INVESTIGACIONES Y AVANCES EN NUTRICION Y SALUD DE LOS ALIMENTOS

Bustos, Mariela Cecilia
Investigaciones y avances en nutrición y salud : trabajos completos del V CICYTAC 2014 / Mariela Cecilia Bustos ; Isabel Brutti ; Gabriela Pérez ; compilado por Romina Cabrera ... [et al.] ; coordinación general de Victoria Rosati ; editado por Alberto Edel León ... [et al.]. - 1a ed compendiada. - Córdoba : Ministerio de Industria,Comercio, Minería y Desarrollo Científico Tecnológico . Secretaría de Ciencia y Tecnología, 2015.
Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online
ISBN 978-987-45738-7-2

1. Nutrición. 2. Salud. I. Cabrera, Romina, comp. II. Rosati, Victoria , coord. III. León, Alberto Edel , ed.
CDD 613.2

Diseño: Noriega Julieta. Área de Comunicación. Secretaria de Ciencia y Tecnología de la Provincia de Córdoba.

ISBN 978-987-45738-7-2
9 789874 573872

EDITORES
MARIELA BUSTOS. (UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA, CÓRDOBA, ARGENTINA)
ISABEL BRUTTI. (UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA, CÓRDOBA, ARGENTINA)
GABRIELA PÉREZ. (UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA, CÓRDOBA, ARGENTINA)

PRÓLOGO

La V edición del CICyTAC reflejo el creciente interés de los diferentes actores de la sociedad por la calidad nutricional de los alimentos. Tanto el sector académico como el industrial intentan dar respuesta a las demandas de los consumidores cada día más preocupados por su salud. Los trabajos completos que se presentan en este libro son una muestra de los avances alcanzados por los diferentes grupos de investigación en este sentido que abarcan desde la caracterización de nuevas materias primas y la formulación de alimentos funcionales, hasta la evaluación de la biodisponibilidad de componentes y los estudios sobre el patrón de alimentación de poblaciones específicas. Es nuestra intención que este volumen sea un reflejo de los desafíos que científicos y tecnólogos abordamos para el desarrollo de alimentos con un mejor perfil nutricional y en el conocimiento de la estrecha relación entre la alimentación y la salud. Finalmente, queremos agradecer a los autores por haber atendido prontamente a las sugerencias de correcciones realizadas por los revisores y por su colaboración apuntando a que esta edición fuera de óptima calidad.

Los Editores.

ESTUDIO DE LA CALIDAD DE DIFERENTES MEZCLAS DE HARINAS PROTEICAS APLICANDO EL SOFTWARE MIXPROTLUNA

Bassett, M.N.[1], Espejo, L. [1], Sammán, N.C. [1]

1: Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO), CONICET-UNT, e Instituto de Química Biológica "Dr. Bernabé Bloj", Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, UNT. Chacabuco 461, T4000ILI – San Miguel de Tucumán, Argentina
E-mail: nsamman@arnet.com.ar

Resumen: El escore químico (SCh) de una proteína estima el balance de sus aminoácidos esenciales respecto de un patrón; cuando se busca estimar la utilización proteica es necesario corregir el SCh con la digestibilidad D (SChD). Las proteínas de granos andinos tienen buen valor nutricional, el cual dependería de las distintas variedades y condiciones de cultivo. El objetivo de este trabajo fue estudiar la variabilidad de la calidad proteica de harinas de quínoa y amaranto y de sus mezclas con otras harinas.
Se desarrolló una herramienta informática MixProtLUNA para facilitar el cálculo del SChD de mezclas proteicas; su base de datos se elaboró con información propia y de bibliografía. Se determinó el SChD de 12 variedades de quínoa y 13 de amaranto. Los resultados mostraron diferencias significativas en los valores respectivos. Las mezclas pueden mejorar su SChD dependiendo de las proporciones y variedades usadas.
La importancia de este trabajo radica en mostrar que la biodiversidad de los granos andinos influye en su valor nutricional y debe ser cuidadosamente considerada en la selección de variedades para la complementación con otras harinas y se puede facilitar utilizando el software MixProtLUNA que es una herramienta útil y de fácil manejo.

Palabras claves: quínoa, amaranto, escore químico, digestibilidad

Abstract: The protein chemical score (SCh) estimates the balance of essential amino acids (aae) for a protein pattern; when searching to assess their use by organism it is necessary to do a correction the SCh with protein digestibility (D). The Andean grains have a good nutritional value, which one differ according to the variety and growing conditions. The aim of this work was to study the variability of protein quality flour of different varieties of quinoa and amaranth and mixtures of these with other flours.
The MixProtLUNA tool that facilitates the calculation of SChD was developed and whose database was elaborated from own and bibliographic information. The SChD of 12 varieties of quinoa and 13 of amaranth were determined. Mixtures could improve their SChD depending on the proportions and varieties used.
The importance of this work is to show that the biodiversity of Andean grains affects their nutritional value and should be carefully considered in the selection of varieties for complementation with other flours and can be accomplished using the MixProtLUNA software which is a useful tool and easy to use.

Keywords: quinoa, amaranths, chemical score, digestibility

INTRODUCCIÓN

Existen vegetales que contienen proteínas de buen valor nutricional y el cual podría variar con las condiciones agroecológicas de cultivo y entre las diferentes variedades. El amaranto (*Amaranthus L.*) y la quínoa (*ChenopodiumquinoaWilldenow*) son especies ancestrales, que pertenecen a la familia Quenopodiáceas. La mayoría de las variedades de estos granos andinos difieren en la morfología, fenología y la composición química. Hoy, el amaranto ha recobrado popularidad como un viejo – nuevo cultivo, al igual que otros como quínoa y chía (*Salvia hispánica L.*), debido a los aspectos nutricionales beneficiosos que presentan algunos de sus componentes y sus ventajas agronómicas (León and Rosell 2007).

La OMS/FAO los califica como alimentos únicos por su alto valor nutricional ya que el balance de aminoácidos esenciales (aae) y contenido de micronutrientes son cercanos al ideal para el ser humano y pueden sustituir en algunas situaciones a las proteínas de origen animal. Actualmente, dada la tendencia mundial de obtener calidad de alimentos en términos proteicos y energéticos, resurgen estos cultivos como una excelente alternativa. El atractivo de estas plantas es que de ellas se puede aprovechar prácticamente todo y que su característica anatomía contribuye a su gran adaptabilidad a distintas condiciones ambientales. Algunas de las ventajas de estas plantas son su tolerancia a la sequía y altas temperaturas, junto a su rápido crecimiento (Jacobsen et al. 2003, Juan et al. 2007, Rastogi y Shukla 2013, Repo-Carrasco et al. 2003). Esto las convierte en una fuente de proteínas ideal en regiones donde las temperaturas y el abastecimiento de agua constituyen un grave problema. Además, poseen una proporción de gluten menor a 0,04%, dependiendo de las variedades, lo que las hace aptas sus harinas para elaborar productos para celíacos (Alvarez-Jubete et al. 2010, Giménez et al. 2013).

Por otro lado, el escore químico (SCh) de la proteína estima el balance de aminoácidos esenciales respecto de una proteína patrón; cuando se busca estimar su utilización biológica, es necesario corregir el SCh con la digestibilidad D (SChD). En la actualidad este es el método sugerido por la FAO (1991) para evaluar la calidad proteica. Cuando se busca cubrir los requerimientos proteicos más rigurosos, el SChD compara el perfil de aa de una proteína en estudio con las necesidades de niños mayores a 2 años, que representan los requerimientos más exigentes de los diferentes grupos etarios a excepción de los lactantes (FAO/WHO/UNU 2002, López et al. 2006). En la práctica nutricional no se dispone de información recopilada y actualizada respecto a los valores de SCh y SChD de los alimentos regionales y sobre todo considerando la biodiversidad de los mismos.La calidad proteica de un alimento puede mejorarse a través de la combinación de dos o más proteínas para lograr un valor nutricional de acuerdo al patrón respectivo de aminoácidos esenciales para el grupo etario seleccionado. Este proceso, mediante el cual se elimina o disminuye el déficit de aminoácidos esenciales de una proteína se denomina "Complementación Proteica". Ejemplo de esto es la combinación de cereales y legumbres, que ofrece una combinación de proteínas para mejorar el valor biológico (López y Suárez 2010). Estas características hacen que el enriquecimiento con legumbres o sus harinas de los productos elaborados tradicionalmente con cereales sea una

oportunidad de crear alimentos novedosos, y con elevada calidad nutricional y organoléptica (Cutullé et al. 2012, Sabaté 2005). Además de complementar contenidos nutricionales, estas mezclas ofrecen condiciones de asimilación y digestión importantes para la salud y nutrición. Si estas mezclas se consumen en cantidades suficientes, cubrirán las necesidades de energía y de proteína, pudiendo ser utilizadas en la alimentación de poblaciones de bajos recursos, así como en personas con riesgo nutricionales (Cerezal Mezquita et al. 2007).

Para facilitar la evaluación de la calidad proteica de mezclas se desarrolló un software (MixPortLUNA) de fácil manejo, que resulta útil para precisar el cálculo y realizar mezclas que realmente aumenten la calidad nutricional respecto de las harinas que la componen. Este programa también permitiría precisar el cálculo de mezclas proteicas destinadas a situaciones biológicas especiales como embarazo, lactancia, preescolares, escolares entre otras.

Por todo lo anteriormente expuesto, el objetivo de este trabajo fue estudiar la variabilidad de la calidad proteica de las harinas de diferentes variedades de quinoa y amaranto y de sus mezclas con otras harinas aplicando el software MixProtLUNA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se desarrolló la herramienta informática MixProtLUNA que facilita el cálculo del SChD y cuya base de datos fue elaborada a partir de la recopilación bibliográfica de composición de aae de alimentos proteicos. Algunos valores de D se determinaron "in vivo" por ensayos con ratas blancasWistar, provistas por el Bioterio del Instituto de Química Biológica de la UNTy otros se tomaron de bibliografía.

Se utilizó como referencia el patrónde puntuación de aae recomendado por la FAO para niños con edadescomprendidas entre los y los 2 años(FAO/WHO/UNU 2002).

Se trabajó con 12 variedades de quinoa y 13 de amaranto cuya composición fue recopilada de Bases de Datos Internacionales. Las mismas se combinaron con harinas de otros cereales y leguminosas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se muestran los SChD de las diferentes variedades de amaranto y quínoa evaluados. Se puede observar que existen diferencias significativas en los valores respectivos, lo cual implica diferencias en su composición en aae. El Amaranto hypochondriacus semilla amarilla (INTA Pergamino) presentó el mayor SChD mientras que el menor valor fue para las variedades A. muricatus y A. cruentus. Para quínoa el SChD más alto fue para el cultivar D407 de Colorado, EE.UU y el valor más bajo fue para el cultivar Sayaña, encontrándose valores intermedios para las otras variedades. Esto confirma que la biodiversidad existente se manifiesta en la composición química de los mismos.

Tabla 1: Escore químico corregido por digestibilidad en diferentes variedades de quínoa y amaranto

Variedad ***Amaranto (Amaranthus L.)***	**SChD**
A. HYPOCHONDRIACUS (semilla amarilla INTA)	91,1
A. CAUDATUS (semilla negra INTA)	88,4
A. VIRIDIS	55,2
A. POWELLI	68,0

A. MURICATUS	49,6
A. DEFLEXUS	74,4
A. GRAECIZANS	69,6
A. BLITOIDES	55,2
A. RETROFLEXUS	61,6
A. BLITUM	64,8
A. ALBUS	61,6
A. CRUENTUS	49,6
A. HYBRIDUS	80,0
Quinoa (ChenopodiumQuinoaWilldenow)	
C. QUINOA WILLD CULTIVAR D407	73,9
C. QUINOA WILLD VARIEDAD PIARTAL	64,8
C. QUINOA WILLD VARIEDAD PUNO (KVL 37)	60,0
C. QUINOA WILLD CULTIVAR RATUQUI ENCALILLA	56,6
C. QUINOA WILLD CULTIVAR ROBURA ENCALILLA	50,8
C. QUINOA WILLD CULTIVAR AMILDA BOLIVIA Y ARG.	59,9
C. QUINOA WILLD CULTIVAR CICA BOLIVIA Y ARG	59,9
C. QUINOA WILLD CULTIVAR KAMIRI BOLIVIA Y ARG	53,3
C. QUINOA WILLD CULTIVAR KANCOLLA BOLIVIA Y ARG	50,8
C. QUINOA WILLD CULTIVAR SAJAMA BOLIVIA Y ARG	53,3
C. QUINOA WILLD CULTIVAR SAMARANTI BOLIVIA Y ARG	50,8
C. QUINOA WILLD CULTIVAR SAYAÑA BOLIVIA Y ARG	44,3

*** A: Amaranto; C: Chenopodium. SChD: Escore químico corregido por digestibilidad**

Dos o más proteínas deficientes en aae pueden ser combinadas de forma tal que la deficiencia de uno o más aminoácidos esenciales pueda ser compensada por los de otra proteína. Cuando existe complementación, la mezcla de las proteínas complementarias proporcionan los aminoácidos esenciales con una mayor adecuación respecto de las necesidades del individuo que las consume, logrando un balance equilibrado de aminoácidos lo que permite que se usen más eficientemente.

En las Tablas 2 a), b) y c) muestran a modo de ejemplos combinaciones de proteína de A. Hypochondriacus y quinoa cultivar D407 con harinas de varios cereales y leguminosas en distintos porcentajes.

Se puede observar que los valores de SChD para las mezclas de A. hypochondraicus con las leguminosas y la mayoría de los cereales a excepción de avena aumentan. Esto significa que sus aae se complementan adecuadamente en la proporción estudiada. En cambio se puede observar que para el caso de la quínoa cultivar D407 no existió buena complementación con harina de maíz, ni centeno, a bajas combinaciones mientras que en combinación de 80/20 de proteínas de quínoa no existió una buena complementación con la mayoría de los cereales y/o leguminosas. Además en las tablas 2 a), b) y c) se observa que en general los cereales tienen un bajo contenido de lisina mientras que la mayoría de las leguminosas tienen un bajo contenido en aae azufrados. Esto hace posible su complementación para lo cual se requiere el cálculo de las proporciones adecuadas de proteínas de cada harina componente de la mezcla.

Tabla 2 a: Combinación de 30/70 de proteínas de amaranto o quínoa con cereales y/o leguminosa.

	A. HYPOCHONDRIACUS (SChD= 91,1)		**C. QUINOA W. CULTIVAR D407 (SChD= 73,9)**	
	SChD	**AA limitante**	**SChD**	**AA limitante**
Trigo (SChD= 55,7; AA lim=Lys)	71,3	Lys	70,8	Lys
Maiz (SChD= 49,3; AA lim=Lys)	65,3	Lys	47,8	Lys
Centeno (SChD= 43,5; AA lim=Lys)	61,6	Lys	42,1	Lys
Arroz Blanco (SChD= 54,8; AA lim=Lys)	69,6	Lys	68,6	Lys
Arroz (Harina) (SChD= 59,0; AA lim=Lys)	74,7	Lys	72,2	Lys
Avena (Avena sativa L.) (SChD= 52,3; AA lim=Lys)	42,1	Lys	66,9	Lys
Avena (SChD= 58,3; AA lim=Lys)	70,2	Lys	69,9	Lys
Soja (Grano) (SChD= 99,1)	102,9	-	95,2	-
Soja (Harina) (SChD= 98,9)	100,3	-	93,5	-
Haba (*Vicia fava*) (SChD= 35,9; AA lim=Met + Cys)	63,9	Met + Cys	58,4	Met +Cys
Poroto (*Phaseolus vulgaris*) (SChD= 57,3; AA lim=Met + Cys)	68,4	Val	63,6	Val
Porotorojo *(Phaseolus vulgaris*) (SChD= 43,7; AA lim=Met + Cys)	56,4	Val	56,8	Val, Leu
Poroto negro (*Phaseolus vulgaris*) (SChD= 39,0; AA lim=Met + Cys)	53,3	Leu	54,4	Leu
Garbanzo (*CicerArietinum L.*) crudo (SChD= 72,2; AA lim=Met + Cys)	78,3	Val	72,2	Val
Garbanzo (*CicerArietinum L.*) hervido (SChD= 76,5; AA lim=Met + Cys)	81,0	Val	74,8	Val

***A: Amaranto; C: Chenopodium. SChD: Escore químico corregido por digestibilidad. AA: aminoacidos. Lys: lisina, Met: metionina, Cys: Cisteina, Va: valina, Trp: triptofan**

Tabla 2 b: Combinación de 50/50 de proteínas de amaranto o quínoa con cereales y/o leguminosas

	A. HYPOCHONDRIACUS (SChD= 91,1)		**C. QUINOA W. CULTIVAR D407 (SChD= 73,9)**	
	SChD	**AA limitante**	**SChD**	**AA limitante**
Trigo (SChD= 55,7; AA lim=Lys)	82,7	Lys	72,9	Lys
Maiz (SChD= 49,3; AA lim=Lys)	78,3	Lys	45,9	Lys
Centeno (SChD= 43,5; AA lim=Lys)	73,9	Lys	32,8	Lys
Arroz Blanco (SChD= 54,8; AA lim=Lys)	80,6	Lys	54,4	Trp
Arroz (Harina) (SChD= 59,0; AA lim=Lys)	83,7	Lys	69,7	Lys
Avena (Avena sativa L.) (SChD= 52,3; AA lim=Lys)	78,0	Lys	76,4	Lys, Trp
Avena (SChD= 58,3; AA lim=Lys)	81,3	Lys	74,1	Lys
Soja (Grano) (SChD= 99,1)	102,3	-	87,5	-
Soja (Harina) (SChD= 98,9)	99,7	-	80,8	-
Haba (Vicia fava) (SChD= 35,9; AA lim=Met + Cys)	86,0	Trp, Val	55,1	Trp, Met +Cys
Poroto (Phaseolus vulgaris) (SChD= 57,3; AA lim=Met + Cys)	76,9	Val	62,4	Trp, Met +Cys
Porotorojo (Phaseolus vulgaris) (SChD= 43,7; AA lim=Met + Cys)	67,1	Val	65,6	Val
Poroto negro (Phaseolus vulgaris) (SChD= 39,0; AA lim=Met + Cys)	64,5	Leu	65,6	Leu
Garbanzo (CicerArietinum L.) crudo (SChD= 72,2; AA lim=Met + Cys)	84,6	Val	68,0	Trp, Val
Garbanzo (CicerArietinum L.) hervido (SChD= 76,5; AA lim=Met + Cys)	86,5	Val	59,2	Trp, Val

***A: Amaranto; C: Chenopodium. SChD: Escore químico corregido por digestibilidad. AA: aminoacidos. Lys: lisina, Met: metionina, Cys: Cisteina, Va: valina, Trp: triptofano**

Tabla 2 c: Combinación de 80/20 de proteínas de amaranto o quínoa con cereales y/o leguminosas

	A. HYPOCHONDRIACUS (SChD= 91,1)		C. QUINOA W. CULTIVAR D407 (SChD= 73,9)	
	SChD	AA limitante	SChD	AA limitante
Trigo (SChD= 55,7; AA lim=Lys)	95,9	-	23,2	Trp
Maiz (SChD= 49,3; AA lim=Lys)	96,4	-	11,8	Trp, Val
Centeno (SChD= 43,5; AA lim=Lys)	84,6	Leu	11,5	Trp, Val
Arroz Blanco (SChD= 54,8; AA lim=Lys)	93,5	-	22,1	Trp, Val
Arroz (Harina) (SChD= 59,0; AA lim=Lys)	96,6	-	22,9	Trp, Val
Avena (Avena sativa L.) (SChD= 52,3; AA lim=Lys)	90,8	-	80,4	Trp, Val
Avena (SChD= 58,3; AA lim=Lys)	91,7	-	33,6	Trp, Val
Soja (Grano) (SChD= 99,1)	97,2	-	34,0	Trp, Val
Soja (Harina) (SChD= 98,9)	96,6	-	34,4	Trp, Val
Haba (Vicia fava) (SChD= 35,9; AA lim=Met + Cys)	94,5		22,4	Trp, Val
Poroto (Phaseolus vulgaris) (SChD= 57,3; AA lim=Met + Cys)	88,0	Leu, Val	21,9	Trp, Val
Porotorojo (Phaseolus vulgaris) (SChD= 43,7; AA lim=Met + Cys)	81,0	Leu, Val	22,4	Val
Poroto negro (Phaseolus vulgaris) (SChD= 39,0; AA lim=Met + Cys)	80,1	Leu	22,4	Leu, Trp, Val
Garbanzo (CicerArietinum L.) crudo (SChD= 72,2; AA lim=Met + Cys)	91,0		22,7	Trp, Val
Garbanzo (CicerArietinum L.) hervido (SChD= 76,5; AA lim=Met + Cys)	92,0		23,0	Trp, Val

***A: Amaranto; C: Chenopodium. SChD: Escore químico corregido por digestibilidad. AA: aminoacidos. Lys: lisina, Met: metionina, Cys: Cisteina, Va: valina, Trp: triptofano**

Estos resultados indican que es necesaria una buena selección de la variedad para que la combinación en que los alimentos son consumidos sea eficiente en su aprovechamiento de las proteínas y lograr un nivel nutricional que conduzca hacia una mejor calidad de vida.

CONCLUSIÓN

La biodiversidad de los granos andinos influye en su valor nutricional y debe ser cuidadosamente considerada en la selección de las variedades que se emplearán para la complementación con otras harinas de cereales y/o leguminosas.

La complementación es una metodología que permite mejorar la calidad proteica y lograr productos de mayor valor nutricional para poblaciones de riesgo. Se puede lograr una buena complementación y obtener una proteína de mejor calidad, si se determinan las combinaciones adecuadas de proteínas de cada harina componente de la mezcla.

El programa informático MixProtLUNA es una herramienta que facilita el cálculo para la determinación de la mezcla adecuada de harinas proteicas.

BIBLIOGRAFÍA

Alvarez-Jubete, L., Arendt, E., and Gallagher, E. (2010). Nutritive value of pseudocereals and their increasing use as functional gluten-free ingredients.Trends in Food Science & Technology, 21(2), 106-113.

Cerezal Mezquita, P., Carrasco Verdejo, A., Pinto Tapia, K., Romero Palacios, N., and Arcos Zavala, R. (2007). Suplemento alimenticio de alto contenido proteico para niños de 2 a 5 años: desarrollo de la formulacion y aceptabilidad.Interciencia, 32(12), 857-864.

Cutullé, B., Berruti, V., Campagna, F., Colombaroni, M. B., Robidarte, M. S., Wiedemann, A., and Vázquez, M. (2012). Desarrollo y evaluación sensorial de galletitas de jengibre con sustitución parcial de harina de trigo por harina de arroz y lenteja (Gallentinas). Diaeta, 30, 25-31.

FAO/WHO/UNU. (2002). Protein and amino acid requirements in human nutrition: WHO technical report series no. 935. Geneva, Switzerland.

Giménez, M. A., Bassett, N., Lobo, M., and Sammán, N. (2013). Fideos libres de gluten elaborados con harinas no tradicionales: características nutricionales y sensoriales. Diaeta, 31(144), 19-23.

Jacobsen, S. E., Mujica, A., and Ortiz, R. (2003). La importancia de los cultivos andinos. Fermentum, 13(36), 14-24.

Juan, R., Pastor, J., Alaíz Barragán, M., Megías, C., and Vioque, J. (2007). Caracterización proteica de las semillas de once especies de amaranto. Grasas y aceites, 58(1), 49-55.

León, A. E., and Rosell, C. M. (2007). De tales harinas, tales panes : granos, harinas y productos de panificación en Iberoamérica. 1ª ed Córdoba, Argentina. Hugo Báez. pag.480.

López, L. B., and Suárez, M. M. (2010). Fundamentos de nutrición normal. El Ateneo.pag 19-22, 41-42,87, 92.

López, M. S., Kizlansky, A., and López, L. (2006). Evaluación de la calidad de las proteínas en los alimentos calculando el escore de aminoácidos corregido por digestibilidad. Nutrición Hospitalaria, 21(1), 47-51.

Rastogi, A., and Shukla, S. (2013). Amaranth: a new millennium crop of nutraceutical values. Crit Rev Food Sci Nutr, 53(2), 109-25.

Repo-Carrasco, R., Espinoza, C., and Jacobsen, S.-E. (2003). Nutritional value and use of the Andean crops quinoa (Chenopodium quinoa) and kañiwa (Chenopodium pallidicaule).Food reviews international, 19(1-2), 179-189.

Sabaté, J. (2005). Nutrición vegetariana. Madrid. España. Editorial Safeliz.pag 303.

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE MIELES DE DISTINTAS REGIONES DE ARGENTINA

Bentancour X, Malec L.S.

Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
malec@qo.fcen.uba.ar

Resumen: Se comparó la actividad antioxidante, el contenido de polifenoles totales y el color de veinte mieles argentinas procedentes de diversas regiones y de diferente origen floral (monoflorales y multiflorales). El contenido de polifenoles se determinó con el reactivo de Folin-Ciocalteau, la capacidad antioxidante se analizó mediante la inhibición del radical 2,2-difenil-1-picril-hidracilo (DPPH·) y el color se midió utilizando un fotómetro analizador de color para miel. La actividad antioxidante no varió significativamente ($p > 0,05$) según el origen floral o regional de las mieles, obteniéndose un amplio rango de valores de PI, que oscilaron entre 10,8 y 65,1 para mieles multiflorales y entre 5,2 y 41,9 para mieles monoflorales. Tampoco se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los contenidos de polifenoles y en la intensidad del color de estas mieles. No se registró una buena correlación entre la capacidad antioxidante y el contenido de polifenoles, como tampoco entre este último parámetro y el color. Sin embargo, se observó que conforme aumenta la intensidad del color también lo hace la actividad antioxidante, lo que puede atribuirse a que, además de los polifenoles, existen otras sustancias que contribuyen al color y que serían también responsables de la capacidad antioxidante de las mieles.

Palabras clave: miel, actividad antioxidante, polifenoles.

Abstract: the aim of this work was to compare the antioxidant activity, the total polyphenols content and color of twenty honey types from diverse geographical regions in Argentina and with different floral origin (multi and monofloral). The polyphenol content was determined with the Folin-Ciocalteu reagent, the antioxidant capacity was analyzed by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH·) radical-scavenging activity assay and color was measured using a color analyzer photometer for honey. The antioxidant activity did not vary significantly ($p > 0.05$) with its floral origin or geographical region. A wide range of PI values was obtained, which ranged between 10.8 and 65.1 for multifloral and between 5.2 and 11.9 for monofloral honey. No significant differences were found ($p > 0.05$) between the polyphenol contents and color intensity of these honeys. No good correlation was found between the antioxidant capacity and the phenolic content, neither between this last parameter and the color. However, it was observed that the antioxidant activity increased with color intensity, which can be attributed to other substances that may contribute to the color (besides polyphenols) and that would be also responsible for the antioxidant capacity of the honey.

Keywords: honey, antioxidant activity, polyphenols.

INTRODUCCIÓN

La miel es un alimento del que se tiene constancia de su utilización por numerosas civilizaciones y pueblos a lo largo de la historia, tanto para fines alimenticios como para fines terapéuticos. Además de su uso tradicional como agente edulcorante, este alimento constituye una interesante fuente de antioxidantes naturales. Existe un creciente interés por los efectos beneficiosos de estos antioxidantes, que deriva en parte de la capacidad de los mismos de proteger al organismo frente a enfermedades por su capacidad de eliminar radicales libres (Gheldof *et al.* 2003, Schramm *et al.* 2003). Por otro lado, también se ha demostrado la efectividad de este producto en la prevención de la oxidación lipídica en alimentos, especialmente en algunos productos cárneos (McKibben y Engeseth, 2002, Johnston *et al.* 2005, Antony *et al.* 2006, Nagal *et al.* 2006). En diferentes alimentos de origen vegetal, la actividad antioxidante ha sido atribuida principalmente a la presencia de compuestos fenólicos (Boudet 2007, Ignat et al. 2011). La miel consiste básicamente en una solución altamente concentrada de azúcares, pero también contiene pequeñas cantidades de otros constituyentes entre los que se encuentran los polifenoles (White 1979). Aunque es un alimento ampliamente estudiado desde hace varias décadas, el interés por estos compuestos es relativamente reciente. La composición de la miel puede modificarse considerablemente según su origen botánico presentando características y propiedades distintas tanto desde el punto de vista organoléptico como en su apariencia y actividad biológica. En particular, el contenido de polifenoles al tener su origen en las plantas, puede variar dependiendo de la vegetación del área donde se encuentren las abejas, y se ha observado también, una amplia variabilidad en la efectividad antioxidante de acuerdo al origen de la miel (Al-Mamary *et al.* 2002, Blasa *et al.* 2006, Viuda-Martos *et al.* 2008).

Las mieles argentinas son ampliamente reconocidas por su calidad. Nuestro país se encuentra entre los cinco principales productores mundiales de miel de abejas. Actualmente produce alrededor de 70.000 toneladas por año. Esta producción se caracteriza por su diversidad y es destinada prácticamente en un 95% a la exportación. Si bien un 50% de la misma se concentra en la provincia de Buenos Aires, existen otros polos productivos en Santiago del Estero, Misiones, Tucumán, Neuquén, Chubut, Córdoba, Entre Ríos, La Pampa y Santa Fe. El sector ha adquirido en los últimos años una importancia considerable en términos de volúmenes y de calidad de los productos. Su papel preponderante en el mercado mundial radica en la evolución de la calidad y confiabilidad, habiendo aprobado estándares internacionales cada vez más exigentes. Sin embargo, debido a la diversidad de regiones en las que se produce la miel y a los diferentes orígenes botánicos, tanto su composición como sus propiedades funcionales pueden variar significativamente.

La mayor parte de las investigaciones realizadas en mieles argentinas han sido enfocadas hacia el análisis de su composición, características físico-químicas y a aspectos microbiológicos (Pereyra Gonzales *et al.* 1999, Finola *et al.* 2007, Malacalza *et al.* 2007, Truchado *et al.* 2010). Sin embargo, y a pesar de sus potenciales efectos funcionales, no sólo por su consumo como tal, sino también por su utilización en la formulación de otros alimentos incrementando la estabilidad oxidativa de los mismos, los estudios acerca de su

capacidad antioxidante y de los componentes relacionados con la misma son escasos (Isla *et al.* 2011).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar y comparar la actividad antioxidante, así como el contenido de polifenoles y el color de veinte mieles argentinas procedentes de diversas regiones y diferentes orígenes, tanto monoflorales como multiflorales. Se analizó además, la correlación entre estos parámetros. Se determinó también el contenido de humedad, hidroximentil furfural y la acidez libre con el fin de asegurar condiciones comparables de calidad en las mieles analizadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se analizaron veinte muestras de miel de distintas regiones de Argentina obtenidas de productores apícolas durante la cosecha 2014. Entre éstas, nueve eran de origen monofloral, siendo las fuentes: algarrobo (*Prosopis* sp.), citrus (*Citrus* sp.), palo amarillo (*Lippia lycioides* Stend*)*, eucalipto (*Eucaliptus* sp.), quebracho (*Schinopsis balansae*), atamisqui (*Atamisquea emarginata*), chilca (*Bacharis* sp.), girasol (*Helianthus annuus*) y alfalfa (*Medicago sativa*). Las once restantes eran de origen multifloral.

Determinación de humedad

Se determinó por duplicado según el método A.O.A.C. 969.38 B (1990) utilizando un refractómetro marca ATAGO, modelo HHR-2N. Las muestras de miel fueron previamente calentadas a 40°C para disolver los cristales de azúcar presentes.

Determinación de Color

Se analizó por duplicado de acuerdo al método PFund. Norma IRAM N° 15941-2, utilizando un fotómetro analizador de color para miel marca HANNA, modelo HI 96785. Las muestras de miel fueron previamente calentadas a 40°C para disolver los cristales de azúcar presentes.

Determinación de Hidroximetilfurfural (HMF)

Se analizó por triplicado por el método A.O.A.C. 980.23 (1990). 5,0 g de muestra se disolvieron en aproximadamente 25 ml de agua bidestilada y se lo transvasó cuantitativamente a un matraz de vidrio de 50 ml. A continuación se agregaron 0,5 ml de reactivo clarificante Carrez I, 0,5 ml del reactivo clarificante Carrez II y se llevó a enrase con agua bidestilada. Una alícuota de la solución obtenida (12,0 ml aprox.) se centrifugó durante 5 minutos a 3600 rpm. Se tomaron 5,0 ml del sobrenadante y se lo diluyó con 5,0 ml agua bidestilada (muestra); el mismo procedimiento se realizó pero reemplazando al agua bidestilada por solución de bisulfito de sodio 0,20 % (referencia). Se leyó la absorbancia de ambas soluciones a 284 nm y a 336 nm en un espectrofotómetro UV-VIS Biotraza 752. La concentración de HMF se calcula según la siguiente expresión:

$$HMF\ (mg/kg_{miel}) = [(A_{muestra}-A_{referencia})_{284nm} - (A_{muestra}-A_{referencia})_{336nm}].149,74$$

Donde $A_{muestra}$ es la absorbancia que se midió en la solución con agua, $A_{referencia}$ es la absorbancia que se midió en la

solución con bisulfito de sodio y en el factor 149,74 se consideró la masa molar del HMF (126,0 g/mol), el coeficiente de extinción molar a 284 nm (16830) y el peso de la muestra (5,0 g).

Determinación de acidez libre

Se determinó por duplicado de acuerdo al método A.O.A.C. 962.19 (1990), por valoración potenciométrica con álcali. 10,0 g de muestra se pesaron en un erlenmeyer de 250 ml, se disolvieron en 75 ml de agua bidestilada hervida y enfriada y se agregaron unas gotas de fenoftaleína (0,1% en etanol) como indicador. A continuación se tituló la solución con hidróxido de sodio (0,05N) hasta pH 8,5, utilizando un electrodo de vidrio combinado. La concentración de acidez libre se expresó en mequivalentes por Kg de miel y se calculó con la siguiente expresión:

$$\text{Acidez Libre (meq/Kg}_{miel}) = V_{NaOH}.N_{NaOH}.f_{NaOH}.100$$

Donde V_{NaOH} es el volumen en ml que se gastó en la valoración, N_{NaOH} es la normalidad del hidróxido de sodio y f_{NaOH} es el factor del hidróxido de sodio.

Determinación de la actividad antioxidante

Se realizó por cuadriplicado mediante la reducción del radical $DPPH^{\cdot}$ de acuerdo al método de Turkmen *et al.* (2006), con algunas modificaciones. 0,75 ml de una solución de miel (0,1 g/ml), se mezclaron con 2,25 ml de $DPPH^{\cdot}$ (solución etanólica 0,1 mM). Se preparó una solución control de igual forma, reemplazando la solución de miel por agua bidestilada. Luego, se mantuvo la muestra en oscuridad a temperatura ambiente durante 60 min y se leyó la absorbancia a 517 nm en espectrofotómetro (PG Instruments modelo T60 UV-Vis). La actividad antioxidante se expresó como porcentaje de inhibición (PI) del radical $DPPH^{\cdot}$ y se calculó mediante la siguiente expresión:

$$PI = [(A_{control} - A_{muestra}) / Ac_{ontrol}] \times 100$$

Donde $A_{control}$ es la absorbancia medida en la solución sin miel y $A_{muestra}$ es la absorbancia medida en la solución que contiene a la muestra de miel. Para cada muestra se calculó luego el PI / g b.s.

Determinación de polifenoles totales

Se determinó por triplicado utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteau de acuerdo al método de Meda *et al.* (2005), con algunas modificaciones. A 0,5 ml de una solución de miel 0,1 g/ml se le agregaron 2,5 ml de solución del reactivo de Folin-Ciocalteau (10 ml del reactivo de Folin-Ciocalteau se llevaron a volumen con agua bidestilada en un matraz de 100 ml), se mezcló y se agregaron 2,5 ml de carbonato de sodio (75 g/l). A continuación, se mantuvo en oscuridad y a temperatura ambiente por 60 min. La absorbancia de la solución fue medida a 760 nm en espectrofotómetro (PG Instruments modelo T60 UV-Vis) contra un blanco preparado de igual manera pero reemplazando la solución de miel por agua bidestilada. Se realizó una curva de calibración utilizando ácido gálico como estándar con concentraciones de 20 a 100 mg/l. Los resultados fueron expresados como mg de

equivalentes de ácido gálico (GAE) por 100 g de miel en base seca (b.s.).

Análisis estadísticos

El análisis de los datos se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa Statgraphics Plus (5.1).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizaron los contenidos de polifenoles (expresados en mg ácido gálico /kg b.s.), la actividad antioxidante (expresada en PI /g b.s.) y el color (mm) de las mieles, así como también el contenido de humedad, HMF (mg / kg) y la acidez (meq / kg), con el fin de investigar posibles alteraciones.
Los contenidos de humedad, HMF y acidez de las veinte mieles analizadas se muestran en la **Tabla 1**.
Como puede observarse, todos los valores se encuentran dentro de los límites establecidos en el Reglamento Técnico Mercosur de Identidad y Calidad de la Miel (Código Alimentario Argentino, Resolución GMC Nº 015/94 - Incorporada por Resolución MSyAS N° 003, 11.01.95), que fija máximos de 20%, 40 mg/kg y 40 miliequivalentes /kg para estos parámetros respectivamente. En particular, los valores de HMF resultaron considerablemente más bajos que el máximo permitido. Por lo tanto, se puede inferir que todas las mieles son frescas y no sufrieron tratamientos inadecuados.

Tabla 1: Humedad, acidez e HMF de mieles monoflorales y multiflorales procedentes de distintas regiones de Argentina con límites de confianza del 95%.

Muestra	Tipo	Zona	Humedad (%)	Acidez (meq/Kg)	HMF (mg/Kg)
1	Algarrobo	San Luis	16,0 ± 0,2	14,0 ± 0,3	4,7 ± 0,6
2	Citrus	Entre Ríos	17,1 ± 0,3	37,5 ± 0,9	11,8 ± 0,9
3	Palo Amarillo	Córdoba	15,9 ± 0,2	18,0 ± 0,5	0,4 ± 0,1
4	Eucalipto	Entre Ríos	19,7 ± 0,4	33,5 ± 0,7	ND
5	Quebracho	Chaco	17,9 ± 0,4	34,0 ± 0,8	12,6 ± 0,3
6	Atamisqui	La Pampa	15,8 ± 0,3	10,5 ± 0,2	3,9 ± 0,5
7	Multifloral	La Pampa	16,5 ± 0,3	23,0 ± 0,4	1,5 ± 0,2
8	Multifloral	Buenos Aires	14,3 ± 0,4	16,0 ± 0,3	3,5 ± 0,1
9	Multifloral	La Pampa	15,4 ± 0,3	26,0 ± 0,6	1,6 ± 0,3
10	Multifloral	Córdoba	17,3 ± 0,4	29,5 ± 0,5	4,2 ± 0,1
11	Multifloral	Entre Ríos	16,8 ± 0,4	37,5 ± 0,8	ND
12	Multifloral	Buenos Aires	17,6 ± 0,5	26,5 ± 0,7	1,3 ± 0,3
13	Multifloral	Neuquén	15,7 ± 0,3	29,5 ± 0,6	4,9 ± 0,8
14	Multifloral	Chaco	17,2 ± 0,5	17,5 ± 0,5	5,03 ± 0,01
15	Chilca	Entre Ríos	17,8 ± 0,4	40,0 ± 1,0	3,25 ± 0,01
16	Multifloral	Chaco	16,1 ± 0,3	16,5 ± 0,4	6,0 ± 0,1
17	Girasol	Chaco	17,7 ± 0,4	24,5 ± 0,5	6,6 ± 0,3
18	Alfalfa	Buenos Aires	16,5 ± 0,3	26,5 ± 0,7	3,5 ± 0,6
19	Multifloral	Tucumán	17,6 ± 0,5	24,5 ± 0,6	1,3 ± 0,2
20	Multifloral	Santiago del Estero	17,2 ± 0,4	25,0 ± 0,5	7,7 ± 0,7

En la **Tabla 2** figuran los contenidos de polifenoles (expresados en mg ácido gálico /100 g b.s.), la actividad antioxidante (expresada en PI /g b.s.) y el color (mm) correspondientes a las muestras monoflorales agrupados de acuerdo a la provincia de origen. En la **Tabla 3** figuran los datos correspondientes a los mismos parámetros obtenidos de las muestras multiflorales.

El contenido de polifenoles no varió significativamente ($p > 0,05$) según el origen regional de las mieles y tampoco entre las mieles de origen multifloral y las monoflorales, obteniéndose diferencias considerables entre las mieles de cada grupo. El rango obtenido fue de 241 a 1115 mg ácido gálico/kg b.s. para mieles monoflorales y de 375 a 1273 mg ácido gálico/kg b.s. para las multiflorales. Estos contenidos entran dentro del rango reportado por otros autores para mieles de diferentes países, encontrándose entre los valores más elevados (Alvarez-Suarez *et al.* 2010, Maurya *et al.* 2014).

Tabla 2: Color, polifenoles y actividad antioxidante de mieles monoflorales procedentes de distintas regiones de Argentina con límites de confianza del 95%.

Muestra	Tipo	Zona	Color (mmPfund)	PI/g b.s.	Polifenoles totales (mg_{AG}/Kg b.s)
18	Alfalfa	Buenos Aires	28 ± 1	10,7 ± 0,3	548 ± 9
5	Quebracho	Chaco	88 ± 3	41,9 ± 2,5	1115 ± 13
17	Girasol	Chaco	56 ± 2	24,8 ± 1,3	613 ± 8
3	Palo Amarillo	Córdoba	47 ± 1	15,2 ± 0,6	774 ± 8
2	Citrus	Entre Ríos	55 ± 1	22,8 ± 0,4	532 ± 3
4	Eucalipto	Entre Ríos	69 ± 2	38,6 ± 0,8	583 ± 8
15	Chilca	Entre Ríos	39 ± 1	16,3 ± 0,5	517 ± 12
6	Atamisqui	La Pampa	16 ± 1	6,6 ± 0,4	241 ± 5
1	Algarrobo	San Luis	13 ± 1	5,2 ± 0,1	326 ± 4

Tabla 3: Color, polifenoles y actividad antioxidante de mieles multiflorales procedentes de distintas regiones de Argentina con límites de confianza del 95%.

Muestra	Tipo	Zona	Color (mmPfund)	PI/g b.s.	Polifenoles totales (mg_{AG}/Kg b.s.)
8	Multifloral	Buenos Aires	60 ± 2	21,2 ± 0,3	607 ± 13
12	Multifloral	Buenos Aires	27 ± 1	10,8 ± 0,3	375 ± 8
14	Multifloral	Chaco	42 ± 1	21,9 ± 1,1	750 ± 4
16	Multifloral	Chaco	53 ± 2	18,0 ± 1,1	507 ± 13
10	Multifloral	Córdoba	50 ± 2	22,8 ± 0,2	683 ± 5
11	Multifloral	Entre Ríos	78 ± 2	58,7 ± 1,4	1068 ± 17
7	Multifloral	La Pampa	59 ± 2	23,0 ± 1,4	513 ± 6
9	Multifloral	La Pampa	44 ± 1	14,1 ± 1,1	426 ± 7
13	Multifloral	Neuquén	87 ± 3	65,1 ± 0,3	995 ± 2
20	Multifloral	Santiago del Estero	36 ± 1	11,7 ± 0,1	780 ± 8
19	Multifloral	Tucumán	82 ± 2	34,7 ± 1,0	1273 ± 26

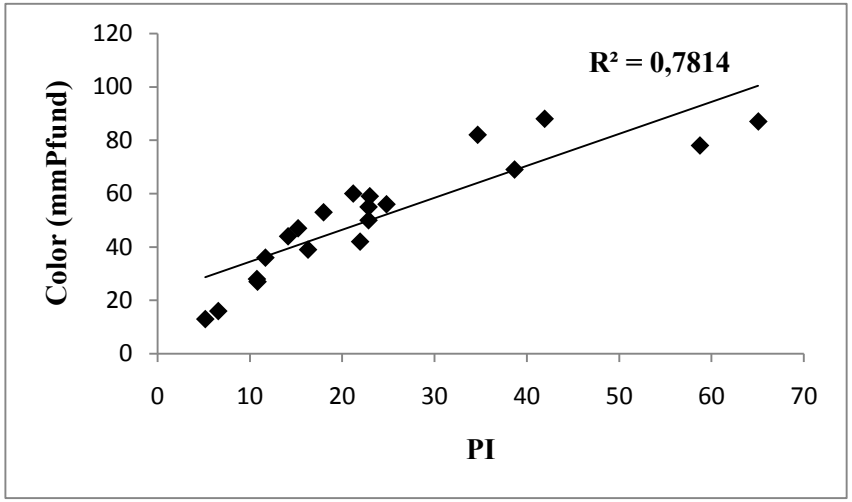
Tampoco se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre la actividad antioxidante ni en la intensidad del color de las mieles monoflorales y multiflorales. Los PI oscilaron entre 5,2 y 41,9 /g b.s. para las primeras y 10,8 y 65,1 /g b.s. para las segundas. El color varió también ampliamente, de 13 a 88 mm y de 27 a 87 mm para las mieles monoflorales y multiflorales respectivamente. Es de destacar que, dentro de las monoflorales, la miel de algarrobo que fue la de mayor

contenido en polifenoles, también presentó el mayor PI y resultó además, la más oscura.

En general, se considera que los compuestos fenólicos cumplen un rol importante en la capacidad antioxidante de los alimentos vegetales. En algunos trabajos se han reportado correlaciones positivas entre la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles en mieles (Alvarez-Suarez *et al.* 2010, Bertoncelj *et al.* 2007). No obstante, otros autores sugieren que la capacidad antioxidante de las mieles es el resultado de la acción combinada de diferentes compuestos (Gheldof *et al.* 2002, Ferreira *et al.* 2009).

En el presente trabajo, no se registró una buena correlación entre el PI y el contenido de polifenoles, como tampoco entre este último parámetro y el color. Sin embargo, se observó (**Figura 1**) que conforme aumenta el color también lo hace la actividad antioxidante.

Figura 1: Correlación entre el color y la actividad antioxidante (DPPH) de la miel.



CONCLUSIONES

El contenido total de polifenoles y la actividad antioxidante presentaron amplias variaciones entre las mieles procedentes de distintas regiones de la Argentina y de diferentes orígenes florales. No se observó buena correlación entre ambos parámetros, aunque en las más oscuras la capacidad antioxidante resultó más elevada. Esto puede atribuirse a que, además de los polifenoles, existen otras sustancias que contribuyen al color y que serían también responsables de la capacidad antioxidante de las mieles.

BIBLIOGRAFIA

Al-Mamary M, Al-Meeri A, Al-Habori M. 2002. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. Nutrition Research, 22: 1041–1047.

Alvarez-Suarez JM, González-Paramás AM, Santos-Buelga C, Battino M. 2010. Antioxidant Characterization of Native Monofloral Cuban Honeys. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58: 9817–9824.

Antony S, Rieck JR, Acton JC, Han IY, Halpin EL, Dawson PL. 2006. Effect of dry honey on the shelf life of packaged turkey slices. Poultry Science, 85: 1811-1820.

AOAC, Association of the Official Analytical Chemists, 1990. Official Methods of the Association of the Official Analytical Chemists, Ed. Horwitz, W., 15th ed., Washington, DC.

Bertoncelj J, Dobersek U, Jamnik M, Golob T. 2007. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. Food Chemistry, 105: 822-828.

Blasa M, Candiracci M, Accorsi A, Piacentini MP, Albertini MC, Piatti E, 2006. Raw Millefiori honey is packed full of antioxidants. Food Chemistry, 97: 217-222.

Boudet AM. 2007. Evolution and current status of research in phenolic compounds. Phytochemistry, 68: 2722–2735.

Código Alimentario Argentino, 2010. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos, Ministerio de Economía, República Argentina. Disponible en:
http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/marco/CAA/capitulospdf/Capitulo_X.pdf

Ferreira, I CF R, Aires E, Barreira, JCM, Estevinho L M. 2009. Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different

contributions of the entire honey and phenolic extract. Food Chemistry, 114: 1438-1443.

Finola MS, Lasagno MC, Marioli JM. 2007. Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. Food Chemistry, 100: 1649–1653.

Gheldof N, Xiao-Hong W, Engeseth N. 2002. Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 5870–5877.

Gheldof N, Wang XH, Engeseth NJ. 2003. Buckwheat honey increases serum antioxidant capacity in humans. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51:1500–1505.

Ignat I, Volf I, Popa VI. 2011. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. Food Chemistry, 126: 1821-1835.

Isla MI, Craig A, Ordoñez R, Zampini C, Sayago J, Bedascarrasbure E, Alvarez A, Salomón V, Maldonado L. 2011. Physico chemical and bioactive properties of honeys from Northwestern Argentina. LWT - Food Science and Technology, 44: 1922-1930.

Johnston JE, Sepe HA, Miano CL, Brannan RG, Alderton AL. 2005. Honey inhibits lipid oxidation in ready-to-eat ground beef patties. Meat Science, 70: 627-631.

Malacalza NH, Mouteira MC, Baldi B, Lupano CE. 2007. Characterisation of honey from different regions of the Province of Buenos Aires, Argentina. Journal of Apicultural Research, 46: 8-14.

Maurya S, Kushwaha AK, Singh S, Singh G. 2014. An overview on antioxidative potential of honey from different flora and geographical origins. Indian Jornal of Natural Products and Resources, 5: 9-19.

McKibben J, Engeseth NJ. 2002. Honey as a protective agent against lipid oxidation in ground turkey. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 592–595.

Meda A, Lamien CE, Romito M, Millogo J, Nacoulma OG. 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. Food Chemistry, 91: 571–577.

Nagal T, Inoue R, Kanamori N, Suzuki N, Nagashima T. 2006. Characterization of honey from different floral sources. Its functional properties and effects of honey species on storage of meat. Food Chemistry, 97: 256-262.

Pereyra Gonzales A, Burin L, Buera M.P. 1999. Color changes during storage of honeys in relation to their composition and initial color. Food Research International, 32: 185-191.

Schramm DD, Karim M, Schrader HR, Holt RR, Cardetti M, Keen CL. 2003. Honey with high levels of antioxidants can provide protection to healthy human subjects. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 1732–1735.

Truchado P, Tourn E, Gallez LM, Moreno DA, Ferreres F, Tomás-Barberán FA. 2010. Identification of Botanical Biomarkers in Argentinean Diplotaxis Honeys: Flavonoids and Glucosinolates. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58: 12678–12685.

Turkmen N, Sari F, Poyrazoglu ES, Velioglu YS. 2006. Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. Food Chemistry, 95: 653–657.

Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Alvarez JA. 2008. Functional Properties Of Honey, Propolis, And Royal Jelly. Journal of Food Science, 73: 117-124.

White J W. 1979. Composition of honey. En: E. Crane, editor. Honey: A comprehensive survey. London: Heinemann. Pág: 157-206.

EXTRACCIÓN DE FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS (FOS) DE RAÍCES FRESCAS DE YACÓN *(SMALLANTHUS SONCHIFOLIUS)*

Bonfiglio*, G.V[1, 2], Margalef, M.I[1,2], Daz, M [3,4]

1: Facultad de Ciencias de la Salud
2: Consejo de Investigación
3: Facultad de Ciencias Exactas
4: Instituto de Investigaciones para la Industria Química (INIQUI-UNSa-CONICET), Universidad Nacional de Salta. Avenida Bolivia 5150, Salta
*gise23829@gmail.com

Resumen: El yacón *(Smallanthus sonchifolius)* representa un recurso natural potencial de fructooligosacáridos (FOS), ya que es una raíz que los almacena como hidratos de carbono de reserva, en una proporción de 60–80 % de la materia seca. Los FOS son compuestos valiosos porque tienen efectos beneficiosos sobre la salud humana, derivados principalmente de su acción prebiótica. El objetivo de este trabajo fue diseñar un proceso de extracción de FOS de raíces frescas de yacón. Se estudió un tratamiento térmico para inactivar las enzimas responsables del pardeamiento enzimático y se optimizaron las variables que maximizaron la extracción de FOS con agua, usando un diseño experimental de tres factores (relación volumen de agua/masa de yacón, temperatura y tiempo de contacto agua/yacón) en tres niveles, con un total de 15 puntos. El análisis de resultados se realizó aplicando la Metodología de Superficie de Respuesta. Los extractos obtenidos en las condiciones óptimas fueron concentrados y secados por atomización ensayando almidón y maltodextrina como coadyuvantes obteniéndose productos de buena calidad. Se propone aquí un método sencillo para obtener un polvo rico en FOS a partir de raíces frescas de yacón que podría ser útil en formulación de alimentos funcionales.

Palabras Claves: Yacón- Fructooligosacáridos- Prebióticos

Abstract: Yacon *(Smallanthus sonchifolius)* represents a natural potential source of fructooligosaccharides (FOS), since it is the only root that stored them as reserve carbohydrates, in a ratio of 60 - 80% of dry matter. FOS are valuable compounds which have beneficial effects on human health, specifically due to its prebiotic action. The objective of this work was to design an extraction process of FOS from fresh yacon roots. The heat treatment was studied in order to inactivate the enzymes responsible of the enzymatic browning, and the variables which maximized the FOS extraction with water, were optimized using an experimental design of three factors (ratio volume of water / mass of yacon, temperature and contact time water / yacon) on three levels with a total of 15 points. The analysis of results was performed using the Response Surface Methodology. The extracts obtained under optimal conditions, were concentrated and spray-dried with starch and maltodextrin as adjuvants obtaining good quality products. In the present work, a simple method is proposed to obtain a powder rich in FOS from fresh yacon roots that could be useful for the formulation of functional foods.

Keywords: Yacon – Fructooligosaccharides - Prebiotic

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) son la principal causa de muerte en el mundo; representan más del 63 % de las defunciones y el 90 % de las mismas ocurren en los países de ingresos bajos y medios (Organización Mundial de la Salud 2011a). En Argentina son la principal causa de muerte y discapacidad; solo dos grupos (cardiovasculares y cáncer) son responsables de la mitad de todas las muertes y del 27% de los años de vida potencialmente perdidos (Ministerio de Salud de la Nación 2009). Esta realidad es concordante con el surgimiento de la "nutrición óptima" o "nueva nutrición", cuyo interés se centra en la relación entre la alimentación y la promoción de la salud (Ashwell 2004).

En la actualidad el interés de la población por las condiciones de salud y calidad de vida orientan las investigaciones hacia componentes bioactivos presentes en los alimentos (Araya et al. 2003). Entre los compuestos bioactivos cuyas propiedades saludables han sido evaluadas, se encuentran péptidos y aminoácidos, ácidos grasos, fitoesteroles, oligosacáridos no digeribles y fibra alimentaria, la cual es la que despierta mayor interés en el mercado de los alimentos funcionales (AF) (Starling 2007). En los últimos años se ha propuesto el término "Fibra Funcional", que se refiere a carbohidratos no digeribles aislados que tengan efectos fisiológicos beneficiosos en los seres humanos. Bajo estos términos, los fructanos se consideran parte de la fibra funcional (Kip et al. 2005).

Los fructanos son carbohidratos no digeribles formados por varias unidades de fructosa y un residuo común de glucosa. Pueden ser producidos por bacterias, algas, hongos y plantas. En las plantas los fructanos son usados como reservas de carbohidratos, encontrándose en distintos órganos como hojas, raíces, tubérculos, rizomas y frutos (Niness 1999, Madrigal y Sangronis 2007).

Los fructanos tipo inulina poseen casi exclusivamente enlaces β (2→1) fructosil-fructosa mientras que los tipos levano son moléculas con enlaces β (2→6) con presencia ocasional, o no, de enlaces β (2→1). El término fructano incluye tanto oligosacáridos como polisacáridos (Banguela y Hernández 2006). Generalmente la nomenclatura más utilizada en bibliografía para los fructanos tipo inulina con grado de polimerización de 2 a 10 es fructooligosacáridos (FOS), mientras que para los de grado de polimerización promedio más alto se utiliza más frecuentemente el término inulina.

Los FOS se pueden obtener a partir de fuentes naturales, mediante la extracción directa con agua caliente, o por síntesis enzimática a partir de la sacarosa, la cual es sometida a transfructosilación por acción de la enzima fructosiltransferasa (Antosová y Polakovic 2001).

En el Noroeste Argentino existen alimentos no tradicionales con propiedades saludables, siendo uno de ellos el yacón, el cual almacena en sus órganos subterráneos de reserva grandes cantidades de FOS como hidratos de carbono de reserva, en una proporción de 60–80 % de la materia seca, convirtiéndose en un recurso natural potencial de dichos componentes (Ohyama *et al.*1990, Asami 1991, Itaya *et al.* 2002). En la actualidad no existen antecedentes sobre la comercialización de FOS de yacón. En consecuencia el estudio sobre la técnica de extracción de los mismos permitiría recuperar y revalorizar esta raíz como ingrediente regional no tradicional para la elaboración de productos funcionales. El

objetivo del trabajo fue diseñar un proceso de extracción de FOS a partir de raíces frescas de yacón *(Smallanthus sonchifolius)* para obtener un producto en polvo con potencial aplicación en la elaboración de alimentos funcionales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se utilizaron raíces frescas de yacón *(Smallanthus sonchifolius)* variedad amarilla, cosecha 2013, con edad de cultivo de 8 meses procedentes de un predio experimental de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Salta (UNSa) y de productores de la localidad de Vaqueros, Salta.

Todos los reactivos químicos utilizados fueron de grado analítico siendo nistosa, kestosa, sacarosa, glucosa, fructosa, catecol, guayacol y Tritón X-100 de Sigma; ácido cítrico, fosfato de sodio, cloruro de potasio y ácido ascórbico de Merck; peróxido de hidrógeno de Cicarelli; maltodextrina con baja dextrosa equivalente (Globe 019110) y almidón de maíz modificado (Ultra Flo 3301) de Ingredion.

Métodos

Para todos los fines de este trabajo las raíces de yacón fueron seleccionadas de manera que fueran frescas y sanas, y con las siguientes características sensoriales: cáscara color marrón café, pulpa amarilla, olor vegetal, sabor suave, levemente dulce y textura firme, crujiente y fibrosa. Las raíces así seleccionadas fueron lavadas por aspersión con abundante cantidad de agua y cepillo con el objeto de eliminar impurezas y sustancias extrañas. Luego fueron cortadas manualmente con cuchillo, de manera transversal, en rodajas de aproximadamente 1 cm de espesor e inmediatamente utilizadas para el ensayo correspondiente.

Los FOS y otros azúcares fueron identificados y cuantificados por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), utilizando un equipo Knauer (Alemania), con la columna analítica Rezex RSO (Phenomenex) termostatizada a 30 °C, agua bidestilada y deionizada como fase móvil a un flujo de 0,2 ml/min y detección de índice de refracción. Se realizaron curvas de calibración con los estándares disponibles comercialmente: nistosa, kestosa, sacarosa, glucosa y fructosa. Para el análisis cuantitativo de los FOS de grados de polimerización superiores a los de los estándares se utilizó el factor de respuesta obtenido para kestosa y nistosa. Las muestras de raíces de yacón fueron preparadas triturando en licuadora una masa pesada de las mismas con agua, en una relación volumen de agua/masa de yacón de 10 a 1, colocando la mezcla resultante en un agitador orbital termostatizado a 90 °C, durante 40 minutos, y realizando posteriormente dos filtraciones, la primera con papel de filtro común y la segunda con membranas de 0, 45 µm de tamaño de poro. Se realizaron diluciones 1:10 de cada muestra y se inyectaron 20 µl.

A fin de controlar las reacciones de pardeamiento características del yacón, se ensayó un tratamiento térmico con el objeto de impedir la formación de compuestos coloreados indeseables durante el posterior proceso de extracción de FOS. Dicho tratamiento consistió en sumergir las rodajas en agua hirviente (aproximadamente 96 °C) durante diferentes tiempos desde 10 a 30 minutos. Se midieron las actividades de las enzimas polifenoloxidasa y peroxidasa en las raíces de yacón antes y después de cada tratamiento.

También se midió el contenido de FOS y otros azúcares en las raíces y en las aguas utilizadas para el tratamiento térmico. Todos los ensayos fueron realizados por quintuplicado. La muestra control consistió en raíces de yacón de la misma partida sin ningún tipo de tratamiento.

Las enzimas fueron extraídas de las raíces de yacón triturando 25 g de las mismas con 50 ml de solución reguladora ácido cítrico 0,1 M/fosfato de sodio 0,1 M pH 6.0, conteniendo ácido ascórbico 5 mM, cloruro de potasio 0,35 M y Tritón X-100 0,5 % (Neves y Da Silva 2007). La mezcla fue colocada en un agitador orbital durante una hora a temperatura ambiente y luego fue centrifugada a 10.000 rpm durante 40 minutos a 4 °C. La actividad de polifenoloxidasa se midió utilizando catecol como sustrato. La mezcla de reacción se preparó con 2 ml de solución reguladora ácido cítrico 0,1 M / fosfato de sodio 0,2 M pH 6.8, 1 ml de muestra y 2 ml de catecol 20 mM en la misma solución reguladora. Las reacciones se iniciaron con el agregado de catecol registrándose el cambio de absorbancia a 420 nm a 30 °C. Una unidad de actividad de polifenoloxidasa se definió como la cantidad de enzima que produjo un cambio de absorbancia de 0,1 por minuto a 420 nm.

La actividad de peroxidasa se midió utilizando la prueba de guayacol (Machado Assefh 2008). La mezcla de reacción consistió en 2 ml de solución reguladora ácido cítrico 0,1 M / fosfato de sodio 0,2 M pH 5,6, 0,2 ml de muestra, 0,1 ml de guayacol 40 mM y 0,1 ml de peróxido de hidrógeno 10 mM , ambos en la misma solución reguladora. Las reacciones se iniciaron con el agregado de peróxido de hidrógeno. Se registró el cambio de absorbancia a 480 nm a 30 °C. Una unidad de actividad peroxidasa se definió como la cantidad de enzima que produjo 1 μmol de tetraguayacol por minuto. Todos los ensayos de ambas actividades enzimáticas fueron realizados por duplicado.

Para optimizar el proceso de extracción de FOS se seleccionaron como variables de estudio la relación volumen de agua/masa de yacón, la temperatura y el tiempo de contacto agua/yacón (variables independientes) y el contenido de fructooligosacáridos en los extractos (variable dependiente). Se utilizó el diseño experimental de Box Behnken para tres factores y tres niveles con un total de 15 puntos experimentales que incluyeron 3 puntos centrales. Cabe señalar que el mismo fue replicado. Para los ensayos de extracción de FOS, 50 g de rodajas de raíces de yacón fueron tratadas térmicamente durante 10 min a 96 °C, luego fueron colocadas y trituradas durante 1 minuto, en una licuadora, con un volumen determinado de agua destilada. La mezcla se colocó en erlenmeyers de 500 ml y se incubó en un baño termostático,con agitación a 70 rpm a diferentes temperaturas por distintos tiempos. Luego de filtrar se determinó el contenido de FOS y otros azúcares en el sobrenadante. Para la selección del proceso de extracción se empleó el Método de Superficie de Respuesta (Elías et al. 2006). El programa estadístico utilizado fue Minitab 14. De esta manera se identificaron los niveles de los diferentes factores que maximizaron el contenido de FOS extraído. Las variables del diseño experimental utilizado se presentan en las Tablas 1 y 2.

Tabla N°1: Diseño compuesto central de tres factores

Relación volumen de agua/masa de yacón (ml/g)	-1	1/1
	0	5/1
	1	10/1
Temperatura	-1	30°C
	0	60°C
	1	90°C
Tiempo de contacto agua/yacón	-1	10 min
	0	25 min
	1	40 min

Tabla N° 2: Diseño experimental para la optimización del proceso de extracción de FOS

Experimento	Relación volumen de agua/masa de yacón	Temperatura	Tiempo de contacto agua/yacón
1	-1	-1	0
2	-1	1	0
3	1	-1	0
4	1	1	0
5	0	-1	-1
6	0	1	-1
7	0	-1	1
8	0	1	1
9	-1	0	-1
10	1	0	-1
11	-1	0	1
12	1	0	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

Extractos obtenidos en las condiciones óptimas fueron concentrados a la mitad de su volumen y con ellos se hicieron pruebas de secado por atomización utilizando un equipo de laboratorio Spray Dryer Buchi Mini modelo B290 con diferentes tipos y concentraciones de coadyuvantes. Los coadyuvantes utilizados fueron maltodextrina con baja dextrosa equivalente y almidón de maíz modificado en diferentes concentraciones hasta el 3%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Control de pardeamiento en Raíces de Yacón

El pardeamiento enzimático de frutas y vegetales se relaciona con la oxidación de compuestos fenólicos endógenos en o-quinonas inestables, las cuales posteriormente por reacciones de polimerización no enzimáticas forman compuestos de colores marrones, rojos y negros. El grado de pardeamiento depende de la naturaleza y cantidad de compuestos fenólicos endógenos, de la presencia de oxígeno, de los iones metálicos, del pH y la temperatura, y de la actividad de las polifenoloxidasas endógenas, siendo estas las principales enzimas involucradas en las reacciones de pardeamiento, aunque también se ha sugerido la participación de las peroxidasas. En particular las raíces de yacón contienen cantidades considerables de compuestos fenólicos (aproximadamente 2g / kg) con predominancia de derivados de los ácidos clorogénico y cafeico. La presencia de estos compuestos y la acción de las enzimas endógenas, provoca un típico de oscurecimiento de las raíces cuando son almacenadas, cortadas o procesadas (Neves y Da Silva 2007).
En este trabajo se planteó, como primer paso antes de la extracción de los FOS, el control del pardeamiento a través de un tratamiento térmico a fin de inactivar las enzimas involucradas en estos procesos. De esta manera se podría proceder a la extracción de los FOS evitando la presencia de

productos poliméricos coloreados contaminantes, que probablemente serían difíciles de separar posteriormente de los FOS extraídos. Se observó que un tratamiento térmico de 10 minutos en agua hirviente fue suficiente para inactivar tanto la polifenoloxidasa como la peroxidasa endógenas. Los extractos enzimáticos de las raíces de yacón sin tratamiento térmico dieron valores promedio muy bajos de actividad de peroxidasa 9,7 x 10^{-3} U/g, y un valor más alto de polifenoloxidasa 0,52 U/g. No se observó actividad de ninguna de las dos enzimas en raíces de yacón tratadas térmicamente durante 10 minutos.

Cabe destacar que el tratamiento térmico de 10 minutos en agua hirviente, antes de proceder a la extracción de los FOS, permitió la posterior obtención de extractos de color amarillo claro que permanecieron sin modificaciones en almacenamiento a temperatura de refrigeración y ambiente. No ocurrió lo mismo con extractos obtenidos de raíces de yacón sin tratar térmicamente, los cuales fueron de color verde oscuro o marrón y se oscurecieron más durante el almacenamiento aún en refrigeración. Sin embargo se presenta la desventaja de que parte de los FOS presentes en las raíces son extraídos por el agua durante el tratamiento térmico, en promedio aproximadamente un 30 %. No obstante se considera este tratamiento como adecuado, ya que si bien provocó una disolución de FOS en las aguas, las mismas podrían ser utilizadas para la posterior extracción de los FOS que permanecen en las raíces de yacón, recuperando de esta manera la totalidad de estos compuestos y eliminado la presencia de productos coloreados indeseables.

Otros autores utilizaron estrategias térmicas más severas, como por ejemplo tratamiento en autoclave a 121 °C por 20 minutos (Lobo 2004), el agregado de sustancias inhibidoras de las reacciones de pardeamiento como metabisulfito de sodio (Marangoni 2007) o combinaciones de ambos tipos de tratamientos. Bastos Pereyra (2009) mostró que un calentamiento a 90 °C durante 10 minutos, utilizando 0,5 % de ácido cítrico evitó el oscurecimiento enzimático.

Proceso de extracción de FOS

Con las raíces sometidas a un tratamiento térmico de 10 minutos en agua hirviente se realizaron los ensayos de extracción de FOS. Los resultados de la variable dependiente (contenido de FOS en los extractos) obtenidos a partir del diseño experimental utilizado se presentan en la Tabla 3.

Según el modelo aplicado la regresión lineal fue significativa ($P < 0,05$) y no hubo interacción entre las variables de estudio. Cabe señalar que en la estimación del coeficiente de regresión, sólo el coeficiente de la variable relación volumen de agua/masa de yacón presentó un resultado significativo de manera que la misma es la que incide significativamente sobre la concentración de FOS. En las Figuras 1 y 2 se puede observar que el contenido de FOS se maximizó al utilizar el nivel más alto de la variable antes mencionada. En la Figura 3 se observa que el contenido de FOS se maximizó al utilizar la temperatura y el tiempo máximo.

Tabla N° 3. Contenido de FOS (g/100g) en extractos de raíces de yacón según el diseño experimental aplicado

Experimento	Contenido de FOS	
	Promedio	Desvío Estándar
1	0,96	0,09
2	1,31	0,13
3	1,68	0,01
4	1,97	0,08
5	1,54	0,05
6	1,61	0,40
7	1,45	0,05
8	1,22	0,12
9	0,99	0,06
10	1,98	0.00
11	1,05	0,15
12	1,45	0,03
13	1,12	0,22
14	1,16	0,54
15	1,16	0,43

Figura N° 1: Contenido de FOS vs. relación volumen de agua/masa yacón, tiempo de contacto agua/yacón

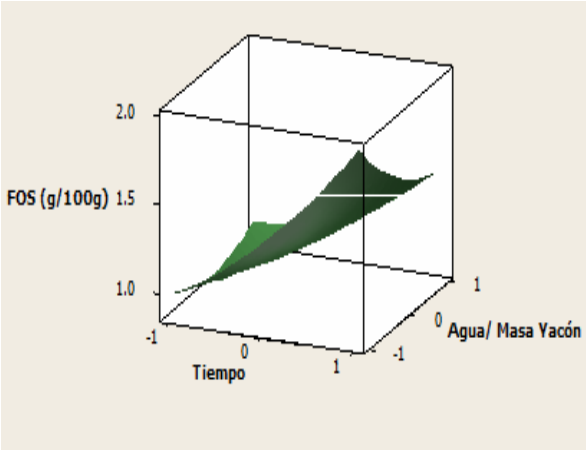
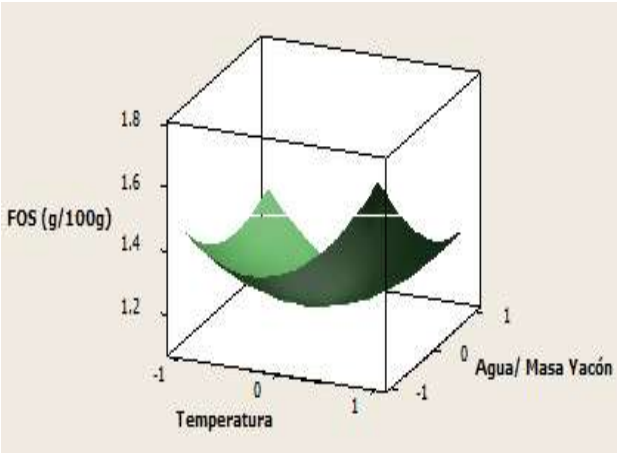


Figura N° 2: Contenido de FOS vs. relación volumen de agua/masa yacón, temperatura



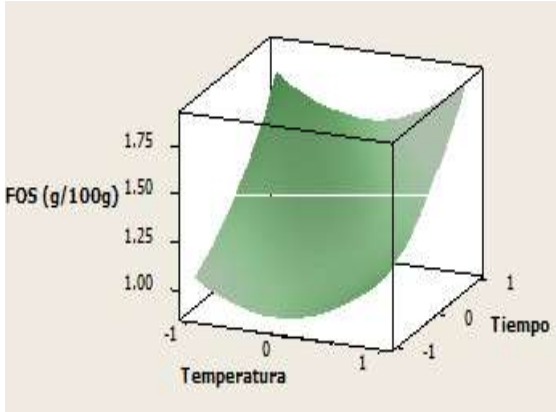


Figura N° 3: Contenido de FOS vs. tiempo de contacto agua/yacón, temperatura

De esta manera el punto de maximización para la extracción de FOS con agua implicó la utilización de una relación volumen de agua/masa de yacón de 10 ml/g, una temperatura de 90°C y un tiempo de contacto agua/yacón de 40 minutos.
Es importante destacar que con la aplicación de estos parámetros se logró recuperar el 100 % de los FOS, en una sola etapa de extracción, ya que una segunda extracción utilizando la misma muestra no reveló la presencia de FOS ni de otros azúcares en los extractos.

Secado de los extractos de Yacón

Extractos obtenidos en las mejores condiciones de extracción antes mencionadas, utilizando las aguas del tratamiento térmico para recuperación total de los FOS, fueron sometidos a distintas condiciones de secado por atomización, utilizando diferentes condiciones operativas: aspiración 100%, flujo de la bomba 10%, temperatura de entrada 110°C y temperatura de salida 71°C. En estas condiciones fueron necesarias aproximadamente 4 horas para secar 500 ml de extracto. Los polvos obtenidos con concentraciones al 3% de coadyuvantes resultaron de buenas características de color blanco. En cuanto a la textura manual el polvo adicionado con almidón modificado resultó suave al tacto, mientras que el adicionado con maltodextrina fue granuloso y pegajoso (Tabla 4). El secado sin coadyuvantes dio como resultado un producto pegajoso y coloreado. Los coadyuvantes fueron necesarios para obtener productos de calidad.

Tabla N° 4: Descripción de las características de los diferentes concentrados de FOS en polvo

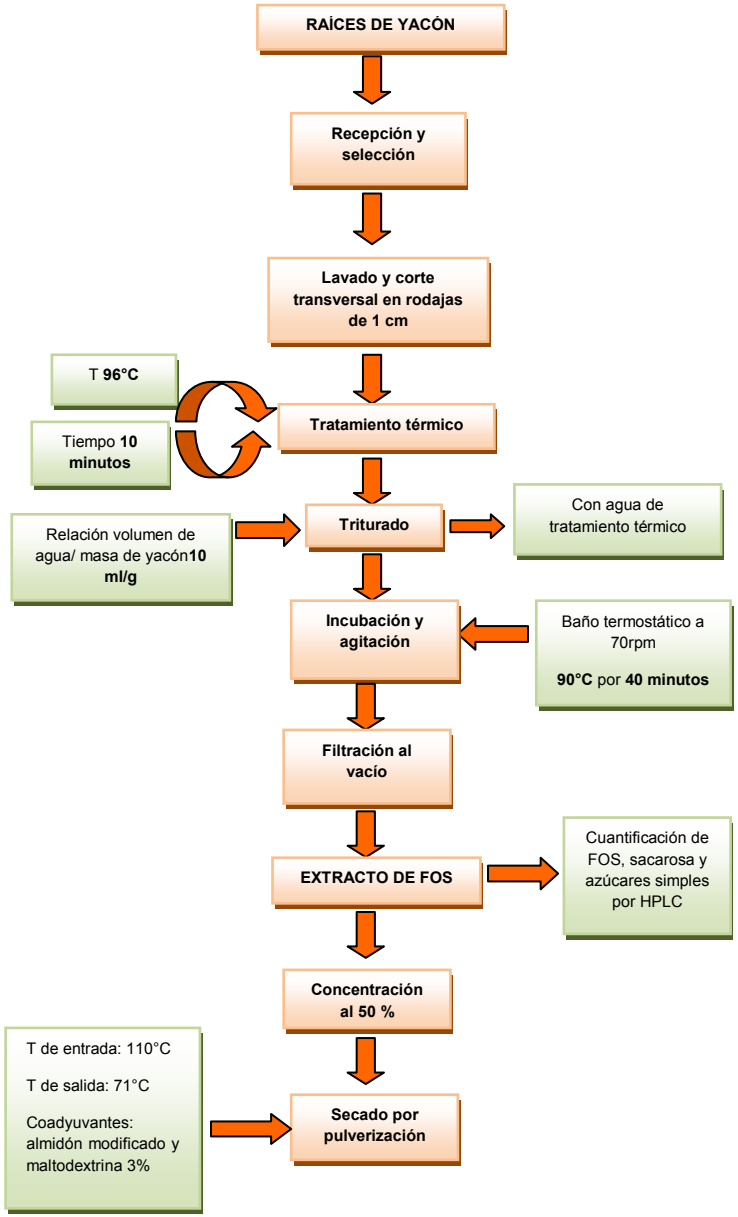
Producto	Descripción	Imagen
Ensayo N°1 Extracto de FOS + Almidón Modificado 3%	➢ Polvo fino, con partículas más gruesas. ➢ Color: blanco ➢ Textura al tacto: suave y adhesivo.	

Ensayo N°2 Extracto de FOS + Maltodextrina 3%	➢ Polvo no uniforme, con aglomeración de partículas de diferentes tamaños. ➢ Color: blanco ➢ Textura al tacto: granuloso, pegajoso y adhesivo.	

Propuesta final de extracción de FOS de raíces de yacón fresco

En base a los resultados obtenidos descriptos en las secciones anteriores se propone un método para obtener FOS en polvo el cual se esquematiza en la Figura 4.

Figura N° 4: Esquema del proceso de extracción de FOS de raíces frescas de yacón.



CONCLUSIONES

Se demuestra en este trabajo que a través de un procedimiento relativamente sencillo y utilizando sólo agua como elemento de extracción, es posible obtener un producto en polvo rico en FOS a partir de raíces de yacón, el cual podría tener aplicaciones potenciales como ingrediente funcional en la formulación de diferentes productos alimenticios.

BIBLIOGRAFÍA

Antosova M, Polakovic M. 2001. Fructosyltransferases: The Enzymes Catalyzing Production of Fructooligosaccharides. Chemical Paper. 55: 350 – 358.

Ashwell M. 2004. Conceptos sobre Alimentos Funcionales. ILSI Europa. Pág. 3.

Araya H y Lutz M. 2003. Alimentos funcionales y saludables. Revista Chilena de nutrición. 30 (1).

Asami T, Minamisawa K, Tsuchiya T, Kano K, Hori I, Ohyama T, Kubota M y Tsukihashi T.1991. Fluctuations of oligofructan contents in tubers of yacon (Polymnia sonchifolia) during growth and storage. Journal of Soil and Plant Nutrition. 62: 621 – 627.

Banguela A, Hernández L.2006. Fructans: from natural sources to transgenic plants. Biotecnología Aplicada. 23: 202 – 210.

Bastos Pereira RA. 2009. Extração e utilização de frutanos de yacon na funcionalização de alimentos. Tesis para la obtención del título de Doctor en Agronomía. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad Estatal Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

Elías C, Salvá R, Morales S. 2006. Optimización por aplicación del método de superficie de respuesta en productos cárnicos. Departamento de Tecnología de Alimentos y Productos Agropecuarios. Universidad Nacional Agraria – La Molina.

Itaya NM, De Carvalho MA, Figuereido – Ribeiro RDL.2002. Fructosyltransferase and hydrolase activities in rhizophores and tuberous roots upon growth of Polymnia sonchifolius. Physiol Plant. 116: 451 – 459.

Kip P, Meyer D, Jellema R. 2005. Inulin improves sensoric and textural properties of low fat yogurts.Dairy Journal. 16: 1098 – 1103.

Lobo AR. 2004. Efeito dos frutanos na biodisponibilidade de cálcio e magnésio em ratos.Dissertação (Mestrado en Tecnología de Alimentos). Faculdade de Ciencias Farmacéuticas. Universidade de Sao Paulo.

Madrigal L, Sangronis E. 2007. La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 57: 387 – 395.

Machado Assefh C. R. 2008. Evaluación bioquímica de la resistencia de caña de azúcar a la Roya común (Puccinia melanocephala H&P Sydow) a partir de la actividad de la enzima peroxidasa. Tesis profesional de la carrera de Licenciatura en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Naturales, UNSa.

Marangoni ST. 2007. Potencialidade de aplicação de farinha de yacon (Polymnia sonchifolia) em productos a base de cereais. Dissertação (Mestrado en Tecnología de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Ministerio de Salud de la Nación. 2009. Estrategia Nacional para la prevención y control de ENT y Plan Nacional Argentina Saludable.

Neves VA y Da Silva MA. 2007. Polyphenol Oxidase from Yacon Roots *(Smallanthus sonchifolius)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 55: 2424 – 2430.

Niness KR. 1999. Breakfast foods and the health benefits of inulin and oligofructose. Cereal Foods World. 44 (2): 79 – 81.

Ohyama I, Ito O, Yasuyoshis I, Karashi T, Minamisawa K, Kubota M and Asami T.1990. Composition of storage carbohydrate in tubers of yacón (Polymnia sonchifolius).Soil Science and Plant Nutrition. 36: 167 – 171.

Organización Mundial de la Salud. 2011 a. Soluciones de bajo costo para luchar contra las enfermedades no transmisibles. Comunicado de prensa.

Starling S. 2007. Healthy foods: defining the category. Healths focus International. Enero.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a: la empresa Ingredion por la donación de maltodextrina con baja dextrosa equivalente (Globe 019110 – Ingredion) y almidón de maíz modificado (Ultra Flo 3301 – Ingredion) para las pruebas de secado, a la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Salta por la donación de las raíces de yacón y al Doctor José Molina por la colaboracióndurante la etapa de extracción de FOS.

COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE PRODUCTOS FORMADOS POR REACCIÓN DE MAILLARD ENTRE PROTEÍNAS DE SUERO Y LACTOSA O GLUCOSA

Cortés D, Leiva G, Malec L

Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
malec@qo.fcen.uba.ar

Resumen: se comparó la capacidad antioxidante de los productos formados durante las distintas etapas de la reacción de Maillard entre proteínas de suero lácteo y lactosa o glucosa. La etapa inicial se estudió mediante la determinación de lisina disponible, la etapa avanzada mediante la formación de hidroximetilfurfural (HMF) y la absorbancia a 294 nm, y la etapa final mediante la absorbancia a 420 nm. Paralelamente se determinó la actividad antioxidante (AA) por el método de inhibición del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH·). La velocidad de formación de productos con AA fue más rápida en el sistema con glucosa que en el sistema con lactosa. El desarrollo de la etapa avanzada mostró buena correlación con la AA. A pesar de que la velocidad de la reacción de Maillard y el aumento de la AA fueron más lentos en el sistema con lactosa, los valores de HMF y de absorbancia a 294 y 420 nm alcanzados en este sistema fueron más elevados. Esto puede atribuirse a que los tiempos de almacenamiento para alcanzar pérdidas de lisina similares resultaron mucho más prolongados que los del sistema con glucosa, dando lugar a la formación de mayor cantidad de compuestos en las etapas avanzada y final.

Palabras clave: reacción de Maillard, actividad antioxidante, proteínas de suero, pardeo.

Abstract: we compared the antioxidant capacity of the products formed during the different stages of the Maillard reaction between whey proteins and lactose or glucose. The first stage was studied by determining the available lysine, the advanced stage was analyzed by the formation of hydroxymethylfurfural (HMF) and the absorbance at 294 nm, and the final stage by the absorbance at 420 nm. The antioxidant activity (AA) was determined simultaneously by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH·) radical-scavenging activity assay. The rate of formation of products with AA was higher in the system containing glucose than the system with lactose. The development of the advanced stage showed good correlation with the AA. Although the Maillard reaction rate and the increment of the AA were slower in the system with lactose, the values of HMF and absorbance at 294 and 420 nm reached in this system were higher. These values can be attributed to the fact that the storage times to achieve similar lysine losses were much longer than those of the system with glucose, resulting in the formation of a greater amount of compounds in the advanced and final stages.

Keywords: Maillard reaction, antioxidant activity, whey proteins, browning.

INTRODUCCIÓN

La reacción de Maillard constituye una de las principales modificaciones que pueden ocurrir durante el proceso de elaboración de los alimentos (Labuza y Baiser, 1992). Para facilitar su estudio, se ha propuesto una división en tres etapas: inicial, intermedia y final (Arnoldi *et al.* 2002). En la primera etapa ocurre la condensación del grupo amino libre de un aminoácido, péptido o proteína con un grupo carbonilo, que generalmente proviene de un azúcar reductor, y es considerada una de las alteraciones nutricionales más relevantes debido a la reducción de la disponibilidad de lisina, el aminoácido esencial más lábil por su grupo ε-amino libre. En la etapa intermedia las proteínas que han sido glicosiladas continúan reaccionando dando lugar a la formación de una gran cantidad de productos (intermediarios o finales), de los cuales algunos pueden presentar fluorescencia o absorber radiaciones en el UV cercano (Matiacevich *et al.* 2005). Las reacciones de la etapa final, complejas y poco conocidas, conducen a la formación de polímeros y copolímeros nitrogenados de peso molecular variable y de color pardo, conocidos como melanoidinas (Davidek *et al.* 2004).

Se ha demostrado además, que algunos productos que se forman durante las distintas etapas de la reacción de Maillard presentan actividad antioxidante. En general, esta propiedad ha sido asociada a la formación de compuestos en las etapas intermedia y final (Manzocco *et al.* 2001, Morales y Jimenez-Pérez 2001), aunque algunos autores observaron en ciertos sistemas un aumento de estas propiedades durante la etapa de glicosilación (Drusch *et al.* 2009).

La evolución de la reacción está afectada por una serie de factores que modifican tanto la velocidad como la natulareza de los productos formados. Estos factores son el pH, la actividad de agua (a_w), la temperatura y tiempo de calentamiento, el estado físico del sistema, la estructura química y la concentración de los reactantes (Jing y Kitts 2000, Chevalier *et al.* 2001b, Thomas *et al.* 2004, Oliver y Melton 2006, Reineccius 2006). Por lo tanto, dependiendo de las condiciones del medio, las propiedades antioxidantes de los productos formados pueden también variar considerablemente (Lingnert y Hall 1986).

La prevención de la oxidación lipídica en los alimentos mediante el uso de antioxidantes sintéticos es una práctica usual. Sin embargo, su inocuidad ha sido cuestionada ya que se ha reportado que algunos de estos compuestos presentarían efectos carcinogénicos (Hocman 1988). Existe, en consecuencia, un creciente interés en la búsqueda de compuestos naturales que posean actividad antioxidante. Los productos de reacción de Maillard pueden ser considerados compuestos naturales comúnmente presentes en alimentos. Por lo tanto, resulta relevante conocer las condiciones que favorecen la formación de productos de esta reacción con actividad antioxidante como estrategia para su aplicación en el procesamiento de los alimentos. Cabe señalar que muchos antioxidantes naturales presentes en los alimentos se pierden de manera significativa durante su procesamiento y almacenamiento (Nicoli *et al.* 1999). Sin embargo, en las mismas condiciones se produce un aumento de los productos de reacción de Maillard, y por lo tanto, se incrementaría la actividad antioxidante debido a la formación de estos compuestos.

La mayor parte de los trabajos que analizaron la actividad antioxidante de los productos de Maillard fueron realizados con sistemas modelo constituidos por azúcares y aminoácidos (Yoshimura *et al.* 1997, Jing y Kitts, 2000, Liu *et al.* 2008) y unos pocos con proteínas (Lertittikul *et al.* 2007, Gu *et al.* 2009). Sería entonces de interés estudiar estudiar la actividad antioxidante de los productos que se forman al reaccionar las proteínas de suero lácteo con azúcares reductores y analizar cómo varían estas propiedades modificando la fuente de grupos carbonilo. El objetivo de este trabajo fue comparar la actividad antioxidante de productos formados formados durante las distintas etapas de la reacción de Maillard entre proteínas de suero y lactosa o glucosa.

MATERIALES Y METODOS

Preparación de las muestras

Se preparó un sistema con proteínas de suero lácteo y lactosa y otro con glucosa, ambos en una proporción tal que la relación molar lisina: azúcar fuera de 9:1, similar a la de la leche, disolviendo los componentes en una solución de buffer fosfato pH 6,5 en una proporción de 15% (p/v), utilizando en ambos sistemas sorbato de potasio (0,3 % p/p) como agente antimicrobiano.

Lisina disponible

La determinación y cuantificación de lisina disponible se llevó a cabo por el método espectrofotométrico con o-ftaldialdehido / N-acetil-L-cisteína (OPA – NAC) (Medina Hernández *et al.* 1992). Las muestras se diluyeron en una solución de SDS al 2% por triplicado y la absorbancia se midió a una longitud de onda de 336 nm en un espectrofotómetro Hewlett Packard HP 8453. La cantidad de lisina disponible fue calculada mediante el uso de una curva de calibración, tomando como estándar las proteínas de suero. Previamente a esto se determinó la concentración de dicho aminoácido en las proteínas con el método espectrofotométrico de 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno (FDNB) propuesto por Carpenter (1960) y modificado por Booth (1971), expresando el resultado como mg de lisina disponible/16 g nitrógeno.
El contenido de nitrógeno fue determinado por triplicado utilizando el método de Kjeldahl, con un digestor Bloc Digest 6 P-Selecta y un destilador Pro-Nitro M P-Selecta.

Hidroximetilfurfural

Para el análisis de HMF se utilizó el método propuesto por Albalá-Hurtado *et al.* (1997) para clarificar las muestras y después se cuantificó por HPLC con un equipo Shimadzu LC-CA equipado con detector espectrofotométrico a 285 nm y una columna en fase reversa ACE 5 AQ 4.6 x 250 mm ACE-126-2546. Se corrió con un flujo isocrático de 1 ml/min., utilizando una fase móvil agua: acetonitrilo (95:5).

Pardeamiento

La determinación de sustancias que absorben en el UV cercano y el grado de pardeamiento, se llevó a cabo realizando mediciones a 294 y 420 nm respectivamente, utilizando el procedimiento propuesto por Ajandouz *et al.* (2001), el cual tiene en cuenta la preparación de las diluciones con una concentración de manera tal que la absorbancia

arroje valores menores a 1,5 con un espectrofotómetro Hewlett Packard HP 8453.

Actividad antioxidante

La actividad antioxidante se determinó mediante el procedimiento planteado por Chevalier *et al.* (2001a) que se fundamenta en la inhibición del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH·). La absorbancia se midió a los 50 minutos a 517 nm con un espectrofotómetro UV-visible Hewlett Packard HP 8453. Los resultados fueron expresados como porcentaje de inhibición (PI) de acuerdo a:

$$PI = [(A_{control} - A_{muestra}) / A_{control}] \times 100$$

Donde $A_{muestra}$ es la absorbancia de la solución de DPPH· conteniendo la muestra y $A_{control}$ es la absorbancia de la solución de DPPH conteniendo agua destilada en lugar de la muestra.

Estudio cinético

Las muestras de los sistemas modelo fueron envasadas en recipientes de vidrio con cierre hermético, se almacenaron a 60ºC, se tomaron alícuotas por duplicado a 46, 74, 102, 116, 128 y 170 hs en el sistema con glucosa y a 284, 550, 730, 960 y 1200 hs en el sistema con lactosa y se realizaron los análisis correspondientes a cada etapa de la reacción. Para estudiar la etapa inicial se determinó el contenido de lisina disponible por el método espectrofotométrico OPA-NAC. La evolución de la segunda etapa se analizó mediante la cuantificación de HMF y de la absorbancia a 294 nm. Por último la etapa final se estudió a través de la formación de color midiendo la absorbancia a 420 nm. De forma paralela, en cada muestra se determinó la actividad antioxidante por el método de inhibición del radical DPPH·. Las muestras control sin tratamiento térmico se analizaron por triplicado y los valores obtenidos para cada parámetro se determinaron como correspondientes al tiempo cero. El tratamiento térmico a 60ºC se realizó hasta obtener valores de lisina disponible remanente entre 40 y 50%, teniendo en cuenta que a tiempos más prolongados, el deterioro nutricional sería tan elevado que el análisis carecería de interés.

Análisis estadístico

Se llevó a cabo el análisis de varianza (ANOVA) para comprobar que las pendientes fueran significativamente distintas de cero. Los intervalos de confianza fueron estimados con un nivel de significación del 95% mediante el test de Student utilizando el programa estadístico Statgraphic Plus 5.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las propiedades antioxidantes de los productos de la reacción de Maillard formados en sistemas con lactosa o glucosa como carbohidrato se compararon analizando la evolución de los porcentajes de inhibición en sistemas conteniendo proteínas de suero lácteo y lactosa o glucosa, almacenados ambos a 60°C. Se observó que la velocidad de formación de productos con actividad antioxidante fue mucho mayor con glucosa que

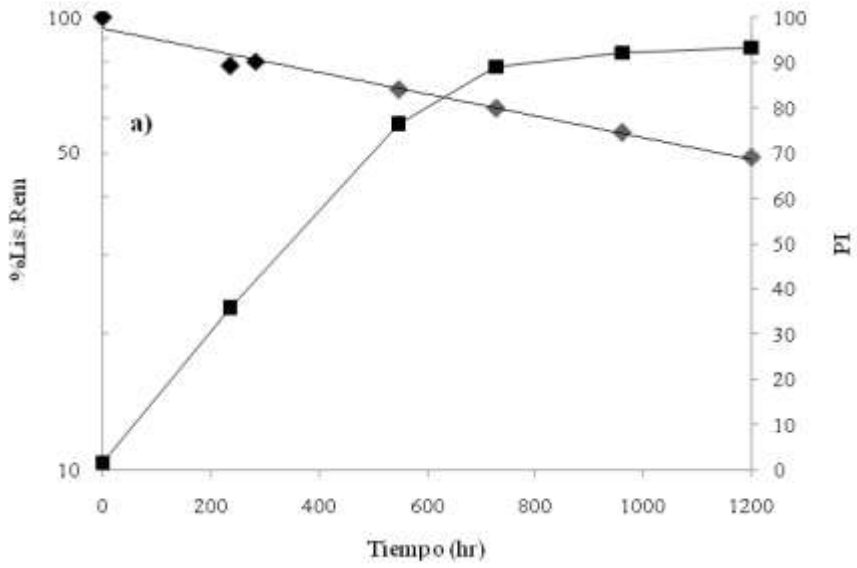
con lactosa, siendo las pendientes 0,49 ± 0,01 h^{-1} y 0,12 ± 0,01 h^{-1} respectivamente.

Estos resultados coinciden con Chevalier *et al.* (2001a), quienes establecieron que la actividad antioxidante estaba relacionada con la naturaleza del azúcar utilizado para modificar la proteína, atribuyendo los resultados obtenidos a diferencias químicas y estructurales entre los azúcares que inducirían a la formación de diferentes productos de la reacción de Maillard.

Para analizar la capacidad antioxidante de los productos formados durante las distintas etapas de la reacción de Maillard en ambos sistemas, se comparó en cada uno de ellos la evolución de la actividad antioxidante a lo largo del tiempo de almacenamiento a 60ºC con la variación de los indicadores correspondientes a cada etapa. Para poder comparar cada parámetro en los sistemas con lactosa y glucosa, se tomaron aquellos valores que correspondían al mismo porcentaje de disminución de lisina, por ser este aminoácido el reactivo limitante de la reacción.

En la **Figura 1** se muestra para ambos sistemas, la variación del PI (escala lineal de la ordenada a la derecha) en función del tiempo y del porcentaje de lisina disponible remanente (escala logarítmica de la ordenada a la izquierda) como parámetro de seguimiento de la primera etapa de la reacción.

Al igual que la formación de productos con actividad antioxidante, la pérdida de lisina ocurrió más rápido en el sistema con glucosa, lo cual se ve reflejado en el valor de las pendientes, siendo las mismas 3,90 ± 0,20.10^{-3} h^{-1} y 0,57 ± 0,03.10^{-3} h^{-1} para los sistemas con glucosa y lactosa respectivamente. Estos resultados coinciden con los reportados por otros investigadores (Nacka *et al.* 1998, Naranjo *et al.* 1998, Chevalier *et al.* 2001b, Ledesma *et al.* 2008) quienes utilizando diferentes sistemas, encontraron que la velocidad de disminución de lisina era mayor con glucosa que con lactosa. También Carulli *et al.* (2011) analizando la velocidad de glicosilación de proteínas de suero encontraron que la reactividad de glucosa era mayor que la de lactosa. Esta diferencia entre las velocidades fue atribuida al incremento de la reactividad del azúcar reductor con la proporción en forma de cadena abierta (Chevalier *et al.* 2001b) junto con el efecto de impedimento estérico causado por el tamaño de los azúcares (Nacka *et al.* 1998).



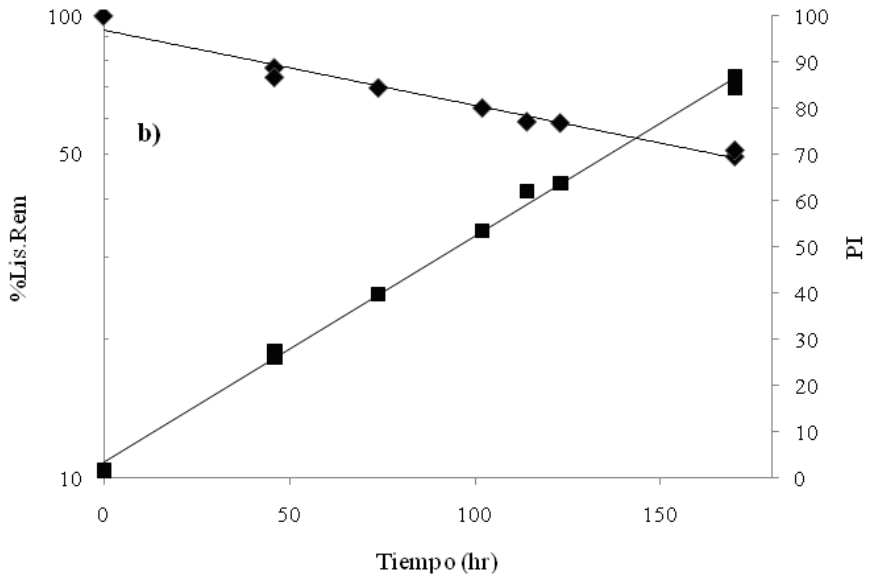
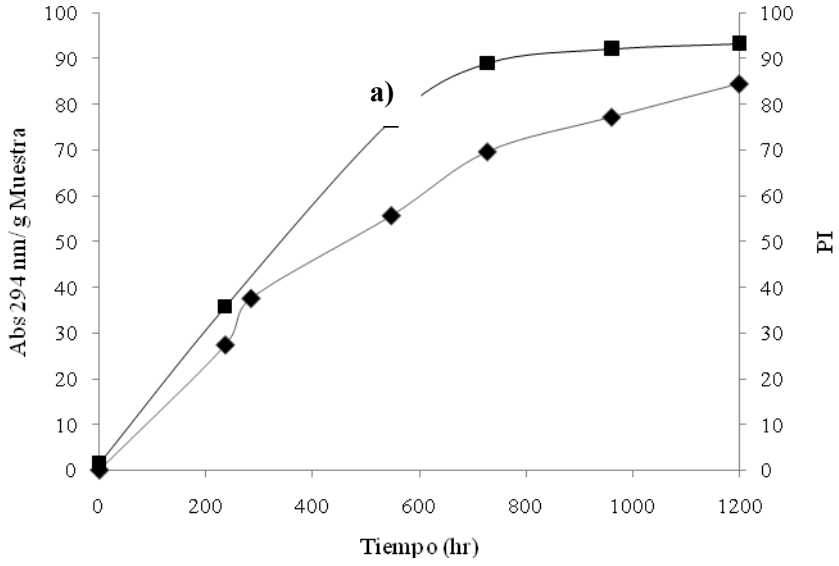


Figura 1: Variación del porcentaje de lisina remanente (♦) y del porcentaje de inhibición (■) en los sistemas modelo con a) lactosa y b) glucosa almacenados a 60°C

Al comparar en el presente trabajo, la evolución del PI de acuerdo a la disminución de lisina en ambos sistemas, puede observarse que los valores de PI correspondientes a un 50% de pérdida de lisina son cercanos al 90% y no se observan diferencias significativas (p>0,05) entre los porcentajes alcanzados en ambos sistemas. Sin embargo, en el que contiene lactosa se llega a ese valor con un menor grado de avance de la etapa inicial (37% de pérdida de lisina) y luego se mantiene prácticamente constante. Esto puede deberse a que en el sistema con lactosa los tiempos de tratamiento fueron más largos, dando lugar a que se formen mayor cantidad de compuestos con actividad antioxidante, aun cuando la pérdida de lisina no llegó a porcentajes tan elevados.

Para analizar la formación de compuestos con actividad antioxidante y su relación con la evolución de la etapa intermedia se comparó el avance del PI con la variación de la absorbancia a 294 nm y con la formación de HMF libre en función del tiempo de almacenamiento. En la **Figura 2** se muestra la variación de la absorbancia a 294 nm y el PI para ambos sistemas.



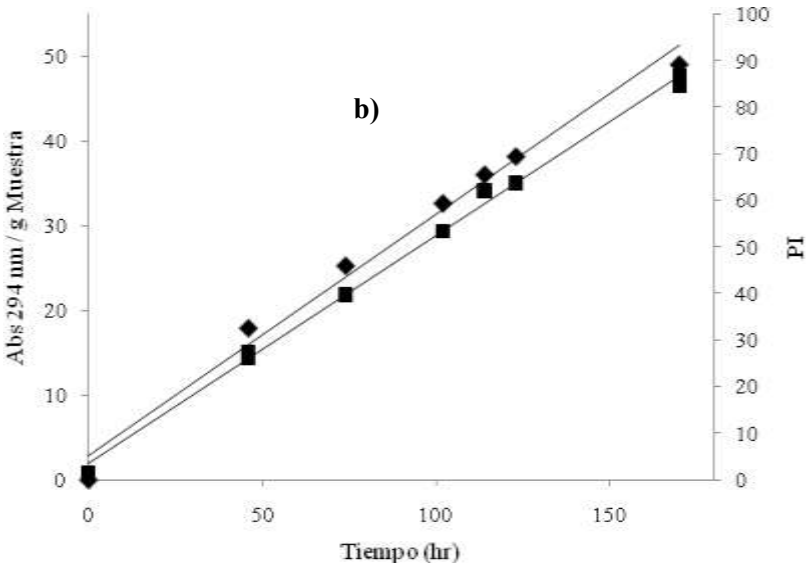


Figura 2: Variación de la absorbancia a 294 nm (♦) y del porcentaje de inhibición (■) en los sistemas con a) lactosa y b) glucosa almacenados a 60 °C.

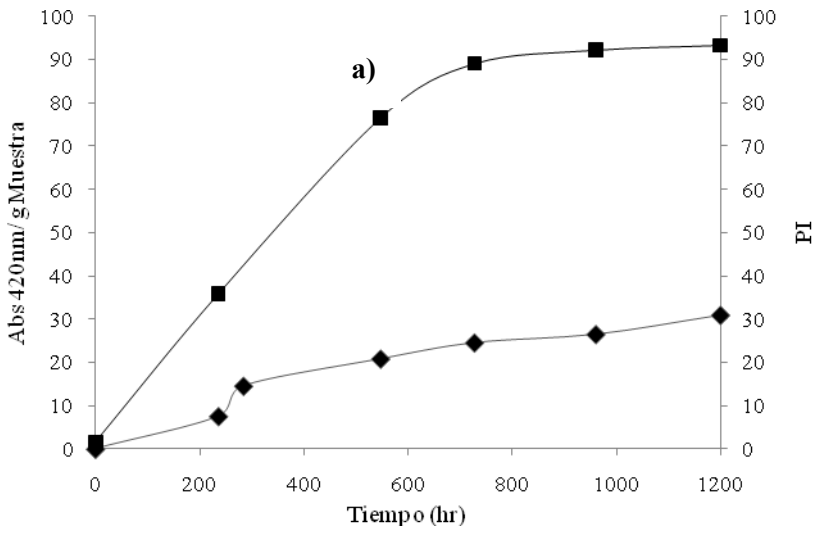
De manera similar a la primera etapa, la velocidad de reacción para la etapa intermedia fue mayor en el sistema con glucosa que en el que contiene lactosa, siendo las respectivas pendientes 0,28 ± 0,02 $h^{-1}.g^{-1}$ y 0,068 ± 0,011 $h^{-1}.g^{-1}$. Sin embargo, los valores de absorbancia alcanzados para pérdidas de lisina de 50% resultaron mayores en el sistema con lactosa que en el que contenía glucosa, siendo 84/g muestra para el disacárido y 49/g muestra para el monosacárido. Se observa además en los gráficos correspondientes a los dos sistemas, que los aumentos de la absorbancia y del porcentaje de inhibición en función del tiempo resultan similares para ambas condiciones.

Respecto al análisis de HMF libre, en ambos sistemas comenzó a detectarse cuando el grado de avance de la etapa inicial de la reacción era considerable, a partir de los últimos dos tiempos analizados. En el sistema con lactosa las concentraciones de HMF alcanzadas fueron 10 ppm y 29 ppm para pérdidas de lisina disponible de 37% y 51% respectivamente.

En el sistema con glucosa la formación de este compuesto fue, al igual que los valores de absorbancia, significativamente menor con concentraciones de 2 ppm y 5 ppm para pérdidas de lisina de 30% y 50% respectivamente. Los valores más elevados de HMF y de absorbancia a 294 nm alcanzados con lactosa, pueden atribuirse a que en este último, los tiempos de almacenamiento para llegar a porcentajes de lisina similares fueron mucho más prolongados, dando lugar a la formación de mayor cantidad de compuestos de etapas avanzadas, que además podrían poseer actividad antioxidante, tal como se planteó previamente al comparar la evolución del PI con la pérdida de lisina disponible.

Esto se evidencia también al analizar la etapa final de la reacción. Al comparar la variación de la absorbancia a 420 nm en función del tiempo de almacenamiento a 60°C (**Figura 3**), se observa que las constantes de reacción para la formación de color no presentan diferencias significativas entre los sistemas con lactosa y glucosa ($p>0,05$), siendo 0,025 ± 0,010 $h^{-1}.g^{-1}$ y 0,018 ± 0,001 $h^{-1}.g^{-1}$ respectivamente. Sin embargo, los valores de absorbancia a 420 nm para pérdidas de lisina del 50% (31 y 3 para los sistemas con lactosa y glucosa

respectivamente), resultaron un orden mayor en el sistema con lactosa.



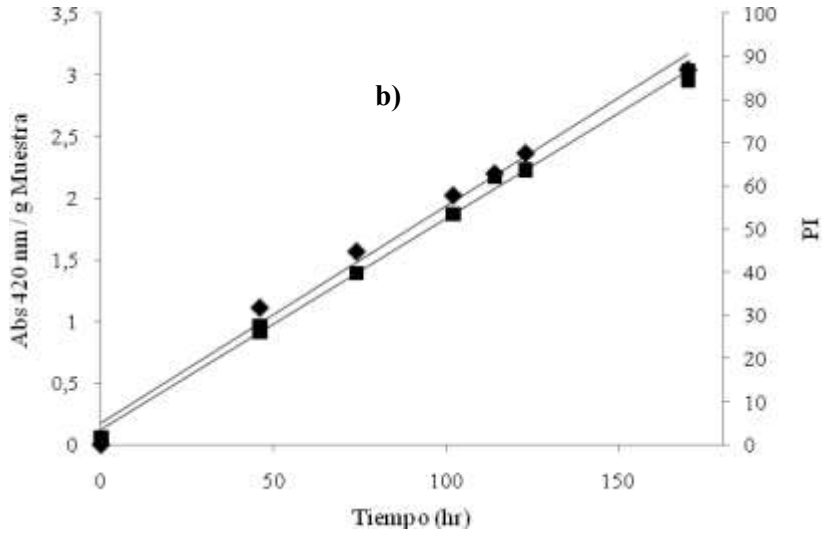


Figura 3: Variación de la absorbancia a 420 nm (♦) y del porcentaje de inhibición (■) en los sistemas con a) lactosa y b) glucosa almacenados a 60 °C.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos pueden atribuirse a que, aunque la velocidad de la reacción de Maillard haya sido más lenta en el sistema que contenía el disacárido, los tiempos de reacción más prolongados contribuyeron a la formación de mayor cantidad de productos de las etapas avanzadas. De esta manera, es posible ver que tanto en la formación de productos de la reacción de Maillard, como en el desarrollo de la actividad antioxidante durante la misma, no sólo debe analizarse la influencia de distintos factores como temperatura, a_w o tipo de reactante, sino que, a igual grado de avance de la reacción, se evidencia una fuerte relación con los tiempos de tratamiento térmico.

BIBLIOGRAFIA

Ajandouz EH, Tchiakpe LS, Dalle Ore F, Banajiba A, Puigserver A. 2001. Effects of pH on caramelization and Maillard reaction kinetics in fructose-lysine model systems. Journal of Food Science, 66: 926-931.

Albalá-Hurtado S, Veciana-Nogués MT, Izquierdo-Pulido M, Vidal-Carou MC. 1997. determination of free and total furfural compounds in infant milk formulas by high-performance liquid chromatography. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45: 2128-2133.

Arnoldi A, Boschin G, D'Agostina A. 2002. Melanoidins in foods. Journal of Food Science, 3: 1-10.

Booth, V.H., 1971. Problems in the determination of FDNB-available lysine. Journal of the Science of Food and Agriculture, 22: 658-66.

Carpenter KJ. 1960. The estimation of the available lysine in animal-protein foods. Biochemical Journal, 77: 604-610.

Carulli S, Calvano C, Palmisano F. 2011. MALDI – TOF MS characterization of Glycation Products of whey proteins in a Glucose / Galactose Model system and Lactose – free milk. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59: 1793-1803.

Chevalier F, Chobert JM, Genot C, Haertlé T. 2001a. Scavenging of free radicals, Antimicrobial and Cytotoxic activities of Maillard reaction products of β-lactoglobulin glycated with several sugars**.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49: 5031-5038.

Chevalier F, Chobert JM, Mollé D, Haertlé T. 2001b. Maillard glycation of β-lactoglobulin with several sugars: Comparative study of the properties of the obtained polymers and of the

substituted sites. Le Lait Dairy Science and Technology, 81: 651-666.

Davidek T, Pollien PH, Devaud S. 2004. Flavour and vinylogous compounds generated by Maillard-type reactions. Czech Journal of Food Science, 22: 50-53.

Drusch S, Berg S, Scampicchio M, Serfert Y, Somoza V, Mannino S, Schwarz K. 2009. Role of glycated caseinate in stabilisation of microencapsulated lipophilic functional ingredients. Food Hydrocolloids, 23: 942–948.

Gu FL, Kim JM, Hayat K, Xia S, Feng B, Zhang X. 2009. Characteristics and antioxidant activity of ultrafiltrated Maillard reaction products from a casein-glucose model system. Food Chemistry, 117: 48–54.

Hocman, G. 1988. Chemoprevention of cancer–phenolic antioxidants (BHT, BHA). International Journal of Biochemistry, 20: 639–651.

Jing H, Kitts DD. 2000. Comparison of the antioxidative and cytotoxic properties of glucose-lysine and fructose-lysine Maillard reaction products. Food Research International, 33: 509-516.

Labuza TP, Baiser WM. 1992. The kinetics of nonenzymatic browning. En: HG Schwartzberg, RW Hartel, editores. Physical chemistry of foods. New York: Marcel Dekker. pag 595-649.

Ledesma A, Ramos G, Vázquez L. 2008. Characterization of bovine serum albumin glycated with glucose, galactose and lactose. Acta Biochimica Polonica, 55: 491-497.

Lertittikul W, Benjakul S, Tanaka M. 2007. Characteristics and antioxidative activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein–glucose model system as influenced by pH. Food Chemistry, 100: 669–677.

Lingnert H, Hall G. 1986. Formation of antioxidative Maillard reaction products during food processing. En: Fujimaki M, Namiki M, Kato E, editores. Amino-carbonyl reactions in food and biological systems. Tokio: Elsevier. pag 273 - 279.

Liu SC, Yang DJ, Jin SY, Hsu CH, Chen SL, 2008. Kinetics of color development, pH decreasing and anti-oxidative activity reduction of Maillard reaction in galactose/glycine model systems. Food Chemistry, 108: 533–541.

Manzocco L, Calligaris S, Mastrocola D, Nicoli MC, Lerici C R. 2001. Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. Trends in Food Science Technology, 11: 340–346.

Matiacevich SB, Santagapita PR, Buera PM. 2005. Fluorescence from the Maillard reaction and its potential applications in food science. Food Science and Nutrition, 45: 483-495.

Medina Hernández MJ, García Alvarez-Coque MC. 1992. Available lysine in protein, assay using o-phthaladehyde/N-acetyl-L-cysteine spectrophotometric method. Journal of Food Science, 57: 503-505.

Morales FJ, Jimenez-Pérez S. 2001. Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. Food Chemistry, 72: 119–125.

Nacka F, Chobert JM, Burova T, Leonil J, Haertlé T. 1998. Induction of new physicochemical and functional properties by the glycosylation of whey proteins. Journal of Protein Chemistry, 17: 5.

Naranjo GB, Malec LS, Vigo MS. 1998. Reducing sugars effect on available lysine loss of casein by moderate heat treatment. Food Chemistry, 62: 309-313.

Nicoli MC, Anese M, Parpinel M. 1999. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. Trends in Food Science and Technology, 10: 94-100.

Oliver CM, Melton LD. 2006. Creating proteins with novel functionality via the Maillard reaction: A review. Critical

Reviews in Food Science and Nutrition, 46: 337-350.
Reineccius G. 2006. Flavor chemistry and technology. Boca Raton: Taylor and Francis Group. pag 33-64, 103-122.
Thomas M, Scher J, Banon S, Desorby S. 2004. Milk powders ageing: effect on physical and functional properties. Critical review. Food Science and Nutrition, 44: 1-26.
Yoshimura Y, Iijima T, Watanabe T, Nakazawa H. 1997. Antioxidative effect of Maillard reaction products using glucose–glycine model system. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45: 4106–4109.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad de Buenos Aires.

DESARROLLO DE COPOS DULCES A BASE DE HARINA INTEGRAL DE QUÍNOA (*CHENOPODIUM QUÍNOA* WILLD), LIBRES DE GLUTEN

Cuello J.R.[1], de Lima Argüello P.B.[1], Seuchuc M.L.[1], Cervilla N.S.[2], Calandri E.L.[2,3]

1. Escuela de Nutrición, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba (UNC). Córdoba Capital, Argentina.
2. Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTA), FCEFyN, UNC. Córdoba Capital, Argentina.
3. Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos Córdoba (ICyTAC), UNC. Córdoba Capital, Argentina.
delima.arguello@gmail.com

Resumen: Se propuso aquí lograr una formulación que aportara a los copos dulces (CD) mayor valor nutritivo y buena aceptación por parte de los consumidores. Se recurrió a un diseño experimental según el método de Taguchi. Los factores evaluados fueron: fécula de mandioca, harina de arroz, tiempo de cocción y $CaCO_3$. Harina integral de quínoa (HIQ), azúcar y goma xántica se mantuvieron constantes. Como parámetro de salida se recurrió a mediciones de textura de los copos, evaluándose la tortuosidad de las curvas de fuerza de compresión vs tiempo. Tres de los nueve ensayos presentaron las mayores tortuosidades y fuerzas de compresión máxima y correspondieron a las siguientes formulaciones: M3: 40% de fécula de mandioca, 40% de harina integral de quínoa y 8% de CaCO3; M5: 22% de harina de arroz, 22% de fécula de mandioca y 44% de HIQ; M7: 42% harina de arroz, 42% de HIQ y 4% de CaCO3. La composición química de los copos dulces fue similar a los copos de maíz tradicionales, aunque de mejor calidad proteica debido a HIQ. La aceptabilidad de los CD fue menor al 50%; posiblemente porque presentaron mayores fuerzas de compresión que los copos tradicionales, elaborados con maíz.

Palabras claves: harina integral de quínoa, copos dulces, libre de gluten.

Abstract: Our purpose was to achieve a formulation for sweet flakes (CD) with more nutritive value and good acceptance by consumers. A Taguchi experimental design was adopted. The factors evaluated were: cassava starch, rice flour, cooking time and CaCO3. Quinoa grain flour (HIQ), sugar and xanthan gum were kept constant. As output parameters, texture measurements of flakes were used, through evaluating the tortuosity from curves of compressive-force vs time. Three of the nine trials showed the highest tortuosity and compression forces and corresponded to the following formulations: M3: 40% of manioc starch, 40% quinoa flour and 8% CaCO3; M5: 22% rice flour, 22% of manioc starch and 44% of HIQ; M7: 42% rice flour, 42% of HIQ and 4% CaCO3. The chemical composition of CD was similar to the traditional corn flakes, although with better protein quality due to the incorporated HIQ. Acceptability of CD flakes was less than 50%; possibly because they had higher compressive forces than traditional flakes, made from corn.

Keywords: whole quinoa flour, sweet flakes, gluten-free.

INTRODUCCIÓN

La quínoa (*Chenopodium quínoa* Willd) es un grano alimenticio que se cultiva ampliamente en la región andina (Tapia 2007); es conocida por su versatilidad y adaptabilidad a condiciones climáticas adversas (National Research Council 1989), su resistencia ante la sequía y la salinidad (Tapia 2007) y su bajo coste de producción (León y Rosell. 2007). En nuestro país, su cultivo se localiza en la región del Noroeste Argentino (NOA) (FAO 2013).

Se la denomina pseudocereal, debido a que sus granos son ricos en materia harinosa (Programa Nacional de Federalización de la Ciencia, la Tecnología y la Innovación) y libres de gluten, que hace de la quínoa un alimento apto para personas con enfermedad celíaca, Vega-Galvez *et al.* (2010). Respecto a la composición química, el contenido de proteína en la quínoa se encuentra entre 13,81 y 21,9%; dependiendo de la variedad, y en cuanto a los aminoácidos esenciales, el balance es superior al trigo, cebada y soja y semejante a la proteína de la leche (FAO 2011). El contenido de aceite en el grano es relativamente alto, cerca del 6% y con alta proporción de ácidos grasos insaturados (León y Rosell 2007) del tipo ω3 y ω6 (FAO 2011). El alto contenido de carbohidratos (66 %), hace que la quínoa tenga un elevado aporte energético (Mujica 2001).

La enfermedad celíaca es una intolerancia permanente a las proteínas del gluten, afección que se manifiesta a través de una atrofia severa de la mucosa del intestino delgado superior. Esto produce un defecto en la utilización de nutrientes a nivel del tracto digestivo (Polanco Allué 2004). En la República Argentina, la tasa de prevalencia es 0,72 por 1000 (De Rosa 1993). Es bien conocido que el grano de quínoa no posee proteínas del gluten (gliadinas, secalinas, hordeínas y, posiblemente, aveninas).

En nuestro país se ha verificado una demanda creciente y sostenida de los denominados cereales para el desayuno, dentro de los cuales se ubican los copos dulces (Lezcano 2010). Según el Código Alimentario Argentino (CAA), se denomina "cereales en copos (Flakes)" a aquellos preparados con granos limpios, liberados de su tegumento por medios mecánicos o por tratamiento alcalino, cocinados con la adición, o no, de extracto de malta, jarabe de sacarosa o dextrosa y sal, secados, aplastados y tostados (Código Alimentario Argentino 2013). Szczesniak (1971) reportó que para determinados alimentos la textura fue más importante que el flavor en la elección del consumidor. Esto es especialmente importante en alimentos de sabores suaves como el arroz, o de características crujientes o crocantes como los cereales de desayuno o cereales en copos (Szczesniak 1990)

Nuestro proyecto consistió en la elaboración de copos dulces a base de harina integral de quínoa, con sabor y textura agradables al paladar y libres de gluten.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de la harina integral de quínoa

Los granos de quínoa fueron tamizados en tamiz vibratorio "Zonitest" y el lavado de las semillas se realizó por flujo continuo de agua, ambos procesos fueron ejecutados siguiendo la metodología descripta por Cervilla y col. 2011.

Posterior al lavado, y a los efectos de reducir el contenido de humedad de la semilla, se realizó el secado de las mismas en un lecho fluidizado marca "Sherwood Scientific". Luego para la obtención de la harina integral se utilizó el molino de martillo Fritsch, que muele por impacto, opera con una frecuencia de 50 Hz y una potencia 1590 W. Las piezas internas del molino son de acero inoxidable. Se empleó una malla de 0,25 mm.

Elaboración de los copos dulces

Los ensayos realizados para obtener los copos dulces se efectuaron de acuerdo al esquema presentado (**Figura 1**). Posterior a la mezcla de los ingredientes secos, se añadió la cantidad de agua necesaria hasta alcanzar una masa de textura homogénea y no pegajosa, que permitiera su manipulación. Se empleó una máquina elaboradora de pastas marca "Pastalinda"; la masa se introdujo entre los rodillos de laminado, inicialmente en posición 3 de apertura. La lámina así obtenida se pasó otras dos veces más, estrechando la apertura de los rodillos a 5 y 7, sucesivamente. Se colocó la lámina en una placa y se procedió a fraccionar la masa con un cortante. Una vez alcanzada la temperatura de cocción deseada (140°C) se ubicó la placa en horno por convección eléctrico marca "Pauna" y transcurrido el tiempo establecido para cada muestra (5, 10 y 15 min.) fueron retiradas.

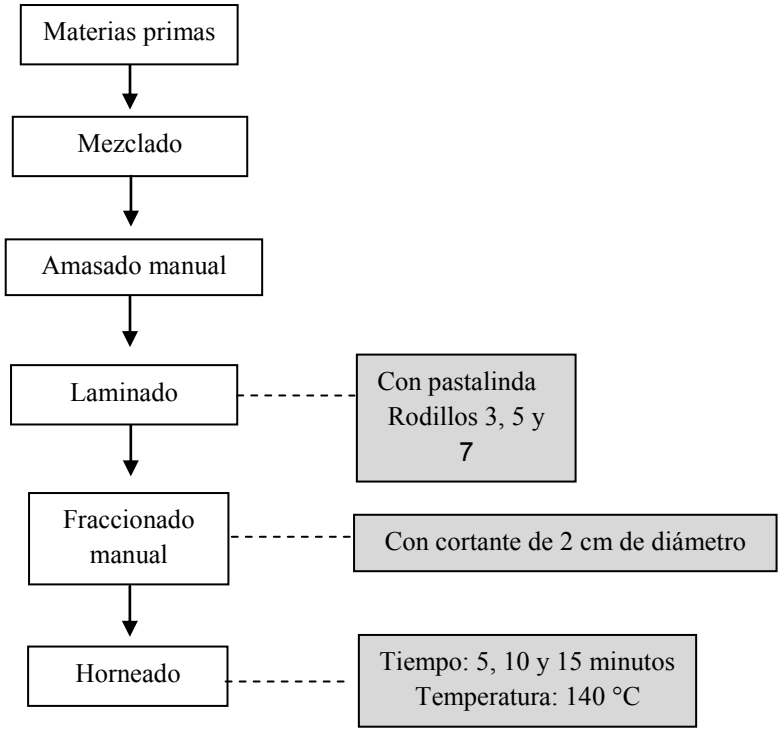


Figura 1: Elaboración de copos.

Metodología Taguchi

De las variables intervinientes se mantuvieron constantes la harina integral de quínoa, el azúcar y la goma xántica , quedando como factores: harina de arroz, fécula de mandioca, tiempo de cocción y carbonato de calcio (CaCO3). La matriz de diseño quedó conformada como se muestra en la **Tabla 1** y a partir de ésta surgieron las formulaciones para cada muestra (**Tabla 2**).

Tabla 1: matriz de diseño.

	FACTORES			
Nivel	Harina de arroz$_{(g)}$	Fécula de mandioca$_{(g)}$	Tiempo de cocción $_{(min)}$	$CaCO_{3\ (g)}$
1	0	0	5	0
2	30	30	10	6,25
3	60	60	15	12,5

Tabla 2: Formulaciones CD

Ensayo	H. Quínoa(g)	H. Arroz(g)	F. Mandioca(g)	Azúcar (g)	Goma Xántica(g)	CaCO3 (g)	Tiempo de Cocción(min)
1	180	-	-	25,7	0,45	-	5
2	98,97	-	49,49	20,65	0,44	10,3	10
3	72	-	72	20,59	0,44	15	15
4	93,38	46,7	-	20,03	0,43	19,45	10
5	78,55	39,27	39,27	22,46	0,45	-	15
6	60,63	30,31	60,63	21,67	0,44	6,32	5
7	75,12	75,12	-	21,48	0,45	7,82	15
8	58,66	58,66	29,33	20,97	0,45	12,22	5
9	52,36	52,36	52,36	22,46	0,45	-	10

Determinaciones

Proteínas: según el Método Oficial de Análisis de AOAC 1999. Se empleó un digestor de seis posiciones, marca Büchi® modelo K-424 y un destilador semiautomático de la misma marca, modelo K-350;
Lípidos: por el método de extracción con Soxhlet utilizando n-hexano como solvente, según la técnica reportada por la AOAC 1999.
Humedad: por método indirecto; las pruebas se realizaron por triplicado, de acuerdo a AOAC International 1999.
Cenizas: por calcinación en mufla Indet 273 a 600 °C, de acuerdo con AOAC 1999.
Carbohidratos: por diferencia, utilizando la ecuación 100 – [% humedad + % proteínas + % cenizas + % lípidos].
Valor energético: en base a los resultados de las determinaciones anteriores y aplicando los factores de conversión para cada uno de los macronutrientes (ANMAT).
Textura: se utilizó un Texturómetro marca INSTRON modelo 3342. Los gráficos obtenidos fueron procesados utilizando el software ImageJ, el cual permite determinar mediante un algoritmo matemático la tortuosidad de cada una de las curvas, se trata de un número adimensional, proporcional a la cantidad de quiebres que cada curva presentan. Las muestras que presentaron valores se tortuosidad similares, fueron las seleccionadas para ser comparadas con los copos de maíz tradicionales (CM) que se encuentran en el mercado.
Color: Se midieron los parámetros L*a*b* con un espectrofotómetro KONICA MINOLTA CM-600 d en el modo SCI.

Análisis sensorial

Aceptabilidad: para determinar el grado de aceptabilidad de los CD se procedió a evaluar los siguientes caracteres organolépticos: color, sabor, aroma y textura, este último medido a través de los parámetros dureza, primer mordida y masticabilidad.
La prueba fue realizada por 69 jueces no entrenados de ambos sexos en la sala de valoración sensorial del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA), el cual cuenta con boxes individuales, acondicionados para el desarrollo de tal actividad.
El instrumento que se empleó para recolectar la opinión de cada degustador fue un formulario previamente confeccionado, el cual incluía el consentimiento informado que legitimó la participación de los encuestados en la investigación.
Para el procesamiento de los datos, se tuvieron en cuenta factores de ponderación (**Tabla 3**), los cuales fueron asignados de acuerdo a la relevancia de cada atributo en relación con la aceptación de los CD. La muestra se consideró aceptada, por cada encuestado, cuando la suma de todos los atributos fue mayor o igual a 20 puntos. Luego se cuantificó cuántos de estos jueces aceptaron el producto, si superaba el 50% tenían aceptación general.

Tabla 3: Factores de ponderación.

Atributo	Factor de ponderación
Color	3
Aroma	2
Sabor	5
Dureza	5
Primera mordida	2
Masticabilidad	3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La **Tabla 4** muestra los valores de humedad final de los copos dulces. Se observó una disminución conforme aumentó el tiempo de horneado. Nath (2006), quien trabajó en snacks de papa y soja listos para comer, determinó que la temperatura y el tiempo de cocción son los parámetros más relevantes que afectan el contenido de humedad del producto. Si bien se encontraron diferencias significativas entre las muestras con 5 minutos de cocción (**Tabla 4**), estas se relacionaron con el contenido inicial de agua en las masas.
La fuerza de compresión máxima (FCM) alcanzada fue menor en aquellas muestras cuyos contenidos de humedad eran elevados (muestras 1, 6 y 8, **Tabla 4**); estos copos resultaron demasiado blandos y se doblaban durante la medición, sin quebrarse. Por el contrario, al evaluarse el efecto de la humedad sobre la tortuosidad (TT) de los copos dulces, se observó que las muestras con humedades menores al 3,5% arrojaron los mayores valores de TT, algo similar a lo encontrado en un estudio sobre snacks listos para comer,

donde se observó que valores de humedad superiores al contenido crítico establecido (4%) afectaban notablemente la textura de los snacks y por ende, su aceptabilidad por parte de los consumidores (Pritam Mazumder 2005).

Tabla 4: Tiempo de horneado, porcentaje de humedad, fuerza de compresión máxima (FCM) y valores de tortuosidad (TT) según muestras.

Muestra	Humedad (%)	FCM (N)	TT	Tiempo de horneado (min.)
1	13,49^{c} ± 3,52	23,79^{a}	1,16^{a} ± 0,03	5
2	6,57^{b} ± 0,55	92,85^{c}	1,19^{a} ± 0,02	10
3	**1,61^{a} ± 0,50**	**111,06^{c}**	**1,23^{b} ± 0,02**	**15**
4	8,63^{b} ± 0,61	44,71^{b}	1,16^{a} ± 0,03	10
5	**3,49^{a} ± 0,31**	**144,33^{d}**	**1,27^{b} ± 0,05**	**15**
6	15,98^{d} ± 0,18	6,97^{a}	1,17^{a} ± 0,01	5
7	**3,45^{a} ± 0,39**	**70,79^{b}**	**1,22^{b} ± 0,05**	**15**
8	17,54^{d} ± 1,61	10,99^{a}	1,16^{a} ± 0,01	5
9	8,42^{b} ± 0,64	91,85^{c}	1,14^{a} ± 0,01	10
CM tradicionales	**-**	**29,88^{a}**	**1,26^{b}**	

Medias con una letra idénticas no son significativamente diferentes p(>0,05)

Las muestras denominadas M3, M5 y M7 presentaron valores de TT similares a la muestra comercial (CM) no existiendo entre ellas diferencias estadísticamente significativas; a la vez, fueron los valores de tortuosidad más altos obtenidos en los nueve ensayos. Sin embargo, como se muestra en la **Figura 2,** las fuerzas máximas de compresión de los tres copos fueron sustancialmente mayores que para CM, como se observa en la **Tabla 4** son estadísticamente significativas. Los CM, con un valor próximo a 30 N, resultó cercano a los 42 N obtenido por Mukherjee *et al* (1997) para snacks deshidratados de papa. Se concluye que, a fin de recibir una mayor aceptación, los CD deberían elaborarse con una dureza sustancialmente menor.

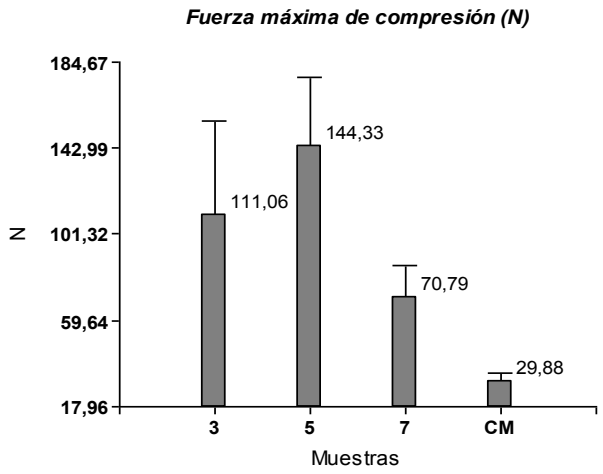


Figura 2: Valores de FCM de los CD a base de HIQ y de los CM tradicionales.

El empleo del carbonato de calcio como aditivo es frecuente en la industria alimentaria. Es insoluble, con un alto contenido de calcio (40%) Valencia García *et al.* (2010), imparte firmeza y mejora la textura (Quiminet 2012). Su inclusión genera puntos de discontinuidad en la masa laminada, lo que facilita el quiebre de la misma. Las muestras M3 y M7, que contenían $CaCO_3$ en su formulación, presentaron menor FCM que la M5, en donde ese aditivo estaba ausente.

Como se muestra en la **Tabla 5**, los valores de L*, b* y a*, para M3 M5 y M7 no presentaron diferencias significativas. Sin embargo, los valores de a* para las tres muestras resultaron notablemente mayores a los obtenidos para el resto de las formulaciones ensayadas (**Tabla 5**). Un valor positivo de a* indica un desplazamiento al rojo y generalmente se vincula con el pardeamiento debido a la reacción de Maillard, que tiene lugar durante el proceso de cocción.

Las M5 y M7, que no presentaron diferencias significativas en tortuosidad, también muestran semejanzas en la coloración, en particular llaman la atención los valores de L*, sustancialmente menores al obtenido para M3. Ese parámetro mide la luminosidad de la luz reflejada, teniendo presente que M3 posee mayor proporción de fécula de mandioca, su blancura debe seguramente contribuir con el incremento en L*. (**Tabla 5**). De acuerdo a las preferencias de los jueces no entrenados (**Figuras 5**, **6** y **7**), en donde se observa inclinación, en cuanto al color, por las M5 y M7 en detrimento de la M3, podría afirmarse que el panel optó en general por aquellas muestras donde prevaleció el color rojo y con menor influencia de los amarillos, esto último se infiere del hecho de que el parámetro b* dio valores positivos menores para M5 y M7.

Tabla 5: Mediciones de color en CD.

Muestra	L*	a*	b*
1	$44{,}17^{a}$ ± 5,05	$4{,}19^{c}$ ± 0,40	$22{,}55^{b}$ ± 1,64
2	$67{,}53^{c}$ ± 2,46	$3{,}74^{c}$ ± 1,33	$28{,}10^{d}$ ± 1,60
3	**$64{,}58^{c}$ ± 8,62**	**$8{,}47^{e}$** ± 1,07	**$28{,}98^{d}$ ± 2,66**
4	$62{,}26^{c}$ ± 1,69	$2{,}27^{b}$ ± 0,54	$24{,}64^{c}$ ± 1,27
5	**$43{,}46^{a}$ ± 4,94**	**$7{,}23^{d}$** ± 1,45	**$22{,}18^{b}$ ± 2,27**
6	$53{,}68^{b}$ ± 7,38	$2{,}52^{b}$ ± 0,30	$21{,}67^{b}$ ± 2,32
7	**$43{,}46^{a}$ ± 6,01**	**$7{,}52^{d}$** ± 1,38	**$22{,}39^{b}$ ± 1,90**
8	$54{,}03^{b}$ ± 6,06	$1{,}10^{a}$ ± 0,28	$17{,}51^{a}$ ± 1,38
9	$65{,}61^{c}$ ± 11,90	$1{,}76^{b}$ ± 0,50	$21{,}19^{b}$ ± 3,18

Medias con una letra idénticas no son significativamente diferentes p(>0,05)

Como se desprende de las **Figuras 3** a **5**, mientras M3 y M5 mostraron una aceptación general del 13% y 26%, respectivamente, la M7, con el valor más bajo de FCM (**Figura 2**), agradó al 43% de los encuestados. Si bien el agregado de carbonato de calcio mejoró la textura del producto, no fue suficiente para lograr un copo dulce que agrade a la mayoría de los potenciales consumidores. Estos resultados hacen necesario revisar el procedimiento de elaboración, a fin de volver más frágiles a los copos dulces con HIQ.

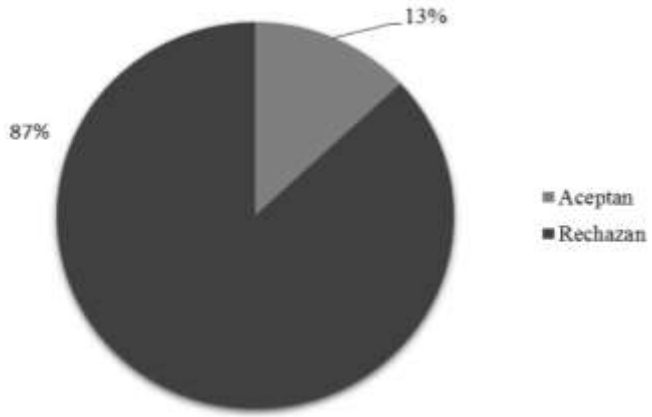


Figura 3: Aceptación general de los CD a base de HIQ, libres de gluten. M3

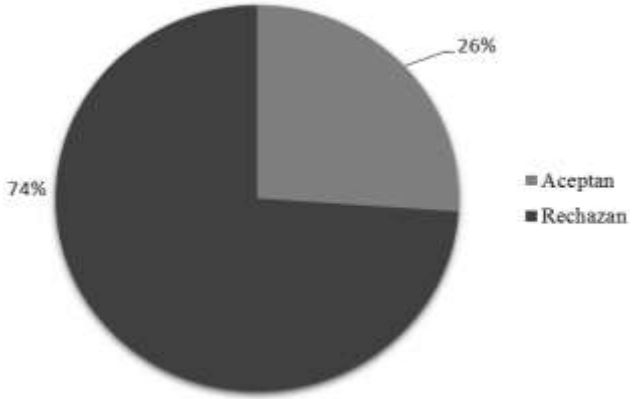


Figura 4: Aceptación general de los CD a base de HIQ, libres de gluten. M5

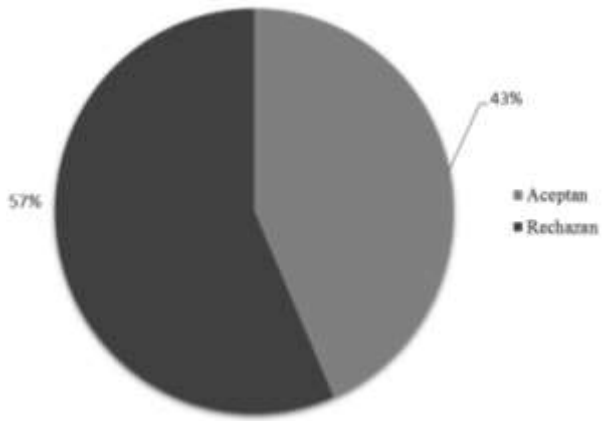


Figura 5: Aceptación general de los CD a base de HIQ, libres de gluten. M5

Con respecto al color, la M3 fue la menos agradable a la vista de acuerdo al 6% de los encuestados, además de ser la que al 51% de los consumidores no les pareció ni agradable ni desagradable. Por otro lado, las M5 y M7 fueron las más agradables, así lo manifestó el 57% y 44% de los jueces, respectivamente. En relación a la última muestra, el 30% de los encuestados refirió que el color percibido era muy agradable. (**Figuras 6**, **7** y **8**).

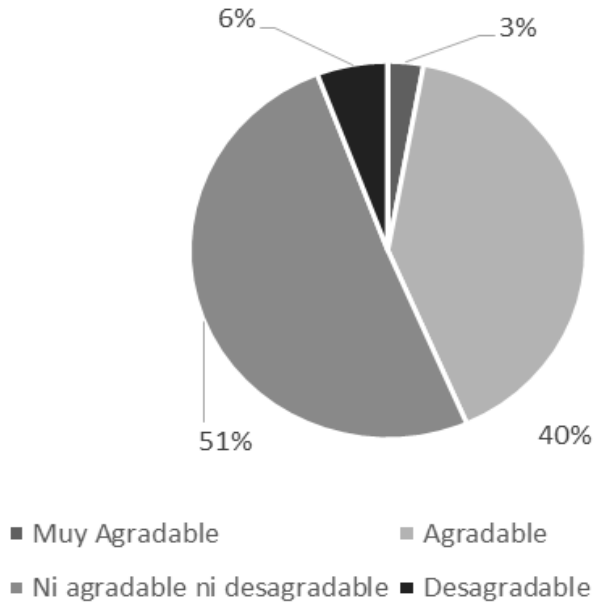


Figura 6: Percepción del color M3

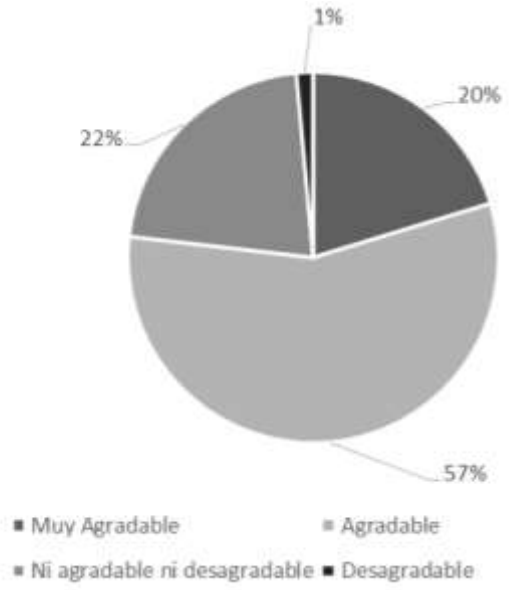


Figura 7: Percepción del color M5

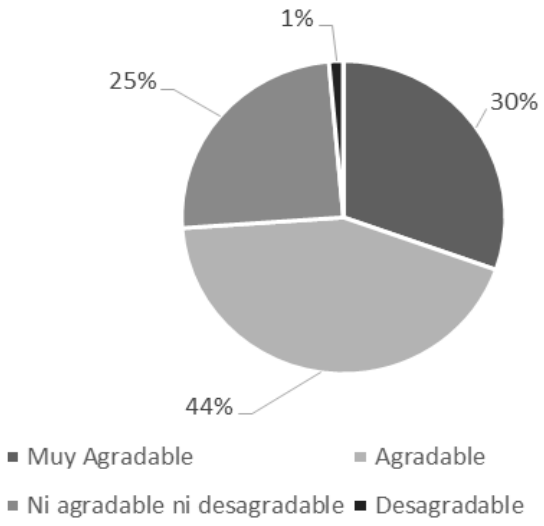


Figura 8: Percepción del color M7

En cuanto al perfil nutricional de los copos, todas las muestras presentaron valor similar a los de CM tradicionales, en cuanto al contenido de carbohidratos, proteínas, grasas y valor energético total, (**Tabla 6**) y coincidente con un estudio sobre optimización de hojuelas de quínoa realizado en Santiago de Chile (Altimira *et al.* 2006). Los CD aquí desarrollados tendrían una mejor calidad proteica que los copos de maíz tradicionales, pues se complementarían unas con otras las harinas empleadas para su elaboración. La quínoa posee como aminoácidos limitantes la cisteína y metionina, mientas que los limitantes de cereales como el arroz son la lisina, la treonina y la isoleucina (Martínez y Martínez 2006).

En todos los casos el elevado valor energético se debió principalmente al contenido de carbohidratos, próximo, en todos los casos, a 25 g por cada 30 g de muestra (**Tabla 6**). En las muestras analizadas existe una sobreestimación del valor energético, ya que para el cálculo se emplearon los carbohidratos obtenidos por diferencia y estos no distinguen entre las fracciones digeribles e indigeribles (fibra dietética).

Como se observa en la **Tabla 6**, el contenido de cenizas en la M3 (2 g%) es mayor que en las M5 y M7 (0,5 g% y 1 g%, respectivamente), esto se debería al contenido de carbonato de calcio en las muestras, siendo mayor en la M3 (15 g), menor en la M7 (7,82 g) e inexistente en la M5.

Tabla 6: Información nutricional de los CD y de los CM tradicionales, cada 100 g de producto.

	M 3		**M 5**		**M 7**		**CM**
	Porción (30 g)	% VD (*)	Porción (30 g)	% VD (*)	Porción (30 g)	% VD (*)	Porción (30 g)
Valor energético (kcal)	112	6	116	6	113	6	116
Carbohidratos (g)	26	9	25	9	25	8	26
Proteínas (g)	2	3	3	4	3	4	2
Grasas (g)	0,5	1	0,5	1	0,5	1	0,2
Cenizas (g)	2	-	0,5	-	1	-	s/d

(*)% Valores Diarios con base a una dieta de 2000 kcal. Sus valores diarios pueden ser mayores o menores dependiendo de las necesidades energéticas.

CONCLUSIÓN

Es posible la elaboración de CD a base de HIQ y libres de gluten. El perfil nutricional de estos es similar al de los CM tradicionales.
El contenido de humedad y el contenido de carbonato de calcio afectan la tortuosidad del producto final.
El tiempo de cocción influye en la coloración de los CD.
Si bien ninguna de las muestras elegidas superó el 50% de aceptación por parte del panel de jueces no entrenados, es necesario tener presente la influencia que ejercen los preconceptos y subjetividades respecto de cómo deben ser los copos de cereales para consumir con leche o yogur.
Dentro de los aspectos a mejorar, consideramos que, un laminado más fino de la masa disminuiría la dureza de los CD, aumentando paralelamente la aceptación de los consumidores. Otro aspecto sobre el que sería necesario seguir trabajando es el sabor; posiblemente la incorporación de un saborizante de aceptación masiva como son la vainilla o frutilla haría más aceptable el producto por parte de los consumidores. Los saborizantes deberían ser termo-resistentes dado que en ensayos preliminares, realizados con esencias líquidas comunes, se verificó la pérdida total de las mismas durante el horneado. Consideramos que a la vez de otorgar un sabor agradable, el saborizante contribuiría en enmascarar el residuo amargo, característico de la quínoa.

BIBLIOGRAFÍA

Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) URL: http://www.anmat.gov.ar/consumidores/alimentos/informacion_nutricional.pdf. Última consulta: 25/06/2013.

Altimira cruz JS, Aranguiz farias LE. 2006. Desarrollo, optimización y estudio de factibilidad técnico económica de productos a base de quínoa (*Chenopodium quinoa* Willd). Tesis doctoral. Santiago de chile: Departamento de ciencia de los alimentos y tecnología química, Universidad de Chile.

AOAC International. 1999. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analysis Chemist. 16th Edition, 5th Revision, Gaithersburg, USA.

Beckleheimer, J. 1994. URL: http://www.sample_url.bibliography/html. Última consulta: 01/04/2004.

Capítulo IX: Alimentos farináceos – Cereales, harinas y derivados. 2013. En: Código Alimentario Argentino.

Cervilla NS, Mufari JR, Calandri EL, Guzmán CA. 2011. Composición química de harinas de quínoa de origen argentino, pérdidas minerales durante el lavado. Revista SAN, 13: 293-299.

De Rosa S. 1993. Estudio multicéntrico para determinar la prevalencia de la enfermedad celíaca en un área de la República Argentina. Med. Infant, 1(2):5-72.

Enfermedad celíaca, protocolos diagnósticos y terapéuticos en pediatría. URL: http://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/5-celiaca.pdf. Última consulta: 29/05/2013.

FAO. 2011. La Quinua: Cultivo milenario para contribuir a la seguridad alimentaria mundial. URL http://www.fao.org/fileadmin/templates/aiq2013/res/es/cultivo_quinua_es.pdf. Última consulta: 24/06/2013.

FAO. 2013. Acuerdo para fortalecer la producción de quinua en Argentina. URL: http://www.fao.org/agronoticias/agro-noticias/detalle/es/c/177506/. Última consulta: 13/06/2013.

León AE, Rosell C. 2007. De tales harinas, tales panes: granos, harinas y productos de panificación en Iberoamérica. Córdoba.

Lezcano E. P. Secretaría de Ganadería, Agricultura y Ganadería y Pesca. 2010. URL: http://www.alimentosargentinos.gov.ar/contenido/revista/ediciones/49/productos/r49_07_CerealesDesayuno.pdf. Última visita: 10/11/2014.

Lost Crops of The Incas. 1989. National Research Council: 161.

Martínez AO, Martínez de Victoria E. 2006. Proteínas y péptidos en nutrición enteral. Nutr Hosp, 21: 1-14.

Mujica A, Jacobsen E, Izquierdo J, Marathee JP. 2001. Quinoa (Chenopodium quínoa Willd). URL: http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/cdrom/contenido/libro03/home03.htm. Última consulta: 10/06/2013.

Mukherjee S. 1997. Studies on HTST whirling bed dehydration technology for the production of RTE puffed potato cubes. Tesis doctoral no publicada. India: Post Harvest Technology Centre, IIT.

Nath A, Chattopadhyay PK. 2006. Optimization of oven toasting for improving crispness and other quality attributes of ready to eat potato-soy snack using response surface methodology. Journal of Food Engineering, 80: 1282-1292.

Normas alimentaria FAO/OMS. Codex Alimentarius. 2013. URL: http://www.codexalimentarius.net/gsfaonline/additives/details.html?id=185. Última consulta: 26/07/2013.

Pritam Mazunder BS et al. 2005. Textural attributes of a model snack food al different moisture contents. Journal of Food Engineering, 79:511-516.

Programa Nacional de Federalización de la Ciencia, la Tecnología y la Innovación (PROFECyT), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, y Secretaria de Ciencia y Tecnología (Secyt). Quínoa y amaranto: debilidades y desafíos tecnológicos del sector productivo. URL: http://www.cofecyt.mincyt.gov.ar/pdf/productos_alimenticios/Quínoa_y_Amaranto.pdf. Última consulta: 05/06/2013.

Quiminet. 2012. El carbonato de calcio en los alimentos. URL: http://www.quiminet.com/articulos/el-carbonato-de-calcio-en-los-alimentos-8219.htm. Última consulta: 26/07/2013.

Sancho J, Bota E, Castro J. 1999. Introducción al análisis sensorial de los alimentos. Barcelona: Edicions Universitat de Barcelona.

Szczesniak AS, Kahn EL. 1971. Consumer awareness of and attitudes to food texture. Journal of Texture Studies, 2: 280-295.

Szczesniak AS. 1990. Texture: Is it still an overlooked food attribute?. Food Technology, 44: 86-95.

Tapia M, Fries AM. 2007. Guía de Campo de Cultivos Andinos. FAO y ANPE.

Valencia García FE, Román Morales MO, Cardona Sánchez DP. 2010. El calcio en el desarrollo de alimentos funcionales. Revista Lasallista de Investigación (Antioquía), 1: 104-116.

Vega-Galvez A, et al. 2010. Nutrition facts and functional potential of quinoa (Chenopodium quinoa willd.), an ancient Andean grain: a review. J Sci Food Agric.

CARACTERÍSTICAS ANTIOXIDANTES DE VINOS TINTOS DE LOS VALLES CALCHAQUÍES, SALTA

Di Carlo BM [(1)], Pérez, NP [(1)], Gómez de Díaz R[(1)], Salomón R[(2)], Moyano F[(1)] , Peñaranda SS [(1)] , Zerpa G[(1)], Rabus P[(1)], Buttazzoni R[(1)]

1. Universidad Nacional de Salta, Consejo de Investigación, Facultad de Ciencias Exactas, Argentina
2. Universidad Nacional de Salta, Facultad de Ingeniería, Argentina.

bertadcar@yahoo.com.ar

Resumen: Los vinos tintos tienen polifenoles que les proporcionan características antioxidantes, beneficiosas para la salud siempre que se realice un consumo moderado del vino tinto en la alimentación diaria. Se estudiaron los vinos tintos provenientes de empresas vitivinícolas de los Valles Calchaquíes, Salta. Se analizaron las variedades *Malbec, Cabernet Sauvignon, Tannat* y *Syrah*, mediante análisis de polifenoles totales por absorción en UV a 280 nm determinando el índice D280 y capacidad antioxidante mediante ensayo de intensidad colorante por medición de absorbancia a 520 nm y 420 nm evaluando la intensidad por su sumatoria y el matiz por su relación. Los resultados presentaron contenidos fenólicos con índices D280 entre 43,3 a 55,7; la capacidad antioxidante está dada por la intensidad colorante de los vinos tintos con valores de absorbancias a 420 y 520 nm que oscilaron entre 0,60 a 1,09; existiendo correlación entre los polifenoles totales y la capacidad antioxidante con un coeficiente de correlación de 0,974. Se determinó que el varietal *Cabernet Sauvignon* posee mayor capacidad antioxidante, siguiendo en orden de importancia los varietales *Malbec, Tannat* y *Syrah*.

Palabras claves: vinos, tintos, capacidad antioxidante.

Abstract: The total polyphenol content in red wines is correlated with their antioxidant capacity. It is beneficial to health if the wine is consume in low quantities. We analyzed red wines from wineries Calchaquíes Valleys*, Malbec, Cabernet Sauvignon, Tannat* and *Syrah* variety by analysis of total polyphenols by UV absorption at 280 nm and antioxidant capacity assay using colour intensity measuring absorbance at 520 nm and 420 nm evaluating the summation and relation. The results presented indices D280 phenolic contents between 43.3 and 55.7, the antioxidant capacity was given by the colour intensity of red wines with absorbance values at 420 and 520 nm that ranged from 0.60 to 1.09; correlation exists between polyphenols and antioxidant capacity with a correlation coefficient of 0.974. The *Cabernet Sauvignon* variety has more phenolic content then is *Malbec, Tannat, Syrah* variety.

Keywords : red wines, polyphenol, antioxidant capacity.

INTRODUCCIÓN

Los constituyentes fenólicos de los vinos tintos, en ensayos *in vitro*, han demostrado que inhiben la susceptibilidad de las LDL (lipoproteínas de baja densidad) a la oxidación, causantes de lesiones vasculares arterioescleróticas, dado que las LDL oxidadas son captadas por los macrófagos mediante receptores específicos, desarrollando placas o ateromas que son elementos centrales en este tipo de lesiones. También, se ha descripto efectos protectores en patologías como diabetes, cáncer, infecciones víricas, úlcera estomacal y duodenal, inflamaciones y hasta acción antialérgica (Martínez-Flores *et al*, 2002)

Cada región vitivinícola está marcada por características propias, hay áreas con climas y suelos diferentes que favorecen el cultivo de varias cepas y la producción de amplia variedad de estilos de vinos, es de importancia el estudio fenólico y la capacidad antioxidante de los vinos tintos provenientes de los Valles Calchaquíes de la provincia de Salta, que comprende una región integrada por los departamentos de Cafayate, San Carlos, Molinos (Colomé) y Cachi de la provincia de Salta, donde existen 26 bodegas que elaboran vinos tintos varietales *Cabernet Sauvignon, Malbec*, *Syrah* y *Tannat..*

Kanner *et al.* (1994) estudiaron el efecto antioxidante de los fenoles del vino en la peroxidación lipídica utilizando diferentes catalizadores biológicos. Vinson y Hontz (1995), propusieron el uso de un índice de fenoles antioxidantes para fijar la capacidad antioxidante en vinos (contenido de fenoles/IC50 de lipoproteinas). Por su parte, Frankel *et al.* (1995), evaluaron la capacidad de inhibición de la oxidación in vitro del LDL humano en vinos californianos, analizando la capacidad de los principales compuestos fenólicos y del resveratrol. Otros autores, entre ellos Sato et al. (1996), Simonetti et al. (1997), Arnao et al. (1998), Ghiselli et al. (1998), estudiaron la actividad antioxidante en vinos de diversos orígenes (español, italiano y estadounidense) por diferentes métodos y su relación con el contenido de polifenoles.

En los últimos años han surgido numerosos estudios, que demuestran que el consumo moderado de vino es beneficioso para la salud, principalmente en la prevención de enfermedades crónicas asociadas al estrés oxidativo, tales como la aterosclerosis y enfermedades cancerígenas. Es así que, los compuestos antioxidantes ingeridos en la dieta serían fundamentales para la prevención de este tipo de enfermedades. Los antioxidantes son esencialmente importantes para el organismo por la capacidad que tienen de proteger a las macromoléculas biológicas contra el daño oxidativo. Entre los más conocidos figuran los tocoferoles, el ácido ascórbico, los flavonoides, antocioaninas, carotenoides, ácidos fenólicos (Larson, 1997).

Se han propuesto diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante en alimentos. En general, estos métodos se basan en la capacidad de los antioxidantes para captar radicales libres (Arnao et al., 1998; Robards et al., 1999). Se utilizan métodos de detección en fase lipídica, generando enzimáticamente el radical ABTS+, o bien con el test del radical DPPH; en fase acuosa, test TAA y del *Status* Antioxidante total; en sistemas de membrana, peroxidación del linoleato, LH/LUV test; actividad antioxidante del óxido nitroso y otros (Cano et al., 2000; Arnao, et al., 2001; Brand-

Williams et al.,1995; Arnao et al., 1998; Rapisarda et al., 1999; Asuma et al., 1999).

Se atribuye un 40 % de la capacidad antioxidante a los siguientes polifenoles: antocianos (55%), taninos (25%), flavonoles (15%) y ácidos fenólicos hidrosolubles (5 %), según Ursini y col, 1996.Estos autores, señalan una correlación de la intensidad colorante con la capacidad antioxidante de los vinos (R=0,99), apoyando el postulado de la importancia de los antocianos en la capacidad antioxidante total.

Estudios biológicos sobre los polifenoles presentes en los vinos tintos, señalan que son compuestos biodisponibles, por lo que son alimentos funcionales por su contenido de antioxidantes naturales, es decir, proveen beneficios para la salud, siempre que se realice un consumo moderado en la alimentación diaria. (Sato *et al*, 1996)

En éste trabajo se determina el contenido total de polifenoles en vinos tintos de los Valles Calchaquíes de la provincia de Salta y se correlaciona con su capacidad antioxidante, estos resultados se difundirán a la comunidad y serán transferidos a las empresas vitivinícolas de la zona.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Se analizaron 18 muestras compradas en el mercado local, variedades *Malbec, Cabernet Sauvignon, Tannat* y *Syrah*, provenientes de bodegas ubicadas en los departamentos de Cafayate, San Carlos, Molinos (Colomé) y Cachi de la provincia de Salta.

Métodos de análisis

En las muestras se determinaron los polifenoles totales por absorción en UV a 280 nm el índice D280 según técnica de Ribéreau-Gayon (2006), éste índice se basa en la absorción a ésta longitud de onda de los ciclos bencénicos de la mayoría de los fenoles, se calculó como la absorbancia del vino diluido 1:100 multiplicado por 100. Se evaluó la capacidad antioxidante mediante ensayo de intensidad colorante por medición de absorbancia a 520 nm y 420 nm determinando la intensidad por su sumatoria, que indica la totalidad del color del vino y el matiz por la relación absorbancia 420/absorbancia 520 según técnica de Ursini y colaboradores (1996), valorando así la proporción de color amarillo con relación al color rojo.

Análisis estadístico

En el tratamiento estadístico de los resultados se aplicó el análisis de la varianza a los resultados y el test de Tukey para comparar medias y análisis de componentes principales mediante el programa estadístico InfoStat (De Rienzo *et al*, 2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados presentaron contenidos fenólicos con índices D280 entre 43,3 a 55,7; como se puede observar en la figura 1. Además, las determinaciones de la capacidad antioxidante realizadas *in vitro* dan idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas in vivo. Por otra parte, por lo general, la actividad antioxidante total está dada por la sumatoria de las

actividades antioxidantes de los componentes individuales del producto, modificada a veces por el efecto sinergista o inhibidor de cada uno de ellos.

El contenido total de polifenoles en los vinos tintos se correlaciona con su capacidad antioxidante (Sato *et al*, 1996). En estudios realizados en humanos, el consumo moderado de vinos tintos a mediano plazo, demostró la resistencia de las LDL a la oxidación (Youdin *et al,* 2002).

Los vinos que tienen un máximo en el espectro para longitudes de onda de 280 nm, se puede cuantificar el contenido total de polifenoles por lectura directa de la absorbancia. A partir de las mediciones del contenido de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteau o por lecturas de absorbancia a 280 nm, se puede predecir la actividad antioxidante de los vinos.

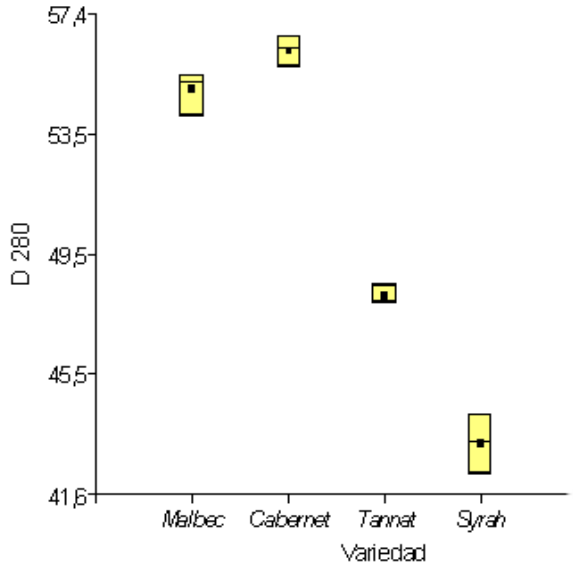


Fig 1. Valores de Absorbancia a 280 nm

Vinson y Hontz (1995) y Frankel *et al.* (1995) encontraron una correlación directa entre los polifenoles totales y la actividad antioxidante determinada por el porcentaje de inhibición de la oxidación de lipoproteínas humanas de baja densidad (LDL). Sato *et al.* (1996) analizando vinos de diversos orígenes y años de vendimia, informaron acerca de una relación lineal entre los polifenoles totales y el valor de la capacidad de captar radicales superóxido (SOSA). Simonetti *et al.* (1997), en vinos italianos, obtuvieron resultados similares al medir la actividad antioxidante total mediante el radical ABTS.

Sánchez-Moreno *et al.* (1999), aplicaron el test del DPPH para cuantificar la capacidad antioxidante en vinos españoles, y

encontraron una relación lineal entre el contenido en fenoles totales y la eficiencia antirradical (AE) que es igual a la inversa de la EC50 por el tiempo.

Por otra parte, la capacidad antioxidante está dada por la intensidad colorante de los vinos tintos con valores de suma de absorbancias a 420 y 520 nm que oscilaron entre 0,60 a 1,09 como se observa en la figura 2.

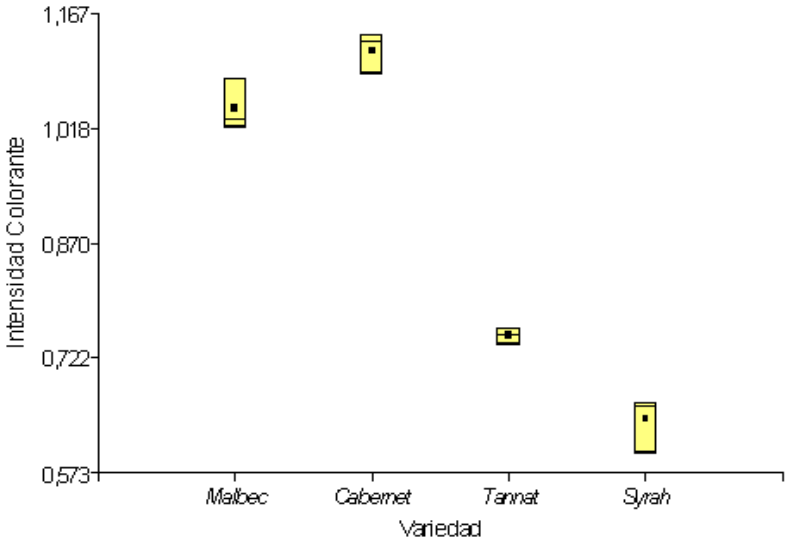


Figura 2. Intensidad colorante de vinos tintos regionales.

Analizando la relación entre la intensidad colorante, se determinó que existe correlación entre los polifenoles totales y la capacidad antioxidante con un coeficiente de correlación de 0,974, como se puede observar en la figura 3. Se determinó que el varietal *Cabernet Sauvignon* posee mayor capacidad antioxidante, siguiendo en orden de importancia los varietales *Malbec, Tannat* y *Syrah*.

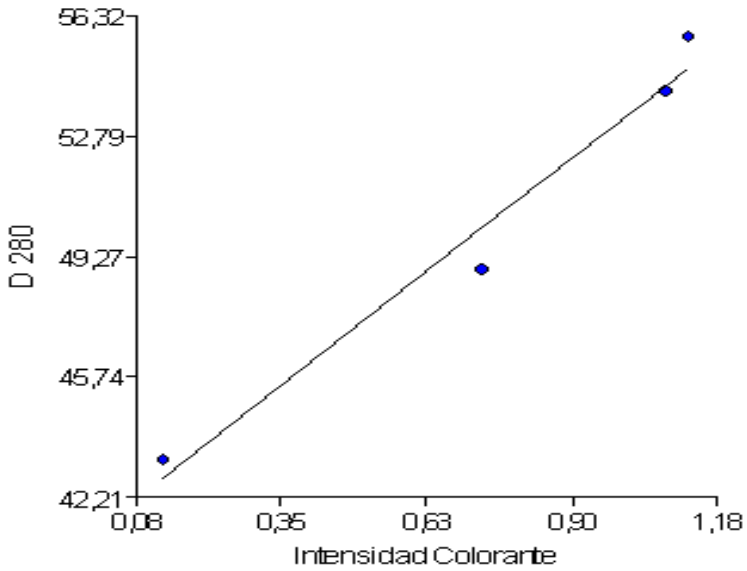


Figura 3. Correlación entre la intensidad colorante y D 280.

Ursini y colaboradores señalan una correlación de la intensidad colorante con la capacidad antioxidante de los vinos (R=0,99), apoyando el postulado de la importancia de los antocianos en la capacidad antioxidante total (Ursini *et al*, 1996).

La capacidad antioxidante está dada por la intensidad colorante de los vinos tintos, la cual se debe a los antocianos rojos y taninos amarillo-amarronados, siendo los mayores valores del contenido fenólico los correspondientes a las muestras del varietal *Cabernet Sauvignon*.

Se determinó el matiz o tinte de los vinos tintos, a través de la relación entre las absorbancias a 420 y 520 nm, siendo sus v alores entre 0,79 a 0,93 que indican que se trata de varietales con tiempos de añejamiento mayores al año como se muestra en la figura 4.

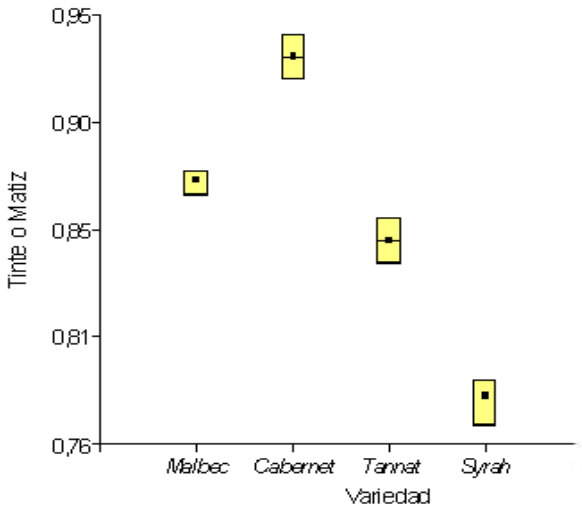


Figura 4. Tinte o matiz de los vinos tintos regionales.

Los principales constituyentes fenólicos del vino con capacidad antioxidante son los derivados de ácidos fenólicos, ácidos cinámicos, flavonoides, procianidinas y estilbenos; los cuales provienen de la piel, pepas y pulpa de la uva.
Ghiselli *et al.* (1998) al estudiar la capacidad antioxidante de las distintas fracciones polifenólicas del vino sugirieron que las antocianinas tendrían un papel importante en la actividad antioxidante total.

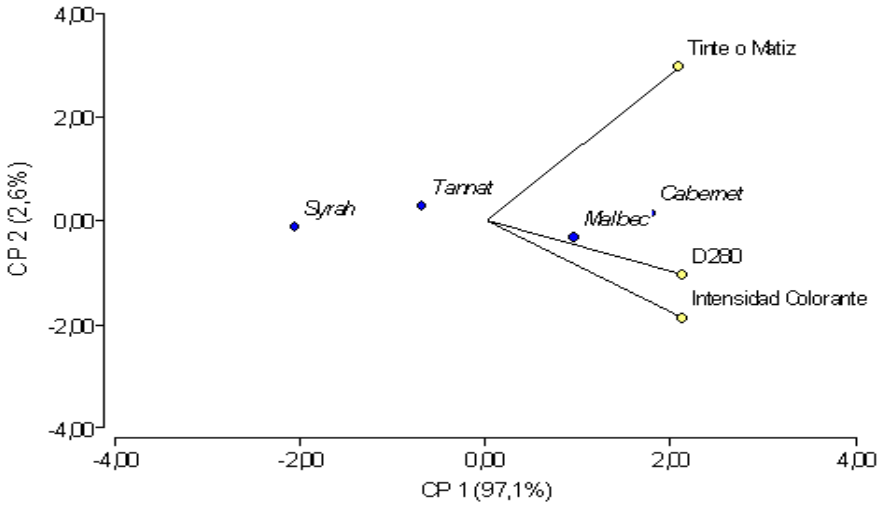


Figura 5. Análisis multivariante de los vinos tintos regionales.

Se complementó los estudios realizado con un análisis multivariante de los resultados, para comprender su variabilidad que se observa en la figura 5. Se puede apreciar que la componente 1 participa con el 97,1 % y la componente 2 con el 2,6 %, también se determina la asociación de los vinos de las variedades *Malbec* y *Cabernet Sauvignon* con los mayores valores de tinte, intensidad colorante y contenido fenólico, mientras que los varietales *Syrah* y *Tannat* se encuentran asociados con menores valores de éstos resultados.
Los valores de autovectores e_1 y e_2, fueron de 0,58, y -0,29 para los valores de D 280 flavonoles, 0,58 y -0,51 para la intenidad colorante, 0,57 y 0,81 para el tinte o matiz, respectivamente.

De éste análisis multivariado, destacamos que los varietales *Cabernet Sauvignon* y *Malbec* presentan mejores características polifenólicas, siendo esto de importancia para la salud, si consideramos la capacidad antioxidante de éstos componentes para el organismo, siempre que se realice un consumo moderado (Renaud *et al,* 1994, Orogozo *et al* , 1997, Frankel *et al* 1993).

Podemos considerar a los vinos tintos alimentos funcionales por su contenido de antioxidantes naturales, con componentes fisiológicamente activos y biodisponibles, como son los polifenoles, siendo beneficioso su consumo controlado para la salud de la población, como lo demostraron los estudios de intervención realizados en humanos por Leighton (1999) en Chile, donde se proporcionaba una porción diaria de 240 ml de vino tinto en la dieta con vigilancia médica y nutricional; a los 90 días se evaluaron la capacidad antioxidante del plasma y los polifenoles plasmáticos que aumentaron en la dieta suplementada con vino.

CONCLUSIONES

Los vinos tintos regionales presentaron contenidos fenólicos con índices D280 entre 42,4 a 61,8; registrando un coeficiente de correlación de 0,974 con la capacidad antioxidante determinada por la intensidad colorante de los vinos que oscilaron entre 0,51 a 1,05. Se determinó que el varietal *Cabernet Sauvignon* posee mayor capacidad antioxidante, siguiendo en segundo orden de importancia los varietales *Malbec, Tannat* y *Syrah*. Estos resultados son de valor tecnológico y de importancia para la salud, si se tiene en cuenta que numerosos estudios demostraron el consumo moderado de vinos tintos es beneficioso por la acción antioxidante de los polifenoles, que previenen la oxidación de las LDL (lipoproteínas de baja densidad) en los seres humanos y que son causantes de lesiones vasculares arterioescleróticas, además de demostrarse que los polifenoles tienen efectos protectores en patologías como diabetes, cáncer, etc. Además, estos estudios tienen relevancia para la tipificación y caracterización de los vinos tintos de los Valles Calchaquíes del norte argentino con la finalidad de lograr en un futuro la denominación de origen controlada aumentando su valor de comercialización.

BIBLIOGRAFÍA

Arnao, MB, Cano A, Alcolea JF, Acosta M, 2001. Estimation of free radical-quenching activity of leaf pigments extracts. Phytochemical Analysis, 12: 138-143.

Arnao, MB, Cano A, Acosta M, 1998. Total antioxidant activity in plant material and its interest in food technology. Recen Research Development in Agricultural and Food Chemistry, 2:893-904

Asuma K, Katsunari I, Hidekazu I, Hisao H, Terao J. 1999. Evaluation of antioxidative activity of vegetable extractas in linoleic acid emulsion and phospholipid bilayers. Journal of the Science of Food and Agriculture, 79: 2010-2016.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm.-Qwiss.u-Technol., 28: 25-30.

Cano A, Acosta M, Arnao MB. 2000. A method to mesure antioxidant activity in organic media: application to lipophilic vitamins. Redox Report, 5 (6): 366-370.

Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW 2008. InfoStat, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Durán O, Trujillo N. 2008. Estudio comparativo del contenido fenólico de vinos tintos colombianos e importados. Redalyc vitae,15,1: 17-24.

Frankel E, Kanner J, German JB, Parks JE. 1993. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. Lancet, 341: 454-457.

Frankel EA,Waterhouse E, Teissedre P. 1995. Principal Phenolic Phytochemicals in sellected California wines and their

antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. Journal of Agricultural and Food Chemistry., 43: 890-894.

Ghiselli A, Nardini M, Baldi A, Scaccini C. 1998. Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an italian red wine. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 2: 361-367.

Hurtado I, Caldú P, Gonzalo A, Ramon J, Minguez S, Fiol C. 1997. Antioxidative capacity of wine on human LDL oxidation in vitro: effect of skin contact in winemaking of white wine. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45: 1283-1289.

Kanner J, Frankel E, Granit R, German B, Kinsella J. 1994. Natural antioxidants in grapes and wines. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42: 64-69.

Larson R. 1997. Naturally ocurring antioxidants. CRC Press LLC, pág. 116.

Leighton F. 1999. Plasma polyphenols and antioxidants, oxidative DNA damage, and endotelial function, in a dieta n wine intervention study in humans. Proc. Intl. Congreso on Wine and Health, Florence. Drugs Exptl. Clinical Research, 25:133-141.

Martínez Flores S, González-Gallego J, Culebras JM y Tuñón MJ. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutrición Hospitalaria .XVII , 6 : 271-278.

Orogozo JM, Dartigues JF, Lafont S, Letenneur L, Commenges D, Salomón R, Renaud S, Breteler MB. 1997. Wine consumption and dementia in the elderly: a prospective community study in the Bordeaux Area. Revista de Neurología, 3: 185-192.

Peynaud E.1996. Balance in wine. New York, USA : 2º Ed. John Wiley & Sons, Inc., pag 188.

Rapisarda P, Tomaino A, Lo Cascio R, Bonina F, De Pasquale A, Saija A. 1999. Antioxidant effecttiveness as influenced by phenolic content of fresh orange juices. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47: 4718-4723.

Renaud S, Ruf JC. 1994. The French paradox: vegetables or wine. Circulation, 90: 3118-3119.

Ribéreau-Gayon J, Peynaud E, Sudrad P, Riberéreau- Gayon P. 2006. Ciencias y Técnicas del vino. Buenos Aires: Hemisferio Sur. pag 537.

Robards K, Prenzler PD, Tucker G; Swatsitang P, Glover W. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. Food Chemistry, 66: 401-436.

Sato M, Ramarathnam N, Suzuki Y., Ohkubo R, Takeuchi M, Ochi H. 1996. Varietal differences in the fhenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different soruces. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 44:37-41.

Sanchez Moreno C, Larrauri J, Saura Calixto F. 1999. Free radical scavenging capacity of selected red, rosé and white wines. Journal Science of Food and Agriculture, 79: 1301-1304.

Seddon TJ, & Downey MO. 2000.Comparison of analytical methods for the determination of condensed tannins in grape skin. Australian Journal Grape Wine Research, 14: 54–61.

Simonetti P, Pietta P, Tetolin G. 1997. Polyphenol Content and total antioxidant potential of selected italian wines. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45: 1152-1155.

Sommers C, Evans M. 1977. Spectral evaluation of young red wines: anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO2, "chemical age". Journal Science of Food and Agriculture, 28: 279-287.

Ursini F, Tubaro F, Rapuzzi P, Aamburlini A, Maiorino M.1996. Wine Antioxidants: Effects in Vitro and in vivo. Wine and Human Health. Udine 9-11.

Vinson J, Hontz B, 1995. Phenol antioxidant index: comparative antioxidant effectiveness of red and white wines. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43: 401-403.

Youdim KA, Spencer JP, Schroeter H, Rice Evans C. 2002. Dietary flavonoids as potential neuroprotectans. Biology Chemistry, 383: 503-519.

ANALIZAR PARÁMETROS DE CALIDAD, CONTENIDO MINERAL Y POLIFENOLES, SEGÚN LA ZONA DE CULTIVO, PARA LA VALORIZACIÓN DE LOS MELONES PRODUCIDOS EN SAN JUAN-ARGENTINA

Fabani M.P. [1], Baroni M.V. [2], Lorena L.[1], Carrascosa E. [3], Tapia A. [1], Wunderlin D.A. [4], Feresin G.E. [1]

1: Universidad Nacional de San Juan, Facultad de Ingeniería, Instituto de Biotecnología, San Juan, Argentina.
2: Universidad Nacional de Córdoba / CONICET, SECyT–ISIDSA / ICYTAC, Córdoba, Argentina.
3: Empresa del Grupo Carrascosa, Albardón, San Juan, Argentina.
4: Universidad Nacional de Córdoba-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas - ICYTAC, Córdoba, Argentina.

Resumen: El melón es un fruto cuyo consumo se encuentra en crecimiento, las condiciones edáficas y climáticas en la provincia de San Juan, favorecieron su cultivo y adaptación, permitiendo obtener melones de buena calidad. El objetivo fue analizar parámetros de calidad, contenido mineral y polifenoles de melones, variedad *Sundew*, cultivados en la provincia de San Juan y al mismo tiempo la influencia de la zona de cultivo. Se muestrearon melones de Media Agua, 9 de Julio y 25 de Mayo. Los melones de Media Agua se destacaron en relación a los de 9 de Julio y 25 de Mayo. En relación al análisis de sólidos totales y contenido mineral, éstos dependen de la región de cultivo, influenciado probablemente por las prácticas agrícolas y el clima. Mientras que la relación del tamaño y la forma del fruto, así como el valor de pH en la pulpa, no se vieron influenciados por la zona. Los resultados obtenidos hasta el momento, indican que los melones estudiados, presentaron parámetros de calidad muy satisfactorios para su comercialización, con un contenido mineral y de compuestos polifenólicos que podría contribuir a revalorizar este producto, y considerar que su consumo podría otorgar efectos beneficiosos para mantener un estado saludable.

Palabras clave. Melón, calidad, minerales, polifenoles.

Abstract: The melon is a fruit whose consumption is increasing, soil and climatic conditions in the province of San Juan, favoured its cultivation and adaptation, allowing to obtain good quality melons. The aim was to analyse quality parameters, mineral content and polyphenols in Sundew melons from the province of San Juan and at the same time the influence of the growing area. The melons were sampled from Media Agua, 9 de Julio and 25 de Mayo. The melons from Media Agua was highlighted in relation to those from 9 de Julio and 25 de Mayo. In relation to the analysis of total solids and mineral content, they depend on the region of cultivation, probably influenced by agricultural practices and climate. While the ratio of the size, the shape of fruit, and the pH value of the pulp were not influenced by the region. The results obtained so far indicate that the melons studied parameters showed very satisfactory quality for marketing, and a mineral content of polyphenolic compounds that could contribute to revalue this product and consider that their consumption could provide beneficial effects to keep a healthy state.

Keywords. Melon, quality, minerals, polyphenols.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, en Argentina el sector agrícola aumentó el área sembrada y la producción de cultivos "no tradicionales" como los frutos de bayas y pepitas. Este crecimiento del sector frutícola se vio impulsado con el objetivo de buscar alternativas para ingresar en los mercados de consumo internacional, donde se evidencia un notable y creciente interés por consumir alimentos con características distintivas de la zona de producción y que aporten un efecto beneficioso a la salud. Numerosos estudios recomiendan el consumo de frutas y vegetales para mantener un estado saludable, ya que ofrecen protección frente al envejecimiento y numerosas enfermedades crónicas, como diabetes, cáncer, enfermedades cardiovasculares, oculares y neurológicas asociadas al estrés oxidativo (Boeing et al. 2012, John y Shahidi 2010, Leenders et al. 2013, Sharma 2014). Al mismo tiempo, un gran número de minerales son esenciales en la dieta humana, como el sodio, potasio, calcio, cobre, zinc y manganeso, ya que su ausencia o insuficiencia induce después de cierto tiempo algunas modificaciones a los procesos metabólicos. Los metales no esenciales como el plomo, cadmio, mercurio, aluminio entre otros; pueden encontrase presentes en los alimentos y causar un efecto tóxico a quien los consume, por lo que es importante conocer el contenido de los mismos.

El impulso del sector fruti-hortícola argentino es un pilar importante en el desarrollo del país, lo vuelve protagonista en un mundo que está en continuo desarrollo y con necesidades alimenticias cada vez mayores debido al aumento de la población, especialmente en países como China y Asia. Por otra parte, el concepto de Argentina como "granero del mundo" se fue modificando, dejando paso a un concepto de desarrollo, donde la investigación y tecnología aplicada a la producción constituye un aspecto fundamental en el sector agropecuario, para agregar valor a la producción con la inclusión de innovación tecnológica.

En particular, la provincia de San Juan tiene una agroindustria de larga tradición, la cual ha crecido sostenidamente en los últimos años y ocupa un lugar destacado en la producción nacional. Los frutos que se producen son considerados en los mercados internacionales productos *premium,* por su alta calidad y sanidad, cualidades favorecidas por las condiciones climáticas de la región (baja humedad y alta radiación solar) y el agua de riego (satisface las necesidades hídricas y nutritivas).

El melón (*Cucumis melo* L.), aunque se lo considera una fruta, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), lo incluye entre las hortalizas por tratarse de un cultivo temporal. Su consumo como parte de la dieta diaria, está en constante crecimiento, lo cual indica que hay un futuro promisorio para la producción del mismo a nivel nacional y principalmente provincial, basado en las características nutricionales del fruto que se suma a la calidad y sus propiedades beneficiosas para la salud. En consecuencia, es necesario desarrollar y estandarizar métodos que permitan establecer indicadores químicos propios de un producto, que garanticen calidad nutricional y autenticidad, para lograr la diferenciación del producto en términos de comercialización.

El objetivo del trabajo fue analizar parámetros de calidad, contenido mineral y polifenoles, según la zona de cultivo, para

la valorización de los melones producidos en San Juan-Argentina

La planta del melón pertenece a la familia de las cucurbitáceas, y su fruto es la parte comestible (*Cucumis melo* L.), Es anual, originaria de Asia occidental y África. Las principales variedades de melón son: Cantaloupes y Honey Dew, los frutos son normalmente redondos u ovalados. Los colores de la corteza pueden ser muy diversos en función de la variedad (crema, amarillo cremoso, verde cremoso, blanca o gris) y de textura lisa, rugosa o reticulada. La pulpa es aromática, con textura suave y es de color amarillo, verde, rosado y tonos intermedios dependiendo de la variedad (www.inv.gov.ar; www.senasa.gov.ar; http://produccion.sanjuan.gov.ar).

El melón constituye una de las frutas más consumidas, ocupa el cuarto lugar en el mundo, se consume principalmente en fresco, también se lo utiliza para elaborar jugos, dulces y conservas. Los 10 principales países productores de melón son China (~15 millones ton 44% de la producción mundial), España (~12 millones ton, 34% de la producción mundial), Irán, Turquía, E.E.U.U., Rumania, Italia, Marruecos, India y Egipto.

En Argentina, el cultivo del melón es una de los principales cultivos hortícolas en el esquema agrícola de la Provincia de San Juan, y los departamentos productores más importantes son Sarmiento, San Martín, Pocito, 25 de Mayo y 9 de Julio. También producen melones en menor cantidad las provincias de Santiago del Estero, Salta, Mendoza (Lavalle), La Rioja (Capital y Chilecito), Corrientes, Entre Ríos y San Luis (Quines).

El sabor y dulzor del melón son parámetros muy importantes, e indicadores de su calidad. El Departamento de Agricultura de EE.UU. (USDA Nutrient Database), publico que el aporte nutricional del melón es notable con la ventaja que aporta pocas calorías (36 kcal/100 g) (http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl).

La información del contenido de minerales, compuestos fenólicos y actividad antioxidante del melón es limitada (Lester 2008, Ismail et al. 2010). Vouldoukis et al. (2004) estudiaron las propiedades anti-inflamatorias de la pulpa de melón basados en la actividad de la enzima superóxido dismutasa Los melones son muy apreciados por su sabor y aroma único, el cual depende de la variedad y grado de madurez (Beaulieu 2005, Beaulieu y Lea 2006). La corteza del melón se utiliza en confituras, en la elaboración de dulces y fruta abrillantada, mientras que las semillas en la medicina tradicional china principalmente como antitusivo y digestivo (Duke y Ayensu 1985). Estudios recientes se han enfocado en el analisis del contenido de ácidos grasos, tocoferoles, esteroles y perfiles fenólicos del aceite de la semilla del melón (Abdalbasit y Bertrand 2008, Mariod y Matthaus 2008) y en las propiedades físico-químicas (Yanty et al. 2008).

Según lo informado por el Instituto de Investigaciones Tecnológicas (IIT) (2011) el melón sanjuanino es el más dulce del país, con 16,9º Brix o tenor azucarino interno promedio. En segundo lugar se encuentran los de Santiago del Estero (15,60º Brix) y en tercer lugar los de Mendoza (14,26º Brix). Al mismo tiempo, se conformó un panel de cata de melón, que realizó experiencias de cata y análisis sensorial del mismo, y comparándolo con productos de otras provincias (datos no publicados) http://www.tiempodesanjuan.com/notas/2013/1/19/confirmado-melon-sanjuanino-dulce-pais-25204.asp.

Los melones que se producen en San Juan son híbridos, derivados del Rocío de Miel con mejoras. La más conocida es

la variedad *Sundew*, esta posee un ciclo de cultivo más corto (85-90 días), lo que permite ingresarlo al mercado antes de la segunda quincena de diciembre.

MATERIALES Y MÉTODOS

1- Material de Estudio. Frutos de melón (*Cucumis melo* var sundew).
2- Diseño de Muestreo y Procesamiento. La recolección de frutos se realizó en localidades características de la región en estudio: Media Agua, 25 de Mayo y 9 de Julio.
Como material experimental se tomaron diez muestras de melones frescos de cada uno de los establecimientos objeto de estudio. El muestreo fue representativo de los cultivares. Todas las muestras se almacenaron a 4-8°C en la oscuridad, hasta su análisis dentro de los 2-4 días posteriores al muestreo. La colecta de los frutos se realizó en el mes de Enero del 2013 (mes de mayor producción).
Los melones se lavaron, pesaron y cortaron a la mitad para evaluar los siguientes parámetros de calidad: a) forma (longitud/ancho); b) color externo y de la pulpa; c) porcentaje de pulpa, corteza y semillas. Se homogeneizó aproximadamente 500 g de pulpa utilizando una licuadora, una alícuota se filtró y se empleó para determinar: a) contenido de azúcares (°Brix) y b) pH; el resto se almacenó en tubos falcon (50 mL) en la oscuridad a -20° C. Una alícuota de la pulpa se cortó en trozos (aproximadamente 2 cm^3) y se determinó el contenido de materia seca (AOAC, 2000).
3- Extractos Metanólicos. A partir de 1 g de muestra (pulpa fresca), por sonicación se hicieron extracciones con metanol. El sobrenadante se empleó para realizar los siguientes ensayos:
Polifenoles. a) Contenido Total de Compuestos Fenólicos Solubles (TFS), se utilizó el método de Folin–Ciocalteau, y para cuantificar una curva de calibración con ácido gálico (Heldrich, 1990). b) Contenido de Flavonoides (F). Se hará empleando la metodología de Chang et al. (2002), con algunas modificaciones.
Bioensayos. Actividad atrapadora del radical DPPH. Para la búsqueda de agentes atrapadores de radicales libres se empleará el bioensayo "in vitro" del radical DPPH (1,1-Difenil-2-picrilhidracilo) de acuerdo a Tapia et al. (2004). Se calculó la concentración del extracto que proporciona el 50% capacidad atrapadora de radicales libres (EC_{50}) a partir de la gráfica % inhibición a 517 nm vs concentración del extracto.
Contenido Mineral. Se analizarán por FAAS-FAES e ICP-MS 16 elementos minerales (Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Zn, B, Al, As, Pb, V, P, Se y Cd) previa digestión de la muestra seca (Baroni et. al., 2006, 2009, 2011; Di Paola et al., 2011; Fabani et al., 2009, 2010, 2013).
4- Tratamiento Estadístico de los Datos. Los datos obtenidos serán analizados mediante estadística descriptiva (Programa: Infostat, versión 2014).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evaluaron los parámetros de calidad pos-cosecha en los frutos, los cuales se presentan en la Tabla 1. El peso (pulpa, cáscara y semillas) y forma (largo/ancho), presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los cultivares estudiados (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros de calidad en melones de cultivares de Media Agua (MeMAgua), 9 de Julio (Me9Julio) y 25 de Mayo (Me25Mayo) (medias ± SD, n=10). Letras diferentes indican diferencias significativas entre cultivares, Duncan (p <0,05).

	MeMAgua	Me9Julio	Me25Mayo
Peso (g)	2978±219[a]	2691±544[a]	2584±400[a]
Pulpa (g)	1700±149[a]	1444±323[a]	1408±230[a]
Corteza (g)	1101±86[a]	1091±199[a]	1033±171[a]
Semillas (g)	158±32[a]	136±24[a]	129±28[a]
Forma (largo/ancho)	1,06±0,06[a]	1,03±0,07[a]	1,02±0,08[a]
Materia seca (%)	16,7±0,7[a]	13±2[b]	15±2[b]
Contenido de sólidos solubles (°Brix)	14±2[a]	11,8±0,5[b]	12,5±0,7[b]
pH	6,91±0,07[a]	6,7±0,2[a]	6,8±0,2[a]

La forma (largo/ancho) fue de entre 0,94 y 1,12 (esférica=1), valores aceptados en el mercado para los melones *sundew*. El color de la pulpa fue verde y la cáscara lisa, sin estrías, en tonos beige. El mayor peso de los frutos se correlacionó positivamente con el aumento de las longitudes evaluadas, largo (R^2=0,86, p<0,05) y ancho (R^2=0,83, p<0,05). El melón es una de las frutas con mayor contenido de azúcar que se consume, por lo que el contenido de sólidos solubles (SS) es a menudo el único parámetro de calidad confiable que se puede utilizar para determinar el momento óptimo de cosecha. Las muestras de Media Agua presentaron los valores más elevados (14±2) de SS, y el contenido de azúcares fue significativamente diferente al valor obtenido en los melones de 25 de Mayo (12,5±0,7) y 9 de Julio (11,8±0,5). Los valores encontrados fueron mayores al nivel de azúcar mínimo recomendado para esta fruta (8° Brix) (Villanueva et al. 2004), lo que indica que son apropiados para su comercialización en los mercados internacionales. El contenido medio de materia seca fue de 15±2%, en relación directa con el contenido de SS de los frutos.

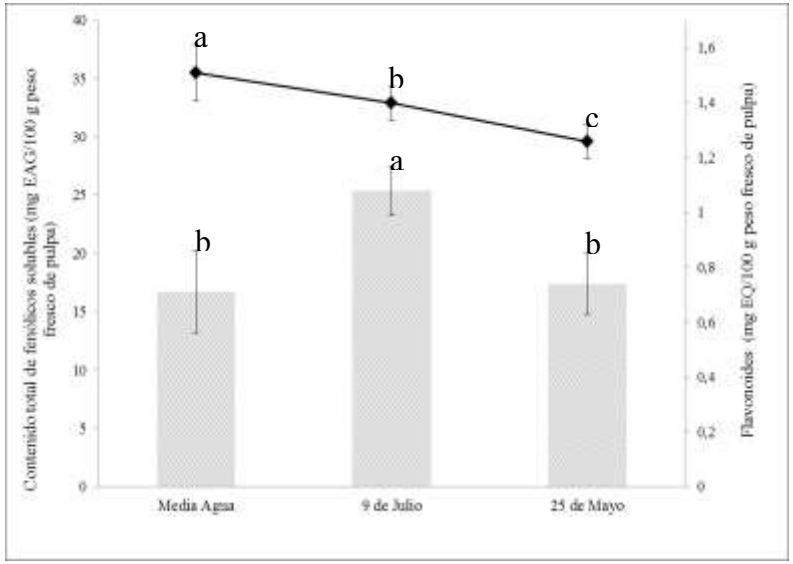


Figura 1. Contenido total de fenólicos solubles (TFS) y flavonoides (FL) en los melones de Media Agua, 9 de Julio y 25 de Mayo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre cultivares, Duncan (p <0,05).

Las variaciones observadas en lo que respecta al contenido de SS y los indicadores de calidad del fruto (color, tamaño y forma) pueden atribuirse a las variación de las condiciones ambientales, el riego antes de la cosecha (calidad y disponibilidad del agua) (del Amor et al. 1999, Pardossi et al. 2000).

El contenido total de fenólicos solubles (TFS) varió entre 28 y 37 mg EAG/100 g de pulpa fresca (pf) (Figura 1).

Se observaron diferencias significativas (p> 0,05) entre cultivares de diferentes localidades, presentando los melones de Media Agua el contenido más elevado (35±2 mg EAG/100 g pf) y las muestras de Me25Mayo el más bajo (30±2 mg GAE/ 100 g pf) (Figura 1).

En cuanto al contenido de flavonoides (F), las muestras de Me9Julio mostraron la mayor concentración (1,08±0,09 mg QE/100 g fw), el análisis estadístico de los datos mostro diferencias significativas respecto al contenido en MeMAgua y Me25Mayo (Tabla 2). Estos resultados son más bajos que los informados por Maietti et al. (2012) en *Cucumis melo* var Reticulatus cultivados en Italia, así como también en melones de la región Cumra en Turquía (Kolayli et al. 2010).

El contenido de polifenoles que aporta a la dieta este fruto es bajo, ~ 81 mg para un cuarto de melón (~ 250 g), en relación a lo recomendado en la ingesta diaria (500-1000 mg/dia), pero su consumo cotidiano, contribuye a mantener un estado saludable.

Por otra parte, se evaluó la actividad atrapadora del radical DPPH en los extractos metanólicos, los datos se presentan en el Figura 2

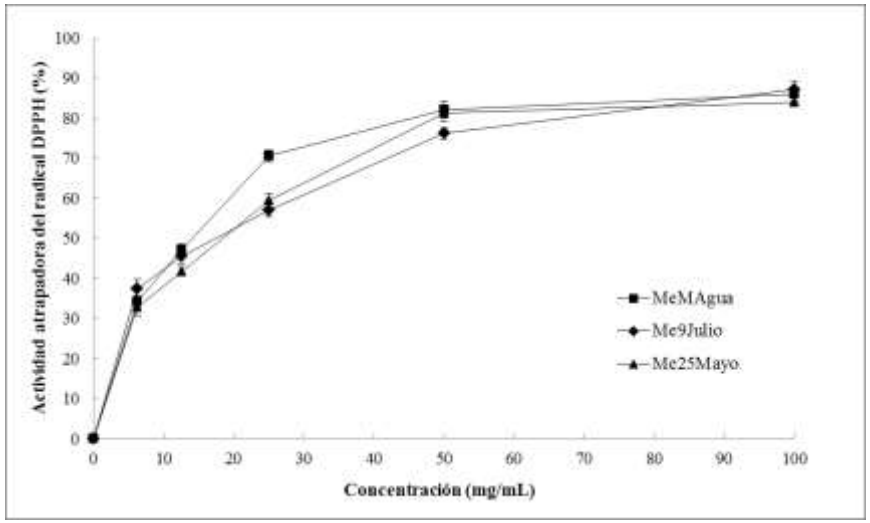


Figura 2. Actividad atrapadora del radical DPPH en extractos metanólicos de melones de Media Agua, 9 de Julio y 25 de Mayo.

La capacidad atrapadora de radicales libres mayor se presentó en las muestras de MeMAgua (EC50=14,0 mg/mL), y en menor medida las de Me9Julio (EC50=17,5 mg/mL) y Me25Mayo (EC50=18,3 mg/mL). Estos resultados se atribuyen al contenido de TFS presente en los melones. Varios estudios han revelado que el contenido fenólico en vegetales están asociados a su actividad antioxidante probablemente debido a sus propiedades redox, lo cual les permiten actuar como agentes reductores y donantes de hidrógeno (Chang et al. 2001). En este trabajo, se encontró una correlación de Pearson

significativa pero baja (R^2=0,43 p <0,01) entre el contenido de TFS y la actividad atrapadora de radicales libres (DPPH), lo que sugiere que la actividad antioxidante está relacionada con la cantidad de compuestos fenólicos y otros compuestos presentes en el MeOH-E.

Se analizó por FAAS e ICP-MS el contenido de 16 elementos minerales en las muestras de melones recolectadas. Los macroelementos que se determinaron fueron: K, Ca, Mg, Na y P, y como microelementos: B, Al, V, Mn, Fe, Cu y Zn. Los minerales Se, Cd, Pb y As también se determinaron. La cuantificación de minerales es importante para lograr el mantenimiento del cuerpo en perfecto estado de salud, debido a que son imprescindibles para la actividad de las células. El organismo no puede fabricarlos, por lo que debe utilizar las fuentes exteriores de los mismos, como son los alimentos.

En la Tabla 2, se presentan los valores obtenidos del contenido de minerales en la pulpa. El análisis elemental mostró que el K (entre 2249±208 y 3202±319 mg/100 g pf) es el nutriente mineral más abundante, seguido por el Na (entre 75±25 y 159±21mg/100 g pf), P (entre 78±12 y 123±13 mg/100 g pf), Mg (entre 65±5 y 89±7 mg/100 g pf) y Ca (entre 23±7 y 56±9 mg/100 g pf). El contenido medio de elementos minoritarios decrece de la siguiente manera Na > Cu > Zn > Mn (Tabla 2). El elemento V y Al estuvo por encima del LCM solo en las muestras de melones de Media Agua. El contenido de Fe y B se encontró por debajo del límite de cuantificación (Tabla 2) y no se detectó la presencia de As, Cd, Se, ni Pb (< LOD).

Se observó que las muestras de Media Agua presentaron una concentración de minerales mayor que las otras dos localidades de San Juan estudiadas, observándose diferencias significativas en lo que respecta al contenido de K, Mg, Na y P. Los melones de Media Agua presentaron la mitad del contenido de Ca que los de 25 de Mayo y 9 de Julio.

Tabla 2. Contenido de minerales en melones de Media Agua, 9 de Julio y 25 de Mayo (medias±SD, n=10). Todas las mediciones se reportan en peso fresco (pf). Letras diferentes indican diferencias significativas entre cultivares, Duncan (p <0,05).

Minerales	MeMAgua	Me9Julio	Me25Mayo
K (µg/g)	3202±319 [b]	2249±208 [a]	2470±347[a]
Mg (µg/g)	89±7 [b]	65±5 [a]	66±7 [a]
Ca (µg/g)	23±7 [a]	55±8 [b]	56±9 [b]
Na (µg/g)	159±21 [b]	75±25 [a]	76±15 [a]
Mn (µg/g)	0,28±0,07 [a]	0,28±0,04 [a]	0,30±0,07 [a]
Cu (µg/g)	0,4±0,1 [a]	0,6±0,2 [b]	0,4±0,1 [a]
Zn (µg/g)	1,7±0,3 [b]	1,0±0,2 [a]	1,2±0,4 [a]
P (µg/g)	123±13 [b]	78±12 [a]	85±15 [a]
Al (µg/g)	2,9±0,6	< LCM	< LCM
V (µg/g)	0,020±0,004	< LCM	< LCM

LDM (µg/g pf): As (0,18), Cd (0,009), Se (0,422), Pb (0,007). LCM (µg/g pf): B (4,9), Fe (1,62), V (0,016), Al (1,35). Letras diferentes indican diferencias significativas entre cultivares, Duncan (p <0,05).

La importancia del contenido de K en los alimentos se debe a que interviene en el mantenimiento de la presión osmótica, especialmente en el interior de las células, así como en la

transmisión nerviosa. Los melones analizados presentan valores importantes de este mineral y el consumo de 250 g de melón (aproximadamente un cuarto de melón), aportaría 650 mg de K, un 19% de lo requerido en la ingesta diaria (3510 mg/día). Adicionalmente, el contenido de K de la planta se ha relacionado con la calidad de la fruta, especialmente el contenido de SS (Lester 2005), ya que este elemento fue reconocido como un factor principal en la síntesis y acumulación de azúcares en el fruto. Según se observa en este trabajo los melones que poseen el mayor contenido de SS, los que provienen de la localidad de Media Agua, también son lo que tienen mayor contenido medio de este mineral en la pulpa.

Con respecto al Mg, es de los minerales que forman el hueso, es necesario para la actividad de muchas enzimas en especial aquellas que utilizan ATP, y es considerado como el cuarto mineral más abundante en el cuerpo y el segundo predominante a nivel intracelular (FAO, 2002), una porción de 250 g de melón aportaría 17,5 g, un 7 % de lo recomendado (250 mg/día). El calcio, es un mineral al que se asocia rápidamente con los huesos, ya que es el principal componente del sistema óseo. Sin embargo, este mineral participa también de forma importante en la transmisión nerviosa, además de formar parte de la estructura de varias enzimas. Interviene en la coagulación en general. Su carencia provoca descalcificación y raquitismo, por lo que es importante tomar a diario una dosis diaria de alimentos que lo contengan. Una porción de 250 g de melones aportaría un 2% del contenido necesario en la ingesta diaria (640 mg/día).

El consumo de melón como parte de una dieta equilibrada es importante ya que aporta metales esenciales, como Na, K, Ca, Cu, Zn y Mn.

Entre los metales pesados los más importantes en cuestión de salud son el Pb, el Cd y el Ni. Algunos elementos intermedios como el As y el Al, los cuales son muy relevantes desde el punto de vista toxicológico, se estudian habitualmente junto a los metales pesados. La fuente de los mismos son: el suelo contaminado en el que se producen los alimentos, los fertilizantes químicos y plaguicidas empleados en agricultura, el uso de materiales durante el almacenamiento y transporte. Por lo que se analizó la presencia de As, Al, Se, V, Cd y Pb para determinar si los melones muestreados absorbieron metales pesados (marcadores de contaminación) durante el crecimiento de la planta. Los valores medidos se encontraron por debajo de límite de detección o cuantificación de los mismos, con excepción del Al en las muestras de melones de Media Agua, sin embargo su contenido estuvo dentro de los límites sugeridos por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1997) (2,5 a 63 mg/día).

CONCLUSIÓN

Los melones de Media Agua se destacaron en relación a los cultivados en 9 de Julio y 25 de Mayo. En relación al análisis del nivel de azúcares, los sólidos totales y el contenido mineral, éstos dependen de la región de cultivo, influenciado probablemente por las prácticas agrícolas empleadas por los productores y el clima. Mientras que la relación del tamaño y la forma del fruto, así como el valor pH en la pulpa, no se vieron influenciada por la zona de cultivo. El análisis de los resultados obtenidos hasta el momento, indica que los melones seleccionados para este estudio, presentan parámetros de calidad muy satisfactorios para su comercialización, con un contenido mineral y de compuestos polifenólicos que podría contribuir a revalorizar este producto, y considerar que su consumo podría otorgar efectos beneficiosos para mantener un estado saludable.

BIBLIOGRAFÍA

Abdalbasit M, Bertrand M. 2008. Fatty acids, tocopherols, sterols, phenolic profiles and oxidative stability of Cucumis melo var. agrestis oil. Journal of Food Lipids, 15: 56–67.

AOCS. (2009). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society (5th ed.). Champaign: AOCS Press.

Baroni MV, Nores ML, Díaz MDP, Chiabrando GA, Fassano JP, Costa C, Wunderlin DA. 2006. Determination of volatile organic compound patterns characteristic of five unifloral honey by Solid-Phase Microextraction-Gas Chromatography-Mass Spectrometry coupled to chemometrics. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54: 7235-7241.

Baroni MV, Arrúa RC, Nores ML, Díaz MP, Chiabrando GA, Wunderlin DA. 2009. Composition of honey from Córdoba (Argentina): evaluation of north–south provenance by chemometrics. Food Chemistry, 114: 727–733.

Baroni MV, Podio NS, Badini RG, Inga CM, Ostera HA, Cagnoni M, Gallegos E, Gautier E, Peral-García P, Hoogewerff J, Wunderlin DA. 2011. How much do soil and irrigation water contribute to the composition of meat? A case study: meat from three areas of Argentina. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59: 11117–11128.

Beaulieu JC. 2005. Within-Season Volatile and Quality Differences in Stored Fresh-Cut Cantaloupe Cultivars. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 8679-8687.

Beaulieu JC, Lea JM. 2006. Characterization and Semiquantitative Analysis of Volatiles in Seedless Watermelon

Varieties Using Solid-Phase Microextraction. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54: 7789-7793.

Boeing H, Bechthold A, Bub A, Ellinger S, Haller D, Kroke A, et al. 2012. Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. European Journal of Nutrition, 51: 637–63.

Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analysis, 10: 178–182.

del Amor FM, Martinez V, Cerda A. 1999. Salinity duration and concentration affect fruit yield and quality, and growth and mineral composition of melon plants grown in perlite. Horticulture Science, 34: 1234-1237.

Di Paola-Naranjo RD, Baroni MV, Podio NS, Rubinstein HR, Fabani MP, Badini RG, Inga M, Ostera HA, Cagnoni M, Gallego E, Peral-García P, Hoogewerff J, Wunderlin DA. 2011. Fingerprints for main varieties of Argentinean wines: terroir differentiation by inorganic, organic and stable isotopic analyses coupled to Chemometrics. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59: 7854–7865.

Duke JA, Ayensu ES. 1985. Medicinal Plants of China. ISBN 0-9177256-20-4.

Fabani MP, Arrúa RC, Vázquez F, Díaz MP, Baroni MV, Wunderlin DA. 2010. Evaluation of elemental profile coupled to chemometrics to assess the geographical origin of Argentinean wines. Food Chemistry, 119: 372-379.

Fabani MP, Luna L, Baroni MV, Monferran MV, Ighani M, Tapia A, Wunderlin DA, Feresin GE. 2013. Pistachio (Pistacia vera var Kerman) from Argentinean cultivars. A natural product with potential to improve human health. Journal of Functional Foods, 5: 1347–1356

Fabani MP, Toro ME, Vázquez F, Díaz MP, Wunderlin DA. 2009. Differential absortion of metals from soil to diverse vine varieties from the Valley of Tulum (Argentina). Consequences to Evaluate Wine Provenance. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57: 7409-7416.

FAO/WHO Organización Mundial de la salud para la agricultura y la alimentación de las Naciones Unidas, Capítulo 2: requerimientos de vitaminas y minerales en humanos Roma, 2002.

Heldrich K. 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists; Association of Official Chemists, Arlington, VA.

Ismail HI, Chan KW, Mariod AA, Ismail M. 2010. Phenolic content and antioxidant activity of cantaloupe (*Cucumis melo*) methanolic extracts. Food Chemistry, 119: 643–647.

John JA, Shahidi F. 2010. Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). Journal of Functional Foods, 2: 196-209.

Kolayli S, Kara M, Tezcan F, Bedia-Erim F, Sahin H, Esra-Ulusoy E, Aliyazicioglu R. 2010. Comparative study of chemical and biochemical properties of different melon cultivars: standard, hybrid, and grafted melons. Journal of Agricutural and Food Chemistry, 58: 9764–9769.

Leenders M, Sluijs I, Ros MM, Boshuizen HC, Siersema PD, Ferrari P, et al. 2013. Fruit and vegetable consumption and mortality: European prospective investigation into cancer and nutrition. American Journal of Epidemiology,178: 590–602.

Lester GE. 2008. Antioxidant, Sugar, Mineral, and Phytonutrient Concentrations across Edible Fruit Tissues of Orange-Fleshed Honeydew Melon (*Cucumis melo* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56: 3694–3698.

Maietti A, Tedeschi P, Stagno C, Bordiga M, Travaglia F, Locatelli M, Arlorio M, Brandolini V. 2012. Analytical traceability of melon (*Cucumis melo* Var Reticulatus): proximate composition, bioactive compounds, and antioxidant capacity in relation to cultivar, plant physiology state, and seasonal variability. Journal of Food Science, 77: 646-652.

Mariod AA, Matthaus B. 2008. Investigations on fatty acids, tocopherols, sterols, phenolic profiles and oxidative stability of Cucumis melo var. agrestis oil. Journal of Food Lipids, 15: 42–55.

OMS (Organización Mundial de la Salud). 1997. Environmental Health Criteria 194 http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc194.htm

Pardossi A, Giacomet P, Malorgio F, Albini FM, Murelli C, Serra G, Vernieri P, Tognoni F. 2000. The influence of growing season on fruit yield and quality of greenhouse melon (*Cucumis melo* L.) grown in nutrient film technique in a Mediterranean climate. Journal of Horticulture Science Biotechnology, 75:488-493.

Sharma, R. 2014. Chapter 59 - Polyphenols in Health and Disease: Practice and Mechanisms of Benefits. Polyphenols in Human Health and Disease, Volume 1, 757-778.

Tapia A, Rodriguez J, Theoduloz C, Lopez S, Feresin G, Schmeda-Hirschmann G. 2004. Free radical scavengers and antioxidants from Baccharis grisebachii. Journal of Ethnopharmacology, 95:155-161.

Villanueva MJ, Tenorio MD, Esteban MA, Mendoza MC. 2004. Compositional changes during ripening of two cultivars of muskmelon fruits. Food Chemistry, 87: 179–185.

Vouldoukis I, Lacan D, Kamate C, Coste P, Calenda A, Mazier D et al. 2004. Antioxidant and anti-inflammatory properties of a Cucumis melo LC. extract rich in superoxide dismutase activity. Journal of Ethnopharmacology, 94: 67–75.

Yanty NAM, Lai OM, Osman A, Long K, Ghazali HM. 2008. Physicochemical properties of Cucumis melo var. inodorus (honeydew melon) seed and seed oil. Journal of Food Lipids, 15: 42–55.

Sitios consultados

http://produccion.sanjuan.gov.ar

http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl

http://www.inv.gov.ar

http://www.senasa.gov.ar

http://www.tiempodesanjuan.com/notas/2013/1/19/confirmado-melon-sanjuanino-dulce-pais-25204.asp

Agradecimientos

CICITCA-UNSJ y CONICET. FMP, BMV, FGE, y WDA son investigadores de CONICET, Argentina.

POTENCIALIDAD DEL CASEINOMACROPÉPTIDO COMO LIGANTE DE CALCIO

Farías, M.E.[1,2], Pighin A.[3], Pilosof, A.M.R.[2]

[1] Departamento de Tecnología, Universidad Nacional de Luján, Rutas 5 y 7, Luján, Buenos Aires, Argentina.
[2] Departamento de Industrias, FCEN, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, CABA, Argentina.
[3] Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Luján, Rutas 5 y 7, Luján, Buenos Aires, Argentina.
efarias@mail.unlu.edu.ar

Resumen: Se evaluó la potencialidad del caseinomacropéptido (CMP) como ligante de calcio ($CaCl_2$) por diferentes métodos: cambio de pH, conductividad, diálisis y medición del tamaño de las partículas por dispersión dinámica de luz láser. El calcio fue cuantificado por espectrometría de absorción atómica. El pH de las soluciones de CMP disminuyó con la adición de $CaCl_2$. En presencia de $CaCl_2$, se obtuvieron tamaños de partículas mayores que en las soluciones de CMP solo, sugiriendo que el calcio promueve el autoensamblaje del CMP en condiciones neutras. El máximo estado de asociación del CMP (hexámero) se obtuvo para una única relación Ca^{2+}/CMP. Relaciones Ca^{2+}/CMP similares fueron halladas en los ensayos de diálisis y conductividad. Los resultados mostraron que un mol de CMP une entre 7,5 y 9 moles de Ca^{2+}. Por lo tanto, se concluye que el CMP puede ligar calcio en condiciones neutras y temperatura ambiente, sin embargo, resta analizar la forma de unión del calcio al péptido, las condiciones de liberación de dicho metal y el efecto de la fuerza iónica en futuros estudios.

Palabras clave: caseinomacropéptido, péptido ligante de calcio, autoensamblaje

Abstract: The calcium ($CaCl_2$) binding potentiality of caseinmacropeptide (CMP) was tested by different methods: pH change, conductivity, dialysis and the measuring of the particle size by dynamic light scattering. The calcium was quantifying by atomic absorption spectrometry. The pH of CMP solutions decreased with $CaCl_2$ added. By analyzing the particle size was observed that, in presence of $CaCl_2$, bigger sizes were obtained than in single CMP solutions, suggesting that the interaction of calcium in CMP promotes its self assembly in neutral conditions. The maximum association state of CMP (hexamer) was obtained for a unique relationship Ca^{2+}/CMP. Similar relationships Ca^{2+}/CMP were found by dialysis and conductivity tests. Results showed that one CMP mole binds of 7.5 to 9 moles of Ca^{2+} in neutral conditions and room temperature. Therefore, it is concluded that CMP may bind calcium under neutral conditions, but remains to analyze the form of calcium binding to the peptide, the conditions for release of that metal and the effect of ionic strength on future studies.

Keywords: caseinmacropeptide, calcium binding peptide, self-assembly

INTRODUCCIÓN

El calcio es el quinto elemento más abundante en la corteza terrestre y por ese motivo debería estar fácilmente disponible en los alimentos. El calcio, que se ingiere con los alimentos, debe ser disuelto en el medio ácido del estómago o mantenerse en solución (si ya está disuelto) durante el tránsito intestinal de pH neutro o ligeramente alcalino (Gueguen y Pointillart, 2000). El 90% de la absorción del calcio tiene lugar en el intestino delgado (Wasserman, 2004) a través de su forma ionizada (Ca^{2+}) o unido a una molécula orgánica soluble (Gueguen y Pointillart, 2000). La absorción del calcio en el estómago representa una fracción muy menor y el calcio restante (menos del 10%) se absorbe en el colon (Vavrusova y Skibsted, 2014). El requerimiento de calcio está afectado por diversos factores como edad, sexo, embarazo, lactancia o enfermedades como la insuficiencia renal, por ejemplo. En este marco, se ha estudiado mucho la fortificación de los alimentos con calcio a través de sales solubles en agua como el cloruro de calcio, carbonato de calcio, citrato de calcio, lactato de calcio y acetato de calcio (Soto et al., 2014). Todas estas sales presentan menor solubilidad a pH neutro o básico (Eckert et al., 2014). Varios autores han estudiado la utilización de péptidos de cadena corta como ligantes de calcio como medio de suplementación de este mineral (Charoenphun et al., 2013; Eckert et al., 2014; Ferraretto et al., 2001; Phelan et al., 2009). Es sabido que los aminoácidos Asp (constante de equilibrio aparente, Kass,: 7 L mol^{-1}) y Glu (Kass 3 L mol^{-1}) son los ligantes de calcio más fuertes entre los aminoácidos, pero bastante más débiles que, por ejemplo, el ión lactato (Kass: 12 L mol^{-1}). Sin embargo, se evidencia un efecto sinérgico en péptidos como GluAsp (Kass: 23 L mol^{-1}) (Vavrusova y Skibsted, 2014) y para caseinofosfopéptidos de cadena corta con una Kass de 38 L mol^{-1} (Zong et al., 2012).

El caseinomacropéptido (CMP) es un péptido bioactivo de 64 aminoácidos obtenido de la ruptura enzimática específica de la □-caseína por la pepsina o quimosina durante la elaboración del queso. El CMP es altamente hidrofílico por su elevada carga negativa a pH superior a 4,5 (Farías et al., 2010). La motivación para usar al CMP como péptido quelante de calcio está basada en cinco consideraciones principales: su alto contenido de ácido siálico que es conocido por su capacidad de quelar calcio (Jaques et al., 1977), su cadena peptídica rica en Glu y Asp con una composición aminoacídica única (Thöma-Worringer et al., 2006), su elevada carga negativa que le confiere muy alta solubilidad a pH superior a 4,5, sus importantes propiedades biológicas (Brody, 2000) y su abundancia por ser un subproducto de la quesería.

Estudiar nuevas aplicaciones del CMP es una manera de revalorizar al suero de quesería. En Argentina se producen anualmente 4.610 millones de litros anuales de suero donde sólo el 45% es procesado, el resto se destina a la producción animal o tristemente al medio ambiente (González, 2013)

No existe en la literatura información sobre mezclas de CMP con sales de calcio, por lo cual teniendo en cuenta sus propiedades funcionales y sus características bioactivas resulta de interés su estudio para el desarrollo de nuevos ingredientes utilizándolo para fortificar alimentos y/o como forma de mantener al calcio soluble, por ejemplo, en bebidas.

En este trabajo se propone evaluar la potencialidad del CMP como ligante de calcio ($CaCl_2$) por diferentes métodos: cambio

de pH, conductividad, diálisis y medición del tamaño de las partículas por dispersión dinámica de luz láser (DLS).

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las muestras

Se utilizó caseinomacropéptido, BioPURE-GMP® de Davisco Foods International (USA). Su pureza, según el proveedor, fue (en base seca): 90,0 ± 3,0% (p/p) de CMP (N x 7,07). Los minerales fueron determinados mediante espectrometría de absorción atómica previa calcinación en mufla a 500 °C con un espectrómetro Analyst 200 Perkin Elmer (USA). La composición de minerales fue la siguiente (100 g de muestra): 950 mg de Na; 125 mg de K y 540 mg de Ca. El contenido de ácido siálico fue 7% (p/p) (Fernando y Woonton, 2010).
La muestra en polvo de CMP se disolvió en agua Milli-Q (2,26 ± 0,07 □S/cm) a diferentes concentraciones (5 a 50 g/L) y se mezcló con una solución de $CaCl_2$ anhidro (Mallinckrodt, USA) (0,4 M) hasta alcanzar concentraciones finales de Ca^{2+} entre 0 - 0,200 M. El pH fue ajustado a 7,0 con NaOH de 0,1 N para evitar dilución. Todos los ensayos se realizaron a temperatura ambiente.

Determinación del pH y conductividad de las soluciones CMP/$CaCl_2$

El pH de las soluciones de CMP se determinó con un pHmetro (Hanna Instruments, Italia) luego de la incorporación de $CaCl_2$ en solución acuosa (0 a 0,060 M) según la técnica descripta por Pitkowski et al., (2009) con modificaciones. El electrodo fue calibrado usando soluciones buffer de pH 7,0 y 4,0.
La conductividad iónica se determinó con un conductivímetro (Oakton CON 2700, Oakton Instruments, USA). Las mediciones se realizaron variando la concentración de CMP para una concentración fija de $CaCl_2$ (0; 0,008; 0,012; 0,016 y 0,020 M) a pH 7,0. Los ensayos se realizaron por cuadriplicado y fueron repetidos a las 24 y 48 horas. Las determinaciones se realizaron a temperatura ambiente.

Determinación de la fracción no dializable de calcio

Una solución de 10 g/L de CMP y 0,018 M $CaCl_2$ preparada en agua Milli-Q fue ajustada a pH 7,0. Se transfirieron 5 ml de la solución en una bolsa de diálisis (membranas de diálisis Celulosa Ester de Biotech, MWCO: 100 – 500 Da, Espectrum Laboratories, Inc., USA) y se dializaron a 20 °C en 500 ml de agua Milli-Q para remover el Ca^{2+} libre durante 24 horas. El agua de la diálisis fue renovada a las 12 hs. El calcio libre se determinó en el agua total (dializado). Para evitar contaminaciones, el material fue lavado con una solución 0,01 M EDTA-Na_2, 2% (p/p) $HNaCO_3$, 0,1% (p/p) SDS y luego enjuagado 5 veces en agua Milli-Q (Roig et al., 1999). Como control se utilizó una solución 10 g/L de CMP.
La concentración de calcio se determinó por espectrometría de absorción atómica con un espectrómetro Analyst 200 Perkin Elmer (USA). Previamente se agregó nitrato de lantano (1,5% p/v) a estándares, muestras y blancos para evitar la interferencia de fosfatos. La capacidad quelante fue calculada como el porcentaje del calcio no dializado con respecto a la concentración de calcio de la solución inicial.
Capacidad quelante %= (mg de Ca^{2+} inicial - mg de Ca^{2+} en el dializado) / mg de Ca^{2+} inicial

Los ensayos se realizaron por cuadriplicado a temperatura ambiente.

Determinación de tamaño de partícula

Las muestras a pH 7,0 fueron filtradas a través de filtros Millipore (0,45; 0,20 y 0,02 µm) y se vertieron en cubetas de poliestireno descartable. El tamaño de partícula del CMP fue determinado por dispersión de luz láser (DLS, siglas en inglés) a temperatura ambiente con un equipo Zetasizer Nano-Zs, Malvern Instruments (Malvern, UK) provisto de un láser He-Ne (633 nm) y un correlador digital (modelo ZEN3600) a un ángulo de dispersión fijo de 173º. La técnica de DLS consiste en iluminar la cubeta por un rayo láser y registrar la intensidad de la luz dispersada por las partículas de la muestra. El diámetro de la partícula se relaciona con su difusividad mediante la ecuación de Stokes-Einstein

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (1)$$

donde, *d(H)*: diámetro hidrodinámico (nm); *D*: coeficiente de difusión translacional ($m^2.s^{-1}$); k: constante de Boltzmann (1,28 x 10^{-23} $N.m.K^{-1}$); T: temperatura absoluta (K); *Π* viscosidad del solvente ($N.s.m^{-2}$).

Para analizar los resultados se utilizaron dos aproximaciones:

(i) El algoritmo CONTIN, para clasificar los datos de intensidad de las partículas/agregados en percentiles. El resultado obtenido se conoce como distribución de intensidad por tamaño de partículas. A través de la teoría de Mie, es posible convertir la distribución por intensidad en distribución por volumen y número de partículas.

(ii) El método de cumulante, para calcular el diámetro promedio de la distribución de intensidad o Z-average y además conocer el índice de polidispersidad que es un indicador del grado de agregación.

El valor del Z-average es adecuado para obtener un valor medio con un propósito de comparación pero no lo es para dar una completa descripción de los resultados para sistemas polidispersos.

Los valores que se informan fueron el promedio de tres repeticiones por duplicado.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa SPSS 15.0 (Statistical Package for the Social Sciences) para Windows. Se realizó la prueba de Tukey para determinar diferencias significativas a $P < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del $CaCl_2$ en el pH de las soluciones de CMP

Las soluciones de CMP a concentraciones entre 5 y 15 g/L presentaron un pH entre 6,7 y 6,9 en agua Milli-Q. Cuando se adiciona $CaCl_2$ en solución, el pH decreció hasta 6,1-6,3 (Figura 1). La disminución del pH con el agregado de $CaCl_2$ también fue observado en soluciones de caseinato de sodio (Pitkowski et al., 2009). La disminución del pH estaría relacionada con la liberación de protones resultado de la unión del calcio a las moléculas de CMP. La concentración de $CaCl_2$ con la cual se alcanzó un pH mínimo fue diferente para cada concentración de CMP siendo éstas 0,04, 0,08 y 0,08 M

para las concentraciones de 5, 10 y 15 g/L de CMP respectivamente.

.

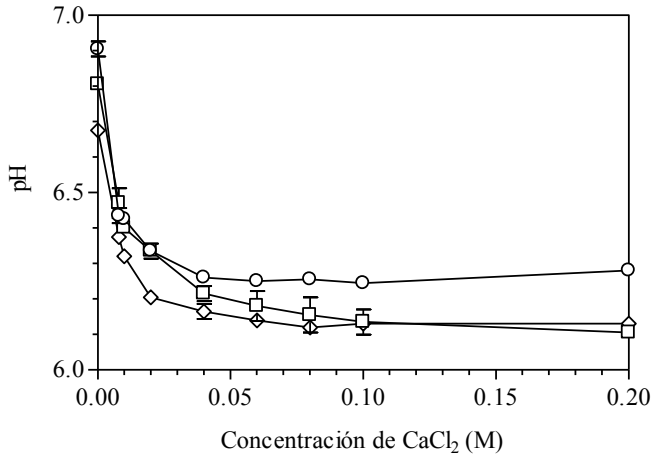


Figura 1: Evolución del pH en función de la concentración de $CaCl_2$ para soluciones de CMPa 5 (○), 10 (□) y 15 (◊) g/L. Las barras representan el desvío estándar.

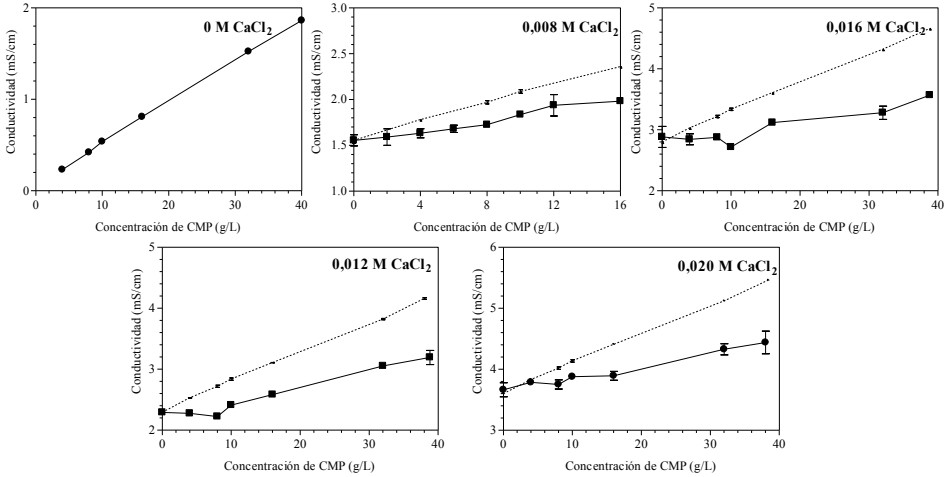


Figura 2: Evolución de la conductividad en función de la concentración de CMP. La concentración de $CaCl_2$ fue 0; 0,008; 0,012; 0,016 y 0,020 M. El pH fue ajustado a 7,0. Las líneas de puntos representan la conductividad predicha en función de la concentración de CMP y las barras al desvío estándar.

Efecto de la relación Ca^{2+}/CMP en la conductividad

La Figura 2 muestra el efecto de la incorporación de CMP en la conductividad de las soluciones para una dada concentración de $CaCl_2$ a temperatura ambiente. Las soluciones de CMP presentaron muy baja conductividad (menor a 2 mS/cm) que se incrementó linealmente con la concentración. Interesantemente, la incorporación de CMP a las soluciones de $CaCl_2$ disminuyó la conductividad con respecto a la predicha (conductividad de la solución de $CaCl_2$ más la conductividad

de la solución de CMP), sin embargo no sucedió lo mismo con el pH que disminuyó inmediatamente ante la presencia de CMP desde 6,7-6,8 a aproximadamente 6,4 y se mantuvo constante. El ajuste del pH a 7,0, no alteró la conductividad (datos no mostrados).

Las soluciones de $CaCl_2$/CMP presentaron un comportamiento similar: inicialmente la conductividad se mantuvo constante ante la incorporación de CMP para luego incrementarse proporcionalmente con la concentración. La conductividad de todas las soluciones no varió hasta las 48 horas (datos no mostrados). Las concentraciones de CMP en las que se produjo un cambio de pendiente en la curva fueron 6, 10, 8 y 16 g/L de CMP para las concentraciones 0,008; 0,012; 0,016 y 0,020 M de $CaCl_2$, encontrando una relación de 1,4 ± 0,2 milimoles de Ca^{2+} por g de CMP. A pesar que la conductividad es un parámetro muy general pues depende de todas las especies iónicas en solución, resultó útil para estimar la proporción de calcio ligado al péptido.

Fracción no dializable de calcio

La fracción dializable de un mineral es una metodología muy simple indicativa de la capacidad ligante de calcio de una proteína o péptido (de la Hoz *et al.*, 2014). Los iones calcio difunden a través de una membrana semipermeable de diálisis debido a la diferencia de potencial químico entre la solución interior y el agua exterior. La fracción de calcio que no atravesó la membrana de diálisis fue 65,3 ± 4,4% y representó a la fracción de calcio ligada por el CMP a pH neutro y temperatura ambiente. Por consiguiente se estimó que 1,2 □ 0,1 milimoles de Ca^{2+} se encuentra unido a un gramo de CMP.

Estado de asociación del CMP en presencia de $CaCl_2$

La Figura 3A muestra las distribuciones de tamaños de partícula por intensidad a temperatura ambiente de soluciones de CMP a diferentes concentraciones (10 y 50 g/L) a pH 7,0. Las distribuciones fueron bimodal para 10 g/L y trimodal para 50 g/L. Sin embargo, la concentración de CMP influyó muy levemente en la posición del primer pico, que se encontró entre 1 y 5 nm, con un valor máximo a 2,3 nm. De los gráficos de distribución por volumen (Figura 3 D) se deduce que solamente el primer pico de intensidad fue predominante, mostrando que los otros picos de intensidad de mayores *d(H)* fueron despreciables cuantitativamente. El software del Zetasizer Nano-Zs permite estimar *el d(H)* que tendría una proteína globular de masa molecular conocida. La estimación del *d(H)* para la forma monomérica del CMP (aproximadamente 7,5 kDa) arrojó un valor de 2,6 nm. Esta estimación debe ser tratada con precaución porque el CMP no es una proteína globular (Smith *et al.*, 2002). Dado que el pico predominante de la distribución de tamaños de partículas por intensidad para el CMP se encontró en 2,3-2,5 nm se infiere que a pH 7,0 el CMP se encuentra predominantemente en la forma monomérica, sin embargo, el ancho de este primer pico (1 a 5 nm) sugiere la presencia de otras estructuras asociadas como dímeros, trímeros y tetrámeros (Farías *et al.*, 2010). Es importante señalar que la posición del pico predominante no fue afectada por la concentración de CMP (Farias, 2012). En la Figura 3 D se observa un ligero desplazamiento del pico de la distribución por volumen hacia tamaños superiores con la concentración de CMP, sugiriendo la presencia de una mayor proporción de formas asociadas. La tendencia a la asociación con la concentración también fue observada para la

proteína□□□lactoglobulina con la misma técnica (Martinez, 2010).

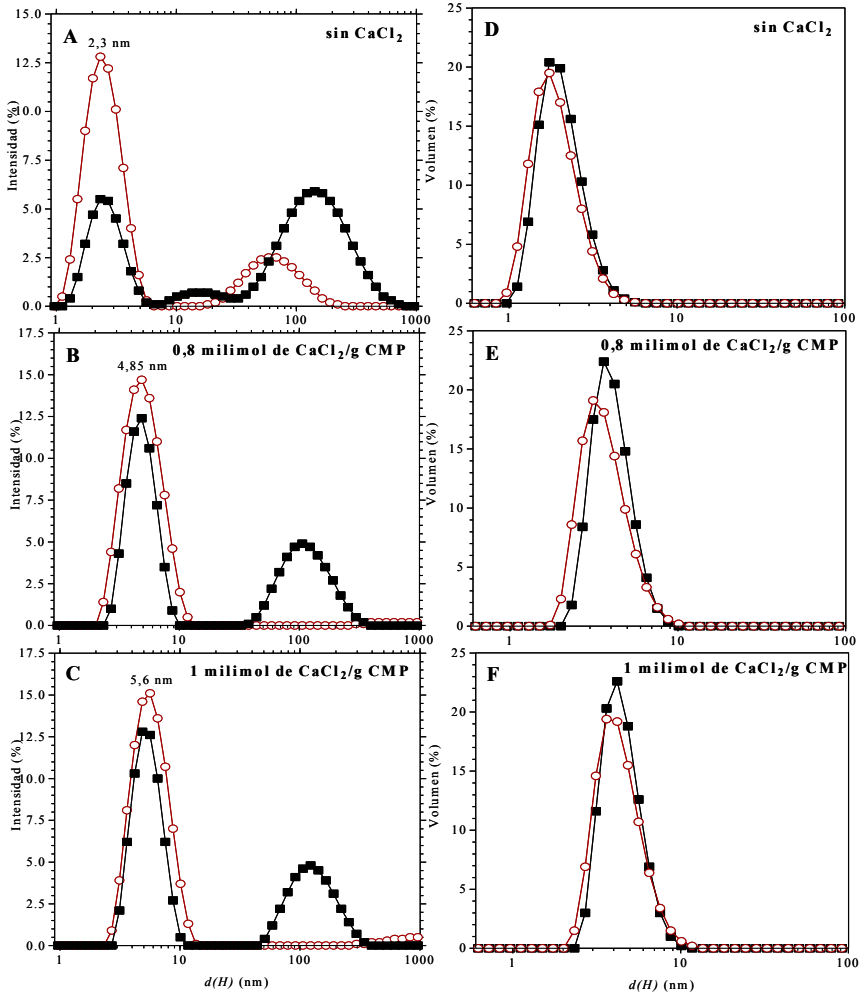


Figura 3. Distribuciones de tamaños de partículas a pH 7,0 para soluciones de CMP a 10 (○) y 50 g/L (■) en presencia de $CaCl_2$ por intensidad (A, B y C) y volumen (D, E y F) a 25 °C.

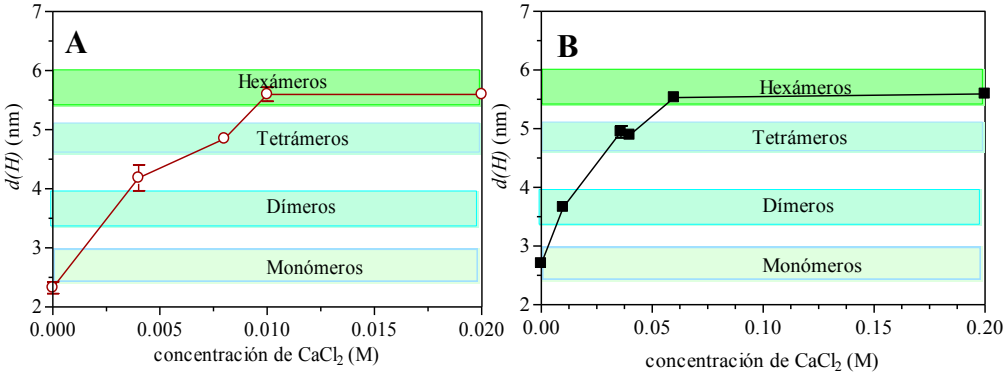


Figura 4: Valor máximo de *d(H)* del primer pico de la distribución de intensidades de soluciones de CMP en función de concentraciones crecientes de $CaCl_2$ a pH 7,0. Concentración de CMP: A) 10 y B) 50 g/L.
Se indica el estado de asociación predominante estimado mediante el software del equipo Zetasizer Nano-Zs. Temperatura 25 °C. Las barras representan el desvío estándar.

La Figura 4 muestra el valor máximo del pico predominante del CMP ante la incorporación de $CaCl_2$ que se desplazó hacia *d(H)* mayores hasta alcanzar un valor máximo (5,6 nm) para las dos concentraciones de CMP estudiadas. Es decir, el péptido en presencia de $CaCl_2$ se autoensambló desde la forma monomérica hasta dímeros, tetrámeros y hexámeros dependiendo de la concentración de $CaCl_2$ presente en el medio, debido al apantallamiento de las cargas negativas que el CMP posee a pH neutro. La mínima concentración de $CaCl_2$

para alcanzar la forma hexamérica dependió de la concentración de CMP siendo 0,010 y 0,060 M para 10 y 50 g/L de CMP respectivamente. Estos resultados mostraron que existe una proporción óptima Ca^{2+}/CMP para que el CMP alcance su máximo estado de asociación siendo esta 1,1 ± 0,1 milimol de Ca^{2+}/g de CMP que coincidió con las relaciones obtenidas en los ensayos de diálisis y conductividad.

Las Figuras 3 B y C muestran las distribuciones de tamaños de partículas por intensidad para las dos concentraciones de CMP a la misma proporción Ca^{2+}/CMP. Puede observarse que coincidieron los valores máximos del pico predominante. Estos resultados confirmaron que el estado de asociación del CMP dependió únicamente de la relación Ca^{2+}/CMP y no de la concentración del péptido.

CONCLUSIONES

Los resultados permitieron confirmar la potencialidad del CMP como ligante de calcio a temperatura ambiente y pH neutro. Si consideramos que la masa molecular del CMP es aproximadamente 7,5 kDa, un mol de CMP podría unir entre 7,5 y 9 moles de Ca^{2+} en estas condiciones. Estos resultados son alentadores, por ejemplo, el péptido Ser(P)Ser(P)Ser(P)GluGlu puede unir hasta 12 moles de Ca^{2+}, según Zong et al. (2012). Por lo tanto, se concluye que CMP es capaz de ligar calcio apreciablemente, sin embargo resta analizar la forma de unión del calcio al péptido, las condiciones de liberación de dicho metal y el efecto de la fuerza iónica en futuros estudios.

BIBLIOGRAFÍA

Brody, E. P. (2000). Biological activities of bovine glycomacropeptide. British Journal of Nutrition 84, 39-46.

Charoenphun, N., Cheirsilp, B., Sirinupong, N. y Youravong, W. (2013). Calcium-binding peptides derived from tilapia (Oreochromis niloticus) protein hydrolysate. Eur Food Res Technol 236, 57-63.

De La Hoz, L., Nunes Da Silva, V. S., Morgano, M. A. y Pacheco, M. T. B. (2014). Small peptides from enzymatic whey hydrolyzates increase dialyzable iron. International Dairy Journal 38, 145-147.

Eckert, E., Bamdad, F. y Chen, L. (2014). Metal solubility enhancing peptides derived from barley protein. Food Chemistry 159, 498-506.

Farias, M. E. (2012). Autoensamblaje del caseinomacropéptido (CMP) y su impacto en la gelificación y espumado. Tesis de doctorado, Departamento de Industrias. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.

Farías, M. E., Martinez, M. J. y Pilosof, A. M. R. (2010). Casein glycomacropeptide pH-dependent self-assembly and cold gelation. International Dairy Journal. 20, 79–88.

Fernando, S. F. y Woonton, B. W. (2010). Quantitation of N-acetylneuraminic (sialic) acid in bovine glycomacropeptide (GMP). Journal of Food Composition and Analysis 23, 359-366.

Ferraretto, A., Signorile, A., Gravaghi, C., Fiorilli, A. y Tettamanti, G. (2001). Casein Phosphopeptides Influence Calcium Uptake by Cultured Human Intestinal HT-29 Tumor Cells. The journal of Nutrition 131 (6), 1655-1661.

González, M., 2013. " www.inti.gob.ar/lacteos/pdf/2suero_argentina.pdf."

Gueguen, L. y Pointillart, A. (2000). The bioavailability of dietary calcium. Journal of the American College of Nutrition 19, 119S-136S.

Jaques, L. W., Brown, E. B., Barrett, J. M., Brey, W. S. y Weltner, W. (1977). Sialic Acid: A calcium-binding carbohydrate. The Journal of Biological Chemistry 252, Nº 13, 4533-4538.

Martinez, M. J. (2010). Impacto de la interacción entre β-lactoglobulina, caseinoglicomacropéptdo y polisacáridos en coloides alimentarios. Tesis de Doctorado, Departamento de Industrias. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.

Phelan, M., Aherne, A., Fitzgerald, R. J. y O'brien, N. M. (2009). Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. International Dairy Journal 19, 643–654.

Pitkowski, A., Nicolai, T. y Durand, D. (2009). Stability of caseinate solutions in the presence of calcium. Food Hydrocolloids 23, 1164-1168.

Roig, M. J., Alegría, A., Barberá, R., Farré, R. y Lagarda, M. J. (1999). Calcium bioavailability in human milk, cow milk and infant formulas-comparison between dialysis and solubility methods. Food Chemistry 65, 353-357.

Smith, M. H., Edwards, P. J. B., Palmano, K. P. y Creamer, L. K. (2002). Structural features of bovine caseinomacropeptide A and B by ^{1}H nuclear magnetic resonance spectroscopy. Journal of Dairy Research 69 85-94.

Soto, A. M., Morales, P., Haza, A. I., García, M. L. y Selgas, M. D. (2014). Bioavailability of calcium from enriched meat products using Caco-2 cells. Food Research International 55, 263-270.

Thöma-Worringer, C., Sørensen, J. y López-Fandiño, R. (2006). Health effects and technological features of caseinomacropeptide. International Dairy Journal 16, 1324–1333.

Vavrusova, M. y Skibsted, L. H. (2014). Calcium nutrition. Bioavailability and fortification. LWT - Food Science and Technology http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.034.

Wasserman, R. H. (2004). Vitamin D and the Dual Processes of Intestinal Calcium Absorption. The journal of Nutrition 134, 3137-3139.

Zong, H., Peng, L., Zhang, S., Lin, Y. y Feng, F. (2012). Effects of molecular structure on the calcium-binding properties of phosphopeptides. European Food Research and Technology 235, 811-816.

Agradecimientos

Los autores agradecen a María Julia Martínez, Sofía Torregiani, Ezequiel Alfano, Gustavo Gómez, a los Departamentos de Tecnología y Ciencias Básicas de la Universidad Nacional de Luján, a la Universidad de Buenos Aires, al CONICET y a la ANPYCT de la República Argentina.

BIO-ACCESIBILIDAD DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS OBTENIDOS CON DISTINTOS SISTEMAS ENZIMÁTICOS A PARTIR DEL ALGA *PORPHYRA COLUMBINA*

Garzón, AntonelaG.[1]; Cian, Raúl E.[1,2]; Drago, Silvina R.[1,2]

[1]Instituto de Tecnología de Alimentos – Universidad Nacional del Litoral, Argentina
[2]CONICET, Argentina

Resumen
Se hidrolizó un extracto proteico (EP) de *Porphyra columbina* con distintos sistemas enzimáticos (Alcalasa y Alcalasa+Flavourzyme), obteniendo los hidrolizados: A y AF, respectivamente. Se estudiaron las propiedades antioxidantes (TEAC, BEAC, CQ, CAAL y PR)y antihipertensivas (inhibición de ECA I)de EP, A y AF y se evaluó la bio-accesibilidad de los compuestos bioactivos presentes en A y AF llevando a cabo una digestión gastrointestinal *in vitro* acoplada a un sistema de diálisis. A los dializados obtenidos se les determinaron las propiedades bio-funcionalesmencionadas anteriormente. La proteólisis mejoró el potencial antioxidante y antihipertensivo de EP, debido a la generación de péptidos bioactivos y a la liberación de compuestos fenólicos. A su vez, la digestión gastrointestinal *in vitro*incrementó las propiedades antioxidantes de los hidrolizados, aumentando dicha capacidad de 2 a 4veces,según el ensayo utilizado. Los compuestos capaces de inhibir a ECA I conservaron sus propiedades inhibitorias luego deladigestión gastrointestinal *in vitro*, indicando que las especies generadas a partir de A y AF serían bio-accesibles. En conclusión,*P. columbina* resultó ser una buena fuente natural de compuestos bioactivos potencialmente bio-accesibles.

Palabras clave: Algas rojas – Bio-accesibilidad – Péptidos bioactivos.

Abstract
A protein extract (EP) derived from *Porphyracolumbina* was hydrolyzed using two enzymatic system (Alcalasa and Alcalasa+Flavourzyme), obtaining the respective hydrolyzates (A and AF). Antioxidants (TEAC, BEAC, CQ, CAAL and PR) and antihypertensive (ACE I inhibition) properties from EP, A and AF were studied.Bio-accesibility of bioactive components from A and AF was evaluated by *in vitro* digestion coupled to dialysis system. Bio-functional properties of dialysates were measured as described above. Hydrolysis process improved the antioxidant and antihypertensive EP potential, due both, to the generation of bioactive peptides and the release of phenolic compounds. Also, *in vitro* digestion increased antioxidant properties from A and AF. ACE I inhibition property was kept after dialysis process, indicating that the species generated from A and AF are bio-accessible. In conclusion, *P. columbina*is a good natural source of bioactive compounds that are potentially bio-accessible.

Keywords: Red seaweed – Bio-accesibility – Bioactive peptides.

INTRODUCCIÓN

Los océanos cubren más del 70% de la superficie de la Tierra y son el hábitat natural de una gran diversidad de plantas, animales y microorganismos (Gressler*et al.* 2010). Las algas marinas representan una parte considerable de esta biomasa y su uso como alimento data del año 2700 a.C. en China (Perez*et al.* 2010). El uso más importante de las algas en occidente es la obtención de hidrocoloides y su empleo como agentes espesantes y gelificantes en la industria alimentaria (Souza *et al.* 2012). Otra aplicación muy importante es la obtención de compuestos bioactivos a partir de esta fuente vegetal y su introducción en el mercado ya sea a través de la industria farmacéutica y/o cosmética (Rao*et al.* 2007).Del proceso de extracción de los ficocoloides (gomas) se obtienen como subproductos fracciones proteicas que podrían ser utilizadas para generar péptidos bioactivos mediante hidrólisis enzimática (Cian *et al.* 2012). Esto permitiría aumentar la rentabilidad del proceso, a la vez que podría resultar en una nueva alternativa para obtener compuestos bioactivos.

Los péptidos bioactivosson secuencias de aminoácidos inactivos en el interior de la proteína precursora ("encriptados"), que ejercen determinadas funciones biológicas tras su liberación mediante proteólisis (Qian*et al.* 2008,Fitzgerald*et al.* 2011). Generalmente, son péptidos de pequeño tamaño (3 a 20 aminoácidos), que son liberados durante la digestión gastrointestinal o procesamiento de los alimentos (Tierney*et al.* 2010, Harnedy y FitzGerald, 2011).A partir de las proteínas de las algas rojas se han obtenido hidrolizados enzimáticos con diferentes propiedades bioactivas, y en algunos casos, se han logrado aislar e identificar los péptidos responsables de dicha bioactividad (Harnedy y Fitzgerald, 2011).

Los péptidos con actividad antioxidante y antihipertensiva *in vitro*deben ser capaces de atravesar las barreras gástricas del organismo para poder ejercer sus funciones a nivel *in vivo*. En este sentido, se ha visto que en muchos casos hay una falta de correlación entre las determinaciones *in vitro*e *in vivo*de las bioactividades peptídicas, debido a la inactivación de los péptidos por acción de las proteasas y peptidasas gastrointestinales (Wilson *et al.* 2011). Una alternativa para poder evaluar la bio-accesibilidad de los péptidos es emplear un sistema de digestión gastrointestinal*in vitro*acoplado a un sistema de diálisis, utilizando para ello membranas de cut-off 6 a 8 kDa (Cian *et al.* 2014).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la bio-accesibilidad de compuestos bioactivos (antioxidantes y antihipertensivos) obtenidos con distintos sistemas enzimáticos a partir de un extracto proteico (EP) del alga roja *P. columbina*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El alga *P. columbina* fue recolectada en el período primaveral del año 2012 en la localidad de Punta Maqueda, provincia de Santa Cruz. En el laboratorio, se eliminaron los cuerpos extraños que acompañaban al alga mediante un lavado con agua destilada. Luego las muestras fueron secadas a 100°C y molidas. El producto obtenido se pasó a través de un tamiz cuyo diámetro de poro fue 0,85 mm. El tamizado de *P. columbina* fue dispersado en agua a 50 g kg^{-1} y pH 7,0. La

dispersión obtenida se agitó durante 2 h a 25°C y luego se filtró con un filtro cuyo diámetro de poro fue 0,297 mm. El filtrado se centrifugó a 3000xg durante 30 min a 4°C y el sobrenadante resultante se concentró en rotavaporBuchi RII. El concentrado obtenido se denominó extracto proteico (EP) y fue utilizado como sustrato para las hidrólisis enzimáticas.

A partir de EP se prepararon dos hidrolizados: 1) **A**:hidrólisis con alcalasa2 h y 2) **AF**: hidrólisis con alcalasa 2 h +Flavourzyme 4 h. Los hidrolizados fueron obtenidos empleando un reactor termostatizado de tipo batch de 800 ml de capacidad. La temperatura de hidrólisis en ambos sistemas fue 55°C. Se trabajó a una concentración de sustrato de 1,4% (P/P), y a una relación E/S de 0.4% para alcalasa y 5% para Flavourzyme.Los hidrolizados fueron centrifugados a 2000xg durante 15 min a 25°C. Una alícuota de EPfue centrifugada conjuntamente con los hidrolizados. El sobrenadante obtenido constituyó el material soluble de partida sin hidrolizar que fue considerado como un blanco (**B**) del proceso de hidrólisis.

Para el seguimiento de la reacción de hidrólisis se determinó el grado de hidrólisis (GH) a través de la medición de aminos libres utilizando la técnica del o-ftaldialdehído (OPA), según Nielsen*et al.* (2001).

Las muestras fueron evaluadas en cuanto a: sus perfiles electroforéticos (PAGE - SDS) (Laemmli, 1970), contenido de compuestos fenólicos extractables en agua (CFE) (Schanderl, 1970) y contenido de aminos libres(Nielsen*et al.*, 2001).

Las propiedades antioxidantes de B, A y AF se evaluaron mediante los siguientes métodos: 1) capacidad antioxidante Trolox equivalente (TEAC) frente al radical ABTS propuesto por Cian *et al.*(2012); los valores de TEAC fueron expresados como mmol de Trolox g^{-1} de proteínas, 2) capacidad antioxidante butilhidroxitolueno (BHT) equivalente (BEAC) frente al radical DPPH (Brand-Williams *et al.*,1995); los valores de BEAC fueron expresados como mg BHT g^{-1} proteína, 3) capacidad quelante ligada al cobre frente a la oxidación del β-caroteno (CQ)(Megias*et al.,* 2008);la CQ se calculó a los 180 min de reacción, en función de los controles positivo y negativo. El resultado se expresó en mg EDTA equivalente g^{-1} proteína. 4) Capacidad antioxidante por el método del ácido linoleico (CAAL), utilizando el ensayo de blanqueamiento del β-caroteno propuesto por Pedroche *et al.* (2008); las muestras fueron evaluadas a una concentración proteica de 2 g L^{-1} y la CAAL expresada como porcentaje de degradación del β-caroteno a los 60 min de reacción y 5) poder reductor (PR) de acuerdo a Oyaizu (1986), expresando como µg de ácido ascórbico equivalente g^{-1} proteína.

Las propiedades antihipertensivas de B, A y AFfueron evaluadas mediante el ensayo de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA I) de acuerdo aHayakari*et al.* (1978).

La dializabilidad de los compuestos bioactivos presentes en A y AF fue evaluada simulando una digestión gastrointestinal con pepsina y pancreatina (Drago *et al.* 2005; Cian *et al.* 2013). A los dializados obtenidos (**A_D** y **AF_D**) se les determinó el contenido de CFE y aminos libres con las mismas metodologías indicadas anteriormente.Además, se determinó la tasa de dializabilidad de compuestos fenólicos (D%), la cual se calculó como la cantidad dializada respecto al contenido total en el hidrolizado.

Para evaluar la bio-accesibilidad de compuestos activos de A_D y AF_D se llevaron a cabo las técnicas de propiedades antioxidantes y antihipertensivas descriptas anteriormente. Para los ensayos de TEAC, BEAC, CQ y PR los resultados se expresaron en función del peso total del dializado. Para la

inhibición de ECA I y CAAL se utilizó una concentración proteica de 2 g L^{-1} y los resultados se expresaron como porcentajes de inhibición.

Todas las muestras se evaluaron por triplicado. Se realizó el test de ANOVA para determinar diferencias significativas entre muestras (*P<0,05*) y test de LSD (*Least Significant Difference, del inglés*) para comparación de a pares al 95% de confianza, utilizando el Software Statgraphics Centurion XV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Figura 1** se muestran las curvas de hidrólisis obtenidas con Alcalasa (A) y Alcalasa + Flavourzyme (AF) a partir del extracto proteico (EP).

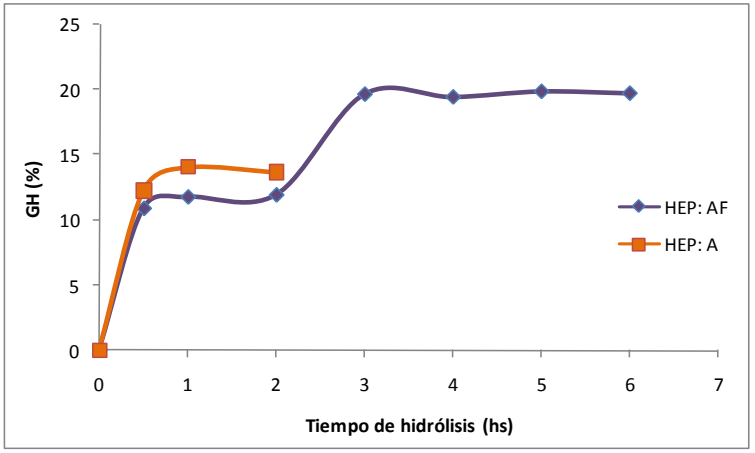


Figura 1.Seguimiento de la reacción de hidrólisisenzimática, (GH: grado de hidrólisis) del extracto proteico con Alcalasa(A) y Alcalasa+ Flavourzyme (AF).

Para el sistema **AF** al cabo de las dos horas de reacción se ve un aumento adicional en el GH, el cual está asociado con la adición de la enzima Flavourzyme. Esta enzima posee principalmente acción exopeptidasa, lo que facilita una proteólisis más completa del sustrato (In *et al.* 2002, Chang *et al.* 2007).

En la **Figura 2** se muestra el perfil electroforético en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS) de B, A y AF.Como se puede ver, en los hidrolizados se produjo una degradación efectiva de las proteínas presentes en B. Esto se manifiesta en el perfil electroforético de A y AF (líneas 3 y 4), como una ausencia de las bandas proteicas características de *P. columbina* (20 y 30 kDa, para R-ficoeritrina y C-ficocianina respectivamente). Para el caso de A, es posible distinguir componentes de degradación ("*sombreado*"), los cuales no están presentes en el perfil de AF. Este resultado concuerda con lo observado anteriormente para el GH e indica una mayor acción proteolítica del sistema AF (componentes << a 14,4 kDa).

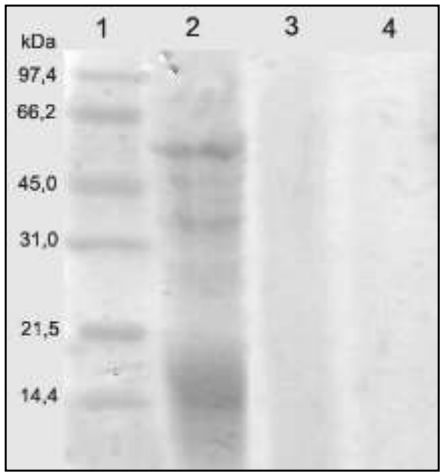


Figura 2. Electroforesis PAGE-SDS. Patrón de pesos moleculares (1); blanco B (2); hidrolizado A (3); hidrolizado AF (4).

En la **Tabla 1**se muestra el contenido de CFE y aminos libres para las muestras B, A y AF.Se puede observar que el contenido de compuestos fenólicos extractables en agua aumentó en el caso de los hidrolizados. Esto indicaría que las enzimas liberarían los compuestos fenólicos ligados a proteínas (Wang *et al.* 2010).
Como se indicó anteriormente, la hidrólisis enzimática promueve la generación de especies de bajo peso molecular (**Figura 1 y Figura 2**), siendo más completa la proteólisis en el caso de la hidrólisis secuencial (AF), lo que se evidencia en el mayor contenido de aminos libres en dicha muestra (**Tabla 1**).

Tabla 1.Contenido de compuestos fenólicos extractables en agua (CFE) y aminos libres.

Muestra	CFE (mg ácido gálico. g sólidos^{-1})	Aminos libres (mEq L-Serina. g sólidos^{-1})
B	14,3 ± 0,0^{a}	1,33 ± 0,02^{a}
A	20,0 ± 1,5^{b}	1,28 ± 0,09^{a}
AF	19,0 ± 0,1^{b}	2,09 ± 0,02^{b}

X ± DE.Valores con distintas letras indican diferencias significativas entre las muestras de cada columna (p<0,05).

En la **Tabla 2** se muestran los resultados obtenidos utilizando los diferentes ensayosde determinación de laactividad antioxidante. B posee propiedades antioxidantes atribuibles principalmente a ficobiliproteínas, aminoácidos libres y compuestos fenólicos presentes en esta fracción. No obstante, para todos los métodos antioxidantes evaluados, sus hidrolizados mostraron un aumento significativo de esta bioactividad, que podría estar asociado a la liberación de péptidos antioxidantes durante el proceso de hidrólisis.
La proteólisis también favoreció la liberación de compuestos fenólicos asociados a las proteínas (Wang *et al.* 2010). En este sentido, ambos hidrolizados (A y AF) presentaron mayor contenido de compuestos fenólicos extractables en agua que B (**Tabla 1**), por lo tanto, el aumento de la capacidad antioxidante observada en A y AF también se debería a estas especies moleculares.
Resulta oportuno destacar que para BEAC, el hidrolizado AF presentó la mayor AAO, mientras que para los métodos de

CAAL y PR, el hidrolizado A fue el que presentó la mayor actividad. Las propiedades de los péptidos están relacionadas con su tamaño molecular, composición y secuencia aminoacídica (Qian*et al.* 2008). En relación a la BEAC, numerosos trabajos han atribuido mayor capacidad antioxidante a especies de bajo peso molecular (Qian*et al.* 2008, Sheih*et al.* 2009). Si se tiene en cuenta que ambos hidrolizados poseen igual contenido de compuestos fenólicos por gramo de sólidos y que AF tiene mayor proporción de aminos libres (**Tabla 1**) se podría suponer que la mayor capacidad antioxidante observada para AF se debe principalmente a especies de bajo tamaño molecular y aminoácidos libres.

Tabla 2. Actividad antioxidante medida a través de: capacidad antioxidante Trolox equivalente (TEAC), capacidad antioxidante BHT equivalente (BEAC), capacidad quelante ligada al cobre frente a la oxidación del β-caroteno (CQ), capacidad antioxidante por el método del ácido linoleico (CAAL) ypoder reductor (PR)

Muestra	TEAC (mmolTrolox g^{-1}proteína)	BEAC (mg BHT g^{-1}proteína)	CQ (mg EDTA g^{-1} proteína)	CAAL (%)	PR (ug AA g^{-1} proteína)
B	1,0 ± 0,1[a]	21,6 ± 1,5[a]	19,54 ± 0,95[a]	29,5 ± 1,9[a]	0,67 ± 0,00[a]
A	4,3 ± 0,1[b]	68,5 ± 3,7[b]	63,24 ± 0,60[b]	65,7 ± 1,7[c]	3,13 ± 0,00[c]
AF	4,1 ± 0,1[b]	113,3 ± 5,8[c]	58,80 ± 3,25[b]	59,9 ± 3,6[b]	1,35 ± 0,11[b]

X ± DE.Valores con distintas letras indican diferencias significativas entre las muestras de cada columna (p<0,05).

En cuanto a la CAAL, se podría suponer que la elevada proporción de especies de bajo peso molecular y aminoácidos libres presentes en AF podría tener un efecto antagónico en dicha actividad. Este hecho también fue observado por Pedroche *et al.* (2007), quienes evaluaron la CAAL de distintas fracciones peptídicas obtenidas a partir de un hidrolizado de *Brassicacarinata*. A su vez, como se mencionó anteriormente, el hidrolizado A presentó mayor PR que el AF. La enzima Alcalasa favorecería la generación de péptidos de tamaño intermedio (Segura Campos *et al.* 2013), los cuales exhibirían mayor PR debido a una mayor probabilidad de tener más números de grupos reductores por molécula. El agregado de Flavourzyme modificaría la secuencia peptídica, impactando negativamente en el PR de las especies generadas.

Los resultados obtenidos del porcentaje de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA I) obtenidos para B, A y AF se muestran en la **Tabla 3**. Como se puede observar, ambos hidrolizados fueron capaces de inhibir a la ECA I. Este resultado concuerda con lo observado por numerosos investigadores al evaluar las propiedades antihipertensivas de forma *in vitro* (inhibición de ECA I), de distintos hidrolizados proteicos (Cian *et al.* 2012, Drago *et al.* 2013, Segura Campos *et al.* 2013).El efecto inhibitorio de A y AF fue significativamente superior al de B. Este incremento podría estar asociado a los péptidos bioactivos generados durante la hidrólisis y a los CFE liberados por la misma.

Tabla 3. Porcentajes de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA I), obtenidas para B, A y AF (10 g L^{-1} proteínas)

Muestra	Inhibición de ECA I (%)
B	12,4 ± 0,5[a]
A	44,8 ± 2,4[c]
AF	35,2 ± 4,3[b]

X ± DE.Valores con distintas letras indican diferencias significativas entre las muestras(p<0,05).

El porcentaje de inhibición de ECA I, obtenido para A, fue significativamente superior al de AF **(Tabla 3)**.El aumento en la inhibición de ECA I podría deberse a la naturaleza peptídica generada por esta enzima. Este resultado coincide con lo reportado por Sheih*et al.* (2009), quienes obtuvieron distintos hidrolizados con pepsina, papaína, Flavourzyme® y Alcalasa®, empleando como sustrato el alga verde *Chlorellavulgaris.* En dicho trabajo se pudo observar que la acción inhibitoria de los péptidos obtenidos con Alcalasa® era superior a la obtenida con Flavourzyme®.

En cuanto a la bio-accesibilidad de compuestos activos de A y AF, en la **Tabla 4** se muestra el contenido de aminos libres y la dializabilidad de CFE de A_D y AF_D.

Tabla 4.Contenido de aminos libres ydializabilidad de compuestos fenólicos extractables (CFE) de A_D y AF_D.

Muestra	Aminos libres (μEq g^{-1}de hidrolizado)	Dializabilidad de CFE (%)
A_D	20,9 ± 1,7[a]	58,8 ± 4,2[a]
AF_D	42,7 ± 4,6[b]	57,0 ± 1,5[a]

X ± DE.Valores con distintas letras indican diferencias significativas entre las muestras(p<0,05).

El contenido de aminos libres de AF_D fue significativamente superior a la de A_D (≈ 50%). Esto estaría indicando, que las especies generadas tras la digestión de AF con pepsina y pancreatina tendrían menor tamaño molecular que las producidas a partir de A, dializando en mayor proporción a través de la membrana de 6 a 8 kDa. Además, se debe tener en cuenta que AF posee mayor contenido de aminos libres **(Tabla 1)**, lo que incrementaría aún más el contenido de estas especies en AF_D.

Con respecto a los CFE, se puede apreciar igual dializabilidad (D%) en ambos dializados. Este resultado indicaría que los CFE liberados tras la digestión con pepsina y pancreatina a partir de A y AF, poseen tamaño inferior a 6 a 8 kDa.

La bio-accesibilidad de péptidos y compuestos activos luego de la digestión gastrointestinal es un factor importante a tener en cuenta si se pretende extrapolar los efectos observados de forma *in vitro* con potenciales efectos *in vivo*. Los resultados obtenidos se muestran en las **Figuras 3 y 4.**

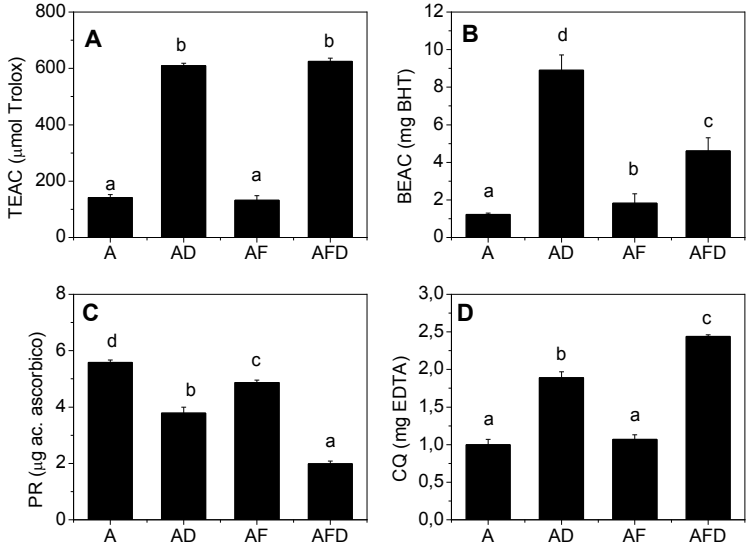


Figura 3. Propiedades antioxidantes de A, AF, A_D y AF_D. A) Capacidad antioxidante equivalente al Trolox, B) capacidad antioxidante equivalente al BHT, C) poder reductor, D) capacidad quelante. Barras con distintas letras indican diferencias significativas entre las muestras ($p<0,05$).

A excepción del PR, el proceso de digestión *in vitro* incrementó las propiedades antioxidantes de los hidrolizados (**Figura 3**) Este aumento puede atribuirse a la proteólisis con pepsina y pancreatina, la cual constituye una nueva hidrólisis enzimática sobre los hidrolizados. Al respecto, muchos péptidos presentes tanto en A como en AF, podrían sufrir una nueva proteólisis, dando como resultado la generación de nuevas especies proteicas de menor tamaño molecular y con mayor actividad antioxidante (Orsini Delgado *et al.* 2011).

Un aspecto muy importante a tener en cuenta es el cut-off empleado para este ensayo (6 a 8 kDa). En este sentido, los dializados no sólo poseen péptidos con mayor TEAC, BEAC y CQ que los presentes en los hidrolizados A y AF, sino que también serían potencialmente bio-accesibles.

Como se mencionó anteriormente, el PR exhibido por ambos hidrolizados estaría asociado a péptidos con peso molecular intermedio. En base a esto, se podría pensar que la reducción de dicha actividad en A_D y AF_D, se debería a una menor dializabilidad de estas fracciones peptídicas a través de la membrana de 6 a 8 kDa. Además, muchas de estas especies proteicas podrían sufrir una proteólisis adicional debido a la digestión *in vitro*, lo que impactaría en la secuencia peptídica, afectando la capacidad reductora de los mismos.

En la **Figura 4** se muestran los valores de CAAL (%) e inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA I) de A_D y AF_D.

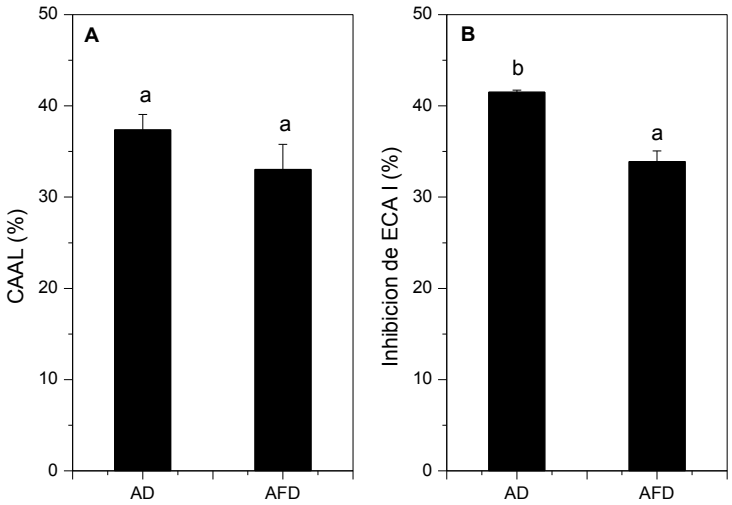


Figura 4.A) Capacidad antioxidante medida por el método del ácido linoleico(CAAL: %), y B) inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA I: %) de A_D y AF_D (13 g L^{-1} de proteínas). Barras con distintas letras indican diferencias significativas entre las muestras ($p<0,05$).

Ambos dializados exhibieron CAAL (%), luego de la digestión gastrointestinal *in vitro* (**Figura 4.A**). Este resultado concuerda con lo observado anteriormente para las demás propiedades antioxidantes.

Al igual que lo que ocurre con la actividad antioxidante, los dializados conservaron las propiedades antihipertensivas (**Figura 4.B**). Al respecto, el mayor efecto inhibitorio se obtuvo con A_D. Este resultado podría estar relacionado con la presencia de ciertos aminoácidos en la secuencia peptídica de las especies generada tras la acción de Alcalasa. Muchos péptidos que poseen residuos de Pro en el extremo C-terminal, generalmente resisten la degradación proteolítica de las enzimas digestivas. Así, la actividad antihipertensiva del péptido perdura luego de la barrera digestiva, pudiendo ejercer su acción a nivel sistémico (Wilson *et al.* 2011). En base a esto, se podría suponer que los péptidos generados a partir de A poseen mayor proporción de Pro que los obtenidos con AF, siendo más resistentes a la digestión gastrointestinal *in vitro*. En relación con esto, el efecto inhibitorio a la misma concentración proteica (13 g L^{-1} de proteínas), de AF_D sobre ECA I se redujo un 31% respecto a AF, mientras que para $A_D$fue del 10% (resultados no mostrados).

CONCLUSIONES

Los hidrolizados presentaron mayor potencia antioxidante, para todos los ensayos evaluados y mayorefecto inhibitorio de ECA I que el extracto de partida, debido a los péptidos bioactivos generados y a los compuestos fenólicos liberados.
El proceso de digestión *in vitro* incrementó las propiedades antioxidantes de los hidrolizados. Este aumento se atribuyó a la proteólisis con pepsina y pancreatina, la cual constituyó una nueva hidrólisis enzimática sobre los hidrolizados.Los dializados no sólo presentaron péptidos con mayor TEAC, BEAC y CQ que los presentes hidrolizados, sino que también fueron potencialmente bio-accesibles. Además, los dializados conservaron las propiedades antihipertensivas, obteniéndose el mayor efecto inhibitorio con A_D. Esto indicó que los péptidos presentes en A fueron más resistentes a la degradación con pepsina y pancreatina, probablemente debido a su secuencia peptídica; y que las especies generadas a partir de A y AF serían potencialmente bio-accesibles.
P. columbina resultó ser una buena fuente natural de compuestos bioactivos potencialmente *bio-accesibles* (antioxidantes y antihipertensivos), que aportan valor agregado al proceso tradicional de obtención de ficocoloides.

BIBLIOGRAFÍA

Brand-Williams W, Cuvelie, ME,Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Food Sci Technol. 28: 25-30.
Chang C, Wu K,Chiang S. 2007. Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobinhydrolysates.Food Chem. 100: 1537-1543.
Cian RE, Caballero M, Sabbag N, González R,Drago S. 2013. Bio-accessibility of bioactive compounds (ACE inhibitors and antioxidants) from extruded maize products added with a red seaweed *Porphyracolumbina*. LWT - Food Sci. Technol. 55: 51-58.
Cian RE, Salgado PR, Drago SR, González RJ,Mauri AN. 2014. Development of naturally activated edible films with antioxidant properties prepared from red seaweed *Porphyracolumbina* biopolymers. Food Chem. 146: 6-14.
Cian RE, Martínez-Augustin O, Drago SR. 2012. Bioactive properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis from protein byproducts of *Porphyracolumbina*. Food Res Int. 49:365-372.
Drago S, Binaghi M, Valencia M. 2005.Effect of gastric digestion pH on iron, zinc and calcium availability from preterm and term starting infant formulas.FoodSci. 70: 107-112.
Drago S,Luggren P, Vioque J,Bentancur Ancona D, Chel Guerrero L, González R. 2013. Propiedades bioactivas de hidrolizados de gluten de trigo. Ed OmniaScience Barcelona, España. pp. 83-109.

Fitzgerald C, Gallagher E,Tasdemir D, Hayes M. 2011.Hearth health peptides from macroalgae and their potential use in functional foods.J AgriculFoodChem. 59: 6829-6836.

Gressler V, Yokoya N, Fujii M, Colepicolo P, Mancini Filho J, Torres R, Pinto E. 2010. Lipid, fatty acid, protein, amino acid and ash contents in four Brazilian red algae species. Food Chem. 120: 585–590.

Harnedy PA, FitzGerald RJ. 2011. Bioactive proteins, peptides, and amino acids from macroalgae. J. Phycol. 47: 218-232.

Hayakari M, Kondo Y, Izumi H. 1978. A rapid and simple spectrophotometric assay of angiotensin-converting enzyme.Anal Biochem. 84: 361-369.

Laemmli U. 1970.Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.Nature. 227-680.

Megias C, Pedroche J,Yust MM, Girón-Calle J, Alaiz M, Millán F,VioqueJ. 2008. Production of copper-chelating peptides after hydrolysis of sunflower proteins with pepsin and pancreatin. LWT- Food Sci Technol. 41: 1973-1977.

Nielsen PM,Petersen D, Dambann C. 2001. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis.Food ChemToxicol. 66(5):642-646.

Noda H. 1993. Health benefits and nutritional properties of nori.J App Phycol. 5: 255-258.

Orsini M, Tironi V,Añón M. 2011. Antioxidant activity of amaranth protein or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. Food Sci. Technol. 44: 1752-1760.

Oyaizu M. 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. Jap J Nutr 44: 307-315.

Pedroche J,Yust MM,Lqari H,Megias C,Girón-Calle J,Alaiz M,Vioque J, Millán F. 2007. Obtaining of *Brassica carinata* protein hydrolysates enriched in bioactive peptides using immobilized digestive proteases. Food Res Int. 40: 931-938.

Perez A, Perez L,Strobl A,Camarda S, Farias S, López C, Fajardo M. 2010. Variación estacional de arsénico total en algas comestibles recolectadas en el Golfo de San Jorge (Chubut, Argentina). Rev. Latinoam. Biotecnol.Amb. Algal 16-30.

Qian ZJ, Jung WK, Kim SK. 2008. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide. Bioresource Technol. 99(6):1690-1698.

Rao P,Mantri V,Ganesan K. 2007. Mineral composition of edible seaweed *Porphyravietnamensis*. Food Chem. 102: 215–218.

Schanderl S. 1970. Tannins and related phenolics. In: Joslyn MA (ed) Methods in food: analysis physical, chemical and instrumental methods of analysis New York: Academic. p. 701-725.

Segura Campos M, Peralta González F,Chel Guerrero L, Betancur Ancona D. 2013. Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides of Chia (*Salvia hispanica*) Produced by Enzymatic Hydrolysis. Int. J Food Sci. http://dx.doi.org/10.1155/2013/15848.

Sheih IC, Fang TJ, Wu TK. 2009. Isolation and characterization of a novel angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the algae protein waste. FoodChem. 115: 279-284.

Souza B, Cerqueira M, Bourbon A, Pinheiro A, Martins J,Texeira J, Coimbra M, Vicente A. 2012. Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilariabiridiae*. Food Hydroc, 27: 287–292.

Tierney MS, Croft AK, Hayes M. 2010.A review of antihypertensive and antioxidant activities in macroalgae.Botánica Marina. 53: 387-408.

Wang T,Jónsdóttir R,Kristinsson HG, Hreggvidsson GO,Jónsson JO,Thorkelsson G,Ólafsdóttir G. 2010. Enzyme-enhanced

extraction of antioxidant ingredients from red algae *Palmariapalmata*. Food sci Technol. 43: 1387-1393.
Wijesekara I, Kim SK. 2010. Angiotensin-I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitors from marine resources: prospects in the pharmaceutical industry. Marine Drugs.8: 1080-1093.
Wilson J, Hayes M, Carney B. 2011. Angiotensin I- converting enzyme and prolylendopeptidade inhibitory peptides from natural sources with a focus on marine processing by-products. Food Chem. 29: 235-244.

EXTRACTOS DE RESIDUOS OLIVÍCOLAS: CONTENIDO FENÓLICO Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Gómez P.E[1], Segovia A.F[1], Lorenzo M.E[1], Bravo M.O[1], Ribotta P.D[2], Cañas M.S[3]

[1] Facultad de Ciencias Agrarias, UNCa, Maestro Quiroga 50, Catamarca, Argentina. analiticafcaunca@gmail.com
[2] ISIDSA, Secretaría de Ciencia y Tecnología, UNC, Juan Filloy s/n, Ciudad Universitaria, Córdoba, Argentina. pribotta@agro.unc.edu.ar
[3] Facultad de Tecnología y Ciencias Aplicadas, UNCa, Ministro Dulce 70, Catamarca, Argentina. marthacanas@tecno.unca.edu.ar

Palabras Clave: Olivo, residuos, extractos fenólicos, actividad antioxidante.

Resumen: En el presente trabajo se evaluó el contenido fenólico y la actividad antioxidante de extractos metanólicos y etanólicos de residuos derivados del olivo (*Olea europea* L.). Se estudiaron pulpa y carozo, obtenidos del orujo extraído durante el proceso de industrialización de aceituna para aceite en las campañas 2012 y 2013. Se cuantificaron polifenoles totales (PFT) y ortodifenoles (ODF). La actividad antioxidante se evaluó por FRAP y DPPH. Los datos se analizaron mediante ANAVA (p=0,05) considerando como factores campaña, material y solvente. Las medias de PFT variaron entre 13572,38 ppm en EPE 2013 (extracto etanólico de pulpa 2013) y 1580,87 ppm en ECM 2013 (extracto metanólico de carozo 2013) y las de ODF entre 7730,39 ppm y 1047,90 ppm para EPE 2012 y ECM 2013 respectivamente. La concentración en PFT, ODF y la relación ODF/PFT de los extractos etanólicos resultó significativamente mayor que la de los metanólicos, tanto en pulpa como en carozo. El rendimiento de PFT y ODF en pulpa resultó significativamente superior al de carozo en ambas campañas y solventes. Frente al DPPH y al FRAP los extractos de pulpa resultaron significativamente más activos que los de carozo, sin significancia en la diferencia por solvente para un mismo residuo.

Abstract: In this study the phenolic content and the antioxidant activity of methanolic and ethanolic extracts, taken from olive waste (Olea europea L.) were evaluated. Pulp and pits, obtained from pomace extracted during the olive oil industrialization process were studied (2012 and 2013 campaigns). Total polyphenols (PFT) and orthodiphenols (ODF) were quantified. The antioxidant activity was evaluated by FRAP and DPPH. Data were analyzed by ANOVA (p = 0.05) considering as factors material, solvent and campaign. PFT media values ranged from 13572.38 ppm in EPE 2013 (ethanol pulp extract 2013) and 1580.87 ppm in ECM 2013 (methanol pit extract 2013). ODF media values range between 7730.39 ppm and 1047.90 ppm in EPE 2012 and ECM 2013 respectively. PFT and ODF concentrations and ODF/PFT relation of ethanolic extracts was significantly greater than that of the methanolic not only in pulp but also in pit. PFT and ODF performance in pulp was significantly higher than in pit in both campaigns and solvents. As regards DPPH and FRAP, pulp extracts were significantly more active than pit extracts, with a meaningless solvent difference for the same waste.

Keywords: olive, waste material, phenolic extracts, antioxidant activity

INTRODUCCIÓN

Los residuos de la industria aceitera del olivo representan un problema ambiental importante ya que se generan grandes cantidades en cortos períodos de tiempo (Roig 2006). Argentina se ubica como el principal productor de aceite de oliva de América del Sur, posee más de 100.000 hectáreas implantadas con olivos distribuidas en Catamarca (24000 ha), La Rioja (20500 ha); San Juan (19500 ha), Mendoza (17500 ha), Córdoba (5000 ha), Buenos Aires (2500 ha) y Rio Negro (600 ha); el 65% de las cuales se destina para aceite (COI 2012).

En la campaña 2011 se produjeron alrededor de 200000 toneladas de aceite de oliva a nivel nacional (COI 2012) y se generaron simultáneamente cerca de 800000 t de alperujo, un material constituido por la pulpa, piel, carozo y agua de vegetación de la aceituna después de su industrialización, por el método de dos fases (Hermoso 1994). El alperujo contiene elevada humedad (55-70%) que le otorga una consistencia pastosa que dificulta su traslado; contiene altas concentraciones de fenoles, lípidos y ácidos orgánicos que le confieren un carácter fitotóxico y biotóxico (Morillo Pérez 2007) que retardan su biodegradabilidad y en general complican su manejo. Estos residuos también contienen recursos valiosos tales como una gran proporción de materia orgánica y una amplia gama de nutrientes que podrían ser reutilizados. En la zona mediterránea los residuos industriales del olivo se emplean con distintos fines: la obtención del aceite de orujo mediante extracción del remanente graso de los residuos con solventes orgánicos, la combustión, la gasificación, la digestión anaerobia, el compostaje, la fermentación sólida, la preparación de alimento balanceado para animales (Fernández-Bolaños 2006), entre otras aplicaciones. En Argentina cada vez son más las investigaciones orientadas al estudio del alperujo, referidas a la evaluación de su ecotoxicidad (Hanna et al. 2011), su comportamiento como abono orgánico (Aybar et al. 2012), su utilización en compostaje (Pozzi et al. 2010), elaboración de lombricompuesto (Hammann et al. 2006) y el empleo del carozo para preparación de carbón activado (Filippin et al. 2006). En la provincia de San Juan una empresa olivícola aprovecha la biomasa proveniente de los restos de poda y el alperujo para generar el 50% de la energía utilizada en la planta extractora y en una finca de 600 ha de olivos (Puga 2014). La Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Provincia de San Juan creó además una planta de compostaje que procesa residuos sólidos urbanos, restos de poda de arbolado público y residuos orgánicos de actividades agroindustriales locales (INTA 2014). En el oeste catamarqueño otro emprendimiento prepara un "té de compost" que utiliza con fines fitosanitarios (Alurralde 2014).

Las investigaciones más innovadoras en esta temática están orientadas a extraer los compuestos con actividad antioxidante de los residuos agroindustriales del olivo (Fernández Bolaños 2006). El estudio de sustancias con propiedades antioxidantes es prioritario por el papel que desempeñan para evitar el deterioro de productos alimentarios, preparados farmacéuticos y cosméticos (Sherwin 1985). Debido a que los antioxidantes sintéticos están bajo sospecha de ser perjudiciales para la salud (Dwyer, 1996; Venereo Gutiérrez, 2002), en la actualidad existe un gran interés por la búsqueda de sustancias alternativas, preferiblemente de origen biológico. Muchos residuos agroindustriales son potenciales fuentes de antioxidantes

naturales, precisamente en los últimos años ha crecido el interés por el estudio de los principios activos presentes en los residuos de la industria del olivo, prueba de esto son las numerosas publicaciones que hay al respecto (Chiba 1979, Tsukamoto 1985, Altarejos 1997, Ozkaya, 1999, Guinda, 2002, Pérez-Bonilla 2003, Gómez 2009).

A nivel local, Gómez, et al. (2013) trabajando sobre residuos agroindustriales de olivos concluyeron que extractos etanólicos de hoja, madera y alperujo de la variedad Arbequina son fuentes naturales de fitofenoles con propiedades antioxidantes y que la actividad de los extractos en orden decreciente es: hoja > madera > alperujo. En la actualidad, y debido a que el alperujo es el residuo olivícola que más problemas ambientales produce, el equipo de investigación está profundizando el estudio sobre este material. La propuesta de manejo consiste en tratar al alperujo como materia prima y no como residuo, cambio conceptual que imparte originalidad a la metodología planteada y explica que el estudio se realice sobre alperujo recién obtenido del proceso industrial, evaluando metodologías extractivas, sobre las distintas fases del alperujo fresco: pulpa, carozo y agua de vegetación. El contenido fenólico del agua de vegetación y su aptitud para su re-utilización en la propia industria y/ó, previo tratamiento, para usos agrícolas, ya fue analizada por Gómez et al. (2014). Dando continuidad al estudio, el objetivo del presente trabajo consiste en evaluar el contenido fenólico y la actividad antioxidante de extractos, metanólicos y etanólicos, de pulpa y carozo separados del alperujo proveniente de la molienda de aceituna para la obtención de aceite por el método de dos fases.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con muestras de carozo y pulpa de *Olea europea L.* variedad Arbequina obtenidas a partir de muestras de orujo fresco recolectado durante el proceso de industrialización de las campañas 2012 y 2013, en la Planta Piloto "Olivares del Valle" de la Cooperativa 12 Olivos y la Universidad Nacional de Catamarca, ubicada en el complejo industrial El Pantanillo, Valle Central, Catamarca.

Las muestras de orujo se recolectaron a la salida de la centrífuga horizontal en recipientes plásticos perfectamente identificados y se almacenaron a 4-5 ºC. Posteriormente se separaron las fracciones pulpa y carozo por triada.

Los extractos se obtuvieron por triplicado a partir de 3 gramos de muestra liofilizada y molida con adición de 30 mL de etanol ó metanol, según el caso. Se dejó macerar 24 h, se filtró y se repitió el procedimiento sobre el residuo recuperado. Finalmente se enrasó a 100 mL con solvente en matraz aforado y rotulado. Se cuantificaron por triplicado polifenoles totales (PFT) por Folín-Ciocalteu a 725 nm y ortodifenoles (ODF) con molibdato de sodio a 370 nm. Los resultados de ambos parámetros se expresaron en mg de ácido cafeico/kg de muestra seca.

La actividad antioxidante se evaluó mediante el poder reductor de los extractos y su capacidad de atrapar radicales libres. El poder reductor de los extractos sobre el catión Fe^{+3} se cuantificó por el método de Benzie y Strain (1996) empleando FRAP (2,5 mL de la solución 2,4,6-tripiridil-s-triazina; 10 µM en HCl 40 mM; 2,5 mL de $FeCl_3$ 20 µM y 25 mL de buffer acetato 0,3 µM a un pH de 3.6) y el resultado se expresó en µmol de trolox por gramo de muestra. La capacidad de captura de radicales libres de los extractos se

midió por el método del DPPH (Rojano 2008) determinando el porcentaje de inhibición de radicales libres a los 15 min de reacción, por disminución de la absorbancia a 515 nm. Los ensayos de realizaron por triplicado.
Los resultados se expresan a través del valor medio ± la desviación estándar y se analizaron mediante ANAVA (p=0,05) (Infostat 2013), considerando como factores campaña, material y solvente para cada variable respuesta.

Resultados y discusión

Estudio preliminar de la distribución de los compuestos fenólicos en los diferentes materiales durante el proceso extractivo.

A modo exploratorio se realizaron extracciones metanólicas de los compuestos fenólicos del aceite, pulpa (EPM), carozo (ECM) y agua de vegetación de un mismo proceso extractivo para ambas campañas con la finalidad de evaluar la distribución de los polifenoles en los materiales provenientes de la molienda de aceituna por el método de dos fases. En la tabla 1 se presentan las medias de dos repeticiones del contenido fenólico en los extractos metanólicos y los porcentajes de distribución en cada una de las fases para las muestras de los años 2012 y 2013.

Tabla 1. Distribución de los compuestos fenólicos en aceite, pulpa, carozo y agua de vegetación efectuando extracciones metanólicas.

Muestra	***Año***	***PFT*** *(mg ácido cafeico/kg muestra)*	***% Total***
EPM	2012	4589,86	68,44
ECM	2012	1730,25	25,80
Aceite	2012	93,80	1,40
Agua vegetación	2012	292,51	4,36
Total 2012		6706,41	100,00
EPM	2013	6363,92	77,95
ECM	2013	1580,87	19,36
Aceite	2013	126,27	1,55
Agua vegetación	2013	93,55	1,15
Total 2013		8164,62	100,00

En ambas campañas se observa que la pulpa retiene la gran mayoría de los compuestos fenólicos, al menos los solubles en metanol. Teniendo en cuenta las dos campañas, la fracción de pulpa y de carozos presentaron valores promedios de 73,20 % y 22,60 % de los compuestos fenólicos respectivamente. Es decir que en los componentes del "orujo" se encontró el 95,8 % de los compuestos fenólicos de la aceituna. El agua de vegetación y el aceite solo retuvieron el 2,75 % y el 1,47 % respectivamente. La primera conclusión a la que se arribó en el presente trabajo fue que el agua de vegetación contiene menos compuestos fenólicos disueltos que lo que se preveía en función de su naturaleza hidrofílica. De acuerdo a estos primeros resultados, se estima que separando el agua de vegetación del resto del material sólido del alperujo se obtendrá una fase sólida menos húmeda y una fase acuosa

que según Gómez et al. (2014), es apta para su re-utilización en la propia industria o, previo tratamiento, para usos agrícolas. Estos resultados motivaron que se decida avanzar el presente estudio sobre las fases del residuo más ricas en compuestos fenólicos: la pulpa y el carozo. El diseño experimental tomó la siguiente forma:

Tabla 2. Diseño de experimento: extracción de compuestos polifenólicos.

Residuo	***Solventes***	
	Etanol 50%	*Metanol*
Pulpa *(del orujo)*	*EPE*	*EPM*
Carozo *(del orujo)*	*ECE*	*ECM*

Contenido fenólico y ortodifenólico de extractos orgánicos de pulpa y carozo.

Las medias de polifenoles totales (PFT) y orto-difenoles (ODF) y sus desviaciones estándar de extracciones etanólicas y metanólicas de pulpa y carozo, analizadas por triplicado, se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Contenido en PFT y ODF de extractos etanólicos y metanólicos de pulpa y carozo para las campañas 2012 y 2013.

Extractos	***Año***	***PFT***	***ODF***
		(mg ácido cafeico /kg muestra)	
EPE	*2012*	*11334,86 ±348,98 D*	*7730,39± 125,23 D*
EPE	*2013*	*13572,38± 108,02 E*	*7026,85 ±554,19 CD*
ECE	*2012*	*1829,26 ± 123,13 A*	*1816,38± 70,95 A*
ECE	*2013*	*1827,15 ± 120,89 A*	*1586,59 ± 47,03 A*
EPM	*2012*	*4589,86 ±290,81 B*	*6323,04 ±106,48 BC*
EPM	*2013*	*6363,92 ± 285,31 C*	*5018,10 ± 753,30 B*
ECM	*2012*	*1730,25± 238,93 A*	*1359,53 ± 51,88 A*
ECM	*2013*	*1580,87 ± 313,97 A*	*1047,90± 68,41 A*

Para un mismo parámetro, medias con la misma letra no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Los extractos de pulpa presentaron un nivel de PFT significativamente mayor en el año 2013 para ambos solventes, posiblemente asociado a la incorporación de agua en el proceso de industrialización en la campaña 2013 que pudo haber arrastrado los compuestos fenólicos hacia la pulpa. En los extractos de carozo la campaña no influyó estadísticamente en el contenido de PFT ni de ODF.

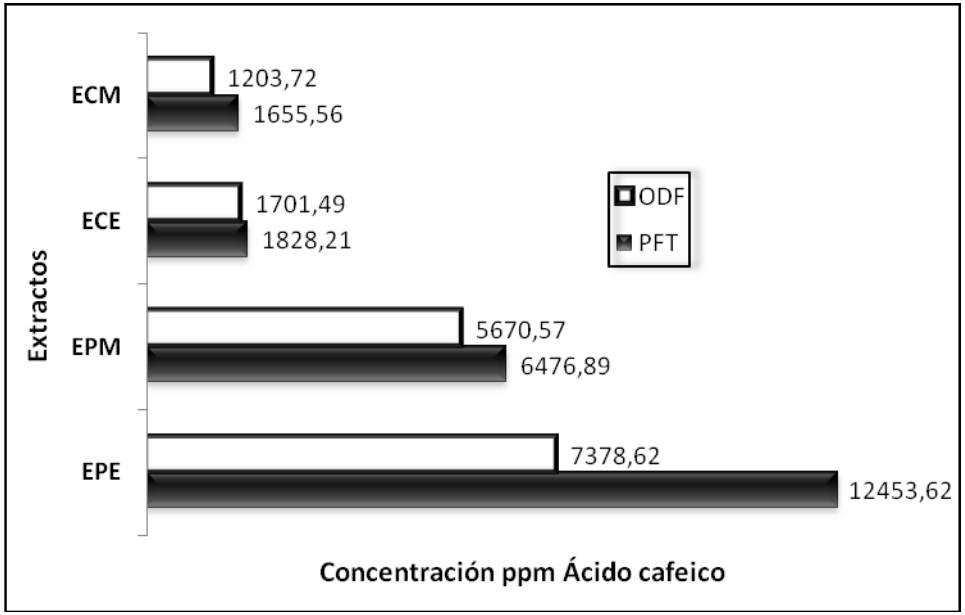
El rendimiento de PFT en pulpa resultó significativamente superior al de carozo en ambas campañas, tanto en los extractos etanólicos (un 83,86% en 2012 y un 86,53 % en

2013) como en los metanólicos (un 62,30% en 2012 y un 75,16 % en 2013). El contenido de ODF en pulpa también fue significativamente superior al de carozo en los dos años en estudio, en los extractos etanólicos (un 76,50% en 2012 y un 77,42 % en 2013) y en los extractos metanólicos (un 78,10% superior en 2012 y un 79,12 % mayor en 2013).

Se observa que el poder extractivo del etanol acuoso resultó mayor que el del metanol para los PFT y los ODF, tanto de pulpa como de carozo, en ambas campañas. En el caso de la pulpa las diferencias extractivas de los PFT supera el 50 % en los dos años analizados, mientras que en carozo alcanzó el 13,5 %.

La mayor riqueza en PFT y ODF de la pulpa y el mejor poder extractivo del etanol acuoso sobre los compuestos fenólicos presentes en el orujo de aceituna, se visualiza claramente en el Gráfico 1 en el que se presentan los valores promedios de la concentración fenólica y ortodifenólica por extracto, para los dos años considerados.

Gráfico 1. Rendimientos en PFT y ODF de los extractos ECM, ECE, EPM y EPE



Gómez et al. (2009) trabajando sobre extractos etanólicos de restos de poda de olivos de Arbequina concluyeron que el contenido fenólico y ortodifenólico de hoja es significativamente superior a los de madera del olivo (27540 contra 19635 mg de ácido cafeico /kg de muestra) y también en ODF (18130 contra 7422 mg de ácido cafeico /kg de muestra). La comparación de estos valores con los registrados en la presente investigación nos permite dar el siguiente orden decreciente de la riqueza polifenólica y ortodifenólica de los extractos etanólicos de los diferentes residuos

agroindustriales del olivo hoja> madera>pulpa>carozo. Los valores medios de ODF en extractos etanólicos de madera y pulpa resultaron próximos entre sí y cercanos a los 7400 mg de ácido cafeico /kg de muestra.

Dentro de los compuestos fenólicos, los antecedentes atribuyen la mayor actividad antioxidante a los ortodifenoles (De la Torre Carbot 2007, Oliveras López 2005), razón por la cual es interesante evaluar el porcentaje de ODF en relación al total de los fenoles cuantificados. Un 87,55 % de los fenoles extraídos de la pulpa con etanol son ODF, mientras que para el caso del metanol/pulpa el porcentaje de ODF desciende a 59,25 %. En el extracto etanólico de carozo un 93,07 % de los PFT son ODF, mientras que con metanol el porcentaje es de 72,71 %. Los extractos de pulpa presentan mayor cantidad de ODF que los de carozo y el etanol extrae, en pulpa y carozo de aceituna, mayor porcentaje de ODF que el metanol. A pesar de que ambos solventes son inflamables, el mejor comportamiento extractivo del etanol frente a los residuos agroindustriales del olivo es muy favorable desde el punto de vista industrial y medio ambiental, debido a la menor toxicidad del etanol.

Actividad antioxidante de extractos etanólicos y metanólicos de pulpa y carozo

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se debe a su capacidad para eliminar los radicales libres, donar átomos de hidrógeno o electrones, o quelar cationes metálicos (Amarowicz 2004). Al evaluar la actividad antioxidante de extractos debemos considerar el sinergismo existente entre los principios activos afines al solvente extractor, ya que no se trata de un compuesto puro que actúa de manera aislada, sino de una matriz compleja en la que los distintos componentes interactúan, potenciándose ó inhibiéndose. Varios métodos se han desarrollado recientemente para medir la capacidad antioxidante total de alimentos y bebidas (Pellegrini et al. 2000), debido a que los compuestos antioxidantes pueden actuar a través de diferentes mecanismos y ningún método puede evaluar completamente la capacidad antioxidante total, se busca complementar la información brindada por cada uno. Por ese motivo para el presente estudio se decidió medir el potencial reductor de los extractos sobre el Fe^{+3} a través del ensayo del FRAP y la actividad antirradicalaria, por el método del DPPH, que tiene la ventaja de no verse afectado por ciertas reacciones secundarias de polifenoles, tales como la quelación de iones metálicos y la inhibición de la enzima, de modo que estaría asociado fundamentalmente a la capacidad de las especies de un extracto de capturar radicales libres.

En la Tabla 4 se presenta la actividad antioxidante medida por FRAP (expresada µmol trolox/g muestra) y por DPPH (expresada como PI a los 15 min de reacción) de extracciones etanólicas y metanólicas de pulpa y carozo y sus diferencias estadísticas.

Tabla 4. Actividad antioxidante de extractos etanólicos y metanólicos de pulpa y carozo.

Extracto	Año	FRAP (µmol Trolox /g muestra ± DS)	DPPH (PI a 15 min± DS)
EPE	2012	754,03±182,52 B	67,12±1,54 D
EPE	2013	1970,86±395,07 D	74,15±2,15 E
ECE	2012	394,49±48,78 A	22,35±0,83 B
ECE	2013	293,43±26,84 A	13,25±0,74 A
EPM	2012	672,24±194,83 B	51,92±0,66 C
EPM	2013	1006,96±181,80 C	80,97±1,82 F
ECM	2012	222,86±50,85 A	16,00±1,17 A
ECM	2013	233,68±18,69 A	15,29±3,32 A

Para un mismo parámetro, medias con la misma letra no son significativamente diferentes (p > 0,05)

La campaña no influyó significativamente sobre la actividad reductora, medida por el FRAP, de los extractos de carozo. Por su parte los extractos de pulpa fueron sensibles a este factor; el EPE 2013 fue un 61,74 % más reductor que el EPE 2012 y los EPM 2013 fueron un 33,24 % más activos que en 2012.

La actividad antirradicalaria, medida por DPPH, se vio afectada estadísticamente por la campaña en todos los extractos, a excepción de la de los extractos metanólicos de carozo. En pulpa, las diferencias favorecieron a los extractos 2013 y en el ECE al 2012.

Los extractos de pulpa presentaron una actividad antioxidante significativamente mayor que los de carozo frente al FRAP y al DPPH en ambos solventes y en las dos campañas.

Las máximas diferencias en las actividades antioxidantes de los extractos de pulpa y carozo se registraron en campaña 2013. En los extractos etanólicos la capacidad reductora fue un 85,11 % superior y la actividad antirradicalaria un 82,13 % mayor en los extractos de pulpa que en los de carozo. En los extractos metanólicos el comportamiento fue similar aunque con actividades y diferencias algo menores. Este comportamiento resulta coherente con el nivel significativamente mayor de PFT y ODF de los extractos de pulpa 2013 para ambos solventes, asociado a la incorporación de agua en el proceso de industrialización de ese año que arrastró parte de los compuestos fenólicos del fruto hacia los residuos de la industria.

Los extractos etanólicos presentaron, en general, mayor actividad reductora frente al FRAP que los extractos metanólicos, tanto en pulpa como en carozo, resultados que evidencian la mayor capacidad del etanol para extraer compuestos reductores, de la pulpa y el carozo del orujo de la aceituna. La diferencia máxima registrada fue de 48,91 % en los extractos de pulpa de la campaña 2013.

El efecto de los solventes sobre la actividad antirradicalaria presentó un comportamiento diferenciado por campaña. En el año 2012, sin agregado de agua en el proceso de amasado, los extractos etanólicos mostraron mayor capacidad de atrapar radicales libres que los metanólicos, tanto en pulpa (22,66 %) como en carozo (28,41%). En la campaña 2013, la extracción con metanol lixivió más compuestos antirradicalarios de la pulpa (8,42 %) y del carozo (13,34 %) que el etanol. Podríamos suponer que la diferencia en el

proceso de elaboración tuvo incidencia sobre el coeficiente de reparto de los compuestos con actividad antirradicalaria de la materia prima en las diferentes fases en que se separa a la salida de la centrífuga horizontal.

El análisis de correlación de Pearson encontró alta correlación entre las capacidades reductoras y antirradicalarias de los extractos (0,81) y un coeficiente de correlación de 0,87 entre PFT y FRAP y entre PFT y DPPH. Por su parte la correlación entre el contenido de ortodifenoles es mayor con la capacidad antirradicalaria (0,91) que con la capacidad reductora (0,75) lo que se halla perfectamente de acuerdo con los antecedentes (De la Torre Carbot 2007, Oliveras López 2005), que responsabilizan de la capacidad de atrapar radicales libres a los compuestos ortodifenólicos.

CONCLUSIONES

La pulpa proveniente del alperujo contiene alrededor del 80 % de los compuestos fenólicos y ortodifenólicos presentes en este material y sus extractos presentan mayor actividad antioxidante que los de carozo. Complementando los resultados obtenidos en esta investigación con los registrados al evaluar los restos de poda se puede indicar el siguiente orden decreciente para la riqueza polifenólica de los residuos agroindustriales del olivo: hoja> madera>pulpa>carozo.

El mayor poder extractivo y la menor toxicidad del sistema etanol-agua 50%, comparado con el metanol, sumado a la mayor capacidad para inhibir radicales libres y al mayor poder reductor de los extractos etanólicos de pulpa y de carozo, confirman la conveniencia de este alcohol para extraer compuestos fenólicos y ortodifenólicos de los residuos industriales del olivo. Estos resultados son amigables tanto con la industria y como con el medio ambiente.

En función de lo anteriormente expuesto los residuos agroindustriales del olivo pueden ser considerados fuentes naturales, abundantes y completamente renovables de compuestos fenólicos con actividad antioxidante y la extracción etanólica es una alternativa factible de implementar.

Para contribuir a un aprovechamiento integral del alperujo se sugiere extraer en primer lugar los compuestos fenólicos logrando, de manera simultánea, otorgarle valor agregado al subproducto y liberarlo de los compuestos activos que retardan el proceso de compostaje u otros tratamientos, facilitando de este modo su manejo posterior. La metodología propuesta evita, por otra parte, el vertido de contaminantes al suelo por lo que a la vez promueve una producción más limpia.

BIBLIOGRAFÍA

Altarejos J, Nogueras M, Sánchez A. 1997. VIII Simposium Científico-Técnico de Expoliva, Jaén.

Alurralde A. 2014.Te de compost de orujo con fines fitosanitarios: una experiencia en Olivares de Pomán. Comunicación oral. http://www.olivaresdepoman.com.ar/homecast.html

Amarowicz (2004) Free- radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. Food Chem 84:551–562

Aybar V, Gómez P, Bravo M, Herrera R, Vergara-Avalos L, Andrada C. 2012. Efecto de la utilización del alperujo como abono orgánico en el comportamiento del cultivar Coratina. Revista del CIZAS. 12-13 (1-2): 19-25.

Benzie IF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. Anal Biochem. 239 (1): 70-76.

Chiba M, Okabe K, Hisada S, Shima K, Takemoto T, Nishibe S. (1979). Chem. Pharm. Bull. Nº 27: 2868.

Consejo Oleícola Internacional. 2012. http://www.internationaloliveoil.org.

De la Torre Carbot K. 2007. Efecto del consumo del aceite de oliva sobre la composición de las lipoproteínas de baja densidad en individuos de diferentes países europeos. Tesis de Doctorado. Universidad de Barcelona. Cap. II: 21-40.

Dwyer J. 1996. Is there a need to change the America Diet?: Dietary phytochemicals in cancer prevention and treatment. Adv. Experimen. Med. Biol., 40: 192-193.

Fernandez Bolaños J, Rodríguez G, Rodríguez R, Guillén R, Jiménez A. 2006. Potential use of olive by-products. Grasas y Aceites, 57(1): 95-106

Filippín A, Pozzi M, Petek C, Matías C, Iriarte A. 2006. Obtención de carbón activado a partir de residuos oleícolas. III Congreso Iberoamericano de Ambiente y Calidad de Vida. Catamarca.

Gómez EV, Salim Rosales CB, Gómez PE, Rodríguez NL, Bravo MO. 2009. Actividad antioxidante de extractos de residuos de poda de olivos -Olea europaea L.- cultivar Arbequina procedentes del Valle Central de Catamarca. Tesis de Grado. Universidad Nacional de Catamarca. Argentina. Editorial Científica Universitaria – Secretaría de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional de Catamarca.176 páginas. Disponible en:http://www.editorial.unca.edu.ar/Publicacione%20on%20line/DIGITESIS/Tesis%20de%20Gomez/index.htm

Gómez P, Bravo M, Salím Rosales C, Gómez E, Ribotta P. 2013. Obtaining phenol compound from agroindustrial remains. VI International Conference on Polyphenols and Health. Buenos Aires. Argentina.

Gómez P, Segovia A[1], Lorenzo M, Bravo M, Herrera R, Ribotta P, Cañas M. (2014). Características físico-químicas del agua de vegetación proveniente de la molienda de arbequina para la obtención de aceite. Revista del CIZAS. (En prensa).

Guinda A, Lanzón A, Ríos J, Albi T. 2002. Aislamiento y cuantificación de los componentes hoja del olivo: Extracto de hexano. Grasas y Aceites. 53: 419-422.

Hammann A, Filippin A. Pozzi M. 2011. Determinación de Ecotoxicidad del alperujo mediante bioensayos de germinación y crecimiento de Lactuca sativa. Huayllu-Bios, 5.

Hammann A, Segura H, Filippín A, Casimiro S, Matías C. 2006. Dinámica Poblacional de Lombrices de Tierra (Eisenia Foetidae) en el acompostamiento del orujo y su efecto en las características físico-químicas del mismo. IIICongreso Iberoamericano de Ambiente y Calidad de Vida. Catamarca.

INTA. 2014. Noticia sobre Jornada "Aprovechamiento agrícola de residuos de la industria extractiva de aceite de oliva". http://inta.gob.ar/noticias/aprovechamiento-agricola-de-residuos-de-la-industria-extractiva-de-aceite-de-oliva/.

Hermoso M, Gonzalez J, Uceda M, Garcia- Ortiz A.; Morales J, Frias L, Fernandez A. 1994. Elaboración de aceites de oliva e calidad. Obtención por el sistema de dos fases. Apuntes Nº 11/94. Junta de Andalucía. Consejería de agricultura y pesca. Servicio de publicaciones y divulgación.

Molyneux P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin J. Sci. Technol. Nº 26. (2): 211-219.

Morillo Pérez JA. 2007. Biorremediación del alpeorujo: estudio de la microbiota asociada y producción del exopolisacárido jamilano". Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Granada, 2007. http://hera.ugr.es/tesisugr/16617861.pdf.

Oliveras López J. 2005. Calidad del aceite de oliva virgen extra. Antioxidantes y función biológica. Tesis de Doctorado. Universidad de Granada. Cap. I. Sección 2: 42.

Ozkaya M, Celik M. 1999. Acta Hortic. Nº 474: 477.

Pérez-Bonilla M, Salido S, Linares P, van Beek T, Altarejos J, Nogueras M, Sánchez A. 2003. La madera de olivo como nueva fuente de antioxidantes naturales. Foro de la tecnología oleícola y la calidad. Código TEC-26. Disponble en:

<http://www.expoliva.com/expoliva2003/simposium/com.asp?anio=2003&codigo=TEC>.
Pozzi M, Filippín A, Matías C, Hammann A. 2010. Posibilidad de uso del Alpechín en Fertilización de
Tierras Agrícolas. Información Tecnológica, 21 (4): 117-123.
Puga Betty. 2014. Bioenergía: Produciendo energía a partir del olivo. Cima, 201: 16-21.
Roig A, Cayuela ML, Sanchez-Monedero MA. 2006. An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. Waste Management 26. 960–969.
Rojano B, Saez J, Schinella G, Quijano J, Vélez E, Gil A, et al. 2008. Experimental and theoretical determination of the antioxidant properties of isoespintanol (2-isopropyl-3,6-dimethoxy-5-methylphenol). J Mol Struct. 877 (1-3): 1-6.
Sherwin E. 1985. Synthetic antioxidants for fats and oils. Flavor Chemestry of Fats and Oil.
Tsukamoto H, Hisada S, Nishibe S. 1985. Shoyakugaku Zasshi. Nº 39: 90.
Venereo Gutiérrez J. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Rev Cuban Medic Militar, 2 (31):126-133.

Agradecimientos:
La presente investigación se lleva a cabo en el marco del proyecto 02/H103 financiado por la SeCyT de la UNCa y el PFIP 047 financiado por la SCTIP del MinCyTde la Nación.

DETERMINACIÓN DE LA ENERGÍA BRUTA DE UN POSTRE FORMULADO EN BASE A PROTEÍNAS DE LACTOSUERO Y ALMIDÓN DE MAÍZ MODIFICADO

Minetti F.[1], Olivares M.L.[2], Miccolo M.E.[2], Rubiolo A.C.[2], Celeghin A.G.[1]

[1]Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas–Universidad Nacional del Litoral (UNL)-Santa Fe- Argentina.
[2]Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (UNL-CONICET)-Santa Fe-Argentina
celeghin@fbcb.unl.edu.ar

Resumen: Los postres lácteos semisólidosson aceptados por niños y adultos. Sin embargo, frecuentemente no son recomendados para personas con determinados requerimientos nutricionalesdebido a su alto contenido energético.El objetivo de este trabajo fue cuantificar la energía bruta de un postre formulado en base a proteínas de lactosuero y almidón de maíz modificado mediante calorimetría. Se formularon cuatro muestras: la mezcla base con 5% de proteína de lactosuero y 9% de almidón de maíz modificado (P5A9),mezcla base más 2% de cacao (P5A9-CAC), mezcla base más 10% de sacarosa (P5A9-SAC) y mezcla base más 2% de cacao y 10% de sacarosa (P5A9-CAC-SAC). La muestra P5A9 presentó un bajo aporte energético por porción (66,6 kcal/100g). El agregado de cacao (P5A9-CAC) no generó un aporte energético significativo (73,4 kcal/100g) mientras que P5A9-SAC y P5A9-CAC-SAC mostraron aumentos significativos (103,9 kcal/100g y 118,4 kcal/100g, respectivamente). Se concluye que el reemplazo de proteínas de leche por proteínas de lactosuero permite obtener postres con bajo contenido calórico.

Palabras Clave: postres lácteos, proteínas de suero, energía bruta.

Abstract: Semisolid dairy desserts are accepted by children and adults. However, they often are not recommended to persons with special nutritional requirements due to their high energy content. The objective of this work was to quantify the gross energy of a dairy dessert made of whey protein and modified cornstarchusing a bomb combustion calorimeter. Four formulations were prepared: sample 1,mixture formed by 5% w/w of whey protein and 9% w/w of modified cornstarch (P5A9); sample 2, P5A9 mixture and 2% w/w of cocoa (P5A9–CAC); sample 3, P5A9 mixture and 10% w/w of sucrose (P5A9–SAC) and sample 4, P5A9 mixture and 2% w/w of cocoa and 10% w/w sucrose (P5A9–CAC–SAC). Addition of cocoa did not show significant energy contribution (73.4 kcal/100g), but P5A9–SAC and P5A9–CAC–SAC presented significant increase of energy content (103.9 kcal/100g and 118.4 kcal/100g, respectively). It is concluded that the replacement of whey proteins allows to obtain desserts with low caloric content.

Keywords: dairy dessert, whey proteins, gross energy.

INTRODUCCIÓN

Actualmente existe un creciente interés por una alimentación reducida en calorías, a expensas de la disminución del contenido lipídico y/o de hidratos de carbono, lo que ha dado lugar a la aparición en el mercado de diferentes tipos de alimentos. La mayoría de las guías alimentarias de distintos países, así como las recomendaciones de instituciones como la Organización Mundial de la Salud (OMS), difunden como principio de una alimentación saludable el concepto de preferencia por alimentos de alta densidad de nutrientes. En un contexto de amplia variedad de alimentos y moderación en los tamaños de la porción (Britos y Saraví 2009), la industria alimenticia ha ido incorporando productos con mejor calidad nutricional, tratando de reducir los aportes en calorías y limitar la ingesta de grasas (en especial las saturadas y las trans), el sodio y los azúcares.

Los postres lácteos semisólidos son productos de amplio consumo por su facilidad de ingestión. Sin embargo, pueden ser inadecuados para personas con determinados requerimientos dietéticos, debido a que suelen ser alimentos con alta densidad energética. La formulación básica de los postres consiste en leche, espesantes, sacarosa o edulcorantes, aromatizantes y colorantes. No obstante, los principales componentes que condicionan la estructura y, consecuentemente, la textura de estos productos son las proteínas y los polisacáridos. Por eso, cualquier cambio en su composición puede producir modificaciones perceptibles en cuanto a su color, sabor y textura, lo que suele traducirse en una disminución de la aceptabilidad por parte de los consumidores (Tárrega*et al.* 2006, Castro Campos y Bayarri 2011). En tal sentido, resulta relevante obtener un adecuado balance entre estos componentes para lograr formulaciones con una textura aceptada por los consumidores y para controlar la estabilidad física de estos productos, es decir evitar fenómenos indeseables tales como la floculación, sinéresis y separación de fases (Miccolo*et al.* 2012). Para evitar estos efectos se suelen utilizar distintos ingredientes, cuya elecciónde depende de la composición y de las características de cada alimento.

Las proteínas del lactosuero son reconocidas por sus propiedades funcionales y por su excelente valor nutricional (Bryant yMcClement 1998).

Una de las presentaciones comerciales de estas proteínas es en forma de concentrados (WPC),que contienen entre un 20% y un 89% de proteína.Hideko*et al.* emplearon WPC en concentraciones de 1%, 2% y 3%, en un postre lácteo cremoso de chocolate y encontraron que es posible sustituir la leche en polvo por WPC, resultando un producto con menos contenido en grasa y en sólidos totales, y mayor contenido en proteínas con respecto a los postres elaborados con leche en polvo. (Hideko*et al.* 2004)

Un polisacárido ampliamente utilizado como espesante en estos tipos de postres, es el almidón de maíz. Como todo polisacárido es fuente de energía y su principal propiedad funcional es la capacidad de gelatinizar por cocción aumentando la viscosidad de la preparación. Las limitaciones asociadas al uso de almidón nativo son la excesiva viscosidad a bajo contenido de sólidos y su alta susceptibilidad a la retrogradación que produce geles opacos, sinéresis y carencia de estabilidad al congelado-descongelado. Por estos motivos,

se ha generado una amplia variedad de almidones con modificaciones físicas o químicas.

La energía química almacenada en los carbohidratos, proteínas y grasas es transformada por el proceso de respiración celular en energía biológicamente útil. Esta energía una vez utilizada se libera en forma de calor (Parisi2003). El organismo animal no crea ni destruye energía, sino que actúa como transformador de la misma. Por lo tanto, el contenido energético de un alimento se puede determinar combustionando una pequeña cantidad en una bomba calorimétrica y la energía liberada representa el Calor de Combustión o Energía Bruta (EB) del alimento tal como fue ingerido (López y Suarez 2008). Pero existen pérdidas de una parte de la energía de los alimentos por la orina o por las heces, que no siempre se pueden determinar en la práctica calorimétrica. Cuando las pérdidas de energía no se pueden evaluar por calorimetría directa, la Energía Metabolizable (EM) de los alimentos se puede estimar aplicando los factores de Atwater (López y Suarez 2008,Raman*et al.* 2007).En este contexto, el objetivo de este trabajo fue evaluar desde el punto de vista calorimétrico la potencialidad de mezclas de almidón modificado y proteínas de lactosuero para la producción de postres.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de Muestras

Para la formulación de las mezclas estudiadas se utilizó un concentrado de proteína de suero con el nombre comercial LACPRODAN®-80 (Arla FoodIngredients S.A., Buenos Aires, Argentina). Lacprodan®-80 es un concentrado de proteínas de suero (WPC) producido desde el suero de leche por ultrafiltración y secado espray. La composición del concentrado de proteínas de suero provista por el proveedor es 78 ± 2 % p/p de proteínas, 7 ± 2 % p/p de lactosa, 8 % p/p de grasa, 3,5 % p/p de cenizas y 5,5 % p/p de humedad. Asimismo se utilizó almidón de maíz modificado por hidrólisis ácida (Glucovil Argentina S.A., San Luis, Argentina). A partir de estos ingredientes seformularon cuatro muestras: la mezcla base con 5% de proteína de lactosuero y 9% de almidón de maíz modificado (P5A9), mezcla base más 2% de cacao (P5A9-CAC), mezcla base más 10% de sacarosa (P5A9-SAC) y mezcla base más 2% de cacao y 10% de sacarosa (P5A9-CAC-SAC). Se pesaron y mezclaron los ingredientes sólidos en un vaso de precipitado de 500mL y se agregó la cantidad de agua necesaria por pesada completando la masa total a preparar (100g).Cada preparación se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas en un agitador magnético IKA C-MAG HS7 (IKA Labortechnik, Brasilia, Brasil).A continuación, las soluciones se llevaron a un baño termostático Dalvo BTMP (Santa Fe, Argentina) con temperatura controlada a 80°C durante 30 minutos bajo agitación constante. La agitación fue provista por un equipo RW 20n (IkaLabortech Nick, Brasilia, Brasil) a una velocidad angular de 60 rev/min. A este agitador se le adaptó un impulsor helicoidalconstruido específicamente para asegurar una distribución uniforme en toda la masa de la suspensión. Posteriormente, las muestras fueron transferidas a un baño termostático LKB 2919 Multitemp II (Alemania) con agitación regulada a 25°C, durante 30 minutos.Para los ensayos calorimétricos, una delgada capa de muestra fue vertida en placas de Petri de vidrio de 8,5 cm de diámetro y se secaron en estura a 30±1°C durante 72 horas. Luego se retiró la muestra seca de las cajas, con espátula y se la volcó en un mortero, para ser pulverizadas. El polvo resultante se colocó

en las placas de Petri y se llevó a estufa a 30±1°C durante 24 horas. Finalmente, las muestras se compactaron con una prensa pastilladora Modelo 9881 (Buenos Aires, Argentina) y se colocaron en desecador hasta la determinación calorimétrica.

Determinación del valor energético de las preparaciones

La cuantificación del contenido energético de las sustancias puras y de las formulaciones se realizó en un calorímetro Parr 1341, con bomba de oxígeno, balde metálico, camisa, cubierta, motor de agitación, agitador mecánico y circuito de ignición (ParrInstrument C, Illinois, USA). Para el ensayo calorimétrico, cada una de las muestras prensada y seca se colocó en una cápsula interna de la bomba de reacción, que una vez cerrada se cargó con 8 atm. de oxígeno. Dentro del balde metálico se depositó la bomba y se agregó un volumen medido de agua (1300mL). Se conectaron los electrodos y cuando se cerró el calorímetro, el termómetro y el agitador ubicados en la tapa quedaron sumergidos en el agua. Luego de armado el equipo, se puso en marcha el agitador y se esperó el tiempo necesario hasta que se alcanzó el equilibrio térmico en el sistema. Se registró esa temperatura como temperatura inicial del ensayo. A continuación, se presionó un interruptor que generó una corriente eléctrica por los electrodos que produjo una chispa dentro de la bomba, lo que permitió la combustión de la muestra. Una vez producida la combustión de la muestra, la temperatura comenzó a ascender en pocos minutos y se registraron las lecturas temperatura-tiempo cada 30 segundos hasta que se obtuvo un valor constante de la temperatura, que se registró como temperatura final (Atkins y de Paula 2008,Brown*et al.* 2009, Vargas Dominguez 2011).

La interpretación de los resultados experimentales, obtenidos de las determinaciones calorimétricas se realizó aplicando el primer principio de la termodinámica. Considerando que el calorímetro es un sistema aislado que opera a volumen constante, en cualquier proceso termodinámico, la variación de la energía interna (ΔU) del universo físico se conserva, es decir, permanece constante, para un cambio mensurable,

$$\Delta U_{UNIVERSO\ FÍSICO} = q_V = 0 \qquad (1)$$

donde$\Delta U_{UNIVERSO\ FÍSICO}$es la variación de la energía interna del universo físico y es el calor intercambiado a volumen constante. Asimismo, la variación de la energía interna del universo físico se puede considerar como la suma de la variación de energía interna del sistema de estudio y la variación de energía interna de los alrededores. Por lo tanto, el primer principio de la termodinámica se puede plantear de la siguiente manera:

$$\Delta U_{UNIVERSO\ FÍSICO} = \Delta U_{SISTEMA} + \Delta U_{ALREDEDOR} = 0 \quad (2)$$

Si el sistema de estudio es la reacción de combustión y los alrededores son el calorímetro, el agua y accesorios, la expresión (2) se puede expresar:

$$\Delta U_{COMBUSTION} + \Delta U_{CALORÍMETRO} = 0 \quad (3)$$

La variación de la energía interna de la combustión es,

$$\Delta U_{COMBUSTIÓN} \cong \Delta_C U^O n \quad (4)$$

donde$\Delta_C U^O$es la variación de energía interna de combustión estándar y $n$es el número de moles del compuesto combustionado. Considerando que los gases se comportan idealmente, por definición la variación de energía interna de combustión estándar se relaciona con la variación de entalpía de combustión estándar $\Delta_C H^O$, de la siguiente manera,

$$\Delta_C H^O = \Delta_C U^O + (\Delta n)_{GASES}\, RT \quad (5)$$

En donde (Δn) es la diferencia entre el número de moles de productos gaseososylos moles de reactivos gaseosos. Asimismo, la variación de energía interna del calorímetro es,

$$\Delta U_{CALORÍMETRO} = C_{CALORÍMETRO}\,(T_{final} - T_{inicial}) \quad (6)$$

dondeT_{final} y $T_{inicial}$, son las temperaturas final e inicial, respectivamente y $C_{CALORÍMETRO}$, es la constante del calorímetro. Esta constante se calcula combustionando una sustancia cuyo calor de combustión es conocido. Este valor representa la cantidad de calor absorbido por el agua del calorímetro, las paredes y los otros componentes del equipo. El calorímetro utilizado para este trabajo se calibró con ácido benzoico cuya masa molar es 122,13 g/mol y la reacción termoquímica de combustión a la presión de 101,3 kPa. y 298K de temperatura es:

$$C_7H_6O_{2(S)} + 7{,}5\ O_{2(g)} \rightarrow 7CO_{2(g)} + 3H_2O_{(l)} \Delta_C H°_{298} = -3227\ kJ/mol \quad (7)$$

dondeΔn = 7- 7,5 = - 0,5. De esta forma, se obtuvo una variación de energía interna de combustión estándar igual a –3225,76 KJ/mol. Las mediciones para la obtención de la constante del calorímetro se hicieron por duplicado y los valores obtenidos se presentan en la **Tabla 1**.Se observa buena reproducibilidad de los resultados experimentales, los cuales arrojan unvalor promedio de constante de calorímetro de 7,563 KJ/°C.

Una vez calibrado el calorímetro, se procedió acombustionar las formulaciones siguiendo el procedimiento detallado anteriormente. De estaforma, se obtuvo la variación de energía interna de combustión (Δ_CU) de las formulaciones porgramo de muestra y por porción de alimento, que para el caso de postres lácteos seconsidera de 100 g. Esta magnitud se suele llamar energía bruta (EB).

Tabla 1: Valores experimentales obtenidos para el cálculo de la constante del calorímetro.

Masa de ácido benzoico (g)	Moles de ácido benzoico	$T_{inicial}$(° C)	T_{final}(° C)	ΔT	$C_{CALORÍMETRO}$(kJ/ °C)
1,041	0,0085237	27,02	30,64	3,62	7,595
0,907	0,0074265	27,12	30,30	3,18	7,533

Conjuntamente con la determinación de la EB, se estimó a partir de la composición de las formulaciones la energía metabolizable multiplicando la cantidad en gramos de cada macronutrientes por el factor de Atwater correspondiente, 4 kcal/g de proteínas e hidratos de carbono y 9 kcal/g de grasa (López y Súarez 2008).

Análisis Estadístico

A los valores experimentales de EBpor porción se realizó un análisis de varianza multifactorial (ANOVA) y cuando los efectos de los factores fue significativo (P< 0,05) se aplicó el test Fischer LSD de rango múltiple con un nivel de confianza del 95%. El análisis estadístico fue realizado con Statgraphics (Statgraphics Inc., Rockville, MD, U.S.A.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez calibrado el calorímetro se determinó la EBde los ingredientes con los que se hicieron las formulaciones. Los valores obtenidos se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2: Energía Bruta por gramo de ingrediente (Valor medio ± desviación estándar).

Ingrediente	EB (kJ/ g)	EB(kcal/ g)
Sacarosa	16,50± 0,01	3,95± 0,01
Cacao	20,21± 0,09	4,84± 0,02
Almidón	22,25± 0,50	5,32± 0,12
WPC - 80	23,27± 0,07	5,55± 0,02

En el caso de la sacarosa, se observa que el valor promedio obtenido de EBcoincide con el reportado por Atkins y de Paula (2008) para este producto. Asimismo, hay 100 g de carbohidrato por cada 100 g de sacarosa, que se oxidan completamente en una bomba calorimétrica y en el ser humano. Por lo tanto, su presencia en las preparaciones contribuye tanto al sabor dulce, como a la densidad energética de la porción.

Según la ficha técnica reportada por el fabricante de cacao, el producto utilizado presenta en un 95,99% de pureza, 11,7 % p/p de grasa y 2,1 % p/p de humedad. El resto del producto (82,19% p/p) se considera compuesto por hidratos de carbono y proteínas. Por consiguiente, la mezcla presenta una composición mayoritaria de compuestos que aportan 4 kcal/ g y una pequeña cantidad de grasa, la cual aporta 9 kcal/g. Por lo tanto, un valor de EBde 4,84 kcal/g se considera adecuado. El almidón utilizado, según lo reportado por su fabricante, se encuentra en estado puro. No obstante, este producto no es

un almidón nativo (el cual debería aportar 4 kcal/g), sino que posee una modificación química que puede modificar el aporte de EB. El WPC utilizado está compuesto mayoritariamente por proteínas e hidratos de carbono (78% p/p y 7 % p/p, respectivamente) y ambos aportan 4 kcal/g de EB. Pero además, este producto posee 8 % p/p de grasa. Por lo tanto, un aporte de 5,55 kcal/g se considera adecuado para la composición del producto.

En la **Tabla 3** se presentan los resultados experimentales obtenidos de la combustión de las formulaciones bajo estudio. La muestra P5A9 presentó un bajo aporteenergético por porción y el agregado de 2% de cacao no presentó una diferencia calórica significativa. Mientras que las muestras con el agregado de 10% de sacarosa, presentaron aumentos significativos en los valores de la EB.

En la misma tabla también se presentan los valores de energía metabolizable (EM) obtenidos por cálculo, afectando la cantidad de cada macronutriente por su respectivo Factor de Atwater. Se observa que los valores de EMson inferiores a los de EBobtenidos por calorimetría.

En una bomba calorimétrica, cada nutriente se oxida completamente a dióxido de carbono y agua y, además en el caso de compuestos nitrogenados, a nitrógeno, liberando una cantidad de energía en forma de calor. Sin embargo, en el organismo humano la oxidación de algunos de ellos es incompleta (produciéndose urea, creatinina, ácido úrico, cuerpos cetónicos, etc). Por consiguiente, los carbohidratos producen 4,1 kcal por la combustión completa de un gramo de este macronutriente y 4 kcal en el ser humano, aunque esta relación para la glucosa es 3,4/3,4. Por su parte, las proteínas tienen una relación 5,7/4 y las grasas de 9,4/9, entre combustión en la bomba calorimétrica/oxidación en el ser humano (Juliarena P y Gratton 2008, Krause *et al.* 2001). Este es el motivo por el cual los valores de EM son inferiores a los de EB. En tal sentido, en la **Tabla 3** se presentan también los valores de porcentaje de pérdida de energía que realiza el organismo humano.

Tabla 3: Valores experimentales de EBy estimados de EMde las formulaciones estudiadas (valores medios ± desviación estándar)*.

Muestra	EB (kcal/100g)	EM (kcal/100g)	% pérdida
P5A9	66,59±1,34[a]	58,45	12,22
P5A9-CAC	73,35±1,51[a]	67,45	8,04
P5A9-SAC	103,91±1,02[b]	98,45	5,25
P5A9-SAC-CAC	118,35±12,82[c]	107,45	9,21

*** Los valores promedio con letras diferentes en una columna indican diferencias significativas (*P* < 0.05).**

Según CAA, (2010) un alimento "reducido en calorías" es aquel que ha reducido en un mínimo del 25% su contenido energético total y una diferencia mayor a 40 kcal/100g (para sólidos) respecto al alimento tradicional. En tal sentido, la muestra P5A9-SAC-CAC presentó una reducción del aporte energético de 20 %, comparada con un postre comercial de similares características a base de leche. Por lo tanto, no se podría clasificar como un alimento "reducido en calorías". Sin embargo, una formulación con un endulzante que no aporte calorías, cumpliría con este requerimiento.

CONCLUSIONES

La muestra P5A9 presentó un bajo aporte energético por porción y el agregado de 2% de cacao no presentó una diferencia calórica significativa. Mientras que las muestras con el agregado de 10% de sacarosa, presentaron aumentos significativos en los valores de la EB. Por consiguiente, se concluye que el reemplazo de proteínas de leche por proteínas de lactosuero permite obtener postres con bajo contenido calórico.

BIBLIOGRAFÍA

Atkins P, de Paula J. 2008. Cap. 2: primera ley de la termodinámica. En: Química Física, 8° ed.Buenos Aires, Argentina:Medica Panamericana.pag28-75.

Britos S, Saraví A. 2009. Hay que cambiar la mesa de los argentinos. Brechas en el consumo de alimentos de alta densidad de nutrientes. Impacto en el precio de una Canasta Básica Saludable. VII International PENSA conference. Economic crisis: Food, fiber and bioenergy chains.Noviembre 2009, Sao Paulo, Brazil.

Brown TL, LeMay HE, Bursten BE, Murphy CJ. 2009. Cap. 5: Termoquímica. En: Química, la Ciencia Central. 11° ed.México: Pearson Educación. pág 164-209.

Bryant CM,McClement DJ. 1998. Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. Trends in Food Science and Technology.**9**: 143-151.

Castro Campos C, Bayarri S. 2011. Características físicas y sensoriales de postres lácteos. Influencia del contenido en grasa y del espesante. Tesis Máster Universitario en Ciencia e Ingeniería de los Alimentos. (IATA-CSIC) UniversitatPolitècnica de València, España.

Código Alimentario Argentino. 2010. Capítulo VIII: Alimentos Lácteos. Consulta: 04/05/2013. Disponible en: www.anmat.gov.ar.

Hideko P, Nikaedo L, Amaral FF, BarrettoPenna AL. 2004. Caracterização tecnológica de sobremesas lácteas achocolatadas cremosas elaboradas com concentrado

protéico de soro e misturas de gomas carragena e guar. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 40 (3): 397-404.
Huber KC,BeMiller JN. 2010. Modified starch chemistry and properties. En: Bertolini AC. Starches: Characterization, Properties and Applications. 1°ed.Florida: CRC Press. pag 145-203.
Juliarena P, Gratton R. 2008. Cap.2. Generalidades sobre alimentos. En: Tecnología, ambiente y sociedad. UNICEN.Buenos Aires. pag 1-23. Disponible en: www.exa.unicen.edu.ar/catedras/tecnoambiente/CAP02.pdf Consultado: 05/2014.
Krause L, Kathleen Haban S. 2001. Cap. 2: Energía. En: Nutrición y dietoterápia12° ed.DF, Mexico: Mc Graw Hill. pág 20-32.
López LB, Suárez MM., 2008. Cap. 4. Energía. En: Fundamentos de nutrición normal. 1°ed.Buenos Aires: El Ateneo. pág 48-70.
Madureira AR, Pereira CI, Gomes AMP, Pintado ME, Malcata FX. 2007. Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. Food Research International, 40: 1197–1211.
Miccolo ME, Olivares ML, De Piante Vicín D, Rubiolo AC. 2012. Caracterización reológica de mezclas de proteínas de lactosuero y almidón modificado para la formulación de postres. IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, 14 al 16 de noviembre de 2012, Córdoba, Argentina.
O`Brien L. 2001.Cap.1: Low-calorie sweeteners. En: Alternative Sweeteners. 3°ed. New York: Marcel Dekker Inc. pag 1-12.
Parisi M. 2003. Cap.2. El hombre como sistema integrado. La organización compartimental. En: Temas de Biofísica. Buenos Aires: McGraw-Hill Interamericana. pag 25-30.
Parra Huertas R.A. 2009. Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. Revista de la Facultad Nacional de Agronomía de Medellín,62(1): 4967-4982.
Posada K, Terán DM, Ramírez-Navas JS. 2011. Empleo del lactosuero y sus componentes en la elaboración de postres y productos de confitería. La Alimentación Latinoamericana, 292: 66-73.
Raman A, Baum ST, Colman RJ, Kemnitz JW, Weindruch R, Schoeller DA. 2007. Metabolizable energy intake during long-term calorie restriction in rhesus monkeys. Experimental Gerontology,42: 988–994.
Tárrega A, Costell E. 2006. Effect of composition on the rheological behavior and sensory properties of semisolid dairy dessert.FoodHydrocolloids,20: 914-922.
Vargas Domínguez J. 2011. El calorímetro y el valor energético de los alimentos: la construcción de una alimentación "mexicana". Taller circulación de saberes: instrumentos y colecciones en la historia México, 5 al 8 de diciembre de 2011, DF, México.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por la Universidad Nacional del Litoral y el CONICET. Los autores agradecen a GLUCOVIL Argentina S.A. por el suministro de almidón modificado y a SAPORITI S.A. por el suministro de esencias saborizantes.

DESARROLLO DE UN ADEREZO A BASE DE QUINOA (CHENOPODIUM QUINOA WILLD): CARACTERIZACIÓN NUTRICIONAL Y SENSORIAL

Olmedo A.C[1]., Sicilia I.S[1]., Cervilla N.S[1], Miranda Villa P.P[1], Montoya P.A[1], Mufari J.R[1,2], Grasso F.V[1], Guzmán C.A.[1,2]

(1) Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA), Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (FCEFyN), Universidad Nacional de Córdoba. Av. Vélez Sarsfield 1611, Córdoba, Argentina.
(2) Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos Córdoba (ICYTAC) – CONICET – Universidad Nacional de Córdoba. Bv. Dr. Juan Filloy S/N, Córdoba, Argentina

Dirección de e-mail: pmirandavilla@gmail.com, romi_mufari@hotmail.com

Resumen: La quinoa admite múltiples usos, sin embargo, no formar parte de los hábitos alimentarios de la población a pesar de su destacable valor nutricional. Se desarrolló un aderezo reducido en sodio y con perfil de ácidos grasos superior a los aderezos comerciales. Se realizó la caracterización nutricional de las semillas crudas y cocidas. Para la obtención del aderezo, las semillas cocidas fueron homogenizadas con aceite de oliva, lecitina, ácido sórbico y saborizantes. Luego fueron caracterizados nutricional y sensorialmente, y comparados con marcas comercializadas en Argentina. La composición de las semillas mostró un contenido proteico similar a los cereales de consumo habitual, destacándose la lisina, aminoácido esencial deficiente en los cereales. Se obtuvieron aderezos que según el Código Alimentario Argentino pueden ser considerados "alimentos para regímenes dietéticos" y de "muy bajo contenido en sodio". Además, se diferencia de los existentes en el mercado, por el aporte de proteínas y ácidos grasos monoinsaturados (60%). En el análisis sensorial no existieron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre las calificaciones. La composición nutricional hace del alimento un producto saludable que puede ser empleado por personas con alto riesgo de padecer enfermedades crónicas no transmisibles y se presenta como una alternativa para ser incorporada en la dieta.

Palabras claves: Aderezo, saludable, reducido en sodio, ácidos grasos.

Abstract: Quinoa supports multiple uses, however, not be part of the custom habits of the population in spite of their remarkable nutritional value. Low sodium and fatty acid profile greater than other commercial seasoning was developed. Nutritional characterization of raw and cooked seeds was performed. To obtain the seasoning, cooked seeds were homogenized with olive oil, lecithin, sorbic acid and flavoring. They were characterized nutritional and sensory, and compared with brands marketed in Argentina. The composition of the seeds showed a protein content similar to commonly consumed cereals, emphasize lysine, an essential amino acid deficient in cereals. Seasoning according to the Código Alimentario Argentino can be considered "food for dietary regimes" and "very low sodium" were obtained. In addition, unlike the product existing in the market, for his contribution of protein and monounsaturated fatty acids (60%). In sensory analysis there were no significant differences ($P \leq 0,05$) between the scores. The nutritional composition of

the food makes a healthy product that can be used by people at high risk of chronic non-transmisible diseases and is presented as an alternative to be incorporated in the diet.

Key words: Seasoning, healthy, low sodium, fatty acids.

INTRODUCCIÓN

La quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) es un alimento de origen americano de destacable valor nutricional. Si bien su cultivo y consumo se practica desde el año 5000 a.C., durante mucho tiempo estuvo subvaluado. A pesar de esto, su revalorización ha ido en aumento a tal punto que la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) designó el año 2013, como el año Internacional de la quinoa (FAO, 2012).

A partir del grano es posible obtener gran variedad de productos, entre los que se destacan: harina, hojuelas, extruidos, expandidos, granolas, barras energéticas, leche, almidones, colorantes, saponina, concentrados proteicos, germinados, entre otros productos (Villacrés, *et al.*, 2011; Montoya, *et al.*, 2005).

Si bien no forma parte de los hábitos alimentarios de la población argentina, es posible desarrollar alimentos de consumo masivo, que permitan incorporarla y que además contribuyan a mejorar la salud y el bienestar del consumidor. En este sentido, Argentina, al igual que los países de Latinoamérica, se caracteriza por un alto consumo de carnes, grasas saturadas y azúcares refinados, y un relativamente bajo consumo de fibras y carbohidratos complejos. Dietas con estas características, generan enfermedades cardiovasculares que constituyen un problema de salud pública por su alta prevalencia y por ser la principal causa de muerte de la población adulta, en la mayoría de los países (OMS, 2004).

La composición plasmática de lipoproteínas y colesterol refleja la composición de ácidos grasos dietarios. La ingesta de ácidos grasos saturados (C12, C14 y C16) elevan los niveles de colesterol y lipoproteínas de baja densidad (LDL) en suero. La ingesta de ácidos grasos poliinsaturados puede producir una reducción moderada en los niveles de colesterol de LDL plasmáticos, sin embargo, presentan el inconveniente de ser fácilmente oxidables en sangre. En tanto que, el ácido oleico, presenta un comportamiento neutro respecto a las LDL, pero incrementa el nivel de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Mesejo, Martínez y Martínez, 2012).

Por lo antes mencionado, el presente proyecto tuvo como objetivo evaluar las características nutricionales de las semillas de quinua y el desarrollo de una alternativa saludable a los aderezos tradicionales, que posea un perfil de ácidos grasos con beneficios para la salud, muy bajo en sodio y libre de gluten.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y preparación de la muestra

Los frutos de quinoa estudiando se cosecharon en el Departamento La Poma, Salta, Argentina del año 2010. Para el acondicionamiento de las semillas se utilizó un tamiz vibratorio con malla de 12 mesh, el lavado se realizó por flujo continuo de agua durante 1 hora y fueron secadas en un lecho fluido a 50°C por 15 minutos.

Caracterización nutricional de la Quinoa

La Tabla 1 muestra los ensayos de caracterización realizados a las semillas crudas. Todas las técnicas mencionadas son métodos oficiales de análisis de la AOAC, 1999.

Tabla 1. Técnicas de análisis utilizadas

Análisis	Método	Referencia
Humedad	Indirecto	934.01
Proteína	Kjeldahl	984,13
Grasa total	Soxhlet	920.39
Cenizas	Calcinación	923.03
Carbohidratos	Cálculo por diferencia	BERNAL, 1993
Ácidos grasos	Ésteres metílicos- GC	963.22
Aminoácidos	Hidrólisis proteica- HPLC	994.12

Elaboración del aderezo

Se elaboró con semillas cocidas (500 gramos de semillas se sometieron a cocción en 750 mL de agua durante 700 segundos a temperatura constante en una vaporiera de acero inoxidable), aceite de oliva extra virgen y aditivos permitidos por el Código Alimentario Argentino (CAA). El proceso de obtención del aderezo consistió en la homogenización de 400 g de semillas cocidas, 500 mL de agua potable y 160 mL de aceite de oliva en un molino coloidal marca Colmil. Luego se adicionaron 2 g de lecitina de soya y 1 g de ácido sórbico para una nueva homogenización y se realizó una división en dos partes iguales del producto para la adición de los saborizantes oleorresinosos (apio y mostaza) en proporciones 0,75 y 0,05 respectivamente. El envasado de los aderezos se realizó en frascos de vidrio previamente esterilizados en autoclave por 15 minutos, los frascos fueron almacenados en cámara fría a 3°C.

Evaluación nutricional y sensorial del aderezo

Tabla 2. Técnicas de análisis nutricional

Análisis	Métodos	Referencia
Humedad (g)	Indirecto	934.01:1999
Proteínas (g)	Kjeldahl	984,13:1999
Lípidos (g)	Soxhlet	920.39:1999
Cenizas (g)	Calcinación	923.03:1999
Carbohidratos (g)	Cálculo por diferencia	Bernal, 1993
Sodio (mg/100g)	Espectrometría atómica	985.35:2005
Valor energético (Kcal.)	*	-

*** El valor energético se calculó en base al contenido de los macronutrientes, utilizando como referencia los resultados de los análisis químicos y aplicando los factores de conversión para carbohidratos, proteínas y grasas.**

Para determinar el grado de aceptabilidad de los aderezos se aplicó una prueba afectiva de medición de grado de satisfacción donde se evaluaron los atributos: color, sabor, olor y consistencia utilizando escalas hedónicas de 5 puntos (siendo 5 la mayor puntuación y 1 la menor puntuación). La prueba fue a simple ciego, entregándose a cada panelista las dos muestras codificadas con números de tres dígitos obtenidos de la tabla de números aleatorios. Participaron de la prueba 63 panelistas no entrenados y se utilizaron como vehículo del producto galletas crackers sin sal para untar las muestras.

Procesamiento de los datos

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado, y los resultados fueron expresados sobre base seca como valor medio y su desvío estándar. El análisis de datos fue realizado utilizando InfoStat® versión 2012 (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Para analizar las diferencias entre tratamientos se estimaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA). En aquellos casos en donde se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$), se utilizó a posteriori un test de comparaciones múltiples, LSD de Fisher.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 3 se presentan las determinaciones que se realizaron a la materia prima utilizada para la elaboración del aderezo. Como se puede observar, hay una diferencia de los componentes principales de las dos semillas debido a las perdidas por cocción. Sin embargo, ésta pérdida no produce un detrimento en el perfil nutricional.

Tabla 3. Reporte nutricional de semillas de quinua

Determinaciones	Semilla cruda	Semilla cocida
Proteínas (g)	$14,4^{a} \pm 0,3$	$12,1^{b} \pm 0,3$
Lípidos (g)	$6,8^{a} \pm 0,1$	$5,3^{b} \pm 0,1$
Cenizas (g)	$2,16^{a} \pm 0,09$	$1,7^{b} \pm 0,1$
Carbohidratos (g)	$66,6 \pm 0,5$	$80,9 \pm 0,5$

Pruebas realizadas por triplicado (se reporta la media ± la DS). Medias con diferentes superíndices en una misma fila difieren significativamente ($P \leq 0,05$)

Estos resultados muestran que la quinoa provee un contenido proteico similar a los cereales de consumo común como lo son el trigo entre 7% y 18%, el maíz 9% a 12% y el arroz 6% a 8% (León y Rosell, 2007). El contenido lipídico fue mayor a los reportados por Gil (2010) en comparación con los mismo cereales (trigo 2,2%; arroz 2,4% y maíz 4,3%).

El contenido de cenizas fue menor en las semillas cocidas que en las crudas, esto se debería a las pérdidas ocasionadas durante la cocción. Las perdidas fueron alrededor del 21% (Cervilla, *et al.*, 2014).

El estudio aminoacídico para identificar la calidad proteica de los granos y el aderezo se muestran en la Tabla 4. Las semillas de quinoa sin tratamiento térmico presentaron concentraciones sustancialmente mayores en histidina y lisina que el trigo, el arroz (0,35% y 0,3% respectivamente) (León y Rosell, 2007) y el maíz (0,4%,) (Vera-Guzmán, *et al.*, 2012), pero valores de metionina y cisteína menores, mientras que para los restantes aminoácidos esenciales, los aportes son semejantes (Cervilla, *et al.*, 2012). Las semillas analizadas no poseen proteínas biológicamente completas ya que carecen de la concentración suficiente de aminoácidos esenciales. La puntuación química de la proteína de quinoa asciende a medida que la edad de los grupos analizados es mayor; esto se debe a que los requerimientos de aminoácidos disminuyen como consecuencia de la menor demanda metabólica, dado que no requieren un balance nitrogenado positivo (anabolismo) a edades más avanzadas.

Es decir, que a pesar de las deficiencias aminoacídicas detectadas, es de gran valor destacar que la calidad de una proteína no puede ser juzgada únicamente en relación al patrón de referencia, ya que cuando es comparada con los patrones de requerimientos de aminoácidos esenciales para cada edad, puede resultar inadecuada para el niño y ser adecuada para el adulto.

Si bien se observa que las semillas cocidas presentaron menores concentraciones de aminoácidos, estas deficiencias no afectan la calidad general de la proteína, pues en la versión sin cocción la misma ya presenta un cómputo químico bajo. Además, los aminoácidos lisina e histidina siguen siendo sustancialmente superiores a los de otros cereales, por ejemplo trigo, al igual que en las semillas crudas.

Tabla 4. Perfil de aminoácidos de semillas de quinua y aderezo

Aminoácidos (aa/100g)	Semilla cruda	Semilla cocida	Aderezo*
Ácido Aspártico	0,84 ± 0,04	0,60±0,17	0,28
Ácido Glutámico	1,47 ± 0,04	1,15±0,33	0,54
Serina	0,11 ± 0,03	0,11±0,08	0,05
Histidina	0,90 ± 0,03	0,65±0,22	0,31
Glicina	0,66 ± 0,02	0,42±0,18	0,20
Treonina	0,35 ± 0,02	0,25±0,11	0,12
Arginina	0,89 ± 0,04	0,63±0,24	0,30
Alanina	0,48 ± 0,01	0,37±0,12	0,17
Prolina	0,09 ± 0,03	0,05±0,04	0,02
Tirosina	0,28 ± 0,01	0,20±0,08	0,09
Valina	0,56 ± 0,07	0,42±0,08	0,20
Metionina	0,11 ± 0,03	0,07±0,05	0,03
Cisteína	0,04 ± 0,03	0,03±0,02	0,01
Isoleucina	0,43 ± 0,00	0,31±0,12	0,15
Leucina	0,71 ± 0,02	0,51±0,19	0,24
Fenilalanina	0,43 ± 0,01	0,31±0,12	0,15
Lisina	0,60 ± 0,02	0,44±0,17	0,21

Pruebas realizadas por triplicado (se reporta la media ± la DS)

***El reporte de los aminoácidos en el aderezo fue teórico en base a la cantidad de aminoácidos aportado por la semillas cocidas.**

Tabla 5. Perfil de ácidos grasos de semillas de quinua (%)

Ácidos grasos		Semilla cruda	Semilla cocida
Palmítico	16:0	9,16	10,19
Esteárico	18:0	1,03	nd
Oléico	18:1	27,64	28,74
Linoleico (ω6)	18:2	54,98	53,24
Linolénico (ω3)	18:3	5,67	6,02
Araquídico	20:0	0,33	0,37
Gondólico	20:1	1,19	1,3
Eicosadienoico	20:2	Nd	0,05

La distribución de ácidos grasos de las semillas de quinoa cruda y cocida se presenta en la Tabla 5. Los ácidos grasos insaturados que prevalecieron fueron el linoleico (C18:2) y el

oleico (C18:1). No se observaron diferencias entre semillas crudas y semillas cocidas que pudieran afectar la calidad nutricional de los granos y productos derivados. Estos ácidos grasos son considerados esenciales ya que el organismo no tiene capacidad para sintetizarlos por lo tanto deben ser consumidos en la dieta habitual. La importancia de estos reside en la capacidad para reducir los niveles plasmáticos de colesterol y además poseen efectos antitrombogénicos (Torresani y Somoza, 2003). Por otra parte, el C18:1 poseen un impacto favorable sobre las HDL-colesterol y de LDL-colesterol, elevando las concentraciones de las primeras y reduciendo las segundas. Estos efectos beneficiosos han estimulado su empleo como sustitutivo de las grasas saturadas (Corio, Díaz y Gutiérrez, 2007). El ácido graso saturado prevaleciente en las semillas crudas y cocidas fue el palmítico, siendo su concentración de 9,16% y 10,19%, respectivamente.

Tabla 6. Reporte nutricional del aderezo

	Formulaciones		Marcas comerciales*		
Determinaciones	**Sabor mostaza**	**Sabor apio**	**Mayonesa Libre de colesterol**	**Ketchup**	**Mostaza**
Humedad (g)	7,44	7,48	8,6	7,9	8,9
Proteínas (g)	0,43	0,42	0	0,2	0
Lípidos (g)	1,73	1,77	2,3	0	1,6
Cenizas (g)	0,08	0,07	sd	sd	sd
Carbohidratos (g)	2,33	2,25	1,1	3,9	1,5
Sodio (mg)	0,47	0,49	67	113	139
Valor energético (Kcal.)	26,61	26,61	25	17	21

Valores expresados por porción (12 g): 12 gramos equivalen a una cucharada sopera.
***la información de las marcas comerciales es teórica y consultada en nutrinfo.com**

Los aderezos desarrollados pueden ser considerados como "alimentos de régimen o dietéticos", ya que presentaron modificaciones químicas en su composición que permiten satisfacer necesidades particulares de determinados grupos poblacionales.

La composición nutricional del aderezo por porción (Tabla 6), que equivalen a 12 gramos, mostró contenidos similares en las formulaciones con sabor mostaza y apio. Estos valores, comparados con las marcas comerciales existentes en el mercado argentino, presentaron un aporte calórico mayor como consecuencia del empleo de una materia prima con alto contenido de almidón y bajo contenido en sodio. Según el CAA (art. 1369), el aderezo desarrollado se considera "muy bajo en sodio", dado que sus aportes son menores de 40 miligramo de sodio por 100 gramos de producto listo para consumir. Además, tiene proteínas que le dan un valor agregado a este tipo de alimentos, que generalmente se basan en aceites vegetales.

Tabla 7. Clase y composición de ácidos grasos presentes

	Formulación	
Ácidos grasos	**Sabor mostaza**	**Sabor apio**
Saturados (g)	17,63	17,34
Monoinsaturados (g)	64,41	64,31
Poliinsaturados (g)	17,92	18,3

Los ácidos grasos presentes en el aderezo (Tabla 7 y 8) son aportados por el aceite natural de la quinoa y el aceite de oliva extra virgen. Como se puede observar un destacado contenido de ácidos grasos monoinsaturados sobre los poliinsaturados y saturados.

Figura 1. Ácidos grasos destacados en el aderezo de quinoa

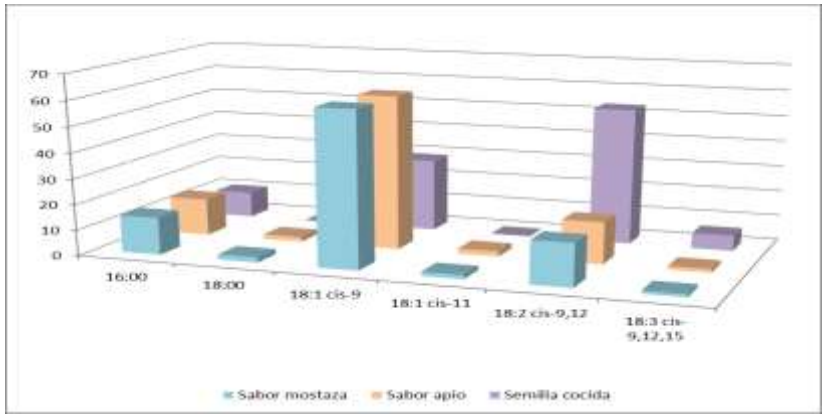


Tabla 8. Composición relativa de ácidos grasos determinada por cromatografía gaseosa

Ácidos grasos		Aderezos		Quinoa	Mayonesa con oliva*
		Sabor mostaza	Sabor apio		
Palmítico	16:0	14,60	14,60	9,16	7,80
Mirístico	14:0	-	-	-	-
Palmitoleico	16:1 cis-9	1,41	1,41	-	-
Margárico	17:0	0,11	-	-	-
Heptadecenoico	17:1 cis-10	0,18	0,18	-	-
Esteárico	18:0	2,00	1,84	1,03	3,20
Oléico	18:1 cis-9	60,50	60,00	27,64	32,70
Vacénico	18:1 cis-11	1,64	2,06	-	-
Linoleico	18:2 cis-9,12	16,70	16,40	54,98	56,60
Octadecatrienoico	18:3 cis-9, trans 12,13	-	0,46	-	-
Linolénico	18:3 cis-9,12,15	1,22	1,44	5,67	-
Araquídico	20:0	0,49	0,51	0,33	-
Eicosenoico	20:1 cis-9	0,49	0,47	-	-
Behénico	22:0	0,26	0,23	-	-
Erúcico	22:1 cis-9	0,19	0,19	-	-
Lignocérico	24:0	0,17	0,16	-	-
Gondólico	20:1	-	-	1,19	-

*** Tomado de Peterson, *et al.*, 2006.**

Tal como se puede apreciar en la Tabla 8, el ácido oleico del aderezo en estudio superó notablemente la cantidad encontrada en una mayonesa con aceite de oliva. Esta característica deja en evidencia la adecuación de este alimento para ser empleado en dietas de personas que tienen un alto riesgo de padecer enfermedades crónicas no transmisibles.

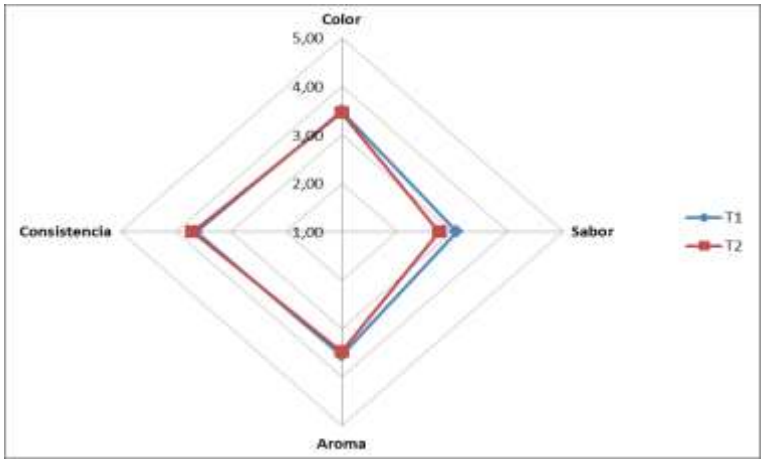
Tabla 9. Valores medios de los atributos sensoriales

Atributos evaluados	Formulaciones	
	T1	T2
Color	3,49[a] ± 0,80	3,46[a] ± 0,82
Sabor	3,08[a] ± 1,20	2,76[a] ± 1,40
Aroma	3,56[a] ± 0,84	3,48[a] ± 1,01
Consistencia	3,63[a] ± 0,10	3,70[a] ± 0,82

Pruebas realizadas por triplicado (se reporta la media ± la DS). Medias con diferentes superíndices en una misma fila difieren significativamente (P<0,05).

De acuerdo con los resultados presentados del análisis sensorial (Tabla 9) no existieron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre las calificaciones emitidas por los panelistas para los atributos evaluados. La puntuación prevalente de los atributos fue 3 y 4 puntos (ni me gusta, ni me disgusta y me gusta, respectivamente). Sin embargo, en la formulación 2 con sabor a apio, se presentó la menor media en la calificación (2,76), llevando a la consideración que este sabor deja regusto en el paladar y no es comúnmente consumido en aderezos (Figura 2).

Figura 2. Calificaciones por atributos sensoriales



CONCLUSIONES

Este trabajo cumplió con sus dos objetivos propuestos: caracterizar en forma completa el grano de quinoa destinado a un producto alimenticio, identificando las cualidades de este cereal andino y avalando el impulso que cobró su producción en los últimos años, reconociendo su aporte no solo a nivel nutricional sino a mejorar la salud. El segundo objetivo de producir un alimento a base de quinoa tuvo en cuenta el desafío de lograr un producto aceptable y que pueda introducirse de manera paulatina en un consumo constante. Al tener en cuenta que la población no tiene adquirido el hábito de consumir quinoa se buscó su introducción en un producto que se compone de sabores fuertes y lograr reducir su sabor característico, el cual puede parecer extraño a un consumidor.

Este producto se diseñó de manera que cumple los requisitos de "muy bajo contenido en sodio" con respecto a los disponibles en el mercado y alto contenido de ácidos grasos monoinsaturados.

El desafío es seguir elaborando productos con propiedades saludables basados en este cereal andino intentando lograr su aceptación y consumo en forma masiva y permanente.

BIBLIOGRAFÍA

AOAC Internacional. 1999. Oficcial Methods of Analysis of the Association of Official Analysis Chemist. 16Th edition, 5th revisión. Gaithersburg – USA.

Bernal RL. 1993. Análisis de Alimentos. Santafé de Bogotá D.C.: Colección Julio Carrizosa Valenzuela No.2. pag 104.

Cervilla NS, Mufari JR, Calandri EL, Guzmán CA. 2014. Pérdidas nutricionales durante la cocción de semillas. Nutrición clínica y dietética hospitalaria, 34(1): 72-76.

Cervilla NS, Mufari JR, Calandri EL, Guzmán CA. 2012. Determinación del contenido de aminoácidos en harinas de quinoa de origen argentino. Evaluación de su calidad proteica. Sociedad Argentina de Nutrición, 13(2): 107-113.

Corio AR, López-Ufano LD, Gutiérrez GR. 2007. Actualización en nutrición para atención primaria. Madrid: Semergen. pag 21.

Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, González L, Tablada M, Robledo CW. 2014. InfoStat. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL http://www.infostat.com.ar

Código Alimentario Argentino. 2008. Capitulo XVII. Alimentos de Régimen o Dietéticos. [en línea]. Buenos aires: Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. URL: http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo_XVII.pdf

FAO. 2012. Celebrando el Año Internacional de la Quinua: Un Futuro Sembrado hace Miles de Años. [en línea]. URL: http://www.fao.org/fileadmin/templates/aiq2013/res/es/nota_conceptual.pdf

Gil HA. 2010. Tratado de Nutrición: Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos, 2ª ed. Madrid: Médica Panamericana. pag 102.

León A, Rosell C. 2007. De tales harinas, tales panes. 1ª ed. Córdoba: Iberoamericana. pag. 480.

Mesejo AA, Martínez MJ, Martínez CC. 2012. Manual básico de nutrición clínica y dietética. 2ª ed. Valencia: Nestlé Healthcare Nutrition. pag 296.

Montoya L, Martínez L, Peralta J. 2005. Análisis de variables estratégicas para la conformación de una cadena productiva de quinua en Colombia. Revista de ciencias administrativas y sociales, 15(25):103-119.

Organización Mundial De La Salud. 2004. "Estrategia mundial sobre régimen alimentario, actividad física y salud". [en línea]. URL: http://www.who.int/dietphysicalactivity/strategy/eb11344/strategy_spanish_web.pdf

Peterson G, Aguilar D, Espeche M, Mesa M, Jáuregui P, Díaz H, Simi M, Tavella M. 2006. Ácidos grasos trans en alimentos consumidos habitualmente por los jóvenes en Argentina. Revista chilena de pediatría, 77(1): 92-101.

Torresani ME, Somoza MI. 2003. Lineamientos para el cuidado nutricional, 3ª ed. Buenos Aires: Eudeba. pag 313.

Vera-Guzman AM, Chávez-Servia JL, Carrillo-Rodríguez JC. 2012. Proteína, lisina y triptófano en poblaciones nativas de maíz mixteco. Revista Fitotecnia Mexicana, 35(5): 7-13.

Villacrés E, Peralta E, Egas L, Mazón N. 2011. Potencial agroindustrial de la quinua, 1ª ed. Quito: Imprenta Ideaz. pag 34.

CONTRIBUCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS (FLAVONOIDES) DE EXTRACTOS DE PROPÓLEOS PARA USO ALIMENTICIO EN LA ELABORACIÓN DE ALIMENTOS FUNCIONALES

Rivero R.C.[1], Archaina D.A.[1], Roche M.F.[1], Vallejos O.A.[1], Sosa N.[1,2], Pancrazio G.I.[1], Baldi Coronel B.M.[1]

1: Facultad de Bromatología, Universidad Nacional de Entre Ríos, Perón 64, Gualeguaychú, Entre Ríos, Argentina.
2: CONICET

Resumen Los propóleos son una mezcla compleja con más de 200 compuestos, principalmente, polifenoles cuya concentración relativa depende del origen de la muestra, mientras que la actividad biológica, de los flavonoides. Teniendo en cuenta la relación flavonoides-efecto biológico se clasifican como productos bioactivos, capaces de establecer múltiples combinaciones, con efecto sinérgico, asignandoespecial importancia su poder antioxidante. El artículo 1339 delCódigo Alimentario Argentino incorpora a los alimentos con propóleos dentro de los dietéticos. En este trabajo se preparó un extractoetanólico de propóleo (EEP) al 85 %v/v, para cada tipo de muestra, obtenido por agitación a temperatura ambiente. Se analizó la composición fenólica empleando cromatografía líquida de alta performance (HPLC).Loscromatogramas obtenidos presentaron un perfil de flavonoides constituido mayoritariamente por ácidos fenólicos (ácido cafeico, ácido benzoico, ferúlico, cinámico, cumárico)y en menor medida por flavonas (pinocembrina, galangina y apigenina)yflavonoles (flavonolesmonohidroxilados en el anillo B). Cuantitativamente, los flavonoides más abundantes en todos los EEP fueron pinocembrina, crisina y galangina, ácido benzoico, cinámico, ferúlico, también kaempferol y apigenina.En conclusión los EEP se perfilarían como un potencial componente para la producción de los alimentos funcionales por ser una fuente de compuestos biactivos naturales que incidirían en el poder antioxidante de los alimentos.

Palabras Clave: extractos de propóleos, compuestos fenólicos, flavonoides, cromatografía.

Abstract: Propolis is a complex mixture of over 200 compounds, mainly polyphenol whose concentration depends on the origin of the sample, whereas the biological activity on flavonoids. Considering the ratio biological effect-flavonoids are classified as bioactive products capable of establishing multiple combinations, with synergistic effect, with special emphasis its antioxidant power. Article 1339 of the Argentine Food Code incorporates foods with propolis in dietary group. In this study an ethanol extract of propolis (EEP) 85% v/v, for each sample, obtained by stirring at room temperature was prepared. Phenolic composition was analyzed using high performance liquid chromatography (HPLC). The chromatograms displayed a flavonoids profile consisting mainly of phenolic acids (caffeic, benzoic, ferulic, cinnamic, coumaric) and flavones (pinocembrin, galangin and apigenin) and flavonols (monohydroxyflavonols in the B ring). Quantitatively, the most abundant flavonoids in all EEP were pinocembrin, chrysin and galangin, benzoic, cinnamic, ferulic, also kaempferol and apigenin. In conclusion, the EEP would outline as a potential component for functional foods

production as a source of natural bioactive compounds that would impact the antioxidant power of foods.

Keywords: propolis extracts, phenolic compounds, flavonoids, chromatography

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas los alimentos funcionales han tenido un creciente interés por parte de los consumidores y de los investigadores, buscando nuevas fuentes de compuestos funcionales o procesos que puedan mejorar las capacidades funcionales de los alimentos. Tal es el caso de los productos derivados de la miel, en este sentido, el propóleo es uno de los productos de la colmena que posee muy buenas propiedades funcionales (Mello *et al.*2010). El propóleo es una sustancia resinosa preparada por las abejas como resultado de mezclar la resina obtenida de plantas con sus secreciones salivales y su composición varía dependiendo de su ubicación geográfica y su origen botánico (Lima *et al.* 2009, Agüero*et al.* 2010, Falcão*et al.* 2013, Agüero *et al.* 2014).Su composición química es compleja y depende de la flora presente en el área de recolección; sin embargo, se han identificado como principales componentes: alcoholes, aldehídos, aminoácidos, ácidos alifáticos, ácidos aromáticos, ésteres aromáticos, flavonoides, ácidos grasos, ácidos *p*-cumáricosprenilados, ácidos cafeoilquínicos, lignanos, ácidos diterpénicos, triterpenos, esteroides y azúcares (Marcucci 1995; Bankova*et al.* 2000).Según Agüero *et al.* (2011) sus propiedades antimicrobianas, antivirales, anticancerígenas y antitumorales han sido motivo de estudio en todo el mundo.

Debido a que el propóleo es un material muy viscoso y posee muchas impurezas, para su utilización debe someterse previamente a un proceso de extracción. El método de extracción de mayor difusión es la extracción etanólica. Al extracto etanólico de propóleose le atribuyen las mejores propiedades funcionales y un alto contenido de compuestos fenólicos. Sin embargo, la aplicación de este tipo de producto en alimentos está limitada por el aroma y el sabor fuerte del extracto etanólico(da Silva *et al.* 2013).

La mayoría de estas preparaciones se basan en extractos etanólicos de propóleos. A pesar de las posibles diferencias en la composición de propóleos, ya que las abejas recogen resinas de fuentes vegetales diferentes, la mayoría de las muestras de propóleos son químicamente bastantes similares. El propóleo bruto se compone de 50 % de resina (compuesto de flavonoides y ácidos fenólicos relacionados y considerada la fracción polifenólica, 30 % de cera, 10 % de aceites esenciales, 5 % de polen y 5 % de diversos compuestos orgánicos). Para su uso debe ser purificado por extracción con disolventes. El solvente usado es el etanol, y mediante extracciones sucesivas se obtienen extractos de propóleos desparafinados ricos en componentes polifenólicos. En tecnología alimentaria, actualmente se tiende al uso de sustancias naturales para la elaboración de alimentos y sobre todo para conferirles propiedades especiales. Así obtenemos los llamados alimentos funcionales que son aquellos que además del aporte nutricional, ayudan a prevenir ciertas enfermedades.

Es importante destacar la fuerte tendencia del mercado, que desde hace tiempo se observa sobre todo en los países desarrollados, de optar por productos naturales y que establezcan en el organismo alguna función beneficiosa específica. Es en este sentido que los propóleos se perfilan como un excelente ingrediente en la formulación de alimentos nutritivos y con alto valor agregado, circunstancias que demuestran ser claves para el desarrollo de la industria

alimentaria actual y, sobretodo, en las economías regionales de la provincia de Entre Ríos.

La inclusión del propóleo en los alimentos, es altamente justificada debido a las importantes propiedades que posee dado que es un concentrado de flavonoides. Es un producto natural, no sometido a procesos de obtención ni refinamientos y constituye un subproducto de la principal actividad de la industria apícola que es la miel de mucha importancia económica para nuestro país. La miel y el polen suelen ser los productos de la colmena más conocidos; sin embargo, al propóleos se le han atribuido innumerables propiedades medicinales como: aglutinante, inmunomodulador, antibiótico, antimicrobiano, antibacteriano, antimicótico, antiinflamatorio, hepatoprotector, antioxidante, antihemorrágico, desparasitante, antitumoral, antioxidante, antiedema, estimulante de la regeneración de epitelios, reductor de colesterol, revitalizante, desintoxicante, tónico, etc. (Herrera et al., 2010; Agüero et al., 2011; Saavedra et al., 2011; Pistelli and Giorgi, 2012).El propóleos ejerce además, efecto inhibidor frente a diversos virus. Esta actividad se atribuye al contenido en compuestos fenólicos, principalmente ácido cafeico, ésteres de los ácidos cafeico y ferúlico (3-metilbut-2-enil cafeato, 3-metilbutil ferulato) y agliconasflavónicas (luteolina y quercetina), muy activas frente al virus del herpes (Hegazi y Abd El Hady 2002).

La importancia como complemento de la alimentación se basa entre otras en sus propiedades inmunoestimulantes, ya que aumentan la resistencia del organismo frente a infecciones; además de que los flavonoides o materias colorantes son una de las sustancias más activas de su composición con carácter antiséptico. Incluyendo este producto en la dieta, encontramos numerosas ventajas nutritivas, terapéuticas, dietéticas, así como preventivas de ciertas carencias nutritivas. También la industria alimentaria ha encontrado muy buenos resultados en el uso de propóleos como preservador de alimentos. La investigación bibliográfica nos lleva a comprobar que los propóleos se utilizan como materia prima en la elaboración de diversos productos, tales como: tintura, jarabes y caramelos; también se elaboran preparados en forma de spray o polvo o recubrimientos comestibles; y en productos con miel, o equinácea (Echinacea Purpurea Angustifolia), el propóleos combina propiedades nutricionales importantes (Wollenweber and Buchmann, 1997; Burdock, 1998; Bankova*et al.*, 2000; Cohen et al., 2004).Araújo da Silva *et al.* (2014) menciona a los compuestos fenólicos como un potencial indicador de la calidad biológica de los extractos de propóleos por sus propiedades antioxidantes, poresta razón, muchos nutricionistas recomiendan la ingesta de flavonoides (bioflavonoides e isoflavonoides) para mantener los tejidos sanos y promover un adecuado equilibrio de hormonas y antioxidantes en el cuerpo, presentando propiedades medicinales muy interesantes. La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química (Martínez *et al.* 2002). El número y la posición de grupos hidroxi, la glicosilación y otras sustituciones determinan la actividad de secuestro de radicales por los compuestos fenólicos.

El objetivo de este trabajo fue preparar un extracto etanólicodepropóleo (materia prima)que permita conservar los principios activos naturales (flavonoides) y analizar su composición fenólica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Se tomaron muestras de propóleos de apiarios ubicados en Gualeguaychú, Entre Ríos, Argentina, cosechadas por distintos métodos(n=8): la muestra 1 denominada (M_1) obtenida pormezclas (n=4) cosechadas porel método de raspado, que emplea una espátula para remover el producto adherido en las caras laterales, tapas y entretapa de la colmena. La muestra 2 (M_2)(mezcla n=4), obtenida con mallas plásticasmatrizadas que una vez recubiertas del material, se retiran de la colmena y se almacenan a -20 °C para facilitar la remoción del producto. Para obtener una muestra que sea representativa de lo que se realiza a escala industrial se mezclaron las dos anteriores, consiguiendo la tercera, (M_3). El muestreo se realizó en forma aleatoria.

Obtención de los extractos etanólicos de propóleo (EEP)

Se realizaron extracciones sucesivas a temperatura ambiente con agitación empleando soluciones acuosas de etanol de 85 % (Sawaya*et al.*2004), donde 5 g de propóleo crudo se mezclaron con 50 ml de solución acuosa de etanol, agitando durante 30 minutos. El líquido se separó y el residuo se volvió a extraer con la misma porción de etanol por tres veces. Posteriormente se refrigeró por 72 hs a 4°C y se filtró para separar las ceras.

Determinación del perfil de flavonoides por Cromatografía Líquida de Alta Resolución

Se utilizó un cromatógrafo HPLC Waters Binario Modelo 1525 con detector de arreglo de diodos Waters Modelo 2996, columna de fase reversa 5 µm C 18 250 x 4,6 mm. Las condiciones cromatográficas de trabajo fueron: Flujo: 1,0 mL/min. Volumen de inyección: de 20 µL. Temperatura del horno: 30 °C ± 0,5 °C. Longitud de onda: 270 nm. Tiempo de corrida: 86 minutos. El gradiente empleado se presenta en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Gradiente utilizado en la determinación de flavonoides

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	Bomba A Metanol (%)	Bomba B Agua: Ac. Fórmico (5%)
0	1,00	30	70
15	1,00	30	70
20	1,00	40	60
30	1,00	45	55
50	1,00	60	40
65	1,00	80	20
75	1,00	100	0
86	1,00	30	70

La identificación de los flavonoides se realizó mediante la comparación de tiempos de retención y espectros de absorción, y co-inyección de estándares cuyas características se detallan en la Tabla 2.La cuantificación de estos compuestos se realizó mediante la técnica de estándar externo. Para ello se determinó el área bajo cada pico identificado del cromatograma, se la comparó con la del estándar correspondiente elegidos teniendo en cuenta que más del 50 % del peso de los propóleos está constituido por estos flavonoides (Banskota*et al.* 1998, Duarte *et al.* 2003,Pryzyk*et al.* 2003). Conociendo la dilución realizada a la muestra se determinó la concentración de flavonoidesdel EEP expresada en mg por gramo de residuo seco empleando laecuación (1).

$$CF_{EEP} = \frac{A_m}{A_{std}} \times C_{std} \times \frac{fd}{resinas} \quad \textbf{(1)}$$

Donde:CF_{EEP}: concentración del flavonoides en mg/g de residuo seco del EEP; C_{std}: concentración del estándar en mg/mL de solución; A_m: área del pico correspondiente a la muestra; A_{std}: área del pico correspondiente al estándar; fd: factor de dilución (250); resinas:gramos de resinas en 100g de EEP sobre base seca.

Tabla 2. Parámetros de los flavonoides empleados como estándares

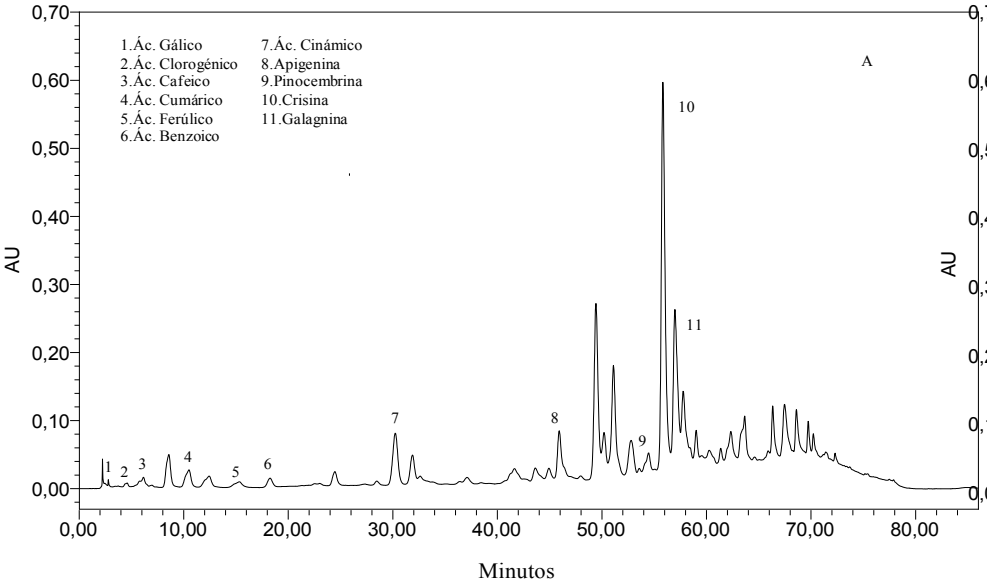
Flavonoides	Pureza STD	CC mg/ml final	Tiempo Retención
Ác. Gálico	96	0,056	2,682
Ác. Protocatequico	90	0,018	3,808
Ác. Clorogénico	99	0,058	4,177
Ác. Cafeico	90	0,036	5,793
Ác. Vainillínico	100	0,020	6,098
Ác. cumárico	98	0,020	9,759
Ác. Ferúlico	90	0,036	11,397
Ác. Sinápico	100	0,020	11,821
Ác. Benzoico	99,5	0,134	17,291
Ac. Elágico	90	0,018	20,860
Ác. Cinámico	99	0,008	29,279
Quercetina	99	0,020	31,480
Kaempferol	99	0,022	40,745
Apigenina	99	0,021	42,411
Pinocembrina	95	0,056	48,293
Crisina	90	0,019	54,902
Galangina	99	0,020	56,442

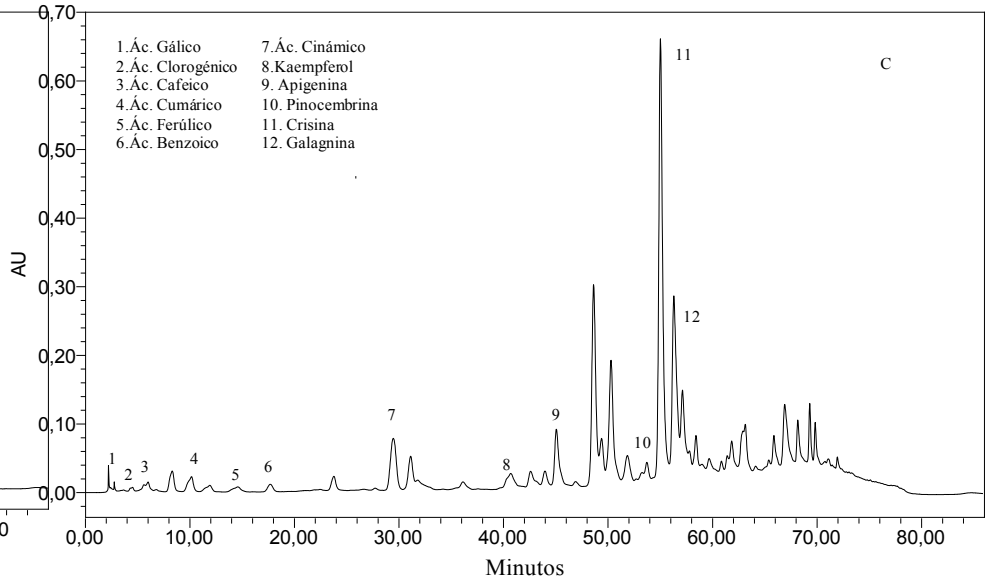
Análisis Estadístico

Las diferencias significativas entre losmétodos de obtención de los EEP y los diferentes compuestos detectados se determinaron mediante análisis de varianza (ANOVA), por la aplicación del método de Fischer. Se utilizó un nivel de significación alfa de 0,05 ($p<0,05$). Para estos procedimientos se trabajó con el software InfoStat v2011e.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dentro de los métodos analíticos utilizados con mayor frecuencia en el estudio del perfil de flavonoides de los propóleos se ha usado con buenos resultados la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Markham*et al.* 1996,Bankova*et al.* 2004,Sawaya*et al.* 2004, Isla *et al.* 2005).
En el análisis por HPLC, los tiempos de retención en una separación cromatográfica dependerán de las condiciones de operación comodel tipo de columna, el flujo y proporción de los solventes a las cuales se realizan los análisis. En la Figura 1 se presentancromatogramasobtenidos de cada uno de los EEP, en los que se identificaron 12 de los 17 flavonoides estudiados.





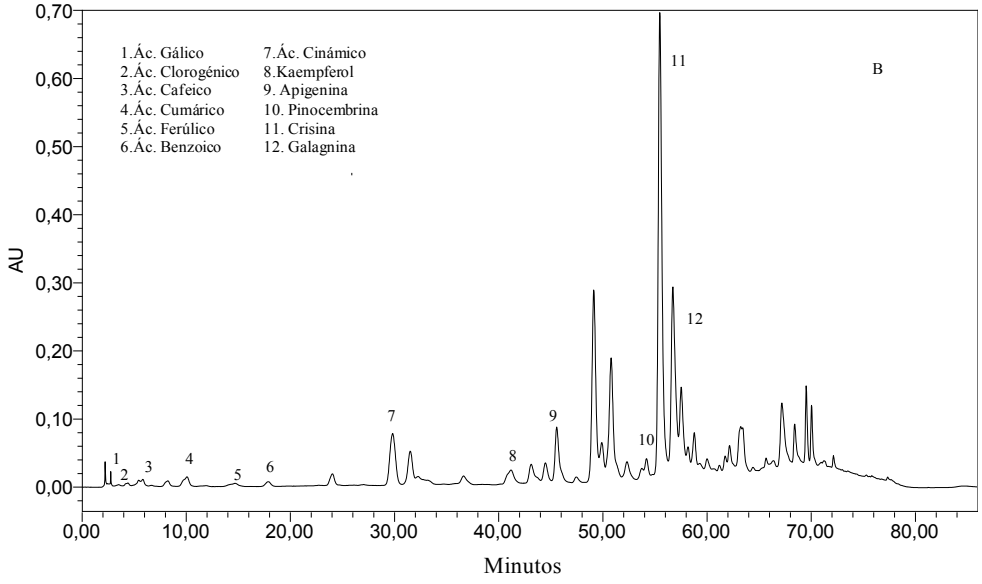


Figura1: Cromatogramas de los EEP correspondiente a las muestras M_1(A), M_2(B)y M_3(C)

Además se puede observar que todos los EEP presentan un perfil de flavonoides constituido principalmentepor ácidos fenólicos y en menor medida por otros compuestos como flavonas y flavonoles. Entre los ácidos fenólicos presentes en todos los EEP encontramos, ácido cafeico, benzoico, ferúlico, cinámico, gálico, mientras que protocatéquico, elágico,vainillínico y sinápiconono se detectaron. Los flavonoides incluyeron flavonas como pinocembrina, galangina y apigenina presentes en todos los EEP mientras que quercetina no se detectó en ninguno de ellos (Figura 1 A, B y C).

Estos compuestos han sido reportados por otros autores al estudiar propóleos de diferentes orígenes geográficos como China, Uruguay (Bonvehi*et al.* 2000), Brasil (De Castro 2001, Duarte *et al.* 2003), Argentina, Australia, Chile, Hungría, Estados Unidos, Nueva Zelanda, Sudáfrica, Tailandia, Ucrania, Uzbekistán (Kumazawa*et al.* 2004), Italia (Bankova*et al.* 2002).Así mismo se han aislado flavonas (apigenina, galangina), flavonoles (kaempferol,), flavanonas (pinobaksina, pinocembrina), chalconas, dihidrochalconas y otros (Marcucci*et al.* 2000, Mateescu 2000,Heo*et al.* 2001,Nafady*et al.* 2003) de diferentes propóleos.Ahn*et al.* (2007) analizaron muestras de diversas regiones de China y los principales compuestos presentes en estas muestras e identificados por estándares fueron los ácidos cafeicos, ferúlico y p-cumárico y los flavonoides, pinocembrina, galangina, crisina, pinobanksina entre otros.

En cambio Isla *et al.* (2005) estudiaron muestras de propóleos colectados en diferentes regiones del norte de Argentina donde los extractos etanólicos fueron analizados por HPLC y comprobaron que la composición química de éstos es similar a la que presentan los propóleos de Europa, Norte América y Nueva Zelanda. En comparación con nuestros resultados obtenidos en muestras provenientes del sur de la Mesopotamia se observaron diferentes perfiles de flavonoides en los EEP analizados aunque presentaron el mismo componente mayoritario (Pinocembrina).

En la figura 2 se presentan las concentraciones de los flavonoides identificados en los diferentes EEP del sur de la Mesopotamia Argentina.Estos valores fueron similares a los reportados por Isla *et al.* (2005) en las provincias de Santiago del Estero y Salta. A fin de simplificar el análisis de los resultados y teniendo en cuenta las diferencias con estudios realizados en nuestro país se puede destacar la presencia de tres componentes cuya suma representa aprox. el 80% del total de los componentes identificados (Pinocembrina, Crisina y Galangina).

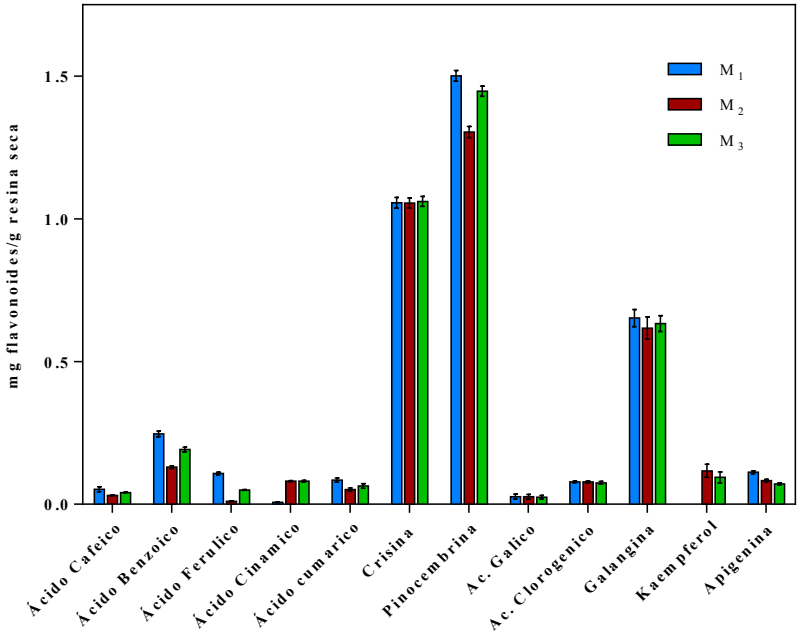


Figura 2: Perfil de flavonoides de los EEP. M_1(azul); M_2(Rojo); M_3 (verde).

A su vez, se determinó la abundancia relativa de flavonoides detectados en los extractos de acuerdo a los diferentes procesos de cosecha, raspado y malla para comprobar variaciones.Los resultados se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Abundancia relativa (%) de los compuestos fenólicos presentes en los extractos de acuerdo a los diferentes métodos de cosecha.

Compuesto	Raspado	Malla	Mezcla
ÁcidoCafeico	$1,32^{cAB}$	$0,87^{bAB}$	$1,06^{bAB}$
ÁcidoFerúlico	$2,75^{eAB}$	$0,28^{aAB}$	$1,30^{cAB}$
ÁcidoCinamico	$0,15^{aAB}$	$2,28^{dAB}$	$2,10^{fAB}$
ÁcidoCumarico	$2,17^{dAB}$	$1,43^{cAB}$	$1,66^{dAB}$
Ac. Galico	$0,69^{b\ A}$	$0,73^{bA}$	$0,65^{a\ A}$
Ac. Clorogenico	$2,0^{d\ AB}$	$2,19^{d\ AB}$	$1,94^{ef\ AB}$
Kaempferol	ND	$2,64^{e\ AB}$	$3,03^{g\ AB}$
Apigenina	$2,85^{e\ B}$	$2,33^{d\ B}$	$1,84^{de\ B}$
ÁcidoBenzoico	$6,29^{f\ C}$	$3,65^{f\ C}$	$4,98^{h\ C}$
Galangina	$16,61^{g\ D}$	$17,33^{g\ D}$	$16,41^{i\ D}$
Crisina	$26,90^{h\ E}$	$29,63^{hE}$	$27,51^{jE}$
Pinocembrina	$38,24^{i\ F}$	$36,63^{iF}$	$37,52^{kF}$

Diferentes letras minúsculas en el mismo método de cosecha indica diferencias significativas entre compuestos mientras que diferentes letras mayúsculas para todos los métodos de cosecha indican diferencias significativas entre compuestos (p<0,05). ND: no detectado

En cuanto a los métodos de cosecha (raspado y malla), se pueden distinguir tres grupos significativamente diferentes asociados a la abundancia relativa de los compuestos identificados (Tabla 3).

El primer grupo constituido por los componentes de menor abundancia relativa (0,15% - 2,75%):ácidoscafeico, ferúlico,

cinámico, cumárico, gálico y clorogénico, apigeninaykaempferol.

El segundo grupo de abundancia relativa comprendida entre 3,65% y 17,33% e integrado por ácido benzoico y galangina(3,5,7-Trihidroxiflavona), flavona hallada en propóleos de Caborca (Hernández *et al.* 2007).

Por último el grupo de los compuestos mayoritarios(26,9% al 38,24%) al que pertenecen crisina(5,7-Dihidroxiflavona) y pinocembrina (5,7-Dihydroxyflavanona) flavonona característica de los propóleos que se asocia con la presencia de árboles de la especie de *Populus*(álamos) y es reportada por primera vez en propóleos producidos en México por Lugo Sepúlveda (2009).

Se puede señalar que en general, entre los diferentes métodos de cosecha no existe efecto significativo sobre la composición fenólica. Estos resultados están acordes con Ordoñez *et al.* (2007) quienes informaron para propóleos de San Juan, Argentina, contenidos de flavonoides similares a los encontrados para propóleos del Norte Argentino, y no observaron diferencias en muestras obtenidas por el método de raspado y malla al igual que los resultados obtenidos en el presente trabajo. Incluso los perfiles obtenidos fueron similares y en todas las muestras de propóleos independientemente del método de recolección y de la época del año se detectó la presencia de galangina considerándolo un flavonoide marcador de la calidad de propóleos.

CONCLUSIONES

Los métodos de cosecha no tienen efecto significativo sobre la composición fenólica global de los EEP.La presencia de estos compuestos demuestra que los EEP se perfilan como un potencial componente para alimentos funcionales aportando compuestos bioactivos de importantes propiedades para la salud, debido a que presentaron un alto contenido de compuestos fenólicos.

BIBLIOGRAFÍA

Agüero MB, Gonzalez M, Lima B, Svetaz L, Sánchez M, Zacchino S, Feresin GE, Schmeda-hirschmann G, Palermo J, Wunderlin D, Tapia A. 2010. Argentinean Propolis from Zuccagnia punctata Cav. (Caesalpinieae) Exudates: Phytochemical Characterization and Antifungal Activity.Journal of Agricultural and Food Chemistry 58(1): 194-201.

Agüero MB, Svetaz L, Baroni V, Lima B, Luna L, Zacchino S, Saavedra P, Wunderlin D, Feresin GE, Tapia A.2014. Urban propolis from San Juan province (Argentina): Ethnopharmacological uses and antifungal activity against Candida and dermatophytes. Industrial Crops and Products 57(0): 166-173.

Agüero MB, Svetaz L, Sánchez M, Luna L, Lima B, López ML, Zacchino S, Palermo J, Wunderlin D, Feresin GE, Tapia A. 2011.Argentinean Andean propolis associated with the medicinal plant Larrea nitida Cav. (Zygophyllaceae). HPLC–MS and GC–MS characterization and antifungal activity. Food and Chemical Toxicology 49(9): 1970-1978.

Araújo da silva J, Brandão Ferreira Itavo CC, Vinhas Itavo L, Da Graça Morais M, Ioriano Franco G, Zeoula LM, Da Silva Heimbach N.2014. Effects of dietary brown propolis on nutrient intake and digestibility in feedlot lambs. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 43: 7. http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982014000700006

Ahn MR, Kumazawa SA, Usui YA, Nakamura J, Matsuka MB, Zhu FC, Tsutomu N. 2007. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. Food chemistry 101(4): 1383-1392.

Bankova PM, Butovska D, Petrov V, Nikolova B, Sabitini AG, Marcazzan GI, Bogdanov S. 2004.Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. Phytochemical Analytical15: 235–240.

Bankova VS, de Castro S L, Marcucci MC. 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. Apidologie 31(1): 3-15.

Bankova VS, Popova M, Bogdanov S, Sabatini AG. 2002. Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. Z. Naturforschung57C(5/6): 530-533.

Banskota AH, Tezuka Y, Prasain JK, Matsushige K, Saiki I, Kadota SH. 1998.Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities'. Nat. Prod.61: 896-900.

Bonvehi JS, Coll FV. 2000. Study on propolis quality from China and Uruguay. Z. Naturforschung 55(9/10): 778-784.

Burdock GA. 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. Food and Chemical Toxicology, 36(4): 347-363.

Cohen HA, Varsano I, Kahan E, Sarrell EM, Uziel Y. 2004. Effectiveness of an herbal preparation containing echinacea, propolis, and vitamin C in preventing respiratory tract infections in children: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter study. ArchPediatryAdolescMed. 158(3):217-21.

da Silva FC, da Fonseca CR, de Alencar SM, Thomazini M, Balieiro JCd., Pittia P y Favaro-Trindade CS. 2013. FoodandBioproductsProcessing 91(1): 28-36.

De Castro SL. 2001. Propolis: Biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee-product. Annual Review of Biomedical Sciences 3: 49-83.

Duarte S, Koo H, Bowen WH, Hayacibara MF, Cury JA, Ikegaky M, Rosalen PL. 2003.Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutansstreptococci. Biological& Pharmaceutical Bulletin 26(4): 527-531.

Falcão SI, Tomás A, Vale N, Gomes P, Freire C, Vilas-Boas M. 2013.Industrial Crops and Products 49: 805-812.

Hegazi A, Abd el hady F. 2002.Egyptian propolis: 3. Antioxidant, antimicrobial activities and chemical composition of propolis from reclaimed lands. Z Naturforsch 57(3-4): 395-402.

Heo MY,Sohn SJ, Au W. 2001. Anti-genotoxicity of galangin as a cancer chemopreventive agent candidate.College of Pharmacy 488(2): 135-150.

Hernández J, Goycoolea F, Quinteros J, Acosta A, Castañeda M, Robles R, Vázquez Moreno L, Velázquez E, Astiazaran H, Lugo E, Velázquez C. 2007. Sonoran Propolis: Chemical Composition and Anti proliferative Activity on Cancer Cell Lines. Planta Med. 73: 1469-1474.

Herrera C, Alvear M, Barrientos L, Montenegro G, Salazar L. 2010. The antifungal effect of six commercial extracts of Chilean propolis on Candida spp. Ciencia e Investigación Agraria, 37: 75-84.

Isla MI, Paredes Guzman JF, Nieva Moreno MI, Koo H, Park YK. 2005. Some chemical composition and biological activity of North Argentine propolis. Journal of Agricultural and FoodChemistry (5): 1166-1172.

Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T. 2004.Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. FoodChemistry 84(3): 329-339.

Lima B, Tapia A, Luna L, Fabani MP, Schmeda-Hirschmann G, Podio NS, Wunderlin DA, Feresin GE.2009.Journal of Agricultural and Food Chemistry 57(7): 2691-2698.

Lugo Sepúlveda RE, Martínez Robinson K, Morales Ramírez G, de La Rosa López R, Noriega Rodríguez J. 2009. Determinación del Origen botánico de propóleos Sonorenses (CABORCA) Mediante HPLC. Invurnus 4(2): 24-30.

Marcucci M. 1995. Propolis: chemical composition biological properties and therapeutic activity. Review. Apidologie 26: 83-89.

Marcucci MC,Ferreres F, Custodio AR, Ferreira MMC, Bankova VS, Garcia-Viguera C, Bretz WA. 2000. Evaluation of Phenolic compounds in Brazilian propolis from different geographic regions. Z. Naturforsch55(1/2): 76-81.

Markham KR, Mitchell KA, Wilkins AL, Daldy JA, Lu Y. 1996. HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. Phytochemistry 42(1): 205-211.

Mateescu C. 2000. Propolis as therapeutic agent. Rumanian Biotechnology Letters 5(5): 329-360.

Mello BCBS, Petrus JCC, Hubinger MD. 2010. Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration.Journal of Food Engineering 96(4): 533-539.

Nafady AM, El-Shanawany MA, Mohamed MH, Hassanean HAH, Nohara T, Yoshimitsu H, Ono M, Sugimoto H, Doi S, Sasaki K, Kuroda H. 2003. Cyclodextrin-enclosedsubstances of Brazilianpropolis. Chemical&pharmaceuticalbulletin 51(8): 984-985.

Ordoñez M, Vera NR, Bedescarrasbure E, Maldonado L, Isla MI. 2007. Análisis comparativo del perfil químico de muestras de propóleo de Calingasta, San Juan, obtenidos por diferentes métodos de recolección y épocas del año. Boletín Lationoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 6(5): 266-267.

Pistelli L, Giorgi I. 2012. Antibacterial activity of extracts containing high concentrations of flavonoids. In A K. Patra (Ed.), Dietary Phytochemicals and Microbes. Springer, New York. pp. 70-72.

Pryzyk E, Dantas AP, Salamao K, Pereira AS, Bankova VS, De Castro SL, AquinoFR. 2003. FlavonoidsandtrypanocydalactivityofBulgarianpropolis. J.Ethnopharmacol 88(2-3): 189-193.

Saavedera N, Barrientos L, Herrera C, Alvear M, Montenegro G, Salazar L. 2011. Effect of Chilean propolis on cariogenic bacteria Lactoba-cillusfermentum. Ciencia e Investigación Agraria, 38:117-125.

Sawaya ACHF, Tomazela DM, Cunha IBS, BankovaVS, Marcucci MC, Custodio AR, Eberlin MN. 2004. Electrospray ionization mass spectrometry finger printing of propolis. Analyst 129(8): 739-744.

Wollenweber E, Buchmann S. 1997. Feral honey bee in the Sonoran Desert: propolis sources other than Poplar (Populus spp.). ZeitschriftfürNaturforschung, 52(7-8): 530-535.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el aporte financiero de la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Entre Ríos. Este trabajo fue financiado por ACTIER, Agencia de Ciencia, Tecnología e Innovación Entre Ríos. Ministerio de Desarrollo

Social, Empleo, Ciencia y Tecnología. Gobierno de Entre Ríos. Programa de Investigación y Desarrollo: Desarrollo de un Cluster en Biociencias aplicadas a la Salud, el Ambiente y la Agroindustria. Agradecemos al Sr Germán RothCardenas, quien proporcionó las muestras de propóleo para el estudio.

APORTE DE ANTIOXIDANTES DE LA DIETA DE UN GRUPO ESTUDIANTES UNIVERSITARIOS

Rossi M. C., Samman N. C.

(1) Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO), CONICET - UNT, and Instituto de Química Biológica "Dr. Bernabé Bloj", Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, UNT. Chacabuco 461, T4000ILI – San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina.
e-mail: cotyrossi@hotmail.com; nsamman@fbqf.unt.edu.ar

Resumen: Numerosos estudios reportan los efectos beneficiosos para la salud de los compuestos fenólicos, pero no se han realizado estudios para recomendar ingestas diarias. Este trabajo tiene como objetivo identificar los principales alimentos aportadores consumidos y estimar la ingesta diaria de polifenoles en un grupo de jóvenes universitarios.
Se realizaron recordatorios de 48 h, en jóvenes universitarios seleccionados al azar de tercer año de la Facultad de Bioquímica.
La muestra estuvo constituida por 59 estudiantes. Para calcular el aporte de sustancias antioxidantes de los alimentos de la dieta se usó las tablas de composición incluidas en Phenol-explorer.
Se observó una ingesta muy baja de alimentos descriptos como principales fuente de compuestos fenólicos.
Los rangos de consumo de los alimentos que aportan mayor cantidad de polifenoles son: mate cebado (0-1150 cc/día), café (0-750 cc/día), té (0-500 cc/día) y cebolla (0-40 g/día).
El consumo promedio de polifenoles totales fue de 911 mg/día. La distribución de los diferentes compuestos fenólicos aportado por la dieta fue 51,55% de ácidos fenólicos; 34,02% flavonoides; 12,90% otros polifenoles y 1,45% lignanos.
Este estudio es un primer paso hacia la generación de datos de ingesta de compuestos fenólicos y de compuestos antioxidantes totales.

Palabras clave: dieta, estudiantes universitarios, antioxidantes, compuestos fenólicos.

Abstract: Numbers of studies report the beneficial health effects of phenolic compounds, but there are no studies that recommend daily intakes. This work aims to identify the main contributors foods consumed and estimate the daily intake of polyphenols in a group of university students.
Reminders of 48 h were performed in randomly selected young third-year university Faculty of Biochemistry.
The sample consisted of 59 students. To calculate the contribution of antioxidants from foods, composition tables included in Phenol-explorer was used. A very low intake of foods described as major source of phenolic compounds was observed.
The ranges of consumption of foods that contribute most polyphenols were mate (0-1150 cc/day), coffee (0-750 cc/day), tea (0-500 cc/day) and onion (0- 40 g/day).
The average consumption of total polyphenols was 911 mg/day. The distribution of the different phenolic compounds provided by the diet was 51.55% of phenolic acids; 34.02% flavonoids; other polyphenols 12.9% and 1.45% lignans.
This study is a first step towards generating data intake of phenolic compounds and total antioxidant compounds.

Key words: Diet, university students, antioxidants, phenolic compounds

INTRODUCCIÓN

La alimentación ejerce una gran influencia en la salud de las personas, afectando su rendimiento físico e intelectual (M.J. Oliveras López et al, 2006; Espinoza, L.,et al 2011; A. Izquierdo Hernández, 2013). Además de considerar el aporte de macro y micronutrientes de las dietas, es importante realizar una evaluación del contenido de otras sustancias que tienen actividad biofuncional. Estas otorgan a los alimentos características que permiten incluirlos en la definición de alimentos funcionales. Recientemente la Academia de Nutrición y Dietética elaboró un documento donde los define como "*alimentos integrales, junto con aquellos que han sido fortificados, enriquecidos o alimentos mejorados que tienen un efecto potencialmente beneficioso en la salud cuando se consume como parte de una dieta variada de forma regular a niveles eficaces*". Agrega que cada vez es mayor la evidencia de que algunos componentes de los alimentos que no se consideran nutrientes en el sentido tradicional, pueden proporcionar beneficios para la salud. El uso de alimentos para proporcionar efectos favorables más allá de la prevención de las deficiencias es una progresión razonable de intervención nutricional tradicional (Academia de Nutrición y Dietética, 2013). Entre estos compuestos se encuentran los prebióticos, probióticos, fibra dietaria y componentes con actividad antioxidante. Estos últimos están presentes en alimentos de origen vegetal, pueden tener gran impacto en la prevención de enfermedades no trasmisibles como enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y cáncer (S. Wang et al, 2011). Estudios epidemiológicos sugieren asociaciones entre el consumo de alimentos ricos en polifenoles y la prevención de enfermedades cardiovasculares y distintos tipos de cáncer entre otras. Se les atribuyen también propiedades anti envejecimiento (A. Scalbert et al, 2005). Todas estas características han hecho que el interés por las sustancias antioxidantes aumente en los últimos años.

Los polifenoles se clasifican en ácidos fenólicos, estilbenos, lignanos, flavonoides y taninos. Los mismos provienen de alimentos de origen vegetal. Los ácidos fenólicos se encuentran ampliamente distribuidos en los alimentos. Los que se encuentran más a menudo son el ácido ferúlico y el cafeico. El salvado de trigo contiene abundante cantidad de ácido ferúlico, mientras que el ácido cafeico se encuentra en frutas, vegetales y café (Kron et al., 1997).

Los flavonoides pueden dividirse en varias clases, algunos de ellos son las antocianidinas, flavonas, flavonoles. Por su actividad estrogénica, las isoflavonas son consideradas especialmente en los últimos tiempos, ya que tendrían un rol preventivo de cáncer de mamas y osteoporosis (Clifford and Scalbert, 2000). Entre los estilbenos se destaca el resveratrol, por sus propiedades anticarcinogénicas. Esta clase de compuesto fenólico no se encuentra ampliamente distribuida en los alimentos (Jang et al., 1998).

Los lignanos son polímeros complejos de moléculas fenólicas, reconocidas como fitoestrógenos (Adlercreutz and Mazur, 1997).

Por último, al mencionar otros polifenoles se hace referencia a compuestos que se producen por la polimerización de flavonoides y ácidos fenólicos (Santos-Buelga and Scalbert, 2000).

Se han realizado numerosos estudios sobre el contenido de compuestos bioactivos en alimentos, pero son escasos los que evalúan la ingesta diaria a través de la dieta.

En este trabajo se analizará el consumo de polifenoles con actividad antioxidante. Los taninos no se considerarán debido a que ejercen una actividad antinutricional (A.M. Camean Hernández, M. Repetto Jiménez, 2012).

Conocer el aporte de los alimentos incluidos en la dieta habitual es fundamental para desarrollar políticas alimentarias y campañas de difusión sobre alimentación que contribuyan a fomentar el consumo de esos compuestos benéficos; también es útil para realizar intervenciones en el sector educativo y de salud pública.

Los jóvenes universitarios pasan mucho tiempo fuera de sus hogares, en muchos casos llegan a estudiar desde lugares alejados a los centros de estudio y esta independización respecto a la alimentación hogareña se ve reflejada en su alimentación. Por esta razón este trabajo propone evaluar la alimentación de este grupo poblacional con especial referencia al consumo de compuestos con actividad antioxidante (C. Troncoso, J. P. Amaya, 2009).

En Argentina entre las principales causas de muerte se encuentran las enfermedades isquémicas del corazón, y cerebrovasculares, y las neoplasias malignas (Indicadores básicos de Salud, OPS, 2012).

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es determinar el consumo diario de polifenoles en un grupo de jóvenes universitarios, identificar los principales alimentos aportadores consumidos y sugerir aquellos que sean ricos en polifenoles y no sean habituales en la dieta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron en jóvenes universitarios seleccionados al azar, recordatorios de 48 h, incluyendo un día hábil y un día de fin de semana. Se consideró que todos fueran sanos y consumieran alimentos en sus hogares y/o en comedores cercanos a la universidad en los que eligieran libremente su alimentación.

Los jóvenes seleccionados se encuestaron durante dos semanas en tres diferentes franjas horarias de asistencia a clases y teniendo en cuenta no repetir la persona ya encuestada. Se les solicitó tener en cuenta además de las comidas realizadas, todas las bebidas no alcohólicas e infusiones. Se incluyó el registro de sexo, edad, peso y talla. Se excluyeron individuos con enfermedades, embarazadas y mujeres en período de lactancia.

Para calcular la cantidad de sustancias antioxidantes aportada por los alimentos se usaron diferentes tablas de contenido de compuestos antioxidantes disponibles en Phenol-explorer (http://phenol-explorer.eu/). Ésta es la primera base de datos integral sobre el contenido de polifenoles en alimentos. Aporta más de 35.000 valores de contenido de 500 polifenoles diferentes en más de 400 alimentos. Estos datos se derivan de la recolección sistemática de más de 60.000 valores de contenido de polifenoles a partir de más de 13.000 publicaciones evaluadas críticamente antes de su inclusión en la base de datos. En el caso de los alimentos regionales que no se incluyen en la Base mencionada, se utilizaron trabajos publicados (Anusic, 2011; López Córdoba, 2011; Bastos, 2007). Solo se consideraron aquellas sustancias antioxidantes no nutrientes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El número total de encuestados fue 59 estudiantes, 14 varones y 45 mujeres de edades comprendidas entre 20 y 35 años.
Los alimentos que fueron consumidos por el grupo en mayor cantidad diaria se muestran en la tabla 1. Los resultados referentes a tipo y cantidades de alimentos consumidos y su contenido de polifenoles según sexo se pueden observar en las tablas 2 y 3. Los rangos de consumo de los alimentos aportadores de polifenoles incluidos en la dieta fueron mate cebado (0-1150 cc/día), café (0-750 cc/día), té (0-500 cc/día) y cebolla (0-40 g/día).
En lo referente a consumo de alimentos, se observó una ingesta muy baja de aquellos descriptos como principales fuente de compuestos fenólicos, a pesar de que varios de ellos son producidos en la provincia de Tucumán (palta, frutos rojos como arándanos y moras). El consumo de verduras y frutas fue también deficiente. Los principales aportadores de compuestos fenólicos de la dieta de los estudiantes fueron las infusiones como café, té y mate. Se observó un alto consumo de alimentos refinados como harinas y panes, mientras que aquellos productos integrales que aportan mayores cantidades de compuestos fenólicos no figuran entre los principales alimentos consumidos. Estos hábitos alimentarios además de determinar un bajo consumo de sustancias antioxidantes, no contribuyen al cumplimiento de las recomendaciones de las guías alimentarias.
En un trabajo que analiza el aporte de polifenoles provenientes de frutas y verduras realizado en Francia, se observó que los principales alimentos aportadores eran manzanas, frutillas y uvas en el grupo de frutas y papas, lechuga y cebolla en el grupo de verduras, sin diferencias significativas entre ambos sexos (Brat et al, 2006). Se debe prestar especial atención a la yerba mate como un aportador importante de polifenoles, por ser un producto propio de la región y consumido por gran parte de la población no sólo del país sino también de países vecinos como Paraguay y Uruguay (Bracesco et al, 2011; Silva, 2011).

Tabla 1- Consumo de alimentos en el grupo de estudiantes universitarios

Alimento	Cantidad Consumida (g/día)	Contenido de Polifenoles (mg/100 g)	Polifenoles Consumidos (mg/día)
Mate cebado	100,0	394,0	394,0
Café	135,6	214,75	289,9
Té	110,5	100,0	110,5
Cebolla	16,2	5,4	87,5
Pan	149,8	23,8	35,6
Harina	82,1	30,4	9,12
Fideos	29,2	30,4	8,81

Tabla 2 - Consumo del grupo encuestado de mujeres

Alimento	Cantidad Consumida (g/día)	Contendido Polifenoles (mg/100 g)	Polifenoles Consumidos (mg/día)
Pan	140,6	23,8	33,3
Café	117,2	214,7	251,3
Té	103,8	100	103,8
Mate	98,5	394	386,1
Harina	83,6	30,4	25,2
Papa	40,4	28,3	11,4
Fideos	27,5	30,4	8,2

Tabla 3- Consumo del grupo encuestado de varones

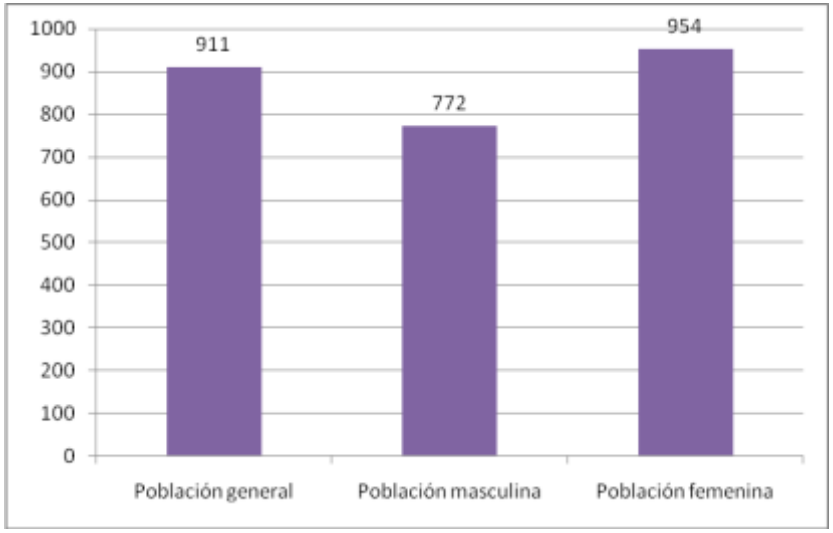
Alimento	Cantidad Consumida (g/día)	Contenido de Polifenoles (mg /100g)	Polifenoles Consumidos (mg/día)
Pan	181,2	23,8	43,0
Café	239,6	214,7	513,2
Harinas	89,3	30,4	27,0
Té	62,5	100,0	62,5
Arroz	55,4	1,08	0,6
Manzana	53,7	5,73	3,0
Mate	48,0	394,0	189,1

En la Figura1 se muestra el consumo promedio de polifenoles totales para la población y separado por sexo. Se puede observar la mayor ingesta de la población femenina, debida fundamentalmente al aporte de la mayor cantidad de té, mate, cereales y papa incluidos en su dieta. El aporte en la población masculina es menor, debido a un menor consumo medio de infusiones ricas en polifenoles.

A pesar de numerosos estudios que reportan los efectos beneficiosos para la salud de los compuestos fenólicos, no se han determinado valores de referencia. Por esta razón, en el presente trabajo no es posible comparar las ingestas observadas con recomendaciones.

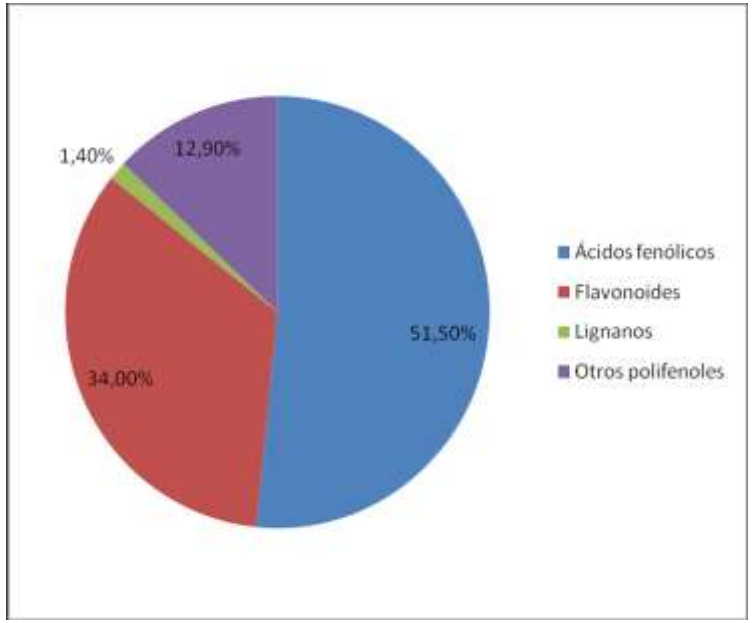
Otros trabajos similares reportan una ingesta diaria de polifenoles de aproximadamente 1g/día (Kühnau et al, 1976; Scalbert, 2000), un valor similar al observado en la media consumida por el grupo evaluado.

Figura 1 -Consumo diario de compuestos fenólicos totales (miligramos/día).



En la Figura 2 se muestra la distribución porcentual de los distintos tipos de compuestos fenólicos aportados por la dieta. El aporte de estilbenos fue despreciable por lo cual no está incluido en el gráfico.

Figura 2- Distribución de compuestos fenólicos aportado por los alimentos consumidos diariamente.



En la tabla 4 se enumeran los principales alimentos aportadores de polifenoles de acuerdo a información obtenida a partir de bibliografía y de la base de datos. Como se ha mencionado, muy pocos de ellos se incluyen en forma significativa en la dieta del grupo poblacional estudiado.

Tabla 4- Alimentos aportadores de compuestos fenólicos

Alimento	Media	Mín	Máx
Sorgo	412,8	0,0	412,8
Germen de trigo	314,1	391,2	1096,0
Harina refinada	83,6	0,0	83,6
Pan de salvado	147,2	0,0	147,2
Frutos rojos	416,7	20,0	1950,0
Café	214,8	156,8	272,7
Té verde	104,5	12,2	134,9
Té negro	103,8	0,0	103,8
Brócoli	198,5	25,0	337,0
Palta	152,1	24,2	187,0
Espinaca	248,6	109,9	483,5
Coliflor	81,7	10,4	274,0

CONCLUSIONES

La población estudiantil universitaria presenta una dieta pobre en alimentos ricos en compuestos fenólicos, como frutas, vegetales frescos y cereales integrales.
Se requieren estudios para determinar valores de ingestas adecuados de estos compuestos para prevenir enfermedades y/o producir los mencionados efectos benéficos para la salud.
Se debe mencionar ciertas pautas a tener en cuenta al interpretar los resultados: la base de datos no es propia de la región lo cual influye en el contenido total de compuestos antioxidantes; se informa sobre valores totales sin considerar su actividad biológica determinada por su biodisponibilidad, y las pérdidas por procesamiento de alimentos.
Si bien el aporte de antioxidantes a través de los compuestos fenólicos es de gran importancia, para realizar una estimación de antioxidantes totales deben ser consideradas también vitaminas con este tipo de actividad como vitamina C, E y compuestos carotenoides.
El presente trabajo es un primer paso hacia la generación de datos de ingesta de este tipo de compuestos y seguidamente de compuestos antioxidantes totales. Estos resultados conducirían a datos más completos para posteriores estudios epidemiológicos.

BIBLIOGRAFÍA

Adlercreutz, H., &Mazur, W. (1997). Phyto-oestrogens and Western diseases.Annals of medicine, 29(2), 95-120.
Anusic, N. (2012). Identificación y cuantificación de polifenoles en yerba mate y brebajes.
Bastos, D., Saldanha, L., (2007). Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (Ilex paraguariensis) and Green Tea (Cameliasinensis) Extracts. *Molecules, 12*(3), 423-432.
Bracesco, N., Sanchez, (2011) Recent advances on Ilex paraguariensis research: Minireview. Journal of Ethnopharmacology, 136(3), 378-384.
Brat, P., Georgé, S., Bellamy, A., Du Chaffaut, L., Scalbert, A., Mennen, L., &Amiot, M. J. (2006). Daily polyphenol intake in France from fruit and vegetables.*The Journal of nutrition*, *136*(9), 2368-2373.
Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*, *56*(11), 317-333.
Clifford1 M. N. , andScalbert A.; (2000) Ellagitannins – nature, occurrence and dietary burden; Journal of the Science of Food and Agriculture Volume 80, Issue 7, pages 1118–1125, 15
Crowe K. M., Francis C.; (2013) Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Functional Foods; Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics, Vol. 113, Issue 8, p1096–1103
Curin, Y., &Andriantsitohaina, R. (2005).Polyphenols as potential therapeutical agents against cardiovascular diseases. *Pharmacological reports*, *57*, 97.

D Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., &Masella, R. (2007).Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali-IstitutoSuperiore di Sanita*, *43*(4), 348.

Espinoza, L., Rodríguez, F., Gálvez, J., &MacMillan, N. (2011). Hábitos de alimentación y actividad física en estudiantes universitarios. Revista chilena de nutrición, 38(4), 458-465.

Fernández, A. M. C., & Jiménez, M. R. (2012). Toxicología alimentaria. Ediciones Díaz de Santos.

Izquierdo Hernández, A., Armenteros Borrell, M., Lancés Cotilla, L., & Martín González, I. (2004). Alimentación saludable. *Revista Cubana de Enfermería*,*20*(1), 1-1.

Jang M, Pezzuto JM, (1998) Cancerchemopreventiveactivity of resveratrol; Drugsunder experimental and clinicalresearch, 25(2-3), 65-77

Kuhnau J.(1976) Theflavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. WorldRevNutrDiet. ;24:117–91.

López Córdoba A. F.; (2012) Desarrollo de sistemas de encapsulación compuestos para la protección de extractos antioxidantes de yerba mate**;** Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) La Plata, Buenos Aires

Neveu, V., Perez-Jimenez, J., Vos, F., Crespy, V., Du Chaffaut, L., Mennen, L., &Scalbert, A. (2010). Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database*, bap024.

Oliveras lópez M J, Nieto Guindo P ; (2006) Evaluación nutricional de una población universitaria; Nutrición hospitalaria ;21(2): 179-183

OMS, Indicadores básicos de Salud, 2012

Pérez-Jiménez, J., Neveu, V., Vos, F., &Scalbert, A. (2010). Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. *European journal of clinical nutrition*, *64*

SantosBuelga, C., &Scalbert, A. (2000).Proanthocyanidins and tannin-like compounds–nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. Journal of the Science of Food and Agriculture, 80(7), 1094-1117.

Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2005).Dietary polyphenols and the prevention of diseases. Critical reviews in food science and nutrition, *45*(4), 287-306.

Scalbert A, Williamson G. (2010) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. J Nutr.;130:2073S–85S.

Silva, R. D. A., Bueno, A. L. S. ;(2011) The effect of aqueous extract of gross and commercial yerba mate (Ilex paraguariensis) on intra-abdominal and epididymal fat and glucose levels in male Wistar rats. *Fitoterapia, 82*(6), 818-826 2011

Spencer, J. P., Abd El Mohsen, M. M., Minihane, A. M., &Mathers, J. C. (2008). Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. *British Journal of Nutrition*, *99*(01), 12-22.

Troncoso, C., & Amaya, J. P. (2009). Factores sociales en las conductas alimentarias de estudiantes universitarios. Revista chilena de nutrición, 36(4), 1090-1097.

Wang, S., Melnyk, J. P., Tsao, R., &Marcone, M. F. (2011).How natural dietary antioxidants in fruits, vegetables and legumes promote vascular health. *FoodResearch International*, *44*(1), 14-22.

EFECTO DEL PAN CON INULINA SOBRE LA MICROBIOTA EN HECES EMPLEANDO UN MODELO EXPERIMENTAL DE RATAS EN CRECIMIENTO.

Salinas M. V.[1], Hamet M. F. [1], Weisstaub A. [2], Ronayne de Ferrer P. [2], Zuleta A. [2], Abraham A. [1], Puppo M. C. [1, 3].

1-CIDCA (UNLP-CONICET), 47 y 116 s/n, CP 1900 La Plata, Bs. As., Argentina.
2-Cátedra de Bromatología (FFyB-UBA), Junín 956, CP 1113 Ciudad Bs.As., Argentina.
3-FCA y F (UNLP), 60 y 119, CP 1900 La Plata, Bs. As., Argentina.

Palabras claves: Prebiótico, microbiota intestinal, modelo de ratas en crecimiento.

Resumen: La población está interesada en optar por dietas saludables, fundamentalmente por alimentos que presenten efectos fisiológicos con importante repercusión en la salud. El desarrollo de pan con prebiótico y calcio seria una alternativa interesante para ofrecer para el consumo humano. Se estudió la modificación de la microbiota en heces y de la fermentación colónica en ratas en crecimiento alimentadas con una dieta a base de pan con inulina y calcio. Para ello, tres lotes de ratas fueron alimentadas con diferentes dietas: control (DC), con prebiótico-synergy1 (DS) y con pan elaborado con calcio y prebiótico (DP). Se determinó la ingesta y el incremento de peso del animal durante la experiencia (60 días). Durante los días 0, 2, 23 y 50 se recogió materia fecal (MF); con estas muestras por un lado se realizó un recuento de *lactobacillus* y *bifidobacterium*, y por otro lado se le extrajo, purificó y amplificó el ácido desoxirribonucleico (ADN) con el fin de hacer una electroforesis con gradiente desnaturalizante en gel de poliacrilamida (DGGE). Una vez sacrificadas, se removió el ciego y se registró el peso y pH del contenido cecal. Las ratas alimentadas con prebiótico (DS y DP) presentaron menor ingesta, mayor peso del ciego y contenido cecal más acido que las alimentadas con DC, asociado con un aumento de microorganismos benéficos para la salud mediado por el efecto del prebiótico en la dieta.

INTRODUCCIÓN

Los hidratos de carbono son nutrientes mayoritarios de la dieta, presentan una biodisponibilidad que depende de la posibilidad de ser absorbidos en el intestino delgado. Según sean o no hidrolizados en el tracto gastrointestinal, se clasifican en disponibles y no disponibles. Los disponibles se caracterizan por tener uniones α entre sus monómeros, mientras que los no degradables constituyen la fracción indigerible, con uniones β, generalmente no hidrolizables, también llamada fibra dietaria. Estos compuestos no degradables, presentes en las estructuras vegetales, llegan intactos al intestino grueso, donde pueden ser sustratos de las enzimas bacterianas de la flora intestinal, provocando diferentes efectos fisiológicos en el huésped: sobre el funcionamiento intestinal, la colesterolemia, glucemia e insulinemia (Roberfroid 1993).

Numerosos estudios establecen la relación entre flora intestinal y salud. La posibilidad de modificar la microflora intestinal mediante algún componente de la dieta ha atraído la atención tanto de tecnólogos, industriales y científicos como por los consumidores, porque de este efecto derivan efectos fisiológicos de importante repercusión en la salud humana. Esta capacidad de modificar la flora se conoce como efecto prebiótico. Para que un componente sea incluido en la categoría de prebiótico se deberán cumplir dos criterios: 1) escapar de la digestión por las enzimas endógenas del tracto digestivo humano (componente resistente); 2) ser fermentado selectivamente por las bacterias sacarolíticas de la microflora colónica (*Bifidobacterias y Lactobacillus*). Estas bacterias intestinales metabolizan en forma rápida estos oligosacáridos y polisacáridos, produciendo ácidos grasos de cadena corta (butírico, acético y propiónico) que bajan el pH en el lumen del intestino grueso. Las Bifidobacterias y Lactobacillus son resistentes al medio ácido mientras que las bacterias perjudiciales, como el *Clostridium*, son sensibles a las condiciones ácidas (Gibson y Roberfroid 1995).

Existen estudios que muestran evidencia promisoria de que la inulina y fructo-oligosacaridos (FOS) aumentan la absorción de calcio, magnesio y hierro en humanos (Coudray *et al.* 1997 y 2003). Además la inulina tiene una larga historia de uso por los diabéticos, y de hecho, se ha informado que beneficia a los diabéticos en altas dosis (40-100mg/día) (Niness 1999). El ácido butírico formado, tiene un efecto protector de la mucosa colónica, aumentando la proliferación de células normales y produciendo mayor secreción de mucina, (Pool-Zobel *et al.* 2002).

Los fructanos más ampliamente estudiados y de mayor uso a nivel industrial son la inulina, la oligofructosa y los FOS (Biedrzycka y Bielecka 2004). Se caracterizan por sus enlaces de tipo β (2→1) entre las unidades de fructosa, con un grado de polimerización que varía entre 2 y 60 unidades, y se les considera carbohidratos de cadena corta o de bajo nivel de polimerización (Englyst y Hudson 1996, Roberfroid 2005b).

Los fructanos por su configuración química no pueden ser hidrolizados por las enzimas digestivas del hombre, por lo que permanecen intactos en su recorrido por la parte superior del tracto gastrointestinal, pero son hidrolizados y fermentados en su totalidad por las bacterias (*Bifidobacterias* y *Lactobacillus)* de la parte inferior del tracto gastrointestinal (intestino grueso, colon). De esta manera, este tipo de

compuestos se comportan como fibra dietética (Flamm *et al.* 2001, Slavin 2003).

El uso de inulina enriquecida con FOS aporta beneficios a la salud: a) provocan la disminución de los niveles lipídicos y glucosa en sangre y la acción laxante; b) poseen la capacidad de la inulina de modular la flora intestinal (Roberfroid 1993, Gibson *et al.* 1995, Rastall *et al.* 2000). Además mejoran la absorción de minerales de la dieta, el contenido mineral óseo (CMO) y la estructura del hueso (Harrington *et al.* 2001, Scholz-Ahrens y Schrezenmeir 2007).

En los últimos años se han realizado algunos estudios relacionados con la incorporación de minerales (Ranhotra *et al.* 1997, 2000) y prebióticos (Wang *et al.* 2002, O' Brien *et al.* 2003) a harinas de cereales para panificación, pero queda por dilucidar acerca de la relación existente entre los nutrientes incorporados y la modificación de la microbiota durante la experiencia con un pan elaborado en nuestro laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Animales. Se trabajó con ratas *Wistar* machos obtenidas por parto normal luego de 21 días de gestación (n=24), las madres pertenecientes al bioterio de la Cátedra de Bromatología y Nutrición de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires fueron alimentadas con dieta stock para roedores a libre demanda. La madre y su progenie (6 a 8/madre) se trasladaron a jaulas plásticas hasta el destete (alrededor de 21 días de edad). Finalizado el destete, se pesaron y se distribuyeron al azar en tres grupos de 8 ratas cada uno de manera que el peso promedio inicial de cada grupo no presentara diferencias estadísticamente significativas entre sí.

Durante toda la experiencia, se mantuvieron los animales en jaulas galvanizadas individuales, con piso de malla, para controlar las condiciones de higiene y evitar la coprofagia. Se respetaron los ciclos luz-oscuridad de 12 horas (8-20 hs: ciclo luz), la temperatura ambiente (21±1) ºC y la humedad relativa (60±10) %, para no alterar el ritmo de alimentación. En todo momento se controló el agua para beber (dispuesta a libre demanda). Se siguieron las normas de la guía para el cuidado y uso de animales de experimentación de acuerdo al National Institute of Health (NIH) aprobado por el Comité de Ética, Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

El pan utilizado fue elaborado con harina de trigo, carbonato de calcio e inulina enriquecida con FOS (synergy1) con la siguiente composición (base seca): 10,4% proteínas, 10,2% inulina/FOS, 4,38% fibra dietaria total, 4,04% lípidos y 2,728% cenizas.

Métodos

Dietas. Las dietas fueron confeccionadas de acuerdo al documento elaborado por el American Institute of Nutrition Rodent Diets (Revers 1993), los ingredientes empleados en la elaboración de las dietas se muestran en la Tabla 1.

Las dietas con prebiótico-synergy1 (DS) y con pan elaborado con calcio y prebiótico (DP) se elaboraron de manera tal que el 10% p/p de la concentración final de fibra sea proveniente directamente de synergy1 o del pan con synergy1, respectivamente. En la dieta control (DC) se utilizó celulosa como fuente de fibra (5% p/p).

Tabla 1. Ingrediente empleado por kg de dieta.

	DC	DS	DP
Caseinato de K (g)	200	200	116
Sales minerales (g)	35	35	16,2
Mezcla vitamínica (g)	10	10	10
L-Cistina (g)	3	3	3
Solución de Vit A (ml)	1	1	1
Aceite de maíz (g)	69	69	41,2
Colina (ml)	7,1	7,1	7,1
Synergy1 (g)	-----	100	-----
Pan (g)	-----	-----	763,4
Fibra (celulosa) (g)	50	-----	-----
Dextrina (g)	624,9	574,9	42,1

Diseño experimental. Se utilizaron tres lotes de 8 animales cada uno a los que se les suministró las dietas DC, DS y DP durante 60 días. En la Figura 1 se muestra un esquema del diseño experimental usado y la cronología de los ensayos realizados durante la experiencia antes del sacrificio de los animales.

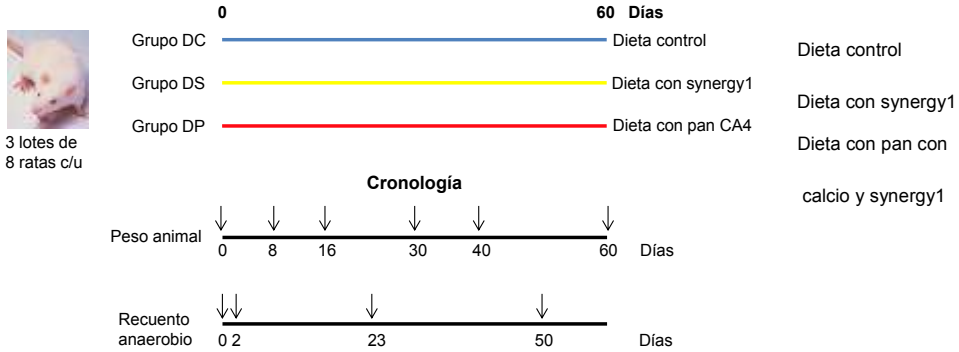


Figura 1. Esquema del diseño experimental utilizado.

Ingesta. El consumo de dieta cada dos o tres días se calculó por la diferencia de peso del comedero con una balanza electrónica Mettler PC 4400 (precisión ± 0,1) g y en base al consumo se calculó la ingesta diaria (g/día) e ingesta total durante toda la experiencia.

Peso corporal. Se efectuó el registro de peso de cada cría al inicio de la experiencia, durante y al finalizar la misma, utilizando balanza analítica OHASUS Explorer (precisión ± 0,01) g.

Recuento de anaerobios viables. Se tomó muestra de materia fecal, se resuspendió en buffer PBS, y se sembró 0,1ml en agar MRS (De Man *et al.* 1960) con cys (0,05% p/v) por duplicado. Las placas de Petri se incubaron en anaerobiosis a 37 °C durante 48 hs. Finalmente, se contó el número de colonias y el resultado se expresó en unidades

formadoras de colonias por gramo de materia fecal -MF- (ufc/g MF).

Análisis de diversidad microbiológica. Se estudió la huella genética de la microbiota intestinal mediante amplificación de regiones variables de ARNr 16S por PCR (Reacción de polimerasa en cadena) y posterior separación en geles de poliacrilamida con gradiente desnaturalizante (DGGE). Para ello se extrajo ADN genómico de muestras de materia fecal utilizando un kit comercial específico (AccuPrepStool ADN Extraction kit, BIONEER, Corea) (Gueimonde *et al.* 2004) que luego fue amplificado utilizando los oligonucleotidos 518R/341F-GC. Los amplicones resultantes fueron separados por DGGE utilizando un gradiente desnaturalizante 40-60% según Hamet *et al.* 2013.Una vez finalizada la corrida electroforética, los geles fueron incubados en la solución de teñido (Sybr Gold, Invitrogen, USA) en oscuridad durante 30 minutos y finalmente fueron reveladas con luz UV en un transiluminador (MaestroGen, Taiwan).
El análisis de los perfiles obtenidos por estas técnicas se realizó numéricamente digitalizando las imágenes de los geles y procesándolos con el programa Gelcompar. Este programa realiza el análisis numérico de los patrones de bandas y además incluye herramientas estadísticas para la interpretación de los datos.

Sacrificio de las ratas. Una vez alcanzado el tiempo final del experimento, 60 días, los animales fueron sacrificados bajo anestesia (0,1 mg de clorhidrato de ketamina/100 g de peso corporal + 0,1 mg de maleato de acetopromazinc/100 g de peso corporal).

Peso y pH del ciego. Para evaluar el efecto de las diferentes dietas sobre la fermentación colónica se pesó el ciego en una balanza analítica y se determinó el pH del contenido cecal.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 2 se muestra la cantidad de dieta expresada en gramos/día y la ingesta total de dieta consumida durante toda la experiencia por cada lote de animales estudiado. Se observa que las ratas a las que se le ha administrado la dieta control (DC) consumieron significativamente más cantidad de dieta por día que las ratas alimentadas con dietas con Synergy1 (DS) y con pan con calcio + Synergy1 (DP). Los animales alimentados con DC consumieron significativamente mayor cantidad de dieta durante toda la experiencia que aquellos a los que se le proporcionó DS y DP.

Tabla 2. Consumo de dieta de los diferentes lotes.

Lote	Consumo			
	g dieta/día	mg Ca/día	g *In*/día	Total (g)
DC	19 **b**	94 **b**	0,00	1108 **b**
DS	15 **a**	76 **a**	1,50	899 **a**
DP	16 **a**	80 **a**	1,12	940 **a**

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas (p< 0,05).

Las diferentes dietas fueron administradas a libre demanda, por lo que las dietas con inulina como fuente de fibra provocaron mayor saciedad que la dieta con celulosa (DC).

Levrat *et al.* (1991) estudiaron el efecto de la dieta con inulina (0 a 20% p/p) sobre los ácidos grasos generados durante la fermentación junto a la acumulación de calcio en el ciego. Estos autores señalaron una reducción en el consumo de las dietas con valores de inulina > 10%, atribuyendo esa disminución a la acumulación de fluidos en el intestino.

Se pesaron los animales al iniciar el experimento, durante la experiencia y al final del ensayo. Los lotes de ratas empleados tuvieron pesos iniciales significativamente diferentes entre sí (Tabla 3). Esto se debe a que la experiencia del lote control se hizo en una primera etapa y las experiencias en ratas a las que se les administraron las dietas DS y DP fueron en simultáneo y en una etapa posterior. Si bien DC y DS presentaron mayor aumento de peso absoluto, para independizarnos del diferente peso inicial de las ratas de cada lote, se calculó el aumento de peso relativo a 100 g de peso de rata como se muestra en la Tabla 3. No se observaron diferencias significativas en el aumento porcentual de peso entre las ratas de los diferentes lotes.

Tabla 3. Peso de los animales al inicio y final de la experiencia.

Lote	Peso animal (g)			
	0 día	**60 días**	**Δ Peso (g)**	**Δ Peso/100 g rata (g %)**
DC	42,9 **b**	327 **b**	284,1 **b**	87 **a**
DS	35,7 **a**	269 **ab**	233,3 **ab**	86 **a**
DP	35,7 **a**	228 **a**	192,3 **a**	84 **a**

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas (p< 0,05).

En la Figura 2 se muestra cómo se va modificando el porcentaje de incremento de peso de los animales de los diferentes lotes en el tiempo. Este parámetro fue calculado según la ecuación 1:

$$(m_f - m_0)/m_0 \times 100 = \Delta peso \quad (1)$$

Donde m_f y m_0 son los pesos finales e iniciales promedio de las ratas. Podemos observar que los animales alimentados con DP experimentaron, a partir de los 30 días de experiencia, una menor velocidad de ganancia de peso que los animales que consumieron DS y DC.

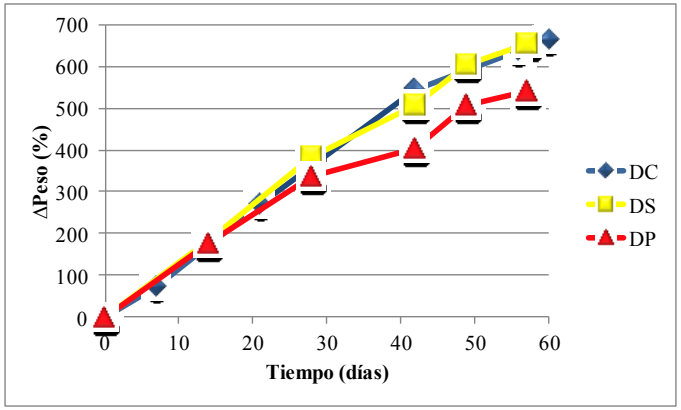


Figura 2. Aumento de peso porcentual de los animales durante el tiempo de la experiencia.

Modificación de la microbiota en heces durante la experiencia

Se realizó un recuento total de bifidobacterias y lactobacilos en la materia fecal de las ratas los días 0, 2, 23 y 50 del ensayo. En la Figura 3 se muestra el resultado expresado en ufc/g de materia fecal (MF). Se puede observar que el número de lactobacilos y bifidobacterias encontrados en materia fecal de ratas que recibieron una dieta control (DC) fue disminuyendo durante la experiencia, observándose una disminución de 2 órdenes de magnitud entre el día 0 y el día 50 del ensayo. En cuanto al número de microorganismos encontrados en la materia fecal de las ratas que recibieron la dieta DS podemos decir que se mantuvo constante durante el ensayo, observándose un leve incremento al final de la experiencia. Finalmente, en la materia fecal de las ratas a las que se les administró una dieta con prebiótico proveniente del pan (DP) se observó un aumento hasta el día 23 de la experiencia y una disminución significativa el día 50 del ensayo.

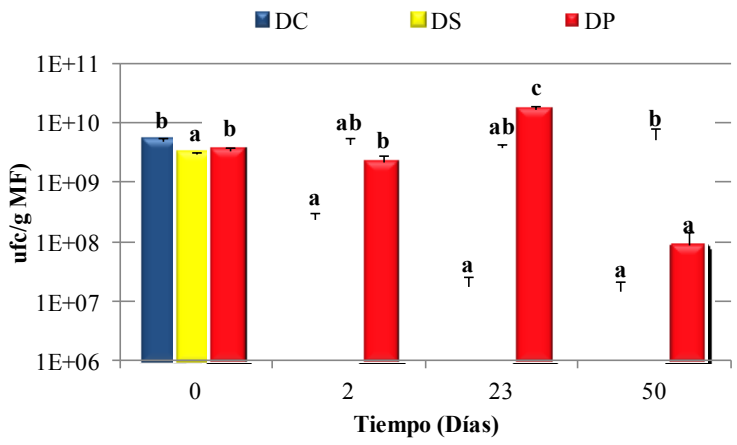


Figura 3. Recuento de anaerobios en MRS con cys. Letras diferentes en un mismo lote indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Media ± desviación estándar.

Estos resultados demuestran que, a diferencia de lo observado en la DC, tanto la dieta DS como la DP resultaron capaces de mantener constante la cantidad de bifidobacterias y lactobacilos presentes en la materia fecal de las ratas que las consumieron.

Con la finalidad de investigar la modificación de la microbiota presente en materia fecal como consecuencia de las diferentes dietas en el modelo de rata en crecimiento, se utilizó una técnica independiente del cultivo comúnmente empleada para el estudio de comunidades microbianas complejas. La metodología utilizada fue la electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante químico (DGGE) que consiste en la amplificación de ADN con oligonucleótidos específicos, separación electroforética en gel con gradiente

desnaturalizante químico y análisis de los perfiles resultantes. Idealmente la posición de cada banda en el perfil de una muestra es representativa de una especie. Sin embargo, en la práctica, el efecto observado en ciertas taxa cuando se utilizan oligonucleótidos para los genes del ARNr 16S, puede llevar a una sobreestimación del número de especies predominantes en las muestras analizadas debido a la presencia de operones múltiples.

Se estudiaron muestras de heces de ratas tomadas los días 0, 23 y 50 de los tres lotes y además del día 36 del lote DS. Los perfiles electroforéticos obtenidos a partir de la amplificación del ADN de las heces estudiadas se muestran en la Figura 4.

El número de bandas encontrado en los diferentes perfiles varió entre 21 y 48. Si comparamos los perfiles de las muestras pertenecientes a ratas de los grupos DC, DP y DS para el día 0 podemos observar que, aunque algunas bandas son comunes, los perfiles obtenidos resultaron diferentes entre sí. Esto es de esperar, ya que la microbiota de cada rata es única. Esta variabilidad de la microbiota entre individuos está ampliamente descripta en ratones (Snart *et al.* 2006, Montesi *et al.* 2005) y microbiota intestinal humana (Zoetendal *et al.* 1998; Vanhoutte *et al.* 2006).

Sin embargo, no sólo se observaron diferencias entre las ratas de los distintos grupos, sino que también hubo diferencias en la microbiota de una misma rata a lo largo del tiempo, y este fenómeno es debido a la dieta. Por ejemplo, el número de bandas del perfil obtenido a partir de las heces de las ratas que consumieron la dieta con synergy1 a los 50 días de experiencia (DS 50) presentó un mayor número de bandas que el perfil obtenido para DS 0. El número de bandas de los perfiles no es indicativo de la cantidad de especies que están presentes en cada comunidad debido a que una especie puede presentar más de una banda en su perfil electroforético (Cocolin *et al.* 2001, Salles *et al.* 2002), pero el análisis de los perfiles electroforéticos permite comparar las variaciones que se producen en las comunidades microbianas.

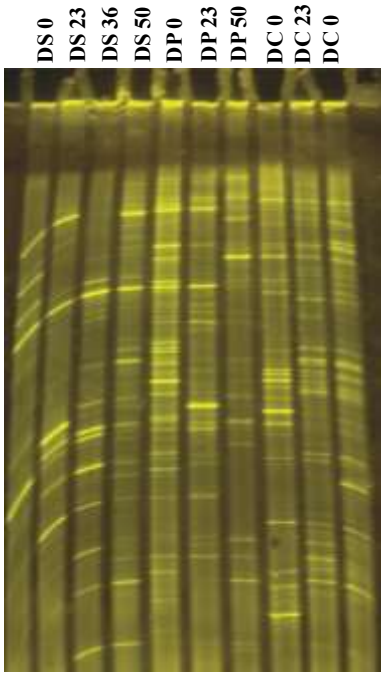


Figura 4. Perfiles electroforéticos obtenidos por DGGE de amplicones del gen que codifica para la región V3 del ARNr 16S obtenidos a partir de ADN aislado de las diferentes heces. DS: dieta Synergy1, DP: dieta pan, DC: dieta control. El número que acompaña a la sigla corresponde al día de toma de muestra de la materia fecal.

Para analizar la similitud existente entre los perfiles electroforéticos obtenidos por DGGE de las distintas heces se utilizó el coeficiente de Jaccard y se realizó un análisis de cluster mediante el método de agrupamiento de ligamiento promedio no ponderado (UPGMA). En la Figura 5 se muestra el dendrograma obtenido a partir del análisis de los perfiles electroforéticos.

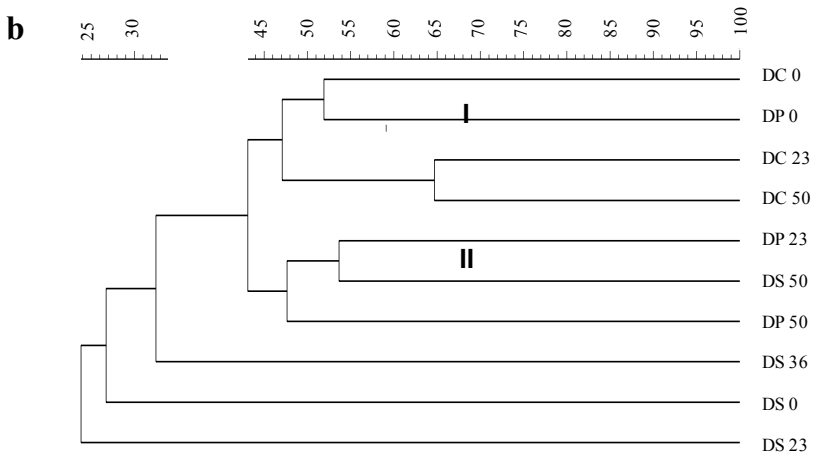


Figura 5. Dendrograma obtenidos por análisis estadístico (Coeficiente de Jaccard- agrupamiento de ligamento promedio no ponderado (UPGMA)) del perfil DGGE mostrado en la Figura 4.

Del análisis del cluster puede observarse dos subcluster bien definidos (I y II) que presentaron un 43% de similitud entre sí. El subcluster I) formado por los perfiles de las muestras control al inicio de la experiencia y durante la misma (DC0, DC23, DC50 y DP0) y el subcluster II) formado por los perfiles de las muestras provenientes de las ratas DS y DP desde el día 23 hasta el final de la experiencia (DP 23, DP 50 y DS 50).
Por lo tanto, de este análisis se puede inferir que hubo una similitud en la microbiota en ausencia del prebiótico (subcluster I, 47% similitud), mientras que a los 50 días de la experiencia las dietas con *In*/FOS, DS y DP presentaron una similitud de 48% entre sí (subcluster II). Además, se puede observar que hay una diversidad microbiana diferente respecto al lote DC.

Fermentación colónica

En la Figura 6 se muestra el peso promedio del ciego y pH del contenido cecal obtenido a partir de los animales de los diferentes lotes estudiados. El contenido cecal de las ratas pertenecientes al lote DS fue significativamente mayor que el de los otros lotes y en el caso de DP el peso del ciego fue similar al de las ratas pertenecientes al lote DC (Figura 6.a).

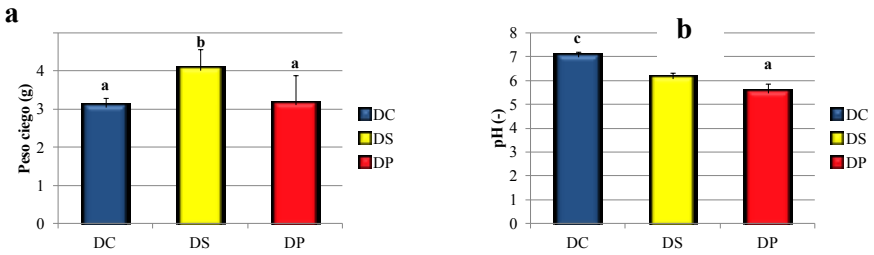


Figura 6. a) Peso del ciego y **b)** pH del contenido cecal.

El pH del contenido cecal del lote DC fue el mayor. El lote de ratas que consumió la dieta DP presentó el menor pH (Figura 6.b).

Tanto el aumento de peso del ciego como el pH del contenido cecal indicarían actividad prebiótica de la dieta. Los oligosacáridos no son absorbidos en la parte superior del tracto gastrointestinal, entran al intestino grueso donde son fermentados por la microbiota intestinal. Por efecto de la fermentación, se produce una disminución del pH como resultado de la producción de ácido láctico y ácidos grasos de cadena corta, principalmente de propionato, acetato y butirato (Levrat *et al.*, 1991).

CONCLUSIONES

En el ensayo *in vivo* se encontró que las ratas del lote control consumieron más dieta que las alimentadas con prebiótico (DS y DP), indicando que los animales de estos dos últimos lotes se saciaban consumiendo menos dieta; a pesar de ello el porcentaje de aumento de peso de los animales fue semejante en todos los lotes.

Se concluyó que el aumento de la fermentación en los animales alimentados con inulina enriquecida en FOS produjo cambios en el ciego (aumento del peso y disminución del pH) como consecuencia del aumento de microorganismos benéficos para la salud mediado por el efecto del prebiótico en la dieta.

BIBLIOGRAFÍA

Biedrzycka E., Bielecka M. 2004. Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of olymerization. Trends in Food Science and Technology, 15: 170-175.

Cocolin L, Manzano M., Cantoni C, Comi G. 2001. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of the 16S rRNA Gene V1 Region To Monitor Dynamic Changes in the Bacterial Population during Fermentation of Italian Sausages. Applied and Environmental Microbiology, 67(11): 5113-5121.

Englyst H., Hudson G. 1996. The classification and measurement of dietary carbohydrates. Food Chemistry, 57: 15-21.

Flamm G., Glinsmann W., Kritchevsky D., Prosky L., Roberfroid M. 2001. Inulin and oligofructose as dietary fiber: A review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 41: 353-362.

Gibson G. R., Beatty E. R., Wang X., Cummings J. H. 1995. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. Gastroenterology, 108: 975-982.

Gibson G. R., Roberfroid M. B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. Journal of Nutrition, 125: 1401-1412.

Gueimonde M., Tölkkö S., Korpimäki T., Salminen S. 2004. New Real-Time Quantitative PCR Procedure for Quantification of Bifidobacteria in Human Fecal Samples. Applied and Environmental Microbiology, 70: 4165–4169.

Hamet M. F., Londero A., Medrano M., Vercammen E., Van Hoorde K., Garrote G. L., Huys G, Vandamme P, Abraham A. G. 2013. Application of culture-dependent and culture-independent methods for the identification of *Lactobacillus kefiranofaciens* in microbial consortia present in kefir grains. Food microbiology, 36(2): 327–34. doi:10.1016/j.fm.2013.06.022.

Harrington M. E., Flynn A., Cashman K .D. 2001. Effects of dietary fibre extracts on calcium absorption in the rat. Food Chemistry, 73(3): 263–269.

Levrat M. A., Rémésy C., Demigné C. 1991. High propionic acid fermentations and mineral accumulation in the cecum of rats adapted to different levels of inulin. The Journal of Nutrition, 121(11): 1730–1737.

Montesi A., García-Albiach R., Pozuelo M.J., Pintado C., Goñi I., Rotger R. 2005. Molecular and microbiological analysis of caecal microbiota in rats fed with diets supplemented either with prebiotics or probiotics. International Journal of food microbiology, 98(3): 281-289.

Muyzer G., De Waal E., Uitierlinden A. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology, 59: 695-700.

O' Brien C. M., Mueller A., Scannell A. G. M., Arendt E. K. 2003. Evaluation of the effects of fat replacers on the quality of wheat bread. Journal of Food Engineering, 56: 265-267.

Pool-Zobel B., van Loo J., Rowlands I., Roberfroid M.B. 2002. Experimental evidences on the potential of prebiotic fructans to reduce the risk of colon cancer. British Journal of Nutrition, 87: S273–S281.

Ranhotra G. S., Gelrot J. A., Leinen S. D., Schneller F. E. 1997. Bioavailability of calcium in breads fortified with different calcium sources. Cereal chemistry, 77(3): 293–296.

Ranhotra G. S., Gelroth J. A., Leinen S. D. 2000. Utilization of calcium in breads highly fortified with calcium as carbonate or as dairy calcium. Cereal chemistry, 74(4): 361–363.

Rastall R. A., Fuller R., Gaskins H. R., Gibson G. R. 2000. Colonic functional foods.en: Functional foods. Concept to product. Ed.G R Gibson y C M Williams. Cap. 4. CRC Press LLC. Boca Raton, FL, Estados Unidos.

Reves P. G., Nielsen F. H., Fahey G. C. Jr. 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. The Journal of Nutrition, 123(11): 1939-1951.

Roberfroid M. 1993. Dietary fibre, inulin and oligofructose: a review comparing their physiological effects. Critical Reviews en Food Science and Nutrition, 33(2): 103-148.

Roberfroid M. 2005a. Introducing inulin-type fructans. British Journal of Nutrition, 93 (Supp. 1), S13-S25.

Roberfroid M. 2005b. Inulin-type fructans: functional food ingredients (p. 370). Boca Raton: CRC Press.

Salles J.F., De Souza A., van Elsas J. 2002. Molecular method to assess the diversity of burkholderia species in environmental samples. Applied and Environmental Microbiology, 68(4): 1595-1603.

Scholz-Ahrens K. E., Schrezenmeir J. 2007. Inulin and oligofructose and mineral metabolism: the evidence from animal trials. The Journal of Nutrition, 137(11): 2513–2523.

Slavin J. 2003. Impact of the proposed definition of dietary fiber on nutrients data bases. Journal of Food Composition and Analysis, 16: 287-291.

Snart J., Bibiloni R., Grayson T., Lay C., Zhang H., Allison G.E., Laverdiere J.K., Temelli F., Vasanthan T., Bell R., Tannock G.W. 2006. Supplementation of the Diet with High-viscosity Beta-Glucan Results in Enrichment for Lactobacilli in the Rat Cecum. Applied and Environmental Microbiology, 72: 1925-1931.

Vanhoutte T., De Preter V., De Brandt E., Verbeke K., Swings J., Huys G. 2006. Molecular monitoring of the fecal microbiota of healthy human subjects during administration of lactulose and Saccharomyces boulardii. Applied and Environmental Microbiology, 72(9): 5990-5997.

Wang J., Rosell C.M., de Barber C.B. 2002. Effect of the addition of different fibres on wheat dough performances and bread quality. Food chemistry, 79: 221-226.

Zoetendal E. G., Akkermans A. D., De Vos W. M. 1998. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. Applied and environmental microbiology, 64(10): 3854-3859.

Agradecimientos

Se agradece al CONICET, la UNLP y la UBA el financiamiento de este trabajo a través de los respectivos proyectos de investigación.

EVALUACIÓN DE LA DIGESTIBILIDAD DE LOS LÍPIDOS DE LA LECHE DE CABRA EN MODELOS BIOLÓGICOS

Silva P.V. [1], Silveira M.F. [1], Seibt L.E. [1], Rodrigues R.[2]

1: Instituto Federal Catarinense. Araquari. SC. Brasil.
2: Universidade Federal de Pelotas. Pelotas. RS. Brasil
paula.vergara@ifc-araquari.edu.br

Resumen: Este estudio tuvo como objetivo analizar la digestibilidad de lípidos de 21 ratas Wistar hembras alimentadas con diferentes dietas: estándar (P), leche de cabra (LC) y la leche bovina (LB). Se evaluó la composición físico-química y ácidos grasos (AG's) de leches, volumen fecal producido (g), el porcentaje de lípidos y de AG's en las heces, el perfil de lípidos en sangre, coeficiente de digestibilidad de los lípidos y porcentaje de lípidos en el hígado de los animales. Según los resultados, las dietas a base de leche fueron significativamente diferentes en su composición de lípidos, con leche de cabra presentó mayor digestibilidad de lípidos. Por lo tanto, la leche de cabra puede ser una alternativa en la dieta para tratar afecciones gastrointestinales, como síndromes de mala absorción.

Palabras clave: leche de cabra, lípidos, absorción.

Abstract: This study aims to analyze lipid digestibility on 21 female Wistar rats receiving three different diets: control (P), goat milk (LC) and bovine milk (LB). Goat and bovine milk physical-chemical and fatty acid profile analysis, total fecal amount and its lipid percentual, blood lipid profile, digestibility coefficient and hepatic lipid percentual were evaluated on this assay for each group. According to the results, milk based diets differ statistically on lipid profile, as for LC presenting increased lipid digestibility. Therefore, LC can be an alternative dietetic for gastrointestinal disorders as for malabsorption syndromes.

Keywords: goat's milk, lipid, absortion

INTRODUCCIÓN

La leche de cabra tiene un mercado prometedor, según algunas peculiaridades de su composición. Se considera un componente importante en los tratamientos clínicos y nutricionales debido a sus propiedades bioquímicas. Existe evidencia significativa de que sea beneficioso para los seres humanos que sufren de trastornos gastrointestinales y reacciones de hipersensibilidad, y se indica como una alternativa en casos de alergia a la leche bovina (Pellerin 2001, Haenlein 2004, Chacón Villalobos 2005, Rodriguez *et al.* 2008, Vargas *et al.* 2008).

La leche caprino se destaca nutricionalmente por su fracción lipídica, en particular cuanto al tipo y el contenido de ácidos grasos, mostrando altos niveles de ácidos grasos de cadena media y corta, tales como butírico, caproico, caprílico y cáprico. La proporción de ácidos grasos de cadena corta es típicamente el doble en comparación a la leche bovina (Haenlein 2004, Park *et al.* 2007, Mora-Gutierrez 2007), lo que puede contribuir a las diferencias en la palatabilidad y aceptación sensorial de la población poco acostumbrado a su consumo. La ingestión de alimentos que contienen ácidos grasos de bajo peso molecular favorece una mayor velocidad y facilidad de digestión y absorción, así como la forma en que se transportan en el organismo (Alves *et al.* 2009); esto provoca que actúen suministrar los requerimientos calóricos de las personas con discapacidad del enzimas lipolíticas o trastornos lipídicos asociados con la mala absorción (McCullough 2003).

La digestibilidad de lípidos depende del correcto funcionamiento del tracto gastrointestinal donde, los cambios pueden afectar a cualquier digestión completa y posterior absorción y el metabolismo de los nutrientes, y puede haber fallado del desempeño de las enzimas lipolíticas, tales como la fibrosis quística, pancreatitis y enfermedades similares (Kierzabaum, 2004).

La búsqueda de los nutrientes con el contenido de lípidos que favorezcan la utilización digestiva, sobre todo en los casos de síndrome de mala absorción, es importante y necesario, que se refiere al estudio de la leche de cabra, rica en triglicéridos de cadena corta y media (Alférez *et al.* 2000). Según McCullough (2003), la inclusión de los triglicéridos de cadena media en estos casos resulta en disminución notable de los síntomas de la esteatorrea, así como llevar a un mayor aumento de peso y mejorar el estado nutricional de los pacientes.

La leche caprina también se ha lanzado como un iniciador en la reducción de colesterol en la sangre y por aumentar el colesterol HDL (High Density Lipoprotein) exactamente debido a la abundancia de triglicéridos de cadena media (Alférez *et al.* 2000, McCullough, 2003, López-Aliaga *et al.* 2005). Sin embargo, se necesitan estudios más profundos y específicos para confirmar esta hipótesis.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la digestibilidad de los lípidos de leche caprina en comparación con la leche bovina, y concomitantemente evaluar los parámetros bioquímicos de la sangre y el comportamiento digestivo de los animales sometidos a diferentes dietas experimentales.

MATERIALES Y METODOS

Condiciones experimentales

Se utilizaron 21 ratas (*Rattus norvergicus*), da cepa *Wistar*/UFPel, hembras (peso inicial promedio de 60,6g y aproximadamente 35 días de edad) de la Central de Animales de Laboratorio de la Universidad Federal de Pelotas - RS. El experimento se realizó en el Laboratorio de Experimento Animal, Departamento de Ciencia de los Alimentos - UFPel, donde los animales permanecieron en condiciones de temperatura controlada (22 ± 2°C), alternando períodos de luz y oscuridad durante 12 horas y cambio de escape de aire.
El experimento duró 28 días, con 7 días de adaptación a los animales, que se instalaron en jaulas metabólicas individuales donde recibieron diariamente 13g de dieta estándar (caseína-based) y agua *ad libitum*. Después de la adaptación, los animales fueron pesados y redistribuidos homogéneamente con el fin de equilibrar los pesos de los grupos experimentales. El protocolo para la realización del período del ensayo con los animales fue aprobado por la Comisión del Ética y Experimentación Animal (CEEA - UFPel).

Dietas

La leche utilizada en la preparación de las dietas se obtuvieron de cabras Saanen y vacas Jersey, después de haber sido pasteurizada (65ºC ± 3°C/30 min), se analizaron la composición físico-química y perfil de ácidos grasos. Las dietas se prepararon semanalmente en forma de gránulos (pellets) y la composición nutricional de acuerdo con las recomendaciones del American Institute of Nutrition – AIN 93M, con el cambio en los lípidos y la fuente de proteínas (renovación parcial de éstos por leche de caprina y bovina). Los gránulos se secaron en un horno con circulación forzada de aire a 50±1ºC (16h). Los grupos experimentales se componen de siete animales en cada grupo (n=7), estos recibieron diariamente 13g de cada alimento y el agua, *ad libitum*:

- Grupo estándar (P): dieta con caseína;
- Grupo leche caprina (LC): dieta con leche caprina;
- Grupo leche bovina (LB): dieta con leche bovina;

Clasificaciones

Composición química de las dietas

Las mediciones de la composición química de las tres dietas fueron los porcentajes: humedad, cenizas, proteína cruda y lípidos de acuerdo con A.O.A.C. (2000).

Evaluaciones bioquímicas

Se realizaron las determinaciones de colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol y triglicéridos en el suero de los animales; parámetros bioquímicos se determinaron al final del experimento. Las muestras de sangre fueron recogidas mediante punción cardiaca, los animales fueron sometidos a ayuno durante 12 horas y se anestesiaron por la campana de inhalación que contiene éter etílico. La sangre recogida de cada animal se centrifugó a 1000 rpm (15 minutos/4ºC) para obtener muestras de suero y se congeló a -20°C, y luego se envían a la Laboratorio de Análisis Clínicas del Hospital Veterinario de la Universidad Federal de Río Grande do Sul - UFRGS (LacVet UFRGS) donde se realizaron las evaluaciones

bioquímicas usando un espectrofotómetro marca Metrolab 1600 plus®. Se realizaron mediciones de colesterol total y los triglicéridos, respectivamente, a través de métodos enzimáticos Colesterol Liquiform Trinder y Triglicérides Liquiform Trinder; HDL-colesterol (c-HDL) por el método Labtest® (precipitación de lipoproteínas LDL y VLDL) y el LDL-colesterol (c-LDL) de acuerdo con la metodología de surfactante selectivo. Todas las determinaciones se realizaron utilizando los kits de la marca Labtest Diagnóstica® S.A (Minas Gerais, Brasil). La fracción de VLDL colesterol (c-VLDL) se determinó mediante la ecuación [VLDL = triglicéridos/5] y la relación LDL/HDL dividiendo los valores calculados previamente.

Determinación de los lípidos hepáticos totales y fecales Digestibilidad de lípidos

Las heces se recogieron en dos períodos durante el experimento (comienzo y fin) para determinar el coeficiente de digestibilidad de lípidos aparente (CDA), de acuerdo con Alférez et al. (2000), según la ecuación:

$$CDA = \frac{(\text{Lípidos ingeridos (g)} - \text{Lípidos excretada (g)}) \times 100}{\text{Lípidos ingeridos (g)}}$$

Después de cada colección, las heces se pesaron, identificaron y fueron almacenadas en papel de aluminio dentro de frascos herméticos en un congelador a -20ºC. En el momento de la cuantificación de los lípidos, las heces se secaron en un horno a una temperatura de 50°C durante 60 minutos y fueron aplastadas y pesadas de nuevo. Los hígados se recogieron después de la eutanasia, se lavó en una solución de NaCl 0,9% a 5ºC, seca en papel de filtro, fue pesado y congelado a -20ºC envuelto en papel de aluminio, para la posterior determinación de los lípidos. Los lípidos de las heces y del hígado fueron cuantificados por la extracción continua con éter de petróleo en Soxhlet de acuerdo con los estándares analíticos del Instituto Adolfo Lutz (1985).

Perfil de ácidos grasos de las heces

Las heces utilizados para la determinación de perfiles de ácidos grasos se recogieron en dos períodos (principio y final) del experimento, fueron pesados, identificaron y almacenadas en papel de aluminio dentro de frascos herméticos en un congelador a -20ºC.

Condiciones Cromatográficas

Para la determinación de los ácidos grasos de la leche y heces, se realizaron las etapas de extracción y esterificación de los lípidos. Los ácidos grasos se analizaron mediante cromatografía de gases VARIAN 3300® equipado con un detector de ionización de llama y columna capilar Carbowax (30m x 0,25mm i.d. x 0,25µm espesor de la película, J&W Scientific, Folson Califórnia, USA).

Análisis estadística

Los resultados se expresaron como medias y desviaciones estándar. Los resultados de la CDA, el peso del hígado, el colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol, triglicéridos, lípidos en las heces y el hígado se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey para comparación de

medias, el nivel de significación 5%. El programa estadístico utilizado fue Statistic 6.0 (Statistic 2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición química de las dietas experimentales

El contenido de ácidos grasos saturados fue ligeramente mayor para leche caprina, con una diferencia de 2,1% en comparación con la leche de vaca; los ácidos grasos insaturados totales fueron similares (26,8 e 28,8, respectivamente) mientras que el contenido de monoinsaturados y polinsaturados fue mayor para la leche bovina. La característica nutricional de importancia fundamental radica en las grandes cantidades de ácidos grasos de cadena media de la leche de cabra respecto a la leche bovina. Estos ácidos grasos de cadena media tienen una influencia directa en la digestibilidad de lípidos, debido a una vía de absorción diferencial (através del circulación portal), siendo esta más rápido (Yankah y Akoh 2000, Alférez 2000, McCullough, 2003).

Evaluaciones bioquímicas

Debido a la alta variabilidad genética de las poblaciones humanas y los hábitos alimenticios, el modelo animal con ratas es adecuado para estudios experimentales de este tipo. Es importante destacar que existe una similitud general entre el sistema cardiovascular de ratas con la de otros mamíferos, incluido el hombre (Águila *et al.* 2002). Sin embargo, un factor importante a considerar es que las fracciones lipídicas analizadas son comúnmente influenciados por muchos factores tales como la dieta, las características individuales, el genotipo y las condiciones ambientales, que varían incluso entre animales de la misma especie (Jaeckel 2008).

Los esteroles son los principales miembros de la fracción insaponificable de grasas y aceites siendo el colesterol los principales esteroles en el tejido animal. El nivel de colesterol en el cuerpo es controlado por su propio mecanismo de regulación que varía de una especie a la otra como entre individuos de la misma especie. Al igual que los triglicéridos, el colesterol es transportado por las lipoproteínas HDL y LDL, que actúan tanto para mantener los lípidos solubles como para proporcionar un mecanismo eficiente para conducir su contenido de lípidos a tejido (Lehninger *et al.* 1995).

Aproximadamente la mitad del colesterol del cuerpo surge de la síntesis exógena, y es suministrado por la dieta. El hígado lleva a cabo aproximadamente el 50% de la síntesis total, mientras que el intestino y la piel son responsables de la porción restante. La capacidad para suprimir la síntesis de colesterol después de la ingestión de esterol vegetal tiene variación entre los seres humanos. Sin embargo, la reducción relativa de colesterol por la disminución de la ingesta dietética puede ser eficaz (Murray *et al.* 1990).

La identificación de los alimentos que pueden promover el colesterol inferior a través de su consumo es importante. López-Aliaga *et al.* (2005) y Haenlein (2004) describen la ingesta de leche de cabra puede disminuir el nivel de colesterol en suero en seres humanos, la inhibición y la limitación su deposición. El consumo de dietas que contienen leche de cabra por arteriopáticos y pacientes de edad avanzada, allá de promover reducciones en el colesterol total, también redujo la fracción LDL.

La **Tabla 1** muestra los parámetros bioquímicos en sangre y suero de ratas Wistar hembras al final del período de prueba.

Tabla 1 - Niveles (mmol.L-1) de colesterol total, triglicéridos, colesterol HDL (c-HDL), colesterol-LDL (c-LDL), colesterol-VLDL (c-VLDL) y LDL/HDL ratio de la cepa de ratas hembras Wistar/UFPel sometido a diferentes dietas durante 28 días.

Parámetros	Dietas		
	Estándar	Leche caprina	Leche bovina
Colesterol total	1,08 ± 0,13[b]	2,03 ± 0,48[a]	1,90 ± 0,29[a]
c-HDL	0,80 ± 0,13[b]	1,13 ± 0,36[a]	1,15 ± 0,19[a]
c-LDL	0,35 ± 0,02[a]	0,35 ± 0,19[a]	0,34 ± 0,05[a]
c-VLDL	0,15	0,17	0,12
LDL/HDL	0,43	0,30	0,29
Triglicéridos	0,74 ± 0,01[ab]	0,85 ± 0,10[a]	0,62 ± 0,07[b]

Los valores corresponden a la estimación promedio de siete repeticiones con desviación estándar (n = 7); Promedios en la misma fila que tienen letras diferentes difieren significativamente por la prueba de Tukey (p ≤ 0,05);

Peso y contenido lípidos del hígado

En la **tabla 2** se enumeran el peso total del hígado, contenido de lípidos totales en el hígado y la relación de porcentaje de peso del hígado al peso corporal en el extremo de experimentación de las ratas Wistar hembras alimentadas con las diferentes dietas.

Tabla 2 – Peso del hígado, respectiva cantidad de lípidos y la relación de porcentaje de peso del hígado al peso corporal en ratas de Wistar/UFPel sometido a diferentes dietas durante 28 días.

Dietas	Peso (g)	Lípidos/Hígado (g)	Peso hígado/peso del cuerpo
Estándar	6,50 ± 0,27[a]	0,15g ± 4,25[a]	0,03 ± 0,17[b]
Leche caprina	3,93 ± 0,90[b]	0,05g ± 1,06[b]	0,04 ± 0,58[a]
Leche bovina	3,52 ± 0,45[b]	0,08g ± 0,45[b]	0,03 ± 0,17[b]

Los valores corresponden a la estimación promedio de siete repeticiones con desviación estándar (n = 7); Promedios en una misma columna con diferentes letras difieren significativamente por la prueba de Tukey (p ≤ 0,05); Estándar: dieta estándar utilizado como basado caseína-control;

Las medias del peso del hígado de los animales alimentados con dietas a base de leche fueron muy similares y menores respecto a la dieta estándar ($p < 0,05$), como el aumento de peso total corporal.

Se puede considerar proporcional, una vez que acompañó a la ganancia de peso más baja registrada al final del experimento en comparación con los animales que recibido la dieta estándar.

El menor peso de los hígados de las dietas experimentales en comparación con la dieta estándar también fue citado por Jaekel (2008), quien observó que las dietas de proteínas vegetales promueven la disminución significativa en el peso del hígado en relación con la dieta que contenía caseína. Esta similitud de los resultados indica una característica interesante, como los productos lácteos se sabe que tienen un mayor contenido de colesterol y de lípidos pueden causar sobrecarga en el hígado y aumento del mismo, que no fue observado en el presente estudio.

Producción de heces y el contenido de lípidos fecal

Los animales que fueron sometidos la dieta leche de cabra produce menor volumen de heces , seguido por la dieta leche de vaca y la estándar ($p \leq 0,05$).

Un mayor producción de las heces puede indicar una digestibilidad de alimentación inferior por las enzimas en el tracto gastrointestinal, como citado por Denardin *et al.* (2007). Helbig (2007) menciona que la ocurrencia de mayor producción fecal está conectado simultáneamente con un pH más bajo y el aumento de la excreción fecal en las heces de los ácidos grasos de cadena corta.

Tomamos nota de que las diferencias entre el punto de vista numérico fueron significativas entre los grupos, con énfasis en la reducida cantidad de heces que se producen durante la duración total del estudio de los animales del grupo de LC y la mayor cantidad de animales fecales grupo LB, difiriendo significativamente de los otros grupos.

La **tabla 3** muestra la relación del consumo de la dieta en diferentes períodos de las ratas hembras Wistar/UFPel los diferentes grupos experimentales con la concentración de lípidos en las heces en el inicio y al final del período de prueba, con una duración total de 28 días.

Tabla 3 - La ingesta de grasa total (g) en los excrementos fecales de ratas Wistar/UFPel sometidos a diferentes dietas durante 28 días.

Dietas	**Ingesta de grasas en la dieta (g)**		**Lípidos totales fecales (g)***	
	Período inicial **	**Período final *****	**Período inicial ****	**Período final *****
Estándar	51,32	50,40	0,27 ± 1,53a	0,63 ± 1,74a
Leche caprina	36,94	43,86	0,48 ± 2,80a	0,44 ± 0,41a
Leche bovina	35,08	43,12	0,84 ± 4,47a	0,58 ± 0,96a

***Los valores son la media de siete repeticiones con estimación de la desviación estándar, citada durante los períodos respectivos (n = 7); Promedios en una misma columna con diferentes letras difieren significativamente por la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$);**
**** Periodo inicial = es la suma de la cantidad de grasas ingeridas en los cuatro primeros días del experimento;**
***** = Período final es la suma de los últimos cuatro días del experimento;**
Estándar: dieta estándar utilizado como control basado en caseína;

El colesterol exógeno se metaboliza en el hígado y el exceso se convierte en ácidos biliares, a través del intestino (circulación entero hepática), se liberan en las heces, siendo parcialmente eliminado. Este hecho, en consecuencia promueve una mayor excreción de lípidos (Machado *et al.* 2007). Se observa que los valores más altos de lípidos se excretan en las heces de los animales alimentados con dietas LB en el período inicial y al final del período experimental aunque las diferencias no fueron significativas (**Tabla 4**). La dieta LC promovió una menor excreción de lípidos en el período final y no hubo diferencias cuando se compara con la dieta estándar al comienzo del experimento.

Teniendo en cuenta la hipótesis de que el colesterol consumido con la leche de cabra se mantiene en una proporción mayor en el plasma que se excreta en las heces. Este hecho puede ser considerado beneficioso para las personas con trastornos de absorción de lípidos, ya que requieren una mayor ingesta de calorías (Ribeiro *et al.* 2002).

La excreción de lípidos inferior puede estar justificada por la mayor presencia de triglicéridos de cadena media en la dieta, ya que inducen la reducción de la síntesis endógena de colesterol y su absorción intestinal, generando de este modo una menor excreción fecal (Alférez *et al.* 2000).

Digestibilidad de lípidos

La velocidad de absorción de los lípidos está determinada principalmente por la longitud de cadena de carbono y el grado de saturación de los ácidos grasos implicados. Por lo tanto, casi todos los lípidos procedentes de fuentes naturales, hechos de triacilgliceroles mixtos, tienen una digestibilidad de 95 a 98%; Sin embargo, si el triacilglicerol contiene una alta cantidad de ácido esteárico o de ácidos grasos de cadena larga saturados, se reduce su digestibilidad (Souza-Soares 1980).

Souza-Soares (1980) destacó que una de las maneras más satisfactorias de evaluar la absorción de lípidos es la comparación cuantitativa de los lípidos en las heces con el contenido de lípidos de la dieta; que tiene la ventaja de ser un método no invasivo para la investigación de la administración sin alterar la homeostasis de los lípidos.

A través de la **tabla 4** se puede observar los datos relativos a la digestibilidad de lípidos en los animales alimentados con diferentes dietas, determinado por la relación de los lípidos ingeridos y excretados por las heces.

Tabla 4 – Digestibilidad del lípidos del ratas hembras *Wistar*/UFPel, sometido a diferentes dietas durante 28 días.

Dieta	Lípidos ingeridos		Lípidos excretados		CDA (%)	
	Período inicial**	Período final***	Período inicial**	Período final***	Período inicial**	Período final***
Estándar	5,34	5,24	0,05	0,10	99,00	97,95
Leche caprina	3,57	4,23	0,04	0,05	98,87	98,81
Leche bovina	3,40	4,18	0,13	0,09	96,17	97,84

Los valores corresponden a la suma de seis repeticiones (n = 6) en cada período correspondiente;
*** CDA = coeficiente de digestibilidad aparente de lípidos (% de absorción);**
**** Periodo inicial = es la suma de los cuatro primeros días del experimento;**
***** = Período final es la suma de los últimos cuatro días del experimento;**
Estándar: dieta estándar utilizado como basado caseína-control;

En el período inicial del experimento la digestibilidad de lípidos fue mayor para dieta P, seguida de la dieta LC y la más baja para la dieta LB sin embargo no hubo diferencias significativas. Estos resultados coinciden con los de Alférez *et al.* (2000) que trabajó con dietas similares, habiendo encontrado los valores de 90,4%, 85,6% y 94,2% para la dieta con leche de cabra, leche bovina y dieta estándar (a base de aceite de oliva) respectivamente, para el coeficiente de digestibilidad de lípidos (CDA).

Cuando se hace referencia a la duración total del experimento, los valores de digestibilidad fueron de 98,73%, 98,43% e 96,56% respectivamente, para la dieta estándar, leche de cabra y leche bovina. Se observa que las dietas P y LC son similares en cuanto a su porcentaje mientras que la dieta LB tiene su valor reducido en comparación con las otras dos dietas, en una diferencia de 2,17% para la dieta estándar y 1,87% con relación a la dieta de leche de cabra.

Aunque no hubo diferencias significativas, el valor alto del coeficiente de digestibilidad de lípidos (CDA) la dieta LC puede estar justificada en función del leche de cabra mejora la utilización digestiva de la fracción lipidia y reduce las pérdidas fecales de este nutriente. Los lípidos de la leche de cabra se consideran más digerible que la leche de vaca, debido a que forman pequeños glóbulos de grasa, y por lo tanto presentan una superficie mayor y en consecuencia, las lipasas en el intestino son capaces de hidrolizarlos con mayor eficiencia, lo que reduce el tiempo de permanencia en el

estómago y el tránsito intestinal. La digestibilidad superior también parece estar directamente relacionada con la concentración más alta de TCM en la fracción lipídica de la leche de cabra en comparación con leche bovina (Alférez *et al.* 2000, Haenlein 2001, López-Aliaga *et al.* 2005, Park *et al.* 2007, Slačanac *et al.* 2010).

CONCLUSIONES

Animales alimentados con leche de cabra presentaron menor índice de eficiencia de alimentación que los alimentados con la dieta de caseína, pero mayor que los tratados con leche de vaca. El mayor peso del hígado de la dieta de leche de cabra fue inversamente proporcional a la concentración de lípidos en el hígado, esto puede estar relacionado con un mayor aprovechamiento de los lípidos de la leche de cabra en el organismo.

La dieta de la leche de cabra provoca en los animales una excreción fecal de lípidos y ácidos grasos de cadena media inferiores respecto al grupo que consumió la dieta que contenía leche bovina, debido a una mayor digestibilidad de los lípidos. El resultado indica la posibilidad de la utilización de la leche de cabra en la dieta de los pacientes con el síndrome de mala absorción de lípidos de acuerdo a su mejor utilización digestiva y el aumento de la absorción de lípidos.

BIBLIOGRAFÍA

Águila MB, Loureiro CC, Pinheiro AR, Mandarim-De-Lacerda CA. 2002 Metabolismo lipídico de ratos alimentados con diferentes tipos de lipídos. Arquivo Brasileiro de Cardiologia, 78: 25 – 31.

Alférez MJM, Barrionueno M, Lopez-Aliaga I. 2000. Digestive utilization of goat and cow milk fat in malabsorption syndrome. Journal of Dairy Research, 68: 451-461.

Alves LL, Richards NSPS, Becker LV, De Andrade DF, Milani LIG, Rezer APS, Scipioni CG. 2009. Aceitação sensorial e caracterização de frozen yogurt de leite de cabra com adição de cultura probiótica e prebiótico. Ciência Rural, Santa Maria, 39, 9:2595-2600.

A.O.A.C. Association of Official Agricultural Chemists (AOAC). 2000. Official Methods of Analysis. HORWITZ, W. (ed), 17 ed., Washington.

Berg MJ, Tymoczko JL, STRYER L. 2004. Metabolismo de ácidos graxos. In: Bioquímica. 5 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.623-652 (1059p).

Chacón Villalobos, A. 2005. Aspectos nutricionales de la leche de cabra (Capra hircus) y sus variaciones em el proceso agroindustrial. Agronomía Mesoamericana, Alajuela, 16, 2:239-252.

Denardin M. 2007. Influência do consumo de arroz ou de macarrão no desempenho e resposta metabólica em ratos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 5, 2007; REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 27, 2007, Pelotas. Anais do... Pelotas: CBAI, 2: 642-644.

Haenlein GFW. 2004. Goat milk in human nutrition. Small Ruminant Research,51:155–163.

Haenlein GFW. 2001. Past, present and futures perspectives of small ruminant dairy research. Small Ruminant Research, 84-9:2097-2115.

Helbig E. 2007. Efeitos do teor de amilose e da parboilização do arroz na formação de amido resistente e nos níveis glicêmico e lipêmico de ratos Wistar. 89p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Pelotas.

Jaekel LZ. 2008. Bebida funcional com extratos de soja e de arroz e sua influência no colesterol e glicemia. 102p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, UFPel, Pelotas.

Kierszenbaum AL. 2004. Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia. 4 ed. Saint Louis: Elsevier, 654p.

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. 1995. Princípios de bioquímica. 2 ed. São Paulo: Ed. Sarvier, 839p.

López-Aliaga I. 2005. Goat milk feeding causes in increase in biliary secretion of cholesterol and a decrease in plasma cholesterol levels in rats. Journal Dairy Science. Champaign, 88:1024-1030.

Machado MRG. 2007. Bebida de soja fermentada com *Lactobacillus acidophilus*: viabilidade celular, avaliação sensorial, armazenamento e resposta funcional. 101f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Pelotas.

McCullough FSW. 2003. Nutritional evaluation of goat's milk. British Food Journal, 105:239-251.

Mora-GutierrezA, Jr Farrel HM, Attaie R, McWhinney VJ, Wang C. 2007. Effects of bovine and caprine Monterey Jack cheeses fortified with milk calcium on bone mineralization in rats. International Dairy Journal, 17:255-267.

Murray RK, Granner DK, Mayes PA. 1990. Harper: Bioquímica. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 763p.

Park YW, Juárez M, Ramos M, Haenlein GFW. 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. Small Ruminant Research, 68:88-113.

Pellerin P. 2001. Goat's milk in nutrition. Annales Pharmaceutiques Francaises, v.59, n.1, p.51-62.

Ribeiro JD, Ribeiro MAGO, Ribeiro AF. 2002.Controvérsias na fibrose cística – do pediatra ao especialista. Jornal de Pediatria, 78: 171-186.

Riegel RE. 2004. Bioquímica dos Lipídios. In: Bioquímica. 4 ed. São Leopoldo: UNISINOS, p.185–215 (548p.).

Rodriguez VA, Cravero BF, Alonso A. 2008. Proceso de elaboración de yogur deslactosado de leche de cabra. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 28 :109-115.

Sanchis FS, Silbiger HLN. Manual de Animais de Laboratório. Manual Purina, 21p., _____.

Slačanac V, Božanić R, Hardi J, Szabó JR, Lučan M, Krstanovic, V. 2010. Nutritional and therapeutic value of fermented caprine milk. International Journal of Dairy Technology, 63-2:171-189.

Souza-Soares L A. 1980. Preparo de triacilgliceróis de cadeia média (TCM) e estudo de sua aplicação. 146f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas.

Statistica for Windows – Release 6.0 A. Tulsa: Statsoft Inc., 2001.

Vargas M, Chafer M, Albors A, Chiralt A and Gonzalez-Martinez C. 2008. Physicochemical and sensory characteristics of yoghurt produced from mixtures of cows' and goats' milk. International Dairy Journal, 18:1146-1152.

Yankah VV, Akoh CC. 2000. Lipase catalyzed acidolysis of tristearin with oleic or caprylic acids to produce strutured lipids. Journal of the American Chemist's Society, 77-5:495-500.