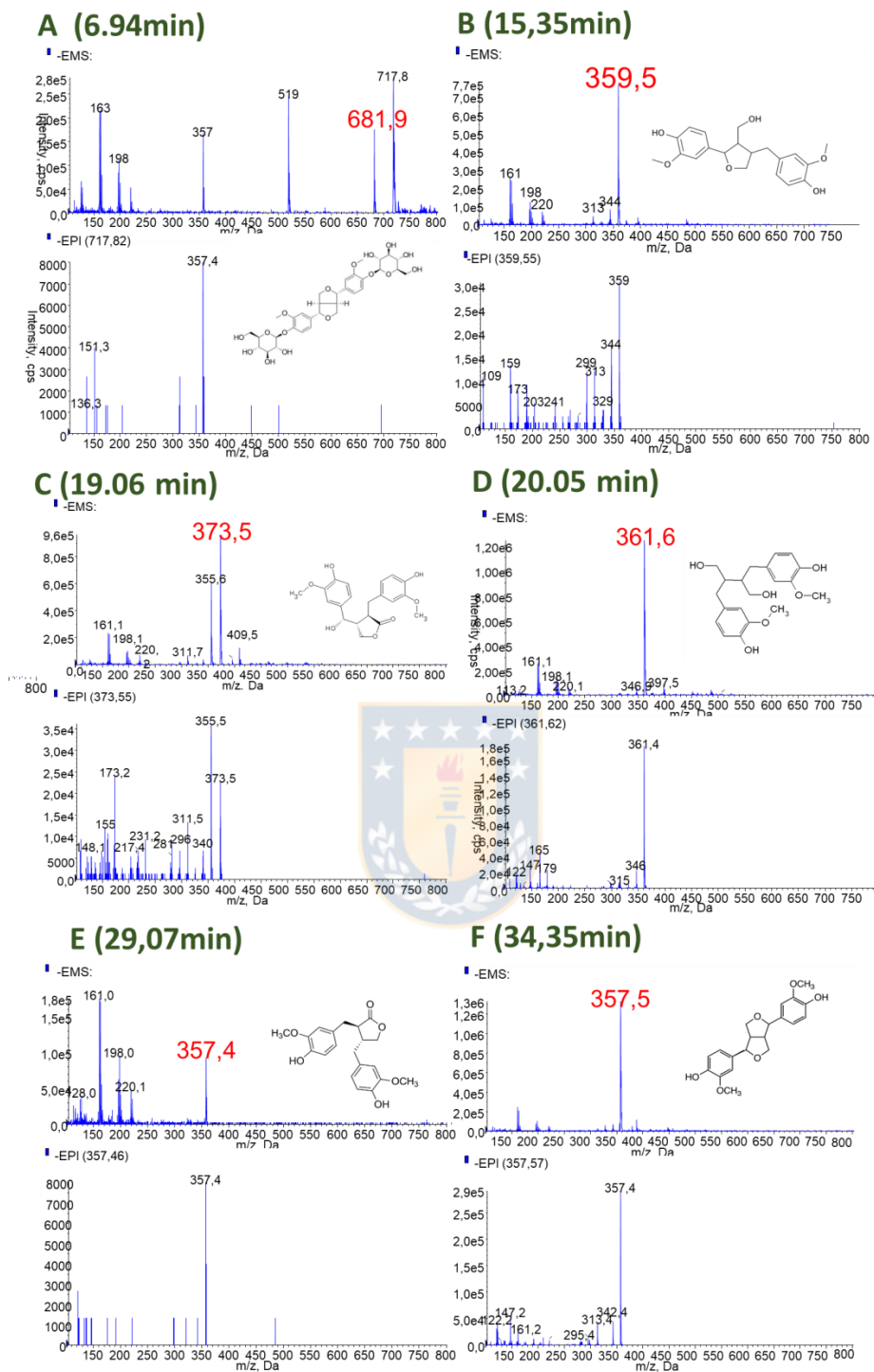


Figura 14: MS/MS spectra of targeted lignans screened in OS samples. Identification: A, pinosresinol diglucoside; B, lariciresinol; C, hydroxymatairesinol; D, secoisolariciresinol; E, pinosresinol; F, matairesinol.

Lignan extraction

To compare the extractions methods, the PIN concentration was evaluated alongside of the total polyphenolic content obtained in the extracts. These concentrations were calculated in a dry matter base for the sample and the final extract.

Comparing the chromatograms of the extracts of OS (figure 15) it can be observed that with the Soxhlet and US-B extractions there is a higher amount of compounds co-extracted making very difficult the determination of the targeted compounds. The extraction with SFE was considerably improved by the use of methanol as a co-solvent, where a larger amount of the targeted compound was achieved a cleaner separation was achieved, and the identification y subsequent quantification of pinoresinol was greatly improved.



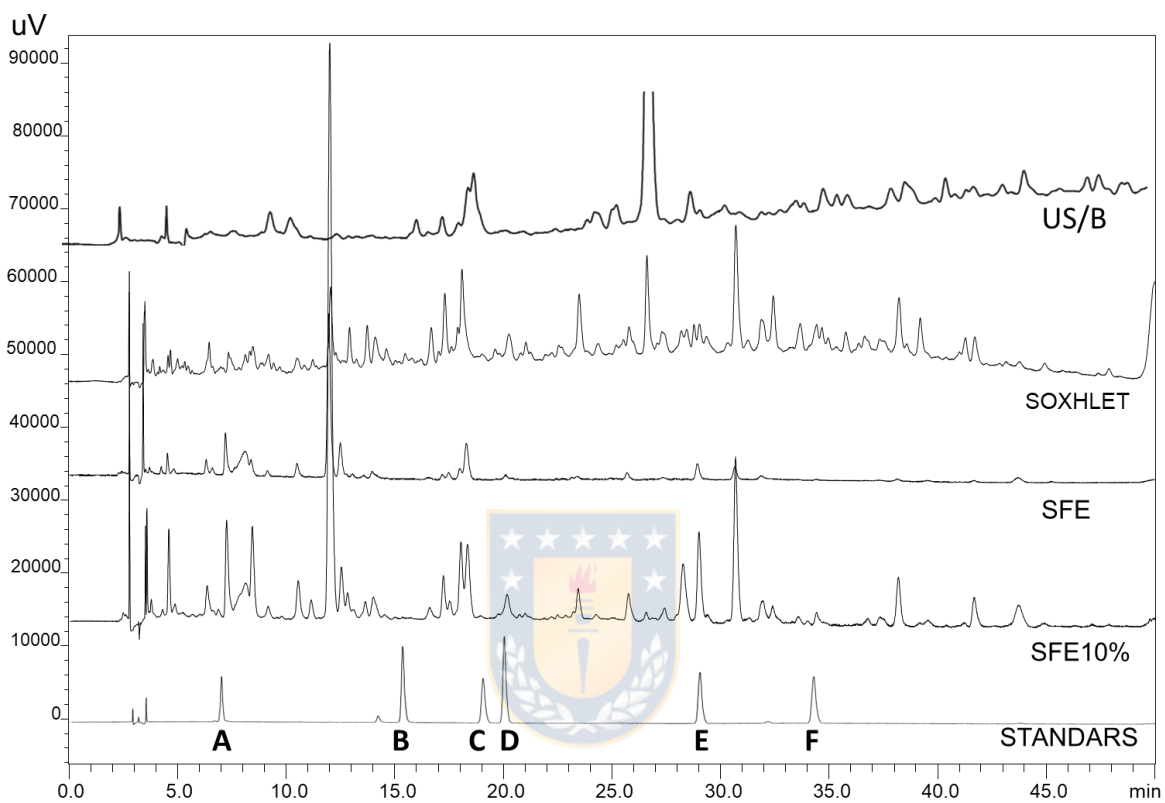


Figura 15: chromatograms of OS extracts made with (US/B) ultrasound assisted solid liquid extraction with basic hydrolysis; Soxhlet extraction; (SFE) CO₂ supercritical fluid extraction; (SFE10%) CO₂ supercritical fluid extraction with 10% methanol. Standards identification in figura 14.

Tabla 16: Pinoresinol concentration in olive stones by three extractive methodologies

Pinoresinol concentration in olive stones by three extractive methodologies

| Method | Total extraction time (h) | Pinoresinol | | Total Polyphenols | |
|------------------|---------------------------|-----------------|----------------------|---------------------|-------------------------|
| | | (mg/100g DW OS) | (mg/100g DW extract) | (GAE mg/100g DW OS) | (GAE g/100g DW extract) |
| US-B | 4 | 4.14 ± 0.01 | 196.4 ± 1.2 | 0.95 ± 0.01 | 4.4 ± 0.38 |
| Soxhlet | 36 | 2.06 ± 0.16 | 100.6 ± 4.2 | 0.22 ± 0.01 | 10.9 ± 0.14 |
| SFE 10% methanol | 2 | 1.01 ± 0.10 | 308.3 ± 2.8 | 0.08 ± 0.01 | 2.4 ± 1.21 |

Note: DW: dry weight; n=3; GAE: gallic acid equivalent.

Comparing the pinoresinol concentration obtained with the three extraction methods showed that the highest concentration of PIN was obtained through the extraction US-B, with twice as much than PIN extracted with Soxhlet. And with SFE+10% methanol half of the PIN extracted by Soxhlet was achieved (Table 16). If this comparison is made in basis of the concentration of PIN is expressed as the final dry extract obtained, the figure is reverted. The highest concentration was reached with the SFE+10%methanol and the lowest was with the Soxhlet extraction. This is consistent with the observed in the chromatograms of figure 15 were the number of compounds coextracted with Soxhlet is

considerably higher leading to a diminution in the proportion of PIN in the final extract. If this is compared with the total polyphenols content extracted on the basis of the dry matrix or in the final extract the same figure can be observed. With the SFE extraction a higher proportion of PIN is extracted with less co-extraction of other compounds. The total extraction time indicated in table 16 considers the complete sample treatment. The actual extraction time was determined during the optimization process and set at a point where an increase in time would not have a statistically significant increase in total lignan concentration. So, increasing the time for by US-B or SFE+10% methanol extractions would result in an extract with the same quantity of target compounds, but maybe with a larger amount of co-extracted compounds that may affect the purity of a final extract.

Oliveras-Lopez et al. [**Erro! Fonte de referência não encontrada.**] reported concentration of PIN between 0.016 and 0.037 mg/g of dry stones in four olive varieties obtained with methanol at reflux, with an average of 2.7 mg/100g of OS, which is three times as much as the PIN extracted with the SFE extraction (1.01 ± 0.03 mg/100g of dry OS), but with a method that required more than 24 h. It must be considered that in the first work, the olive stones were procured directly from fresh olive drupes, where in this case the olive stones are collected from the solid waste of the olive mill after the oils have been already extracted. With SFE the amount of total polyphenols extracted was 7.9 ± 0.1 mg of GAE/100g of dry OS and 2.4 g GAE/ g of dry extract. In Moroccan varieties of olives the stones have been reported to have a total polyphenol, content between 3.6 and 11.3 g GAE/g of dry weight with Soxhlet and between 4.0 and 11.5 g GAE/g with ultrasound assistance from fresh olive drupes [**Erro! Fonte de referência não encontrada.**].

Considering the time necessary and the concentration achieved the SFE extraction method is the most efficient to produce a more concentrated PIN extract of all the assayed methods, with a maximum amount of PIN obtained of 0.3% in the final extract.

Antioxidant capacity of OS extracts

The analytical parameters for the antioxidant capacity of the extracts are presented in table 15.

From these assays it can be observed that the extract with the highest antioxidant capacity is the one obtained with Soxhlet. In table 17 are summarized the results for the antioxidant capacity of olive stones extracts normalized to Kg of sample and to 100g of produced extract. There is no doubt that by Soxhlet there are a larger amount of polyphenolic compounds extracted from the sample, which can be observed in the Folin-Ciocalteu assay and that are most likely other type of polyphenols with antioxidant capacity that have been already described [11, 12], this also is shown by the higher antioxidant capacity measured by ABTS, CUPRAC and ORAC-FL assays. However, this pattern is reverted when the antioxidant capacity is considered in function of the extract produced, where the higher levels were found in the extract produced by SFE, especially since this extract has a lower concentration of polyphenols than the extract made by Soxhlet, and a higher concentration of pinoresinol. In an OS extract made by solid-liquid extraction with 80% methanol an antioxidant activity by ABTS assay was evaluated reaching a TEAC of 436 μM [Erro! Fonte de referência não encontrada.], which compared with the liquid extracts produced by US-B, Soxhlet and SFE were $389 \pm 13 \mu\text{M}$, 3369 ± 158

μM and $2391 \pm 347 \mu\text{M}$, respectively, it can be compared to the solid-liquid extraction assisted with ultrasound, but considerable lower than the Soxhlet and SFE extraction methods.

Tabla 17: Antioxidant capacity in extracted OS samples by three methods.

| | ABTS | | CUPRAC | | ORAC | |
|------------------|---------------------|----------------------------|--------------------|----------------------------|--------------------|----------------------------|
| | TEAC mmol /kg DW OS | TEAC mol /100g DW extract) | mmol TEAC/kg DW OS | TEAC mol /100g DW extract) | mmol TEAC/kg DW OS | TEAC mol /100g DW extract) |
| US-B | 4.9 ± 0.2 | 28.9 ± 0.2 | 1.1 ± 0.2 | 0.5 ± 0.1 | 11.8 ± 0.3 | 121.6 ± 0.4 |
| Soxhlet | 16.8 ± 0.8 | 6.2 ± 0.2 | 29 ± 2 | 133 ± 1 | 342 ± 25 | 461.4 ± 0.2 |
| SFE 10% methanol | 11.9 ± 1.7 | 25.84 ± 0.6 | 17 ± 2 | 439.8 ± 2.3 | 127 ± 15 | 1602 ± 7 |

Note: DW: dry weight; n=3; TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity.

CONCLUSION

The main lignan identified in olive stone extract was pinoresinol. The ultrasound solid liquid extraction assisted by basic hydrolysis was the method with the highest amount of PIN extracted, however with SFE using 10% of methanol produced the highest concentration of PIN in the final extract. With Soxhlet, extracts with higher antioxidant

capacity were produced per Kg of sample, but this capacity was higher in the dry extracts produced with SFE.

The SFE method to extract a valuable lignan such as pinoresinol was more efficient than Soxhlet and ultrasound assisted solid liquid extractions, producing a higher amount of PIN in the extract in less time and with less amount of interferents co-extracted.

Acknowledgments: The authors want to acknowledge the financial support of FONDECYT 11140229 and Proyecto PFB-27 grants.

References

1. N. Pellegrini, S. Valtuena, D. Ardigo, F. Brighenti, L. Franzini, D. Del Rio, F. Scazzina, P.M. Piatti, I. Zavaroni, *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 20, 64, (2010)
2. H. Adlercreutz, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 44, 483, (2007)
3. E. Roselló-Soto, M. Koubaa, A. Moubarik, R.P. Lopes, J.A Saraiva, N. Boussetta, N. Grimi, F.J. Barba, *Trends Food Sci Technol.* 45, 296, (2015)
4. E. Antonini, A. Farina, E.S. Scarpa, A. Frati, P.Ninfali, *Int J Food Sci Nutr*, 67, 9, (2016)
5. A. López-Biedma, C. Sánchez-Quesada, M. Delgado-Rodríguez, J.J. Gaforio, *J Funct Foods.* 26, 36, (2016)
6. H.K. Obied, D.R. Bedgood, P.D. Prenzler, K. Robards, *Anal. Chim. Acta*, 603, 176, (2007)

7. R.W. Owen, W. Mier, A. Giacosa, W.E. Hull, B. Spiegelhalder, H. Bartsch, *Clin. Chem.* 46(7), 976, (2000)
8. J. Poerschmann, B. Weiner, I. Baskyr, *Chemosphere*, 92, 1472, (2013)
9. A. Roig, M.L. Cayuela, M.A. Sanchez-Monedero, *Waste Manag.*, 26, 960, (2006)
10. R. Ghanbari, F. Anwar, K.M. Alkharfy, A.H. Gilani, N. Saari, *Int. J. Mol. Sci.* 13, 3291, (2012)
11. M.J. Oliveras López, M. Innocenti, F. Ieri, C. Giaccherini, A. Romani, N. Mulinacci, *J. Food Comp. Anal.* 21, 62, (2008)
12. A.B. Mansour, E.A. Porter, G.C. Kite, M.S.J. Simmonds, R. Abdelhedi, M. Bouaziz, *J. Agric. Food Chem.* 63, 1990, (2015)
13. D. Boskou. Olive and Olive Oil Bioactive Constituents. *Academic Press and AOCS Press*, 2015.
14. M.H. Alu'datt, I. Alli, K. Ereifej, M. Alhamad, A.R. Al-Tawaha, T. Rababah. *Food Chem.* 123, 117, (2010)
15. I.E.J. Milder, I.C.W. Arts, D.P. Venema, J.J.P. Lasaroms, K.Wähälä, P.C.H. Hollman, *J. Agric. Food Chem.* 52, 4643, (2004)
16. I.E.J. Milder, I.C.W. Arts, B. van de Putte, D.P. Venema, P.C.H. Hollman, *Br. J. Nutr.* 93, 393, (2005)
17. S.M. Willfor, A.I. Smeds, B.R. Holmbom. *J. Chromat. A*, 1112, 64, (2006)
18. M. Araújo, F.B. Pimentel, R.C. Alves, M.B.P.P. Oliveira, *Trends Food Sci. Technol.* 45, 200, (2015)

19. C. Vergara, D. von Baer, C. Mardones, A. Wilkens, K. Wernekinck, A. Damm, S. Macke, T. Gorena, P. Winterhalter, *J Agric Food Chem.* 60, 929, (2012)
20. C.N. Lin, A.M. Huang, K.W. Lin, T.C. Hour, H.H. Ko, S.C. Yang, Y.S. Pu, *Phytochem.* 71, 2140, (2010)
21. J.P.N. Ribeiro, L.M. Magalhães, S. Reis, J.L.F.C. Lima, M. A. Segundo, *Anal. Sci.* 27, 483, (2011)
22. B. Ou, H. Dejian, M. Hampsch-Woodill, J.A. Flanagan, E. K. Deemer, *J. Agric. Food Chem.* 50(11), 3122, (2002)
23. M. Elbir, N.E. Es-Safi, A. Amhoud, M. Mbarki, *Maderas Cienc Tecnol* 17(3), 479, (2015)



4.5.- Valorization of *Pinus radiata* wastes by lignans recovery with different extraction methods: Soxhlet, ultrasound-assisted and supercritical CO₂ ²

Abstract

The performance of three extraction techniques, Soxhlet, solid-liquid ultrasound-assisted with alkaline hydrolysis (US-AH), and supercritical CO₂ with methanol (SCE-CO₂), were evaluated for the recovery of bioactive lignans from *Pinus radiata* discarded wastes. These compounds are valuable and are interesting due to their activity against chronic diseases, such as cancer, and protection against osteoporosis and menopausal syndrome among other ailments. For this a HPLC-DAD-ESI-MS/MS method was developed to identify and quantify the target compounds, and total polyphenol content (Folin-Ciocalteu) and antioxidant capacity (ABTS, CUPRAC and ORAC assays) were optimized to evaluate the extracts produced from *P. radiata* wastes.

Matairesinol and nortrachelogenin were the main lignan identified in pine cones and knots, respectively. The total lignan concentration in knots extracted with Soxhlet, US-AH and SFE were 2.67±0.02, 1.49 ±0.1 and 1.41±0.13 g/Kg of dry weight (DW) sample, respectively. The extracts produced with Soxhlet and SFE yielded 10 g of total lignans per 100 g of DW extract. Although with both methods similar results are achieved, the use of supercritical fluid extraction with CO₂ produced the extract with less waste of solvents and time. The final extract also has high antioxidant capacity and could be aimed to the nutraceutical industry.

Keywords: wood knot; nortrachelogenin; lignan; *Pinus radiata*; Supercritical fluid extraction.

² Manuscrito Inostroza, Troncoso, Vergara. Valorization of *Pinus radiata* wastes by lignans recovery with different extraction methods: Soxhlet, ultrasound-assisted and supercritical CO₂ presentado a Waste Management con fecha Agosto 2018.

1.- Introduction

Lignans are secondary metabolites widely distributed in the plant kingdom, with functions such as phytoalexins protecting against diseases and pests (Gabaston et al. 2017; Großkinsky et al. 2012; Kebbi-Benkeder et al. 2015; Willför et al. 2006, Wijayanto et al. 2015). These are complex phenolic compounds that are formed by two phenylpropanoids C₆-C₃ units linked through a carbon-carbon single bond (C8-C8'), and they vary in the number of phenolic groups, polarity, in the structure of the carbon chains and they can exist as dimers, trimers (sesquilignans) and tetramers (dilignans) commonly called oligolignans (Raffaelli et al. 2002; Umezawa 2003; Willför et al. 2006).

Much of the interest in lignans is due to the variety of properties such as against bacterial infections (Martini et al. 2009), inflammation (During et al. 2012; Pellegrini et al. 2010), cancer (Arroo et al. 2002) and oxidative stress (Touré and Xueming, 2010), where lignans, such as nortrachelogenin has a radical scavenging capacity comparable to vitamins E and C (Erklund et al. 2005). Some of the plant lignans are hydrolyzed and metabolized by the microflora of the colon to enterolactone and enterodiol (Clavel et al. 2006; Raffaelli et al. 2002), which can confer protection against osteoporosis, cardiovascular disease, hyperlipidemia, breast, colon and prostate cancer, and menopausal syndrome (Ayella et al. 2010; Buck et al. 2011; Kiyama 2016; Landete 2012; Lowcock et al. 2013; Milder et al. 2005; McCann et al. 2010; Peterson et al. 2010; Zhang et al. 2015).

Lignans are found in significant concentrations in fiber-rich foods, such as whole grain and nuts, in lower concentrations in fruits, vegetables, soy and meats and alcoholic and non-alcoholic beverages (Durazzo et al. 2013; Milder et al. 2004, 2005; Peñalvo et al. 2008;

Smeds et al. 2012). To incorporate lignan rich food in the daily diet would be the goal to fight chronic diseases. However, due to diet cultural differences, there is also a notion to supplement food products with lignan rich extracts to enhance the intake of this bioactive compounds (Balík et al. 2017; Durazzo et al. 2013).

In wood, early studies showed that the main concentration of lignans were found in tree knots, in species such as Norway spruce (*Picea abies*) (6–24% of lignans), where the main lignans were hydroxymatairesinol, secoisolariciresinol and lariciresinol. In pine trees (*Pinus silvestris*) nortrachelogenin was the main lignan identified in knots (0.4–3%) (Holmbom et al. 2003) and in *P. banksiana*, *P. resinosa* and *P. sylvestris* the main monolignan was also nortrachelogenin (Pietarinen et al. 2006).

There are over four million ha. Radiata pine planted worldwide, with the largest plantations in Chile and New Zealand (about 1.5 million ha. each) and Australia (0.77 million ha.). Among these three southern hemisphere countries account for over 90 percent of the world's Radiata pine plantations (Mead, 2013). In Chile, the *Pinus radiata* crops represent 60% of the total cultivated forest for production purposes (INFOR, 2015). Roughly one third of this production was destined to cellulose pulp production for paper mills. Since knots are not use in the pulp production they are discarded, among other parts of the tree as waste, generating tons of potential source of polyphenols such as lignans (Holmbom et al. 2003). To the date, there is information on *P. radiata* by-products extracts (Aspé and Fernández, 2011; Bocalandro et al. 2012), but no information was found on the presence of lignans in Radiata pine or its by-products, which generates a deep interest in the amount of bioactive compounds, lignans in particular, that could be

obtained from the wastes generated from the most exploited tree species by the Chilean forest industry.

To extract phenolic compounds, such as lignans, a more exhaustive or drastic methodology may be needed, due to the high diversity in polarities which inevitably signifies that there may not be a single optimal conditions for all the main lignans. Among the different extraction methods for phenolic compounds from foods or lignocelulosic matrixes, solid-liquid extraction with polar protic solvents are most commonly used. The extraction of lignans assisted by the use of alkaline hydrolysis which can increase the lignan extraction yield from flaxseed by the rupture of links between lignans and other compounds via ester bonds without a large alteration of glycosides bonds that happens with acid hydrolysis (Alu'datt et al. 2010; Eliasson et al. 2003; Milder et al. 2004, 2005). The use of acid can lead to artefacts such as the formation of isolaricitin and anhydrosecoisolariciresinol (Adlercreutz, 2007). To improve the solid-liquid extraction the aid of the ultrasound cavitation force could increase the phenolic compounds extractability and shorten the extraction time (Chemat et al. 2017a; Meullemiestre et al. 2013; Roselló-Soto et al. 2015).

The effect of heating can also improve the extraction of lignans from seeds (Gerstenmeyer et al. 2013). The solid-liquid extraction of knotwood with acetone:water (95:5 v/v) hydrophilic compounds were obtained for *P. banksiana* (1.43 g/100g wood), *P. strobus* (0.96 g/100g), *P. resinosa* (0.54 g/100g), and *P. sylvestris* (2.73 g/100g) (Pietarinen et al. 2006). A more sophisticated method of extraction, like supercritical CO₂ has been used to obtain polyphenolic compound such as lignans from wood (de Melo et al. 2014). Using

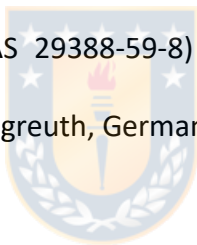
SCE-CO₂ on dead knotwood reached 0.14 g/100g *P. pinaster* wood, where nortrachelogenin was the main lignan quantified, and by the use of 10% of ethanol as a modifier in the extraction, these concentrations were four-fold increased (Conde et al. 2013a). The use of a modifier like methanol or ethanol can significantly rise the polarity of the extraction solvent helping in the extraction of more polar lignans (de Melo et al. 2014; Herrero et al. 2010). The later objective for finding a suitable method is to escalate the extraction to an industrial level. This selection must be done taking into account that US assisted extraction, can improve the solvent penetration between the wood fibers, or by SCE extraction more compatible solvent with human or animal consumption can be used (Chemat et al. 2017b). Even if it signifies a larger initial investment, these technologies could finally produce a more efficient and selective extraction leading to better extraction yields with lower solvent consumption and waste.

The aim of this work was to identify and quantify the lignans extracted from knots, bark and cones of *Pinus radiata* by means of Soxhlet, ultrasound assisted solid-liquid extraction with alkaline hydrolysis and supercritical fluid extraction, in order to assess whether there is some potential in these discarded wastes to obtain valuable lignans and which of the tested extraction methods is more efficient to obtain these compounds in an extract with an interesting antioxidant capacity.

2.- Materials and methods:

2.1.- Chemicals

All solutions were prepared using 18 MΩ deionized water from a Millipore Milli-Q water purification system. Acetonitrile, water, formic acid and methanol, all HPLC grade and methanol p.a., were purchased from Merck (Darmsadt, Germany). The standards of pinoresinol (≥95.0% Purity, CAS 487-36-5), nortrachelogenin (≥95.0% Purity, CAS 34444-37-6) and matairesinol (≥85.0% Purity, CAS 580-72-3) were obtained from Sigma-Aldrich Co. LLC (St. Louis, Missouri, United States). The standards of hidroxymatairesinol (CAS 20268-71-7), secoisolariciresinol (CAS 29388-59-8) and lariciresinol (27003-73-2) were obtained from Phytolab (Vestenbergsgreuth, Germany).



2.2.- Sample preparation

The pine knots were collected from forests in Bulnes, Bio-Bio region, in the south of Chile. The pine knot samples, once obtained, were mill milled to a size of less than 5mm, then lyophilized by a Christ alpha 2-4LD plus lyophilizer (Osterode, Germany) for 48 hours. The samples, once lyophilized, were re-ground to a size of less than 2 mm and then stored in hermetic containers at -20 °C until extraction.

Cone and pine bark samples were obtained from wastes provided by the University of Concepción's Technological Development Unit (UDT), which were dried and ground to a size smaller than 2 mm, then lyophilized and stored hermetically at -20 °C until use.

2.3.- HPLC-DAD-ESI-MS analysis

Lignan analyzes were carried out using a Shimadzu Nexera UHPLC system (Kyoto, Japan) equipped with a diode array detector (SPD-M10AVP) in line with a triple quadrupole mass spectrometer QTRAP 3200 (Sciex, Framingham, MA, USA) with a CLASS-VP control system and LabSolutions data collection software for DAD and Analyst software (version 1.5.2) for MS / MS analysis.

A core shell column Kinetex C-18 (150 x 4.6mm) 2.6 um and equipped with a pre-column of the same phase (Phenomenex, Torrance, CA, USA). The mobile phases were 0.1% formic acid in water (solvent A) and acetonitrile (solvent B), with a flow rate of 0.5 mL/min, a column oven temperature of 25 °C, and the injection volume of 10 µL. The mobile phase gradient was 10% of solvent B as initial condition, which increases to 40% in 50 min, then to 60% at 60 min, 100% at 64 min and maintained until 68 minute, then decreases to 10% until the minute 80, where it is left 5 min for stabilization. Spectrophotometric detection was set at 280 nm and quantification was performed by external calibration curves with the available commercial standards.

The lignan identity was assigned by ESI-MS/MS with a negative ionization voltage of -3500 V, a temperature of 350 °C, with a nitrogen as nebulizer gas (40 a.u.) and auxiliary gas (20 a.u.). The MS/MS identification was performed linking a full scan using the linear ion trap with a second experiment where the highest pseudomolecular ion was send to the collision cell in search of their product ions. In this way a MS/MS study of unknown compounds can be made in one chromatographic analysis. Limits of detection and

quantification (LODs and LOQs) were calculated estimating the typical error by least square method from a low concentration calibration curve, as described by Miller and Miller (2005).

2.4.- Extractions

Soxhlet extraction was used as a standard method to compare with US-AH and SCE. The optimization of the US-AH and SCE extraction methods were performed by multivariate experimental analysis, following a Box-Behnken model with variables such as solid-liquid proportion, temperature and NaOH concentration for US-AH, and extraction, temperature, pressure and cosolvent proportion for SCE.



2.4.1.- Soxhlet extraction

For Soxhlet extraction method, reference is made to Willför et al (2006) with modifications. 5 grams of sample was weighed and placed in a cellulose thimble and extracted for 24 h in a 250 mL Soxhlet apparatus with methanol. The methanolic extract was vacuum evaporated to 25 mL, later stored until analysis at -20 °C in amber bottles to protect them from light.

2.4.2.- Liquid-solid extraction with basic hydrolysis assisted by ultrasound.

For liquid solid extraction, the methodology used in Vergara et al (2012) was used as a reference, with some modifications and optimized. 2 g of ground sample were weighed and 20 mL of an ethanol/water solution (80:20%) NaOH 0.8M. Using an ultrasonic bar Cole-Parmer 4710 series (Chicago, IL) at a frequency of 60 Hz at 90°C for 6 cycles of 30 seconds for each extraction, then the sample is allowed to stir for 30 min before reapplying ultrasound under the conditions described above. The sample is again allowed to stir for 30 min and then centrifuged at 4000rpm for 5 min to collect the supernatant. The extraction is repeated 2 more times to the exhausted sample and the extracts are combined. The pH of the extract is then adjusted to 5 with concentrated HCl, and the extract is passed through solid phase extraction (SPE) C18 cartridges to remove the salts. The extract is eluted with of methanol. The extract is then reduced by vacuum evaporation, and the solution is brought up to 25 ml of methanol in a volumetric flask, which were stored until analysis at -20 °C in amber bottles to protect them from light.

2.4.3.- Supercritical Fluid extraction

The optimized extraction was carried out by means of a CO₂ supercritical fluid extractor Applied Separations, model Spe-ed™ SFE-2 (Allentown, PA, USA), at a temperature of 80 °C and 40 MPa of pressure. Methanol 20% (v/v) was used to modify the polarity of the extraction by means of a co-solvent pump. In each experiment the sample (5 g) was loaded into a 50 ml extraction cell and the remaining volume was filled with glass beads. The outlet valve was maintained at 120 °C and the extraction time was 90 min. The CO₂

outflow was maintained at 5 L/min. The extract was collected in 25mL of methanol, and then stored until analysis at -20 °C in amber bottles to protect them from light.

All extracts were diluted 1:1 with mobile phase solution, and filtered with GV Durapore filters (0.22 mm pore size, 13 mm diameter, Millipore, Bedford, MA) and placed in vials for further analysis by HPLC-DAD-ESI-MS/MS.

2.5.- Antioxidant capacity and total phenols assays

Three different antioxidant capacity assays (CUPRAC, ABTS and ORAC-FL) and Total Polyphenols were performed to the obtained extracts. The assays were made in a 96 well microplate reader (Synergy/HTX multi-mode reader, BioTek). All assays were made in triplicate.

Total phenols were determined using the Folin–Ciocalteu method (Singleton et al. 1999). A total of 50 µL of 1:5 diluted Folin–Ciocalteu reagent, 100 µL of 6% sodium carbonate, and 50 µL of extract were mixed well. The samples are stored at room temperature for 30 min, and the absorbance was measured at 760 nm. Gallic acid was used as a standard.

For radical ABTS generation from ABTS salt, 2.45 mM of $K_2S_2O_8$ was reacted with 7 mM ABTS salt in distilled water for 16 h at room temperature in the dark. The radical ABTS solution was then diluted with ethanol to obtain an initial absorbance of 0.7 at 734 nm. Fresh radical ABTS solution was prepared for each analysis and reactions were complete in 20 min at 30°C. Samples and standards (30µL) were mixed with the radical ABTS solution (190 µL) for 30 min. Trolox was used as a standard (Lin et al. 2010).

The ORAC assays were conducted in pH 7.0 phosphate buffer (K_2HPO_4 75mM and KH_2PO_4 75m M) at 37°C. Peroxyl radical was generated using 25µL of AAPH 152 mM, and 150 µL of fluorescein 0.011 µM was used as the substrate. Samples and standards (25µL) were mixed with the reaction solution for 30 min. Trolox was used as a standard and the fluorescence conditions of detection were 485 nm for excitation and 528 nm for emission. The CUPRAC assays were conducted in pH 7.0 with 50µL CH_3COONH_4 buffer 1M, 50 µL neocuproine 7.5mM and 50µL $CuCl_2$ 10mM at 37 °C for 15 min. This reaction solution was mixed with 25µL of samples or standards for 30 min at 37°C. Trolox was used as a standard and the detection was set at 450nm (Ribeiro et al. 2011).



3.- RESULTS AND DISCUSSION

3.1.- Lignan determination by HPLC-DAD-ESI-MS/MS

Previous tests showed that the extraction by Soxhlet is more exhaustive, and allows to extract a larger amount of compounds. For this reason, was the technique used for the preliminary identification of the lignans present on knots, cones and bark. By comparison of the retention times with the available standards, the UV-visible and mass spectra the identity of the compound of interest were assigned (table 18). It can be observed that in bark there is no noticeable amount of lignans detected by DAD (figure 16), and only traces of secoisolariciresinol was detected with mass spectrometry. In pine cones, small signals for secoisolariciresinol, nortrachelogenin and matairesinol were observed. In *P. radiata* knots was observed secoisolariciresinol, nortrachelogenin and pinoresinol, with small

signals for lariciresinol and matairesinol and traces of hydroxymatairesinol. The analytical parameters for HPLC-PDA lignan determination are shown in the table 19.

Tabla 18: Identification of lignans in Soxhlet extracts of *P. radiata* knots, cones and bark extracts by HPLC-DAD-ESI-MS/MS

| N° | Compounds | t _R (min) | λ (nm) | (M-H) ⁻ (m/z) | Fragments (m/z) | Mayor lignans detected in Soxhlet extract | | |
|----|----------------------|-------------------------|--------|-----------------------------|------------------------------|---|------|------|
| | | | | | | Knot | Cone | Bark |
| 1 | Lariciresinol | 22.5 | 280 | 359 | 344; 329; 299; 159 | + | | |
| 2 | Hydroxymatairesinol | 26.4 | 280 | 373 | 355; 311; 340; 296; 231; 160 | * | * | |
| 3 | Secoisolariciresinol | 27.5 | 279 | 361 | 165; 179; 223; 147; 129 | + | + | * |
| 4 | Nortrachelogenin | 33.6 | 280 | 373 | 327; 355; 164; 147 | + | + | |
| 5 | Pinoresinol | 36.5 | 280 | 357 | 136; 151 | + | | |
| 6 | Matairesinol | 41.5 | 280 | 357 | 313; 343; 209; 298; 122; 161 | * | + | |

Note: t_R, retention time; (M-H)⁻, pseudomolecular ion; +, above limit of detection;

*,traces.

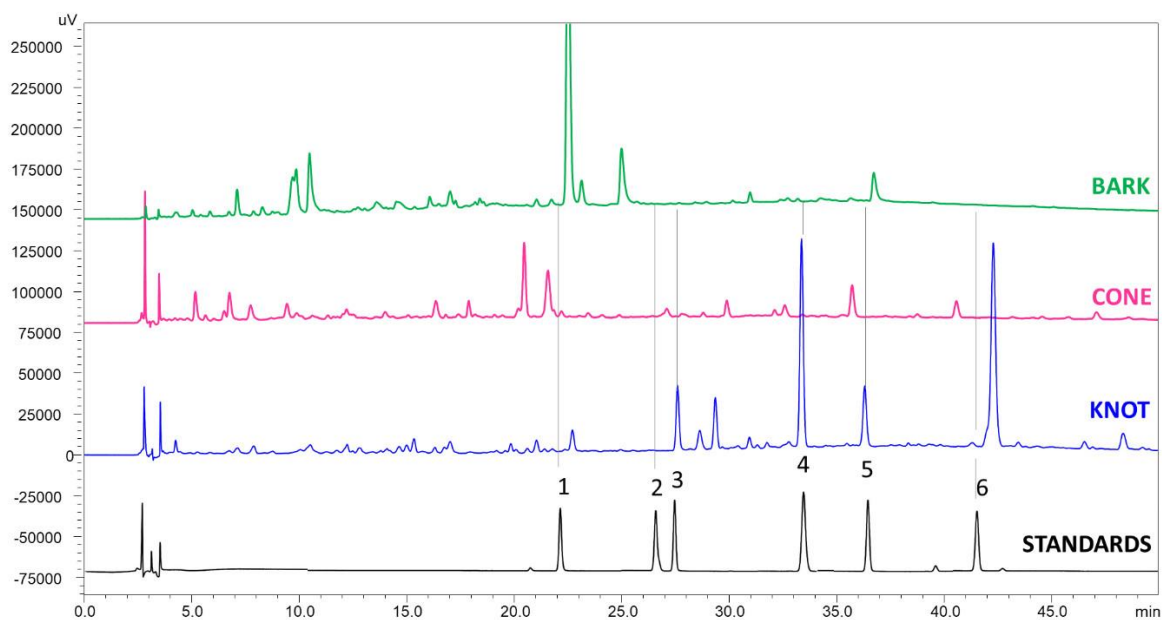


Figura 16: HPLC-DAD chromatograms of *P. radiata* Soxhlet extracts of knots, cones and bark. Identification in table 1.

Tabla 19: Analytical parameters for the chromatographic determination at 280 nm of the main lignans identified in extracts of *P. radiata* knots, cones and bark.

| Lignan | Equation | LOD Concentracion (mg/L) | LOQ | Typical error | R ² |
|----------------------|------------------------|--------------------------------|------|------------------|----------------|
| Lariciresinol | $y = 8583.4x - 375.9$ | 0.23 | 0.78 | 669.03 | 0.9995 |
| Hydroxymatairesinol | $y = 5949x + 255.8$ | 0.27 | 0.90 | 536.81 | 0.9996 |
| Secoisolariciresinol | $y = 8700.8x + 1474.3$ | 0.54 | 1.79 | 1557.11 | 0.9983 |
| Nortrachelogenin | $y = 9245.2x + 338.84$ | 0.62 | 2.07 | 1915.94 | 0.9966 |
| Pinoresinol | $y = 6746.1x + 712.2$ | 0.58 | 1.93 | 1299.32 | 0.998 |
| Matairesinol | $y = 6847.5x + 1063.6$ | 0.35 | 1.17 | 803.89 | 0.999 |

3.2.- Determination of lignans in P. radiata knots and cones by different extraction methods

For each matrix tested, extractions were made by Soxhlet, solid-liquid ultrasound-assisted extraction with alkaline hydrolysis (US-AH), and supercritical fluid extraction (SFE). For pine bark, quantifications were not performed because the concentrations were below the LOD. All the optimized methods were evaluated with the model fit parameters and pass the ANOVA test with 95% of confidence. During the multivariate optimization of the extraction methods the intraday precision was estimated and expressed as the relative standard deviation (RSD %). With Soxhlet extraction the RSD was 1% and 8% for knots and cones respectively, and considering the amount of solvent used, the time and the precaution required when performing the extraction, makes it a time consuming method. The exactitude of this extraction was 94 and 82% as the main lignan recovery for knots and cones respectively. For the solid-liquid ultrasound assisted extraction with alkaline hydrolysis the RSD was 7% and 12% for knots and cones respectively, with the main disadvantage of the amount of salts formed during the neutralization of the extract, which demands an extra cleaning step. The recovery for this extraction method was 101 and 91% for knots and cones, which indicate that in spite of the use of an aggressive hydrolysis and an ultrasound probe, there was no significant loss of lignans due to degradation. For the SFE extraction was 8% for knots and 5% for cones, with the related to the lower time and solvents needed and besides is an environment friendly technique, though the recoveries were lower than the other methods with 96% for knots and 85% for cones. The main disadvantages of SFE are the high cost of implementation and the limited range of polarity

of compounds that can be extracted, however the use of co-solvent allows a wider range of polarity. In figure 17 can be observed the difference between the chromatographic profiles of extracted lignans from knots. The Soxhlet extract is more complex due to the larger amount of compounds extracted resulting in a higher baseline at the end of the chromatogram. With SFE extraction of pine knots the chromatogram showed a minor presence of coextracted compounds of a more polar nature, which can be easily observed with the US-AH extraction.

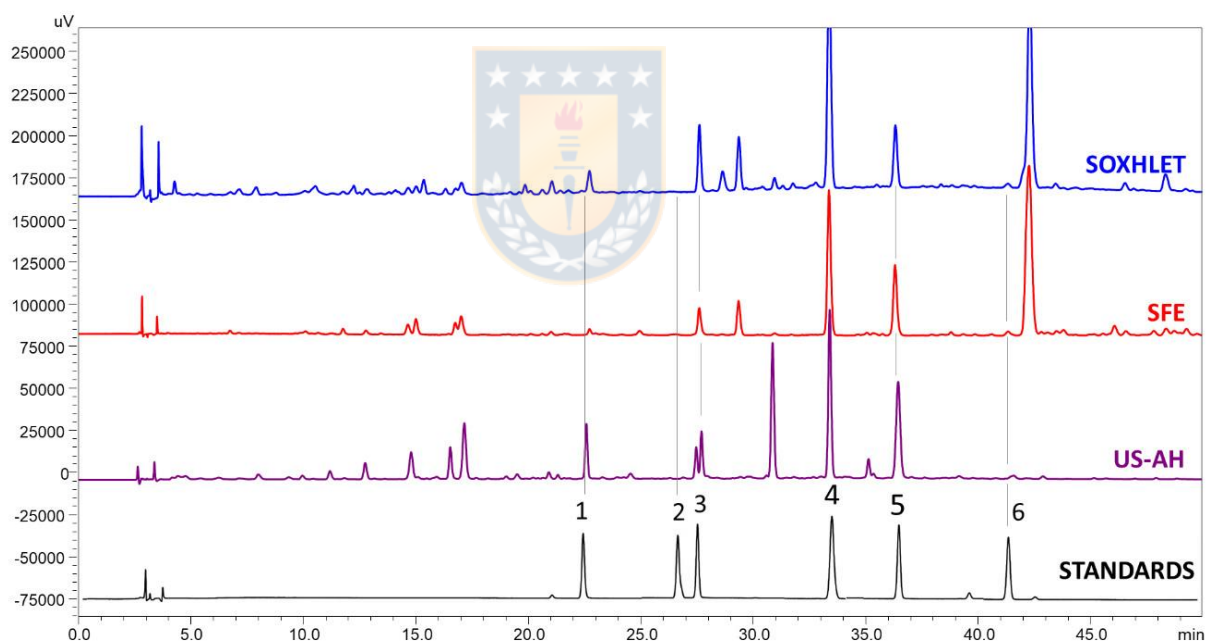


Figura 17: Chromatograms of pine knot extracts by US-AH (ultrasound assisted with basic hydrolysis), SFE (supercritical CO₂ with 20% of methanol) and Soxhlet. Identification in table 1.

The results of the quantification of lignans in *P. radiata* knots and cones by Soxhlet, SCE and US-AH are presented in table 20, where the total lignans are the sum of the identified lignans in each matrix, the concentration are expressed as g of lignans per Kg of dry weight (DW) sample, and also as the percentage of lignans in the final extract (g of lignans per 100 g DW extract). In *P. radiata* knots the main lignan was nortrachelogenin with the highest concentration 1.53 ± 0.01 g/Kg of sample achieved with Soxhlet extraction. With US-AH and SCE the amount of nortrachelogenin extracted was statistically the same ($P < 0.05$). Total lignans obtained from pine knots with Soxhlet extraction was almost 80% higher than the lignans extracted with US-AH or SCE. Holmbom et al. (2003) reported a concentration of total lignans in Norway spruce knots of 9.9% consisting mainly of hydroxymatairesinol. In the same tree species, Hovelstad et al. (2006) found a total lignan concentration of 6.54% w/w of freeze dried wood. In pine cones the highest concentration of lignan was matairesinol 0.19 ± 0.03 g/Kg DW sample with Soxhlet extraction.

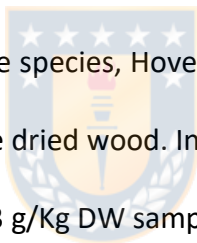


Tabla 20: Concentration of lignans in pine knots and cones

| | <i>Lignan concentration g/Kg DW sample</i> | | | | | | <i>Lignan concentration g in 100 g of extract (% w/w)</i> | | | | | |
|----------------------|--|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---|--------------|-------------|-------------------|--------------|------------|
| | PINE KNOTS | | | PINE CONES | | | PINE KNOTS | | | PINE CONES | | |
| | <i>SOXHLET</i> | <i>US-AH</i> | <i>SFE</i> | <i>SOXHLET</i> | <i>US-AH</i> | <i>SFE</i> | <i>SOXHLET</i> | <i>US-AH</i> | <i>SFE</i> | <i>SOXHLET</i> | <i>US-AH</i> | <i>SFE</i> |
| Lariciresinol | 0.14 ± 0.01 | 0.10 ± 0.01 | 0.13 ± 0.01 | N.D. | N.D. | N.D. | 0.6 | 0.2 | 1.0 | N.D. | N.D. | N.D. |
| Secoisolariciresinol | 0.39 ± 0.01 | 0.37 ± 0.11 | 0.13 ± 0.01 | 0.09 ± 0.02 | 0.11 ± 0.01 | 0.12 ± 0.01 | 1.6 | 0.7 | 1.0 | 0.4 | 0.3 | 0.7 |
| Nortrachelogenin | 1.53 ± 0.01 | 0.71 ± 0.05 | 0.79 ± 0.01 | 0.09 ± 0.01 | 0.07 ± 0.03 | 0.08 ± 0.01 | 6.2 | 1.3 | 5.8 | 0.5 | 0.2 | 0.4 |
| Pinoresinol | 0.59 ± 0.01 | 0.31 ± 0.03 | 0.36 ± 0.01 | N.D. | N.D. | N.D. | 2.4 | 0.5 | 2.6 | N.D. | N.D. | N.D. |
| Matairesinol | N.D. | N.D. | N.D. | 0.19 ± 0.03 | 0.16 ± 0.01 | 0.22 ± 0.01 | N.D. | N.D. | N.D. | 1.0 | 0.5 | 1.2 |
| Total lignans | 2.67 ± 0.02 | 1.49 ± 0.10 | 1.41 ± 0.13 | 0.37 ± 0.03 | 0.34 ± 0.04 | 0.42 ± 0.02 | 10.8 | 2.6 | 10.3 | 1.9 | 1.1 | 2.3 |

Note: n: 3 repetitions per extraction; N.D.: not detected;

Considering the different characteristics of the extraction methods used, the comparison was also made with the concentration of lignans obtained in the final extract. With Soxhlet and SFE the amount of total lignans extracted were approximately 10% w/w, with no significant difference between both extractions ($P < 0.05$). This level was considerably lower with US-AH extraction with less than 3% w/w. Pine cones have a considerable lower concentration of total lignans extracted, almost five times lower than knots. Conde et al. (2013a) showed a concentration of nortrachelogenin between 0.8 and 6% w/w of *Pinus pinaster* knots in water extracts. By comparison with other extraction methods in the same tree species, Conde et al. 2013b reported a total lignan concentration of 28.8 mg / g DW with SCE modifier in *Pinus pinaster* compared to the 82.1mg / g DW by accelerated solvent extraction. Willför et al. (2006) summarizes that the total lignan concentrations in *Picea abies* knots are approximately 40.1-102.8 mg/g DW, in *Abies alba* knots, total lignans are between 43.5 - 57.4 mg/g DW.

If the best result obtained for pine knots are extrapolated to a hypothetical industrial yield, a rough estimation account for 2.8 kg of total lignans for ton of dry pine knot.

3.3.- Antioxidant capacity and Total Polyphenols.

The highest total polyphenol concentration in Radiata pine knots was found with Soxhlet extraction, more than 10 times the polyphenols extracted with SFE and US-AH. This proportions change when the polyphenol concentration is expressed in the produced extract, Soxhlet extraction was 3 fold higher than SFE and 120 times higher than with US-

AH, as shown in table 21. The antioxidant capacity measured by ABTS and CUPRAC, showed a considerably higher capacity for the Soxhlet extracts, considering the amount of other phenolic compounds coextracted among the targeted lignans, reaching a better radical scavenging capacity. However, there is a different behavior in the ORAC assay where the extract produced with SCE showed a statistically higher protection capacity than the extract made with Soxhlet ($P < 0.05$). However, according to Conde et al. (2013b) the antioxidant capacity of this kind of complex extract is not only due to the individual contribution of each compound, but more related to the synergy between them. The authors also indicate that lignans have a large capacity to scavenge radicals, but with a slower reaction kinetic.



Tabla 21: Total polyphenols and Antioxidant Capacity of pine knots

Total polyphenols and Antioxidant Capacity of pine knots.

| | US-AH | | SOXHLET | | SFE | |
|------------------------------------|-------------|-------------|--------------|--------------|-------------|-------------|
| | Pine knots | extract | Pine knots | Extract | Pine knots | extract |
| Total polyphenols (g GAE/Kg DW) | 0.35 ± 0.02 | 0.48 ± 0.02 | 8.52 ± 0.04 | 60.5 ± 0.5 | 0.59 ± 0.01 | 21.4 ± 0.01 |
| ABTS (g Trolox /Kg DW) | 0.09 ± 0.01 | 0.07 ± 0.01 | 2.13 ± 0.01 | 17.3 ± 0.1 | 0.15 ± 0.01 | 2.2 ± 0.01 |
| CUPRAC (g Trolox /Kg DW) | 0.66 ± 0.01 | 0.56 ± 0.01 | 11.81 ± 0.03 | 95.6 ± 0.02 | 3.09 ± 0.01 | 45.2 ± 0.1 |
| ORAC (g Trolox /Kg DW) | 3.50 ± 0.01 | 3.0 ± 0.01 | 14.37 ± 0.01 | 116.2 ± 0.01 | 9.66 ± 0.07 | 141.0 ± 1.1 |

Note: GAE: gallic acid equivalents; DW: dry weight.

4.- Conclusions

The result of this investigation showed that wood knot from *Radiata* pine discarded mainly from cellulose industry, are a potential source for bioactive lignans. The best result to recover a lignan rich extract from knots were achieved with Soxhlet or SCE extraction, producing 10% total lignans in the extract. However, the use of SCE with CO₂ produced the extract in less time and with less use of solvents. The final extract has high antioxidant capacity that could be aimed to the nutraceutical industry.

Acknowledgments

The authors would like to thank Fondecyt Grant 11140229 and Project PFB-27 Grant.



5. References

- Adlercreutz, H., 2007. Lignans and human health. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 44(5-6), 483–525.
- Alu'datt, M.H., Alli, I., Ereifej, K., Alhamad, M., Al-Tawaha, A.R., Rababah. T., 2010. Optimisation, characterisation and quantification of phenolic compounds in olive cake. *Food Chem.* 123, 117–22.
- Arroo, R.R.J., Alfermann, A.W., Medarde, M., Petersen, M., Pras, N., Woolley, J.G. 2002. Plant cell factories as a source for anti-cancer lignans. *Phytochem. Rev*, 1, 27–35.

Aspé, E, Fernández, K., 2011. The effect of different extraction techniques on extraction yield, total phenolic, and anti-radical capacity of extracts from *Pinus radiata* Bark. *Ind. Crops Prod.* 34, 838–844.

Ayella, A., Lim, S., Jiang, Y., Iwamoto, T., Lin, D., Tomich, J., Wang, W., 2010. Cytostatic inhibition of cancer cell growth by lignan secoisolariciresinol diglucoside. *Nutr. Res.* 30(11), 762–769.

Balík, J., Híc, P., Kulichová, J., Novotná, P., Tříška, J., Vrchotová, N., Strohalm, J., Lefnerová, D., Houška, M., 2017. Musts with increased lignan content through addition of lignan extracts. *Food Bioprocess. Technol.* 10, 1367–1373.

Bocalandro, C., Sanhueza, V., Gomez-Caravaca, A.M., Gonzalez-Alvarez, J., Fernandez, K., Roedel, M., Rodriguez-Estrada, M.T. 2012. Comparison of the composition of *Pinus radiata* bark extracts obtained at bench- and pilot-scales *Ind. Crops Prod.* 38, 21–26.

Buck, K., Zaineddin, A.K., Vrieling, A., Heinz, J., Linseisen, J., Flesch-Janys, D., Chang-Claude, J., 2011. Estimated enterolignans, lignan-rich foods, and fibre in relation to survival after postmenopausal breast cancer. *Br. J. Cancer.* 105, 1151–1157.

Chemat F., Rombaut, N., Sicaire, A.G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A-S., Abert-Vian, M., 2017a. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultras. Sonochem.* 34, 540–560.

Chemat, F., Rombaut, N., Meullemiestre, A., Turk, M., Perino, S., Fabiano-Tixier, A-S., Abert-Vian, M., 2017b. Review of Green Food Processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 41, 357–377.

Clavel, T., Henderson, G., Engst, W., Doré, J., Blaut, M., 2006. Phylogeny of human intestinal bacteria that activate the dietary lignan secoisolariciresinol diglucoside. *FEMS Microbiol. Ecol.* 55(3), 471–478.

Conde, E., Hemming, J., Smeds, A., Diaz Reinoso, B., Moure, A., Willför, S., Dominguez, H., Parajo, J.C., 2013a. Extraction of low-molar-mass phenolics and lipophilic compounds from *Pinus pinaster* wood with compressed CO₂, *J. of Supercritical Fluids.* 81, 193–199.

Conde, E., Fang, W., Hemming, J., Willför, S., Moure, A., Dominguez, H., Parajo, J.C., 2013b. Water soluble components of *Pinus pinaster* Wood, *BioResources.* 8(2), 2047-2063.

de Melo, M.M.R., Silvestre, A.J.D., Silva, C.M., 2014. Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. *J. of Supercritical Fluids.* 92,115–176

Durazzo, A., Turfani, V., Azzini, E., Maiani, G., Carcea, M., 2013. Phenols, lignans and antioxidant properties of legume and sweet chestnut flours. *Food Chem.* 140(4), 666–671.

During, A., Debouche, C., Raas, T., Larondelle, Y., 2012. Among plant lignans, pinoresinol has the strongest antiinflammatory properties in human intestinal Caco-2 cells^{1–3}, *J. Nutr.* 142: 1798–1805.

Eklund, P.C., Långvik, O.K., Wärnå, J.P., Salmi, T.O., Willför, S.M., Sjöholm, R.E., 2005. Chemical studies on antioxidant mechanisms and free radical scavenging properties of lignans. *Org. Biomol. Chem.* 3, 3336–3347.

Eliasson, C., Kamal-Eldin, A., Andersson, R., Åman, P., 2003. High-performance liquid chromatographic analysis of secoisolariciresinol diglucoside and hydroxycinnamic acid glucosides in flaxseed by alkaline extraction. *J. Chromatogr. A*, 1012(2), 151–159.

Gabaston, J., Richard, t., Cluzet, S., Palos Pinto, A., Dufour, M., Corio-Costet, M., Mérillon, J., 2017. Pinus pinaster Knot: A Source of Polyphenols against Plasmopara viticola. *J. Agric. Food Chem.* in press, DOI: 10.1021/acs.jafc.7b04129.

Gerstenmeyer, E., Reimer, S., Berghofer, E., Schwartz, H., Sontag, G. 2013. Effect of thermal heating on some lignans in flax seeds, sesame seeds and rye. *Food Chem.* 138, 1847–1855.

Großkinsky, D. K., van der Graaff, E., Roitsch, T., 2012. Phytoalexin transgenics in crop protection-Fairy tale with a happy end? *Plant Sci.* 195, 54–70.

Herrero, M., Mendiola, J.A., Cifuentes, A., Ibáñez, E., 2010. Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. *J. Chromatogr. A*, 1217, 2495–2511.

Holmbom, B., Eckerman, C., Eklund, P., Hemming, j., Nisula, L., Reunanen, M., Sjöholm, R., Sundberg, A., Sundberg, K., Willför, S., 2003. Knots in trees – A new rich source of lignans. *Phytochem. Rev.* 2, 331–340.

Hovelstad, H., Leirset, I., Oyaas, K., Fiksdahl, A., 2006. Screening Analyses of Pinosylvin Stilbenes, Resin Acids and Lignans in Norwegian Conifers, *Molecules*, 11, 103-114.

INFOR Area of Information and Forest Economics, 2015, Chilean statistical yearbook of forestry 2015, Statistical Bulletin N°150, ISBN: 978-956-318-109-8.

Kebbi-Benkeder, Z., Colin, F., Dumarçay, S., Gérardin, P., 2015. Quantification and characterization of knotwood extractives of 12 European softwood and hardwood species. *Ann. Forest Sci.*, 72, 277–284.

Kiyama, R. 2016. Biological effects induced by estrogenic activity of lignans *Trends Food Sci. Technol.* 54, 186-196.

Landete, J. M., 2012. Plant and mammalian lignans: A review of source, intake, metabolism, intestinal bacteria and health. *Food Res. Int.* 46(1), 410–424.

Lin, C. N., Huang, A. M., Lin, K. W., Hour, T. C., Ko, H. H., Yang, S. C., & Pu, Y. S. (2010). Xanthine oxidase inhibitory terpenoids of *Amentotaxus formosana* protect cisplatin-induced cell death by reducing reactive oxygen species (ROS) in normal human urothelial and bladder cancer cells. *Phytochemistry*, 71(17-18), 2140–2146.

Lowcock, E.C., Cotterchio, M., Boucher, B.A., 2013. Consumption of flaxseed, a rich source of lignans, is associated with reduced breast cancer risk. *Cancer Causes Control.* 24, 813–816.

Martini, S., D'Addario, C., Colacevich, A., Focardi, S., Borghini, F., Santucci, A., Figuna, N., Rossi, C., 2009. Antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* strains and antioxidant properties of blackberry leaves (*Rubus ulmifolius*) and isolated compounds. *Int J Antimicrob Agents*, 34(1), 50–59.

McCann, S.E., Thompson, L.U., Nie, J., Dorn, J., Trevisan, M., Shields, P.G., Ambrosone, C.B., Edge, S.B., Li, H., Kasprzak, C., Freudenheim, J.L., 2010. Dietary lignan intakes in relation to survival among women with breast cancer: The Western New York Exposures and Breast Cancer (WEB) Study. *Breast Cancer Res. Treat.* 122, 229–235.

Mead, D.J. 2013. Sustainable management of *Pinus radiata* plantations. FAO Forestry Paper No. 170. Rome, FAO.

Meullemiestre, A., Petitcolas, E., Maache-Rezzoug, Z., Chemat, F., Rezzoug, S.A. 2016. Impact of ultrasound on solid–liquid extraction of phenolic compounds from maritime pine sawdust waste. Kinetics, optimization and large scale experiments *Ultrason. Sonochem.* 28, 230–239.

Milder, I.E.J., Arts, I.C.W., Venema, D.P., Lasaroms, J.J.P., Wähälä, K., Hollman, P.C.H., 2004. Optimization of a Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry method for quantification of the plant lignans secoisolariciresinol, matairesinol, lariciresinol, and pinoresinol in foods. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 4643–4651.

Milder, I. E. J., Arts, I. C. W., van de Putte, B., Venema, D. P., Hollman, P. C. H., 2005. Lignan contents of Dutch plant foods: a database including lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol and matairesinol. *Br. J. Nutr.*, 93(3), 393–402.

Miller, J.C, Miller, J.N., 2005. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 5th edition, Pearson, Prentice Hall, England.

Pellegrini, N., Valtueña, S., Ardigó, D., Brighenti, F., Franzini, L., Del Rio, D., Scazzina, F., Piatti, P.M., Zavaroni, I. 2010. Intake of the plant lignans matairesinol, secoisolariciresinol, pinoresinol, and lariciresinol in relation to vascular inflammation and endothelial dysfunction in middle age-elderly men and post-menopausal women living in Northern Italy. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 20, 64–71.

Peñalvo, J.L., Adlercreutz, H., Uehara, M., Ristimaki, A., Watanabe, S., 2008. Lignan content of selected foods from Japan. *J. Agric. Food Chem.* 56(2), 401–409.

Peterson, J., Dwyer, J., Adlercreutz, H., Scalbert, A., Jacques, P., McCullough, M.L., 2010. Dietary lignans: physiology and potential for cardiovascular disease risk reduction. *Nutr. Rev.* 68(10), 571–603.

Pietarinen, S.P., Willför, S.M., Ahotupa, M.O., Hemming, J.E., Holmbom, B.R., 2006. Knotwood and bark extracts: strong antioxidants from waste materials. *J. Wood Sci.* 52, 436–444.

Raffaelli, B., Hoikkala, A., Leppälä, E., Wähälä, K., 2002. Enterolignans. *J. Chromatogr. B*, 777, 29–43.

Ribeiro, J.P.N., Magalhães, L.M., Reis, S., Lima, J.L.F.C., Segundo, M. A. (2011). High-throughput total cupric ion reducing antioxidant capacity of biological samples determined using flow injection analysis and microplate-based methods. *Analytical Sciences*, 27, 483–488.

Roselló-Soto, E., Koubaa, M., Moubarik, A., Lopes, R.P., Saraiva, J.A., Boussetta, N., Grimi, N., Barba, F.J., 2015. Emerging opportunities for the effective valorization of wastes and by-products generated during olive oil production process: Nonconventional methods for the recovery of high-added value compounds. *Trends Food Sci. Technol.* 45, 296-310.

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299, 152-178.

Smeds, A.I., Eklund, P.C., Willför, S.M., 2012. Content, composition, and stereochemical characterisation of lignans in berries and seeds. *Food Chem.* 134(4), 1991–1998.

Touré, A., Xueming, X., 2010. Flaxseed Lignans: Source, Biosynthesis, Metabolism, Antioxidant Activity, Bio-Active Components, and Health Benefits, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 9, 261-269.

Umezawa, T. 2003. Diversity in lignan biosynthesis. *Phytochem. Rev.* 2, 371–390.

Vergara, C., Von Baer, D., Mardones, C., Wilkens, A., Wernekinck, K., Damm, A., Macke, S., Gorena, T., Winterhalter, P., 2012. Stilbene levels in grape cane of different cultivars in southern Chile: Determination by HPLC-DAD-MS/MS method. *J. Agric. Food Chem.* 60(4), 929–933.

Willför, S.M., Smeds, A.I., Holmbom, B.R., 2006. Chromatographic analysis of lignans. *J. Chromatogr. A.* 1112, 64–77.

Wijayanto, A., Dumarcay, S., Gerardin-Charbonnier, C., Kartika Sari, R., Syafii, W., Gerardin, P, 2015. Phenolic and lipophilic extractives in *Pinus merkusii* Jungh. et de Vries knots and stemwood. *Ind. Crops Prod.*, 69, 466–471.

Zhang, Y., Li, S., Gan, R., Zhou, T., Xu, D., Li, H., 2015. Impacts of Gut Bacteria on Human Health and Diseases, *Int. J. Mol. Sci.* 16(4), 7493-7519.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES FINALES.

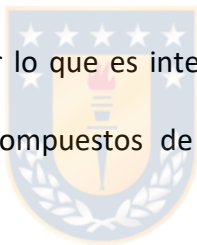


Se desarrolló de una metodología analítica por HPLC-DAD-ESI-MS/MS para la identificación y cuantificación de lignanos en matrices lignocelulósicas.

Se ensayaron diversas matrices consideradas desechos, como mazorca de maíz, paja de trigo, cascara de avena, borra de café, sarmientos de vid, tallos de zarzamora y cáscaras de piñón de araucaria, los cuales después de analizar los extractos por HPLC-DAD-ESI-MS/MS, no se identificaron lignanos dentro de sus compuestos mayoritarios.

De los anteriormente ensayados resultó interesante caracterizar los extractos de zarzamora, ya que se encontraron flavonoides y otros tipos de polifenoles dentro de los compuestos mayoritarios, lo cual no se encuentra reportado en literatura.

Para los extractos de piñón, tampoco ha aparecido alguna investigación sobre la caracterización de sus extractos, por lo que es interesante profundizar más en el tema, más aun habiéndose encontrado compuestos de alto interés, como flavonoides, en particular amentoflavona.



El principal lignano identificado en el extracto de cuescos de aceituna fue pinoresinol. La extracción líquido sólido por ultrasonido asistida por hidrólisis básica fue el método con la mayor cantidad de PIN extraído, sin embargo, con SFE utilizando 10% de metanol produjo la mayor concentración de PIN en el extracto final. Con Soxhlet, se produjeron extractos con mayor capacidad antioxidante por Kg de muestra, pero esta capacidad fue mayor en los extractos secos producidos con SFE.

Para extraer Pinoresinol, SFE fue más eficiente que Soxhlet y que la extracción sólido-líquido asistida por ultrasonido, produciendo una mayor cantidad de lignanos en el extracto, en menos tiempo y con menos cantidad de interferencias coextraídas.

Se puede observar que en la corteza no hay una cantidad apreciable de lignanos detectados por DAD, y solo se detectaron trazas de secoisolariciresinol con espectrometría de masas. En conos de pino, se observaron pequeñas señales para secoisolariciresinol, nortrachelogenina y matairesinol. En los nudos de *P. radiata*, se observó secoisolariciresinol, nortrachelogenina y pinoresinol, con pequeñas señales para lariciresinol y matairesinol y vestigios de hidroximatairesinol.

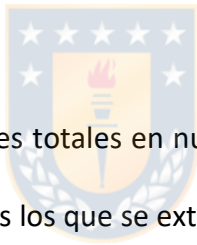
Las principales desventajas de SFE son el alto costo de implementación y el rango limitado de polaridad de los compuestos que se pueden extraer, sin embargo, el uso de co-solvente permite un rango más amplio de polaridad.

El extracto de corteza de pino en metanol a través del método Soxhlet es quien obtiene mayor concentración de polifenoles totales y mayor capacidad antioxidante con $16056 \pm 0,0231$ [ppm] según el método de Folin-Ciocalteu, $4331 \pm 0,0231$ [μ M] según CUPRAC y $128366,8 \pm 0,0231$ [μ M] en ORAC.

El extracto que tiene menor concentración de polifenoles totales son los cuescos de aceituna con $26,4 \pm 0,0860$ [ppm], $388 \pm 0,0246$ [ppm] y $108 \pm 0,116$ [ppm] para Folin-Ciocalteu, $21,2 \pm 0,017$ [μ M] para CUPRAC y $1143,4 \pm 9,3$ [μ M] en ORAC. Los extractos de cono de pino tienen una cantidad de 60% de polifenoles y 70 a 85% de lignanos en nudo de pino [Willför et al.].

El extracto de Soxhlet es más complejo debido a la mayor cantidad de compuestos extraídos, lo que resulta en una línea base más alta al final del cromatograma. Con la extracción de SFE de los nudos de pino, el cromatograma mostró una menor presencia de compuestos coextraídos de naturaleza más polar, que se pueden observar fácilmente con la extracción US-AH.

Si el mejor resultado obtenido para los nudos de pino se extrapola a un rendimiento industrial hipotético, una estimación aproximada representa 2,8 kg de lignanos totales por tonelada de nudo de pino seco.



La mayor concentración de polifenoles totales en nudos de pino Radiata se encontró con la extracción Soxhlet, más de 10 veces los que se extrajo con SFE y US-AH. Esta proporción cambia cuando la concentración de polifenoles se expresa en función del extracto producido, donde la extracción de Soxhlet fue 3 veces mayor que SFE y 120 veces mayor que con US-AH.

La capacidad antioxidante medida por ABTS y CUPRAC mostró una mayor capacidad para los extractos Soxhlet, considerando la cantidad de otros compuestos fenólicos coextraídos entre los lignanos dirigidos, alcanzando una mejor capacidad de eliminación de radicales. Sin embargo, hay un comportamiento diferente en el ensayo ORAC donde el extracto

producido con SFE mostró una capacidad de protección estadísticamente más alta que el extracto hecho con Soxhlet ($P < 0.05$).

Sin embargo, de acuerdo con Conde et al. (2013b) la capacidad antioxidante de este tipo de extracto complejo no solo se debe a la contribución individual de cada compuesto, sino que está más relacionada con la sinergia entre ellos. Los autores también indican que los lignanos tienen una gran capacidad para secuestrar radicales, pero con una reacción cinética más lenta.

Los mejores resultados para la obtención de un extracto rico en lignanos de los nudos se logró con la extracción Soxhlet o SFE, produciendo un 10% de lignanos totales en el extracto. Sin embargo, el uso de SFE con CO₂ produjo el extracto en menos tiempo y con menor uso de solventes. El extracto final tiene una alta capacidad antioxidante que podría ser un buen candidato para la industria nutracéutica.