



VI Congreso Internacional
CIENCIA Y TECNOLOGÍA
de los **ALIMENTOS 2016**
CÓRDOBA - ARGENTINA
— Año Internacional de las Legumbres —



NUTRICIÓN Y SALUD

Nutrición y salud : trabajos completos : VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología

de los Alimentos 2016 / Mariela Bustos ... [et al.] ; compilado por Alberto Edel León ;

editado por Victoria Rosati ; Carlos W. Robledo. - 1a ed compendiada. - Córdoba : Ministerio de Ciencia y Tecnología de la provincia de Córdoba, 2017.

Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online

ISBN 978-987-45380-6-2

1. Tecnología de los Alimentos. 2. Nutrición. 3. Salud. I. Bustos, Mariela II. León, Alberto Edel , comp. III. Rosati, Victoria , ed. IV. Robledo, Carlos W., ed.
CDD 613.2

ISBN 978-987-45380-6-2



PRÓLOGO

La VI edición del CICyTAC refleja 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.

El presente volumen condensa los trabajos de los investigadores que aceptaron la invitación para publicar sus avances científicos en las áreas de Nutrición y Salud. Esperamos que este libro constituya una referencia actual y sea de utilidad para aquellas personas involucradas en el estudio y en la aplicación de conocimientos para atender las nuevas demandas en el desarrollo de alimentos con un mejor perfil nutricional y en el conocimiento de la estrecha relación entre alimentación y salud.

EDITORES

Mariela Bustos
Gabriela Perez
Martín Theumer
Isabel Brutti
Alberto Edel León



EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y CITOTOXICIDAD DE POLIFENOLES EXTRAÍDOS DE FIBRA DE CIRUELA

Basanta M.F. (1,3), De Leo S.A. (2,3), Gerschenson L.N. (1,3), Erlejman A. (2,3), Rojas A.M. (1,3)

- (1) Departamento de Industrias, Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
(2) Departamento de Química Biológica- IQUIBICEN; Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Argentina.
(3) CONICET
florbasanta@gmail.com

RESUMEN

La fibra obtenida por insolubilización en etanol a partir del exocarpo de ciruelas residuales de la cosecha son micropartículas (MPCs) co-extraídas con compuestos fenólicos libres y proantocianidinas pentaméricas (Basanta et al., 2016), siendo por lo tanto fibra potencialmente antioxidante. Se evaluó la capacidad de los polifenoles contenidos en la fibra para revertir el estrés oxidativo inducido por el *tert*-butil-hidroperóxido (t-BOOH) en células embrionarias humanas de riñón (Hek-293) y la citotoxicidad. El aumento del nivel de especies oxidantes intracelulares fue evaluado mediante diclorofluoresceína (DCF). El ensayo de MTT (dimetil-tetrazol) permitió calcular la concentración citotóxica (CC) que disminuía en un 50% la viabilidad celular (CC50). Las células tratadas con t-BOOH mostraron un incremento significativo en la generación de oxidantes en comparación con las células control. Co-incubando células Hek-293 con t-BOOH y concentraciones crecientes del extracto de polifenoles (0,5-3,0 µg/mL), se redujo significativamente ($p < 0,05$) la producción de oxidantes en forma concentración-dependiente, alcanzando el 100% de protección con 3,0 µg/mL. No se observó reducción de la viabilidad en células tratadas (24 h) con el extracto a aquellas concentraciones con efecto antioxidante (3-100 µg/mL), determinándose una $CC_{50} > 100$ µg/mL. Los polifenoles contenidos en la fibra mostraron un efecto protector no citotóxico frente al estrés oxidativo.

Palabras clave: polifenoles, ciruelas, citotoxicidad, estrés oxidativo.

1

ABSTRACT

The fibers obtained from plum (*Prunus salicina*) exocarp tissue remaining after harvest, by insolubilization in ethanol, are microparticles (MPCs) co-extracted with phenolic compounds and pentameric proanthocyanidins (Basanta et al., 2016), being then fiber potentially antioxidant. Fiber polyphenols were biologically evaluated in vitro in their capability to protect human embryonic kidney (Hek-293) cells against the oxidative stress induced by *tert*butyl hydroperoxide (t-BOOH). Cytotoxicity was also evaluated. The increased level of intracellular oxidative species induced by t-BOOH was measured through the dichlorofluorescein (DCF). Cell viability was measured using the MTT assay (dimethyl tetrazole) and the cytotoxic concentration necessary to reduce the viability in a 50% (50CC) was calculated. Cells treated with t-BOOH showed a significant increase in the generation of oxidants. When Hek-293 cells were co-incubated with increasing concentrations of polyphenol extract (0.5-3.0 µg/mL), the production of oxidants was significantly reduced ($p < 0.05$) in a concentration dependent manner, reaching a 100% of protection at 3.0 µg/mL. Cell viability diminution was not observed after cell treatment for 24hs with the extract concentrations that showed antioxidant effect (3-100 µg/mL). Consequently, a $50CC > 100$ µg/mL was determined. Polyphenol contained in plum fibers showed a protective effect against oxidative stress and low cytotoxicity.

Keywords: polyphenols, plums, cytotoxicity, oxidative stress.



INTRODUCCIÓN

Existe un interés creciente por el aprovechamiento de los residuos vegetales de las cosechas y de la industrialización de frutas y verduras, no solo por ser una importante fuente de fibra dietaria sino también por poseer compuestos bioactivos beneficiosos como polifenoles antioxidantes. El desarrollo de nuevos ingredientes multifuncionales a partir de estos residuos y su aplicación en diferentes productos alimenticios como preservadores naturales constituyen un importante desafío, como las micropartículas comestibles (MPC) portadoras de antioxidantes naturales (AONs).

Los compuestos fenólicos constituyen el grupo más extenso de sustancias no energéticas presentes en los alimentos de origen vegetal. En los últimos años se ha demostrado que una dieta rica en polifenoles vegetales puede mejorar la salud y disminuir la incidencia de enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y en la promoción del cáncer (Quiñones et al. 2012). La capacidad de los polifenoles para modular la actividad de diferentes enzimas e interferir consecuentemente en mecanismos de señalización en distintos procesos celulares puede deberse, al menos en parte, a las características fisicoquímicas que les permiten participar en distintas reacciones metabólicas celulares de óxido-reducción (Álvarez Castro y Cambeiro 2003; Tomás-Barberán 2003). Sus propiedades antioxidantes justifican muchos de sus efectos beneficiosos pero no es la única característica relevante en su estructura, también su similitud con moléculas de señalización biológica le dan relevancia en la modulación de procesos celulares.

El objetivo del presente trabajo es evaluar la capacidad antioxidante de los polifenoles contenidos en las micropartículas (MPC) constituidas por fibras del exocarpio de ciruelas, que fueron identificados y cuantificados en un trabajo previo (Basanta et al. 2016), para revertir el estrés oxidativo inducido en células embrionarias humanas de riñón (Hek-293) por el terbutil-hidroperóxido (t-BOOH). Además de esta capacidad antioxidante, se determinó la concentración de extracto que podría ser citotóxica en este modelo celular y disminuir la viabilidad celular. Para esto se define la Concentración Citotóxica 50 (CC50) que se calculó como la concentración de extracto necesaria para reducir la viabilidad celular en un 50% con respecto a la célula no tratada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron ciruelas (*Prunus salicina*) descartadas en la cosecha por tamaño y formas irregulares.

Obtención de las MPCs

Una vez removido el exocarpio de los frutos se obtuvieron las MPCs separadamente del mesocarpio (pulpa) y exocarpio (piel) mediante un proceso de homogenización de cada tejido a alta cizalla en un Ultra Turrax T25, Germany), utilizando etanol frío 80% v/v (500 g de fruta/2L de EtOH). El homogenato fue hervido por 30 min, luego enfriado y centrifugado. El material insoluble se volvió a tratar a alta cizalla con etanol 95 % (v/v), luego fue centrifugado a 10.000 rpm a 4 °C, evaporado bajo campana para eliminar el etanol (23°C), congelado en freezer a -20°C y liofilizado. Mediante tamizado, se seleccionaron las MPCs de granulometría menor a 420µm (Basanta et al. 2016)

Extracto de compuestos fenólicos

Las MPCs de piel (2,5 g) fueron sonicadas durante 15 min suspendidas en 20 mL del solvente de extracción (acetona/agua/ácido acético 70:29,5:0,5 (v/v/v)) (García-Viguera et al. 1998). Luego se centrifugó a 10000 rpm por 15 min a 4 °C. Se evaporó la acetona a 35°C y a presión reducida. El residuo acuoso fue sembrado en una columna (Sep-Pack C18 Waters, Milford, MA, USA) lavado con 10 ml de agua y eluido con 1 mL de MeOH. El extracto fue evaporado hasta sequedad bajo corriente de nitrógeno y el residuo sólido fue re-disuelto en metanol/buffer Fosfato Salino (PBS) (1:1(v/v)) en esterilidad. El extracto obtenido contiene 5,525 mg de compuestos polifenólicos (proantocianidinas pentaméricas y polifenoles libres) (Basanta et al. 2016).

Cultivo celular y condiciones de incubación

Células embrionarias humanas de riñón (Hek-293) fueron incubadas a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% CO₂/95% aire con Medio de cultivo con sales Eagle modificado (DMEM- Dulbecco), suplementado con 10% (v/v) de Suero fetal Bovino (SFB) y antibióticos (50 U/mL penicilina y 50 mg/mL estreptomycin). Para los tratamientos de células se partió de 5.5 mg de extracto de polifenoles que se resuspendieron en



metanol/PBS (1:1 (v/v)) hasta una concentración final de 100 μ g/mL. Se utilizaron diferentes concentraciones de este extracto (0–100 μ g/mL) y diferentes tiempos de incubación: para el ensayo de citotoxicidad, las células fueron incubadas durante 24 horas, mientras que para evaluar los niveles de oxidantes celulares, fueron incubadas durante 1 hora en presencia t-BOOH (Alía et al. 2006, Alía et al. 2005)

Efecto antioxidante

La oxidación celular se evaluó utilizando la sonda fluorescente diacetato de 2',7'-Diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) descrito previamente (Erlejman et al. 2008). Brevemente, DCFH-DA difunde a través de la membrana celular, cuando su localización es citoplasmática, es hidrolizada enzimáticamente por esterasas intracelulares a 2',7'-Diclorodihidrofluoresceína (DCFH). El clivaje por esterasas facilita la retención de la sonda en el compartimento intracelular, dado que la sonda adquiere carga neta y no puede volver a salir por la membrana plasmática. En presencia de oxidantes intracelulares, DCFH se oxida a 2',7'-Diclorofluoresceína (DCF), convirtiéndose en el compuesto fluorescente (Gomes et al. 2005).

Las células Hek-293 fueron sembradas 24 horas antes del experimento, luego fue removido el medio DMEM con SFB y se incubaron con diferentes concentraciones (0,5–3,0 μ g/mL) de extracto durante 1 hora en presencia de 0,4 mM t-BOOH, en medio DMEM libre de SFB, según Basanta et al. (2016). Luego del tratamiento con el peróxido, se removió el medio de cultivo y las células fueron incubadas con DCFH-DA 10 μ M durante 30 min, a 37 °C en estufa con una atmósfera humidificada de 5% CO₂/95% aire en DMEM. Luego de la remoción del medio con sonda y del lavado con PBS. Se procedió a lisar las células con una solución de Igepal 0,1% en PBS, durante 20 min a 4°C. En el sobrenadante obtenido luego de centrifugar a 10.000g durante 2 min, se midió la fluorescencia de DCF (longitud de onda de excitación (λ_{exc}): 485 nm; longitud de onda de emisión (λ_{em}): 520 nm) en FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech, Jena, Alemania). Los valores de fluorescencia de DCF se normalizaron por la cantidad de células a partir de la medición de contenido total de ADN con yoduro de propidio (IP) 50 μ M (λ_{exc} : 520 nm; λ_{em} : 540 nm). Los valores se expresaron como la relación DCF/IP, relativa al control sin tratamiento (nivel de oxidación igual a 1).

Ensayo de citotoxicidad

La citotoxicidad de los extractos de los polifenoles fue evaluada según el ensayo de MTT, modificado a partir del método reportado por Fissore et al. (2014). Para esto se sembraron 5x10⁵ células Hek-293 por pocillo (en placas 96 pocillos) y fueron incubadas con diferentes concentraciones de extracto (3–100 μ g/mL) por 24 horas o con vehículo (metanol/PBS v/v 1:1). Posteriormente, el MTT fue agregado a una concentración final de 125 μ g/mL a cada pocillo durante 1 hora a 37°C y 5% CO₂. La metabolización del MTT produce la formación de sales coloreadas de formazán. El formazán fue solubilizado con 200 μ l de DMSO por pocillo y la formación del producto coloreado fue cuantificado por absorbancia a λ_1 :570nm menos λ_2 :655nm. La Concentración Citotóxica 50 (CC50) se calculó como la concentración de extracto necesaria para reducir la viabilidad celular en un 50% con respecto a la célula no tratada. Además de la viabilidad celular, producto del tratamiento con el extracto, se evaluó el posible efecto citotóxico del vehículo [mezcla de solventes donde fue re-disuelto el extracto: metanol/PBS 1:1 (v/v)]. En la Tabla 1 se indica el volumen de vehículo utilizado para cada concentración final de extracto ensayada, el volumen final de incubación fue de 500 μ L.

Tabla 1. Volumen de vehículo utilizado para cada concentración final de extracto ensayada.

Concentración extracto (μ g/mL)	0	3	5	10	30	50	70	100
Volumen vehículo (μ L)	0	0,42	0,7	1,4	4,2	7	9,8	14

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los extractos metanólicos de polifenoles, constituidos por proantocianidinas pentaméricas y polifeolessimples (Basanta et al. 2016), fueron evaluados biológicamente en su capacidad antioxidante y en



su citotoxicidad mediante el uso de células Hek-293. Se evaluó el efecto del extracto en forma concentración dependiente frente a células expuestas a estrés oxidativo inducido por t-BOOH. La línea celular Hek-293 se utilizó como un modelo in vitro de células humanas.

Capacidad antioxidante

Como se reportó anteriormente, el t-BOOH evoca un estrés celular constante por la generación de ROS (especies reactivas del oxígeno) en experimentos de cultivo celular a corto plazo (Alía et al. 2005). Se ensayaron distintas concentraciones de t-BOOH entre (0,4 a 10 mM). Para las concentraciones más bajas, las células mostraron un aumento en la generación de oxidantes en comparación con las células control no tratadas. Para la concentración de 10 mM se observa que nuestro sistema de detección de ROS pierde eficacia producto de la muerte celular generada, debido a que la sonda DCFH-DA requiere de esterasas endógenas para estar disponible para ser oxidada (**Figura 1**). Para las concentraciones de 0,4 a 10 mM de t-BOOH, no se detectaron cambios en los valores de fluorescencia del IP, referente del contenido de ADN como cantidad de células. Concentraciones más elevadas de t-BOOH mostraron una disminución en la relación DCF/PI, denotando un compromiso en la viabilidad celular. Por lo tanto se decidió utilizar una concentración del agente oxidante t-BOOH de 0,4 mM, para asegurarse de generar y evaluar solamente un efecto oxidante, pero sin causar citotoxicidad en los tiempos ensayados (1 hora). A continuación, se determinó la capacidad protectora del extracto de polifenoles MCPs de piel de ciruela (“Extracto”) por la co-incubación del mismo con 0,4 mM de t-BOOH (**Figura 2**). Se ensayaron concentraciones de extracto de 0,5 a 3,0 µg/ml, para las cuales se encontró una disminución significativa frente la oxidación inducida por t-BOOH en forma concentración dependiente. Para el tratamiento con 3 µg/ml del extracto, ya se alcanzó una protección del 100%. La disminución significativa en la oxidación respecto al tratamiento con t-BOOH se encontró a partir del 1,0 µg/ml de extracto.

Este efecto protector sobre la oxidación celular determinado para el extracto concuerda con el contenido de proantocianidinas (200 mg/100 g MPC) detectadas en las MPC de ciruelas reportadas por Basanta et al. (2016). De acuerdo con estos resultados, otros oligómeros de las proantocianidinas tales como las fracciones de hexámeros de proantocianidina aisladas del cacao ejercen un efecto protector sobre las células Caco-2 frente a un aumento de oxidantes celulares y la pérdida de la integridad de la monocapa (Erlejman et al. 2006), y previenen el factor alfa de necrosis tumoral (Erlejman et al. 2008).

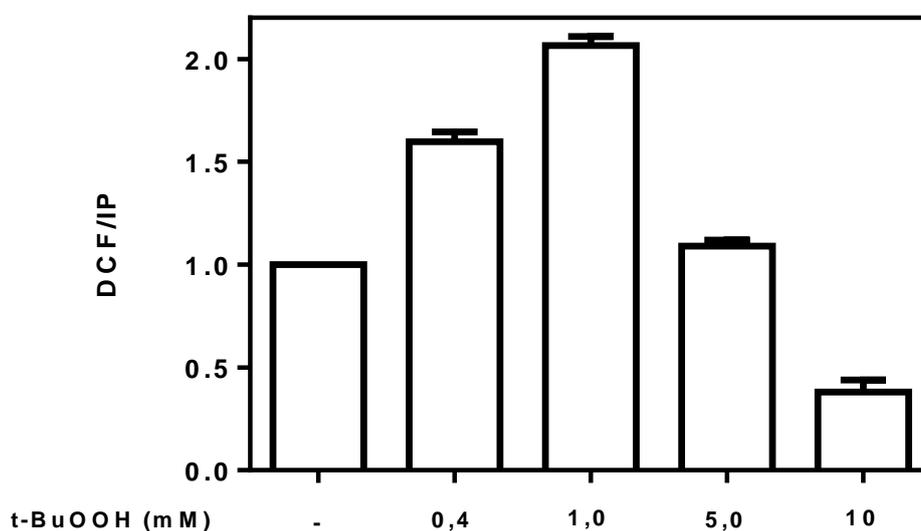


Figura 1. Efecto oxidante de t-BOOH. Los resultados se expresan como fluorescencia relativa de DCF por contenido de ADN, ioduro de propidio (IP).

Se consideró como nivel de oxidación 1 a las células sin tratamiento con oxidante y los demás grupos de células se graficaron como veces con respecto al control.



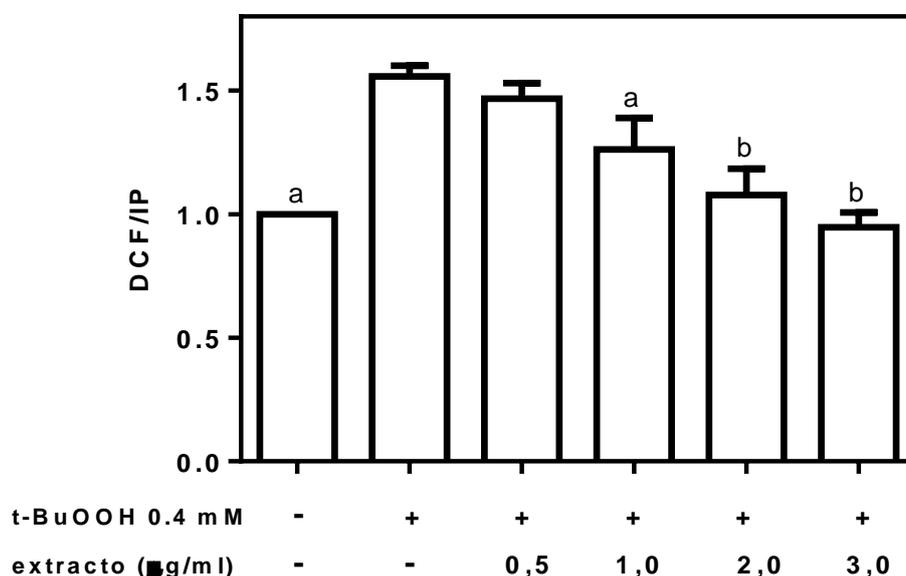


Figura 2. Efecto protector de los extractos de polifenoles obtenidos a partir de las MPCs de ciruela en células Hek-293 sometidas a estrés oxidativo con t-BOOH.

Los resultados se expresan como fluorescencia relativa de DCF por contenido de ADN (fluorescencia de yoduro de propidio): DCF/IP. El valor de 1 (unidad) de oxidación fue asignado a las células que no recibieron tratamiento con t-BOOH. a, b significa diferencias con respecto a las células tratadas con t-BOOH incubadas sin el extracto ($p = 0,01$, $p = 0,05$, respectivamente).

Viabilidad celular

Con el fin de evaluar el efecto directo del extracto sobre las células Hek-293 y para confirmar que la disminución de oxidante celular se relaciona con su efecto protector, sin dañar la viabilidad celular, se evaluó la citotoxicidad del extracto. La viabilidad celular se midió usando el ensayo de MTT, y la CC50 se calculó como el marcador de la citotoxicidad de las células. Se realizó un control con vehículo para cada concentración de extracto ensayada. Como se muestra en la **Figura 3**, cuando las células Hek-293 fueron tratadas durante 24 horas con extracto en un intervalo de concentraciones que varían de 0,3 a 100 µg/µg/mL la viabilidad celular no se redujo cuando se comparó con el vehículo hasta 10 µg/ml. El CC50 calculado es mayor a 100 µg/mL (CC50 = 116,4 µg/mL). Por lo tanto, las concentraciones utilizadas como antioxidante en la **Figura 1** son seguras en relación a la viabilidad celular y no se puede atribuir el efecto antioxidante a un cambio en la viabilidad celular o número total de células presentes en el ensayo. Este rango de concentraciones concuerda con una concentración segura que fue determinada recientemente para los extractos de polifenoles obtenidos a partir de uvas cuando fueron evaluados en células de macrófagos de ratón RAW 264.7 (Melo et al. 2015).

En la **Figura 4** se muestran imágenes representativas de las células tratadas con el extracto durante 24 horas adquiridas con microscopio óptico invertido (Olympus FV-1000, 60x) previo a la incubación con MTT. Se analizó la morfología celular para los distintos tratamientos en comparación con el control (sin tratamiento) y con los correspondientes volúmenes de vehículo utilizados. En la **Figura 4** se muestran imágenes adquiridas para control, (3, 10, 30 y 100) µg/mL de extracto, así como también para la mayor cantidad de vehículo. Las células tratadas con el vehículo no mostraron diferencias morfológicas con las células control, mientras que



para las células tratadas con el extracto, la morfología normal se observa alterada a partir de la incubación con 30µg/ml de extracto, lo cual es consistente con el análisis de la viabilidad celular por el ensayo de MTT. No se observan diferencias entre las células control y las concentraciones de extracto para las cuales se evaluó el efecto antioxidante.

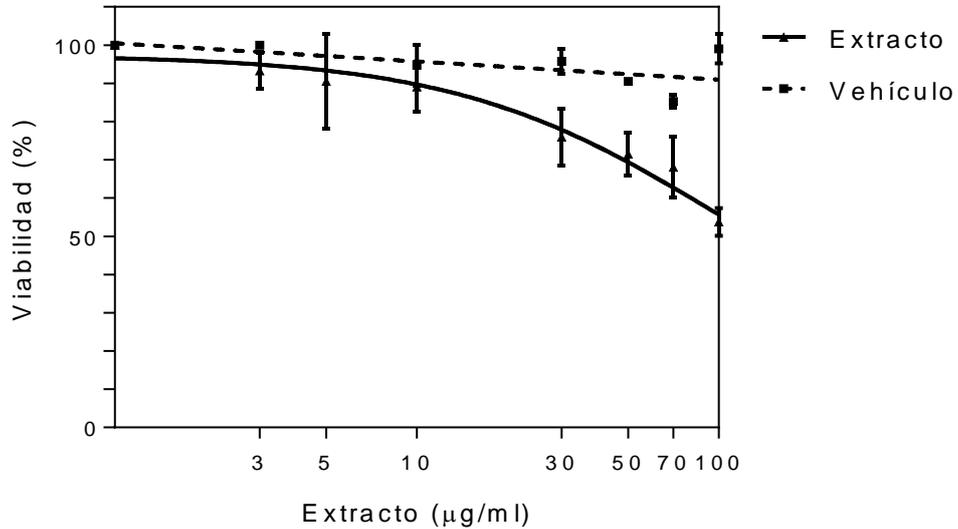


Figura 3. Evaluación de la citotoxicidad de los extractos de los polifenoles obtenidos a partir de las MPC de la piel de ciruela en células Hek-293.

Los datos se expresan como porcentaje de la viabilidad celular con respecto a las células no tratadas (100% de viabilidad celular corresponde al grupo de células que no fueron incubadas con extracto). Los valores experimentales se ajustaron a una curva dosis-respuesta sigmoideal: extracto (línea continua) o vehículo (línea punteada). El vehículo se grafica como el resultado obtenido para el equivalente de volumen agregado de diluyente para cada concentración final de extracto indicada en el eje x. a, b indica diferencias significativas con respecto a vehículo ($p < 0,01$, $p < 0,05$, respectivamente).

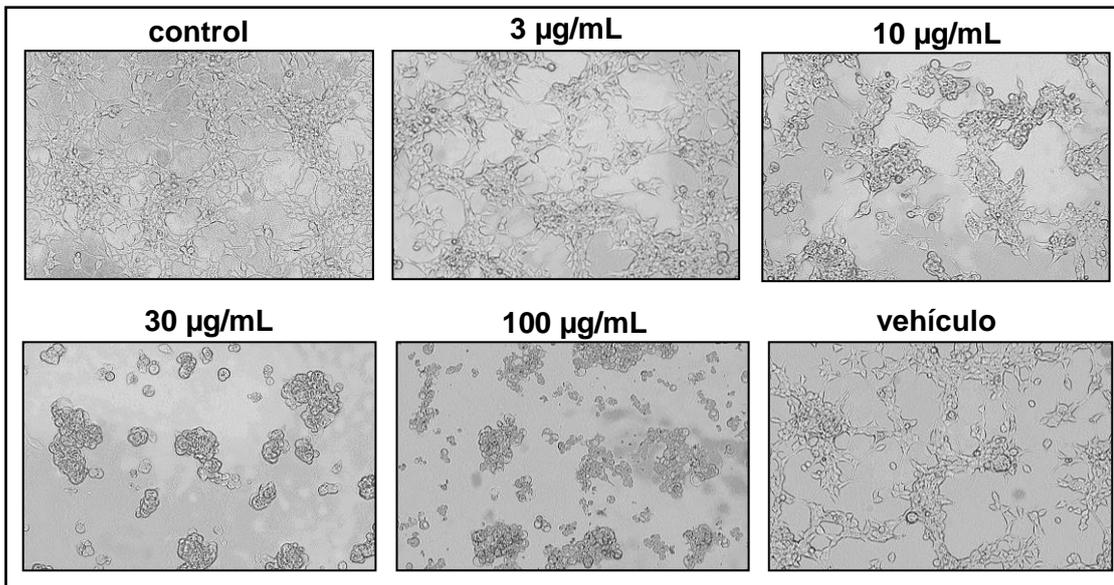


Figura 4. Imágenes representativas de células Hek-293 luego del tratamiento con extracto durante 24 horas.



En estas imágenes se observa que las células recién pierden su morfología normal a partir de la incubación con 30 $\mu\text{g/ml}$ de extracto, una concentración 10 veces mayor a la detectada con actividad antioxidante, mientras que no se observan cambios con el mayor volumen de vehículo ensayado con respecto a células control (sin tratamiento). Las condiciones evaluadas para el ensayo de oxidación no muestran alteraciones morfológicas.



CONCLUSIONES

Los compuestos polifenólicos presentes en los extractos obtenidos a partir de las MPCs de fibra de piel de ciruela presentan capacidad antioxidante demostrada por su efecto protector contra el estrés oxidativo a nivel celular, asociado principalmente con el contenido de proantocianidinas pentaméricas y compuestos fenólicos libres del extracto, tal como fuera determinado en un trabajo previo de los mismos autores. Además, se puede afirmar que el extracto no es citotóxico, demostrado por la determinación de una CC50 > 100 µg/mL (concentración máxima ensayada), y la observación de su morfología celular inalterada.

BIBLIOGRAFÍA

- Alía M, Ramos S, Mateos R, Bravo L, Goya L. 2005. Response of the antioxidant defense system to tert-butyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in a human hepatoma cell line (HepG2). *Journal Biochemical Molecular Toxicology*, 19: 119–128.
- Alía M, Ramos S, Mateos, R, Granado-Serrano, AB, Bravo L, Goya L. 2006. Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 212:110–118.
- Álvarez Castro E, Cambeiro FO. 2003. Actividad biológica de los flavonoides (I). Acción frente al cáncer, *Offarm*, 22:130-140.
- Basanta MF, Marin A, De Leo S, Gerschenson LN, Erlejman AG, Tomás-Barberán FA, Rojas AM 2016. Antioxidant Japanese plum (*Prunus salicina*) microparticles with potential for food preservation. *Journal of Functional Foods*, 24: 287-296.
- Erlejman AG, Fraga CG, Oteiza, PI. 2006. Procyanidins protect Caco-2 cells from bile acid- and oxidant-induced damage. *Free Radical Biology and Medicine*, 41: 1247–1256.
- Erlejman, AG, Jiggers G, Fraga CG, Oteiza PI. 2008. TNFalpha-induced NF-kappaB activation and cell oxidant production are modulated by hexameric procyanidins in Caco-2 cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476: 186– 195.
- Fissore EN, Santo Domingo C, Pujol C, Damonte E, Rojas AM, Gerschenson LN. 2014. Upgrading of residues of bracts, stems and hearts of *Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* to functional fractions enriched in soluble fibre. *Food & Function*, 5: 463–470.
- García-Viguera C, Zafrilla P, Tomás-Barberán FA 1998. The use of acetone as extraction solvent for strawberry fruit anthocyanins. *Phytochemical Analysis*, 9: 274–277.
- Gomes A, Fernandes A, Lima J. 2005. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical methods*, 65: 45-80.
- Melo PS, Massarioli A P, Denny C, Dos Santos LF, Franchin M, Pereira, GE, de Alencar, SM. 2015. Winery by-products: Extraction optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species. *Food Chemistry*, 181: 160–169.
- Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. 2012. The polyphenols, naturally occurring compounds with beneficial effects on cardiovascular disease. *Nutrición Hospitalaria*, 27: 76-89.
- Tomás-Barberán FA. 2003. Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alimentación, Nutrición y Salud*, 10: 41-53.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo financiero de la Universidad de Buenos Aires, CONICET y ANPCyT.



PRINCIPIOS BIOACTIVOS EN EL GRANO Y PRODUCTOS PRECOCIDOS DE KIWICHA (*AMARANTHUS CAUDATUS*)

Burgos V.E. (1), Armada M. (2)

(1) CONICET – Instituto de Investigación para la Industria Química (INIQUI). Universidad Nacional de Salta, Argentina. (2) Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Salta, Argentina.

veritoburgos1@gmail.com

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue determinar fitoesteroles, polifenoles totales, fibra alimentaria y almidón resistente, en el grano y en productos precocidos de kiwicha. Materia prima: granos de kiwicha (GC) (*Amaranthus caudatus*), inflado (KI) y laminado (KL). Cuantificación: fitoesteroles totales y β -sitosterol, sitostanol, estigmasterol, campesterol, brassicasterol; polifenoles totales (EAG); fibra alimentaria (FA), insoluble (FI) y soluble (FS); almidón resistente (AR), no soluble (ANR) y total (AT). Análisis estadístico: análisis de varianza y test Tukey ($p < 0,05$). Las muestras estudiadas presentaron un valor alto de fitoesteroles totales, β -sitosterol (65%) y sitostanol (31%). El GC presentó 0,89 mg EAG/g muestra, observándose una reducción del 9% a 17% en los precocidos ($p < 0,05$). La FA (g/100g bs) fue mayor en el GC y el tratamiento térmico provocó una reducción del 11% (KI) y 14% (KL). El AT fue similar entre las muestras. Existieron diferencias significativas ($p < 0,05$) en el contenido de ANR entre el GC y los productos precocidos. El AR se encontró por debajo de los límites de sensibilidad de detección del método utilizado. El grano y los productos de kiwicha presentaron un buen aporte de polifenoles, fitoesteroles y fibra dietaria, principalmente de tipo insoluble. Conclusión: el grano de kiwicha presenta compuestos bioactivos beneficiosos para la salud.

Palabras clave: principios bioactivos, granos de kiwicha, productos precocidos.

ABSTRACT

The aim of this work was to determine phytosterols, total polyphenols, total dietary fiber and resistant starch in the grain amaranth and precooked products. Material: grain kiwicha (GC) (*Amaranthus caudatus*), puffed (KI) and laminated (KL). Quantification: total phytosterols and beta-sitosterol, sitostanol, stigmasterol, campesterol, brassicasterol; total polyphenols (EAG); Total dietary fiber (FDT), insoluble (FI) and soluble (FS); resistant starch (AR), indigestible (ANR) and total (AT). Statistical analysis: analysis of variance and Tukey test ($p < 0.05$). The samples studied showed a high value of total phytosterols, beta-sitosterol (65%) and sitostanol (31%). The GC had 0.89 mg EAG/g sample, showing a reduction of 9% to 17% in the precooked ($p < 0.05$). The FDT (g/100g bs) was high in the GC and heat treatment caused a reduction of 11% (KI) and 14% (KL). The AT was similar between samples. There were significant differences ($p < 0.05$) in the content of ANR between the GC and precooked products. The AR was found to be below the limits of detection sensitivity of the method used. The grain and products of kiwicha had a good supply of polyphenols, phytosterols and dietary fiber, mainly insoluble type. Conclusion: kiwicha grain presents bioactive compounds beneficial to health.

Keyword: Bioactive principles, kiwicha grains, precooked products.

INTRODUCCIÓN

El amaranto es un alimento rico en compuestos bioactivos por lo que puede ser usado en la elaboración de alimentos funcionales, éstos son: fitoesteroles, escualeno, polifenoles, fibra alimentaria. Repo-Carrasco-Valencia et al. sugieren que el consumo de amaranto puede reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares. Estos compuestos están relacionados con la disminución del estrés oxidativo, que es inducido por los radicales libres, los cuales están asociados en la etiología de las enfermedades crónicas



(Lagarda et al. 2006; Liu 2004).

Los fitoesteroles son componentes bioactivos de los alimentos vegetales. En las plantas, hay más de 200 diferentes tipos de fitoesteroles. El más abundante es el β -sitosterol (24- α -ethylcholesterol), campesterol (24- α -methylcholesterol) y estigmasterol (Δ^{22} ,24- α -ethylcholesterol) (Kritchevsky y Chen 2005). Se cree que el consumo de fitoesteroles puede afectar positivamente el nivel de colesterol en sangre y por lo tanto en la protección contra enfermedades cardiovasculares (Lagarda et al. 2006). La inclusión del aceite de amaranto en la alimentación tiene un efecto beneficioso en la acción de enfermedades coronarias e hipertensión, además puede utilizarse como un suplemento antioxidante natural eficaz para proteger las membranas celulares contra daño oxidativo (Martirosyan et al. 2007).

La cantidad total de ácidos fenólicos en granos de kiwicha es de 16,8 a 59,7 mg/100g. La proporción de ácidos fenólicos solubles es de 7% a 61%; sin embargo, no contiene cantidades cuantificables de flavonoides y tiene cantidades bajas de betalaínas (Repo-Carrasco-Valencia et al. 2010). El grano de kiwicha es buena fuente de fibra dietética, especialmente del tipo insoluble (Kaur et al. 2010).

El almidón resistente (AR) ha sido definido como la suma del almidón y productos de la degradación del mismo, no absorbidos en el intestino delgado de individuos sanos (Muir et al. 1993).

El AR tiene la capacidad de modular los niveles de glucosa postprandial y puede ser fermentado por la microflora del colon para producir ácidos grasos de cadena corta, los que ejercen beneficios positivos para la salud humana tales como el aumento del flujo sanguíneo del colon para aliviar su inflamación y una disminución del riesgo de cáncer de colon y/u otros tipos de cáncer (Dupuis et al. 2014; Lagarda et al. 2006). Varios investigadores han estudiado el contenido de almidón resistente en el grano de amaranto y diferentes productos precocidos encontrándose valores muy variados que van desde 0,12 a 1,24% (Capriles et al. 2008, González et al. 2007, Repo-Carrasco-Valencia et al. 2009).

Por todo lo expuesto anteriormente, el objetivo del presente trabajo fue determinar los principios bioactivos: fitoesteroles, polifenoles totales, fibra dietaria total y almidón resistente en el grano y productos precocidos de kiwicha.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se trabajó con granos de kiwicha (*Amaranthus caudatus*), procedente de la localidad de Cachi, provincia de Salta, correspondientes a cosechas de la misma variedad de los años 2012 a 2015.

Métodos

Obtención de productos precocidos

Para la obtención de la kiwicha inflada (KI), se utilizó un recipiente de aluminio para hacer pochoclos de maíz, el cual fue adaptado para la elaboración del producto inflado debido al tamaño pequeño de los granos de kiwicha. El recipiente consta de una tapa con hélice que permite mezclar los granos, a medida que se van inflando. Se utilizó una cocina de gas Tivoli 500 G.E. V/S 50CM (Argentina). Al término del proceso de inflado, se pasaron los granos reventados sobre una malla 16 Mesh (1190 μ m – ASTM), los cuales fueron seleccionados para su posterior análisis. Al producto obtenido se lo denominó kiwicha inflada (KI). Las variables de proceso fueron: humedad inicial: 7,20%; tiempo de expansión: 30 segundos y temperatura: 160°C \pm 2°C. Para medir ésta última se utilizó un termómetro infrarrojo marca CEM (-50°C-500°C) (Burgos y Armada 2015).

Para la elaboración de la kiwicha laminada (KL), se utilizó un laminador doble tambor o rodillo, donde cada rodillo mide 39x40 cm. Los granos de kiwicha fueron previamente humectados, con una relación (p/v) de granos de kiwicha/ agua de 1/0,8. La muestra se aplicó sobre la superficie externa de un rodillo caliente, el cual rota lentamente sobre su eje horizontal. La capa del material permanece adherida al rodillo aproximadamente el 80% de una revolución; durante este tiempo, la humedad se evapora dejando una capa de sólidos que es removida de la superficie del rodillo por un raspador (Burgos y Armada 2015). Por trabajo previo realizado (Burgos et al. 2013), las variables de proceso fueron: humedad inicial: 18%; velocidad de rotación de los rodillos: 5 rpm; separación de los rodillos: 1 mm; temperatura de los rodillos: 120°C y tiempo de residencia: 11 segundos.



Como patrón de referencia se utilizó un producto inflado de amaranto comercial (AIC) obtenido de una dietética de Salta.

Determinación de Fitoesteroles

Se realizó la cuantificación de fitoesteroles según la metodología Analítica: COI T20 Documento N°10 Modif./2001. El mismo fue analizado en el laboratorio INDUS-LAB (Laboratorio de Análisis industriales, físico químicos y bacteriológicos), Hurlingham, Buenos Aires.

Para la detección y cuantificación de fitoesteroles, se determinó a través de Cromatografía Gaseosa (CG) con detector por ionización por llama (FID). Se empleó el equipo marca Hewlett Packard Serie 6890. La columna utilizada fue Crompack CP8 de 30 m x 0,25 x 0,25. Los resultados se expresaron sobre el contenido total de fitoesteroles (mg/100 g aceite). Se identificaron: β -Sitosterol, Sitostanol, Estigmasterol, Campesterol y Brassicasterol.

Determinación de Polifenoles Totales (EAG)

Se determinó según la técnica de Singleton et al. (1999). La curva de calibración fue realizada con ácido gálico (mg/mL) en concentraciones de 0-90 μ g/mL. La concentración de compuestos fenólicos fue expresada en equivalentes de ácido gálico (mg EAG/g de muestra). Para la obtención de los extractos se pesaron 2 g de muestra del grano y precocidos de kiwicha. Luego, se le adicionaron a las muestras 40 mL de disolvente que consiste en metanol, ácido clorhídrico (0,16 mol/L) y agua, mezclados en una proporción 8:1:1, respectivamente, durante 2 horas. Después, se centrifugaron los extractos (centrífuga Gelec 142, Argentina) a 1500 g y se filtraron. Los residuos se extrajeron de nuevo con 40 mL de acetona durante 2 h, se centrifugaron a 1500 g y se filtraron. El extracto inicial de metanol más este último extracto, fueron mezclados y se almacenaron protegidos de la luz a temperatura de -4°C, hasta su análisis (Chlopicka et al. 2012).

Determinación de Fibra Alimentaria (FA), Insoluble (FI) y Soluble (FS)

Esta determinación fue realizada en el laboratorio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. Se determinaron fibra dietaria total, fibra insoluble y por diferencia se calculó la fibra soluble, según método 991.43 (AOAC 1996).

Determinación de almidón total (AT), no resistente (ANR) y resistente (AR)

La determinación de almidón resistente se realizó de acuerdo al método de la AOAC 2002.02 (2002), AACC 32-40 (2002), utilizando el kit de ensayo K-RSTAR 09/14 (Megazyme International Ireland Ltd., Bray, Ireland). El contenido de almidón total se obtuvo como la suma del contenido del almidón resistente más el de almidón no resistente.

Análisis Estadístico

Se realizó usando el programa estadístico InfoStat (Di Rienzo et al. 2008). Los datos fueron evaluados usando el análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) para un nivel de significancia $p < 0,05$. Se empleó el test de comparaciones múltiples de Tukey para establecer las diferencias significativas entre tratamientos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fitoesteroles

En la **Figura 1** se presenta el contenido de fitoesteroles identificados en el grano y productos precocidos de kiwicha. El grano presentó un valor de 1567,33 mg/100g de aceite. Valores similares de 1596,84 mg/100g de aceite y 1585,10 mg/100g de aceite, presentaron la kiwicha inflada y laminada, respectivamente.



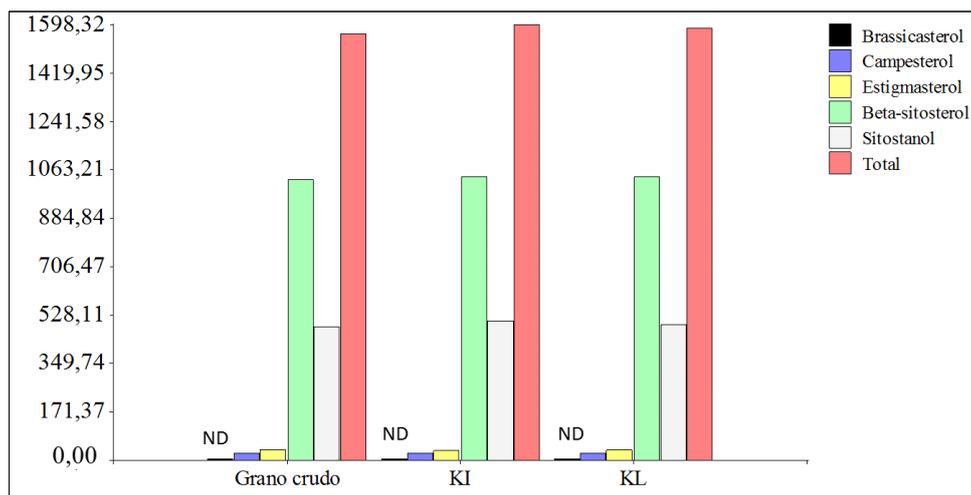


Figura 1. Contenido de fitoesteroles (mg/100g de aceite) del grano crudo, kiwicha inflada y kiwicha laminada. KI: Kiwicha Inflada; KL: Kiwicha Laminada; ND: no detectado.

Czaplick et al. (2011), obtuvieron contenidos superiores a 2616 mg/100 g de aceite en el grano de amaranto. Berger et al. (2003), encontraron valores de fitoesteroles a 2730 mg/100g de aceite en el grano de amaranto. Las investigaciones han demostrado que los fitoesteroles más comunes en las plantas son: β -sitosterol, campesterol y estigmasterol (Awad et al. 2000). En la presente investigación, el análisis de las muestras mostró la presencia de tres principales fitoesteroles, observándose que el de mayor porcentaje en el grano, kiwicha inflada y laminada, fue el β -sitosterol (65%), correspondientes a valores entre 1028,28, 1039,85 y 1037,31 mg; el sitostanol (31%) presentó un 485,67, 508,52 y 495,38 mg, respectivamente. El de menor porcentaje fue el estigmasterol con el 2% (30,42 a 33,34 mg) y el 1% de campesterol (18,06 a 20,04 mg). El brassicasterol no fue detectado, esto coincide con Czaplick et al. (2011). Marcone et al. (2004), estudiaron distintas especies del grano de amaranto y encontraron que el 97% del total de fitoesteroles era β -sitosterol y el resto, campesterol y estigmasterol.

Es interesante observar investigaciones donde demuestran que las dietas de los animales suplementados únicamente con aceite de amaranto (donde se encuentran los fitoesteroles) poseen la capacidad de reducir de forma significativa los niveles de colesterol en sangre y los niveles de colesterol-LDL totales, mientras que aumentan significativamente los niveles de colesterol HDL (Lagarda et al. 2006). Estudios previos sugieren que el consumo de 2 g diarios de fitoesteroles reducen los niveles de colesterol sanguíneo (Normén 2004, Ros 2006). Martirosyan et al. (2007), determinaron que la inclusión de 18 mL de aceite del grano de amaranto en la alimentación de pacientes que sufren hipertensión y enfermedades coronarias, disminuyó significativamente los valores de colesterol total, triglicéridos, LDL y VLDL colesterol, como así también proporciona ácidos grasos poliinsaturados, particularmente ácidos grasos omega 3 y fuente de escualeno.

Polifenoles Totales

En la tabla 1 se muestra el contenido de polifenoles totales de las muestras estudiadas. El grano crudo presentó el mayor aporte. Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre las muestras analizadas. Los valores obtenidos para el grano de kiwicha son superiores a los de otras investigaciones, probablemente pueda deberse al tipo de extracción realizada. Al respecto, varios autores resaltan la importancia del método de extracción y del solvente utilizado (Gorinstein et al. 2007, Nsimba et al. 2008, Ozsoy et al. 2009). Carrasco y Encina Zelada (2008) obtuvieron contenidos de compuestos fenólicos en el rango de 0,19 a 0,30 mg EAG/g de muestra en extractos metanólicos de variedades de *A. caudatus*. Czerwinski et al. (2004) informaron valores de 0,149 y 0,147 mg EAG/g de muestras de harinas de *A. hypochondriacus*. Álvarez Jubete et al. (2010), obtuvieron valores de polifenoles en dos tipos de granos de *Amaranthus caudatus*, entre 99-113 mg EAG/100g de muestra.

Tabla 1. Contenido de polifenoles totales (mg EAG/g muestra b.s) del grano crudo, Kiwicha inflada y



Kiwicha laminada	
Muestras	Polifenoles totales
Grano crudo ¹	0,893±0,003 ^c
Kiwicha Inflada ²	0,812±0,002 ^b
Kiwicha Laminada ³	0,740±0,002 ^a

Valores con letra diferente son significativamente diferentes (p<0,05).

En la presente investigación, el contenido de fenoles se redujo en un 9% y 17%, en la kiwicha inflada y kiwicha laminada, respectivamente. En un estudio realizado por Álvarez Jubete et al. (2010), observaron que el proceso de extrusión afectó el contenido de fenoles totales en las variedades Centenario y Oscar Blanco de amaranto, disminuyendo un 80,3% y 64,4%, respectivamente. Severino de Queiroz et al. (2009), estudiaron el efecto del procesamiento en granos extrudidos, tostados y cocidos de amaranto, sobre el contenido de polifenoles y observaron una reducción del 24 % y 30%.

El grado de pérdida debido al procesamiento, ha sido demostrado por ser altamente dependiente de factores tales como el tipo de sustrato y las condiciones de procesamiento, principalmente el tiempo y la temperatura del proceso (Sensoy et al. 2006). Por ejemplo, en el mismo estudio, se observó que la extrusión no afectó a la actividad antioxidante del trigo sarraceno, mientras que el tostado causó una ligera disminución de la actividad antioxidante. El procesamiento térmico de cereales, como el calor seco, también puede resultar en la síntesis de sustancias con propiedades antioxidantes, tales como algunos productos de reacción de Maillard en la corteza del pan (Lindenmeier y Hofmann 2004).

Fibra alimentaria, insoluble y soluble

En la Tabla 2 se presenta el contenido de fibra soluble, insoluble y fibra alimentaria. El contenido de fibra alimentaria tanto en el grano crudo como los productos precocidos fueron altos, según la clasificación del Código Alimentario Argentino. También pueden considerarse una buena fuente de fibra de tipo insoluble. La relación de fibra insoluble/soluble fue de 2,16. Tosi et al. (2001), obtuvieron para el grano entero de *Amaranthus cruentus*, valores de fibra insoluble y soluble de 8,1 g/100g y 6,1 g/100g, respectivamente, con una relación de fibra insoluble/soluble de 1,32. En coincidencia con otros autores, la fibra insoluble representa el 75-88% de la fibra alimentaria (Repo-Carrasco-Valencia et al. 2009, Tosi et al. 2001). Glorio et al. (2006), obtuvo valores más bajos de fibra soluble (3,19 g/100g) e insoluble (5,76 g/100g) en comparación con los valores obtenidos en este estudio, el cual depende principalmente de la especie y de la variedad, por lo que diversas especies y variedades de amaranto presentan valores de fibra alimentaria entre 9 a 16,5 g/100g.

Tabla 2. Contenido de fibra soluble, insoluble y fibra alimentaria (g/100g b.s) del grano crudo, KI y KL

Muestras	Fibra soluble ¹	Fibra insoluble	Fibra alimentaria
Grano crudo	4,84	10,46±0,26 ^a	15,30±0,46 ^b
Kiwicha Inflada	2,85	10,27±0,22 ^a	13,12±0,03 ^a
Kiwicha laminada	2,98	10,58±0,05 ^a	13,56±0,08 ^a

Valores en la misma columna con letra diferente son significativamente diferentes (p<0,05).

¹Calculado por diferencia

El tratamiento térmico disminuyó el contenido de fibra alimentaria, entre un 11% y 14% para la kiwicha inflada y laminada respectivamente. Esta pérdida fue estadísticamente significativa (p<0,05). No obstante, el contenido de fibra insoluble en comparación con el grano crudo, fue similar (p>0,05). Esto podría deberse a que la fibra se encuentra en las capas exteriores del grano, lo que provoca su pérdida al aplicar el proceso de laminación e inflado. Capriles et al. (2008) obtuvieron valores de fibra alimentaria en el grano de *Amaranthus cruentus* de 14,84 g/100g, y al estudiar el efecto del procesamiento de los mismos, a través del inflado, tostado, cocción agua y laminado no observaron diferencias significativas para los niveles de fibra



alimentaria y sus fracciones. En otro estudio, en el cual se obtuvieron productos precocidos por extrusión, el contenido de fibra alimentaria y fibra insoluble disminuyeron en las variedades de *A. caudatus* "Centenario" y "Oscar Blanco", mientras que en el "Centenario" el contenido de fibra soluble aumentó de 2,5% a 3,1% (Repo-Carrasco-Valencia et al. 2009).

Existen investigaciones que afirman que el grano de amaranto provoca una disminución del colesterol sanguíneo en animales de laboratorio, atribuidos al contenido de fibra dietética (Grajeta 1999, Plate y Áreas 2002).

Almidón resistente (AR) y no resistente (ANR)

El grano crudo obtuvo un valor de ANR (g/100g bs) de 68.40, KI: 66,47 y KL de 67,39. Contenidos entre 57,50-65,00 g/100g fueron obtenidos por Capriles et al. (2008).

No se observó diferencia estadísticamente significativa con la kiwicha inflada y laminada ($p>0,05$) para el ANR. El AR se encuentra por debajo de los límites de sensibilidad de detección del método enzimático utilizado en este estudio.

CONCLUSIONES

El grano de kiwicha y los precocidos obtenidos presentaron un alto valor de fitoesteroles totales. Al analizar el tipo de esteroides presentes, los de mayor aporte fueron el β -sitosterol y sitostanol.

La extracción de metanol-ácido para la cuantificación de polifenoles totales resultó eficaz, ya que los valores obtenidos para el grano de kiwicha fueron elevados. En los precocidos de kiwicha hubo una reducción mínima en el aporte de polifenoles.

El contenido de fibra alimentaria en el grano de kiwicha fue elevado, por lo que se considera una buena fuente de fibra, especialmente de tipo insoluble. La relación de fibra insoluble/soluble es alta. El procesamiento provocó una disminución en el contenido de fibra alimentaria.

Por el aporte de fibra, estos alimentos, resultan interesantes para la formulación de productos dietarios con posible efecto en la reducción de niveles de colesterol y la prevención de enfermedades coronarias.

Por lo tanto existen en el grano de kiwicha compuestos que potencialmente favorecerían la reducción del estrés oxidativo asociado a enfermedades crónicas, disminución del colesterol sanguíneo, regulación del tránsito intestinal y otros efectos beneficiosos para la salud.

BIBLIOGRAFÍA

Álvarez-Jubete L, Wijngaard H, Arendt EK, Gallagher E. 2010. Polyphenol composition and *in vitro* antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking. *Food Chemistry*, 119: 770-778.

American Association of Cereal Chemist (AACC). (2002). Approved methods of the AACC. Method 32.40–01. St. Paul, MN.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (1996). Official methods of Analysis (16th ed.). Washington: AOAC Inc.

Asociation of Official Analytical Chemists (AOAC). (2002). Official Methods of Analysis. Method 2002.02. Washington, D.C., USA.

Awad AB, Chan KC, Downie AC, Fink CS. 2000. Peanuts as a source of β -sitosterol, a sterol with anticancer properties. *Nutrition & Cancer*, 36(2): 238-241.

Berger A, Gremaud R, Baumgartner M, Rein D, Monnard I, Kratky E, Geiger W, Burri J, Dionisi F, Allan M, Lambelet P. 2003. Cholesterol-lowering properties of amaranth grain and oil in hamsters. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 73: 39–47.

Burgos VE, Armada M. 2015. Characterization and nutritional value of precooked products of kiwicha grains (*Amaranthus caudatus*). *Food Science and Technology*, 35(3): 531-538.

Burgos VE, Armada M, Lescano G. 2013. Calidad nutricional proteica de laminados de kiwicha, arroz y sémola de maíz. En XIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CYTAL), Buenos Aires, Argentina.



- Capriles VD, Coelho KD, Guerra-Matias AC, Arêas JAG. 2008. Effects of Processing Methods on Amaranth Starch Digestibility and Predicted Glycemic Index. *Journal of Food Science*, 73(7): 160-164.
- Carrasco RR, Encina-Zelada CR. 2008. Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos de cereales andinos: quinoa (*Chenopodium quinoa*), kaniwa (*Chenopodium pallidicaule*) y kiwicha (*Amaranthus caudatus*). *Revisión de la Sociedad Química de Perú*, 74(2): 85-99.
- Chlopicka J, Pasko P, Gorinstein S, Jedryas A, Zagrodzki P. 2012. Total phenolic and total flavonoid content, antioxidant activity and sensory evaluation of pseudocereal breads. *LWT-Food Science and Technology*, 46: 548-555.
- Czaplicki S, Ogrodowska D, Derewiaka D, Tanska M, Zadernowski R. 2011. Bioactive compounds in unsaponifiable fraction of oils from unconventional sources. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113: 1456-1464.
- Czerwinski J, Bartnikowska E, Leontowicz H, Lange E, Leontowicz M, Katrich E, Traktenberg S, Gorinstein S. 2004. Oat (*Avena sativa L.*) and amaranth (*A. hypochondriacus*) meals positively affect plasma lipid profile in rats fed cholesterol containing diets. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 15(10). 622-629.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, González L, Tablada M, Robledo CW. 2008. InfoStat (Software), GrupoInfoStat, FCA-UNC, Argentina.
- Dupuis JH, Liu Q, Yada RY. 2014. Methodologies for Increasing the Resistant Starch Content of Food Starches: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13: 1219-1234.
- Gavrielidou M, Vallous NA, Karapantsios T D, Raphaelideset SN. 2002. Heat transport to starch slurry gelatinizing between the drums of a double drum drier. *Journal of Food Engineering*, 54(1): 45-58.
- Glorio P, Repo-Carrasco-Valencia R, Velezmoro C. 2006. Almidón y fibra dietética en alimentos: experiencia en Perú. En: Lajolo y Wenzel (Org.), *Carbohidratos en Alimentos Regionales Iberoamericanos*. Sao Paulo. Universidad de Sao Paulo.
- González R, Tosi E, Ré E, Añón MC, Pilosof AMR, Martínez K. 2007. Amaranth starch-rich fraction properties modified by high-temperature heating. *Food Chemistry*, 103: 927-934.
- Gorinstein S, Vargas OJM, Jaramillo NO, Salas IA, Ayala ALM, Arancibia-Avila P, Toledo F, Katrich E, Trakhtenberg S. 2007. The total polyphenols and the antioxidant potentials of some selected cereals and pseudocereals. *European Food Research and Technology*, 225(3-4): 321-328.
- Grajeta H. 1999. Effect of amaranth and oat bran on blood serum and liver lipids in rats depending on the kind of dietary fats. *Nahrung*, 43: 114-117.
- Kaur S, Singh N, Rana JC. 2010. *Amaranthus hypochondriacus* and *Amaranthus caudatus* germplasm: Characteristics of plants, grain and flours. *Food Chemistry*, 123(4): 1227-1234.
- Kritchevsky D, Chen SC. 2005. Phytosterols-health benefits and potential concerns: a review. *Nutrition Research*, 25: 413-428.
- Lagarda MJ, García-Llatas G, Farré R. 2006. Analysis of phytosterols in foods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 1486-1496.
- Lindenmeier M, Hofmann T. 2004. Influence of baking conditions and precursor supplementation on the amounts of the antioxidant pronyl-L-lysine in bakery products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 350-354.
- Liu RH. 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *Journal of Nutrition*, 134: 3479S-3485S.
- Marccone MF, Kakuda Y, Yada RY. 2004. Amaranth as a rich dietary source of β -sitosterol and other phytosterols. *Plant Foods for Human Nutrition*, 58: 207-211.
- Martirosyan DM, Miroshnichenko LA, Kulakova SN, Pogojeva AV, Zoloedov VI. 2007. Amaranth oil application for coronary heart disease and hypertension. *Lipids in Health and Disease*, 6(1): 1-12.
- Muir JG, Young GP, O'Dea K, Cameron-Smith D, Brown IL, Collier GR. 1993. Resistant starch—the neglected “dietary fiber”? Implications for health. *Dietary fiber bibliography and reviews*, 1: 33.
- Normén L, Frohlich J, Trautwein E. 2004. Role of plant sterols in cholesterol lowering. In: Dutta PC, editor. *Phytosterol as Functional Food Componentes and Nutraceuticals* New York: Marcel Dekker Inc. pag 243–315.
- Nsimba RY, Kikuzaki H, Konishi Y. 2008. Antioxidant activity of various extracts and fractions of



- Chenopodium quinoa* and *Amaranthus spp.* seeds. Food Chemistry, 106: 760-766.
- Ozsoy N, Yilmaz T, Kurt O, Can A. 2009. In vitro antioxidant activity of *Amaranthus lividus L.* Food Chemistry, 116: 867-872.
- Plate A, Arêas J. 2002. Cholesterol lowering effect of extruded amaranth (*Amaranthus caudatus L.*) in hypercholesterolemic rabbits. Food Chemistry, 76: 1-6.
- Repo-Carrasco-Valencia R, Hellstrom JK, Pihlava JM, Mattila PH. 2010. Flavonoids and other phenolic compounds in Andean indigenous grains: Quinoa (*Chenopodium quinoa*), kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) and kiwicha (*Amaranthus caudatus*). Food Chemistry, 120: 128-133.
- Repo-Carrasco-Valencia R, Peña J, Kallio H, Salminen S. 2009. Dietary fiber and other functional components in two varieties of crude and extruded kiwicha (*Amaranthus caudatus*). Journal of Cereal Science, 49: 219-224.
- Ros E. 2006. Recomendaciones sobre el consumo de fitoesteroles y estanoles. Terapéutica, 1617: 46-47.
- Sensoy I, Rosen RT, Ho C, Karwe MV. 2006. Effect of processing on buckwheat phenolics and antioxidant activity. Food Chemistry, 99: 388-393.
- Severino de Queiroz Y, Manólio Soares RA, Dias Capriles V, Ferraz da Silva Torres EA, Gomes Arêas JA. 2009. Efeito do processamento na atividade antioxidante do grão de amaranto (*Amaranthus cruentus L.* BRS-Alegria). Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 59(4): 419-424.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Method in Enzymology, 299: 152-178.
- Tosi EA, Ré E, Lucero H, Masciarelli R. 2001. Dietary fiber obtained from amaranth (*Amaranthus cruentus*) grain by differential milling. Food Chemistry, 73(4): 441-443.



EVALUACIÓN DEL CONSUMO DE PESCADO DE RÍO EN ADULTOS DE LA CIUDAD DE ROSARIO

Cabreriso M.S. (1), Chaín P. (1), Gatti M.B. (1), Bosco E. (1), Pellegrini D. (1), Manin M. (1), Ciappini M.C. (1).

(1) Universidad del Centro Educativo Latinoamericano, Avda. Pellegrini 1332. Rosario, Santa Fe, Argentina. laboratorio@ucel.edu.ar

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivos conocer la frecuencia de consumo de pescados de río en habitantes de Rosario, identificar las especies más consumidas y otras percepciones de los consumidores. Se realizó una encuesta estructurada con respuestas cerradas a una población de 147 adultos. Para el análisis descriptivo de los datos se utilizó Excel 2010. El 82% de los encuestados consumía carne de pescado, aunque sólo un 60% ingería pescados de río. Los encuestados que no lo ingerían, indicaron que no les gustaba o que no tenían el hábito, a pesar de que la mayoría consideró que era importante incluirlo en la dieta. Sólo el 8,8% cumplía con las recomendaciones para la frecuencia de consumo de dos veces por semana; el 85% calificó su agrado con una puntuación igual o superior a 7 y el 50% consideró más saludable y más sabroso al pescado de mar. Las especies más consumidas fueron la boga, seguida del dorado y el surubí, en proporciones similares. Las preparaciones más utilizadas fueron a la parrilla o al horno. A pesar de ser un recurso natural de la zona y un alimento de interés nutricional, el consumo de pescado de río es muy bajo para los habitantes de Rosario y sería necesario fomentar su consumo.

Palabras Clave: pescados de río, frecuencia de consumo, consumidores rosarinos.

ABSTRACT

This study aimed to determine the frequency of consumption of river fish in inhabitants of Rosario, to identify the most consumed species, site acquisition, preparation methods most used and other consumer perceptions. A structured questionnaire with closed answers a population of 147 adults was conducted. For the descriptive analysis of data Excel 2010 were used. The 82% of respondents eat fish, only the 60% consume river fish, although most considered it important to include in the diet. Respondents who ate not indicated that they do not like or do not have the habit. Only 8.8% met the recommendations for the frequency of consumption; 85% rated their satisfaction with a score equal to or greater than 7 points and half of respondents considered healthier and tastier fish of the sea. The most consumed species were the boga, followed by golden and surubí, in similar proportions. Preparation forms more used were grilled or baked. Despite being a natural resource of the area and a food of nutritional value, consumption of river fish is very low for the inhabitants of Rosario; it would be necessary to encourage consumption.

Keywords: river fish, frequency of consumption, rosarinos consumers.

INTRODUCCIÓN

Los peces y mariscos son una fuente de energía y proteínas de alto valor biológico y contribuyen a la ingesta de nutrientes esenciales como el yodo, el selenio, el calcio y las vitaminas A y D, que tienen beneficios para la salud bien establecidos (EFSA 2014). El contenido en grasa de los pescados es muy variable y se correlaciona inversamente con el de la humedad. A diferencia de otras carnes, en sus triglicéridos predominan los ácidos grasos insaturados (Abib et al. 2003), proporcionando ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega-3, uno de los componentes de los patrones dietéticos asociados con la salud (EFSA 2014). Por el aporte de dichos ácidos grasos, se los considera un alimento funcional (Santana 2009). En los pescados de río, la relación entre ácidos grasos n-6/n-3 es mucho más equilibrada que en los pescados de mar y más cercana a la ideal (2:1 o 1:1), recomendada por los organismos de salud internacionales (Abib



et al. 2003).

Una alimentación que incluya pescado contribuye en la prevención de enfermedades cardiovasculares, en la disminución de la incidencia de la presión arterial y desarrolla funciones importantes en el embarazo, la lactancia y la infancia (Avdalov 2014).

El comité de guías dietéticas de la *American Heart Association* (AHA) recomienda a la población general el consumo de al menos dos porciones de pescado graso por semana (Ceseri 2006). También la mayoría de las directrices dietéticas europeas recomiendan un mínimo de dos porciones de pescado por semana para los niños mayores, adolescentes y adultos, con el objetivo de garantizar el aporte de nutrientes esenciales, especialmente los ácidos grasos omega-3, pero también la vitamina D, el yodo y el selenio (EFSA 2014). La *European Food Safety Authority* (EFSA) afirma que el consumo de 1-2 porciones de pescado/marisco por semana y hasta 3-4 porciones por semana durante el embarazo, está asociado con mejores resultados funcionales del neurodesarrollo en los niños, en comparación con la ausencia de su consumo. Estas cantidades también se han asociado con un menor riesgo de mortalidad por enfermedad cardíaca coronaria en adultos. Con consumos más elevados no se esperan beneficios adicionales sobre los resultados del desarrollo neurológico, ni otros beneficios sobre el riesgo de mortalidad por enfermedad coronaria (EFSA 2014).

En Argentina, las nuevas guías alimentarias aconsejan el consumo de pescados al menos dos veces por semana (MSAL 2016).

Al analizar las ventajas y desventajas de su consumo, debe tenerse en cuenta que la carne de pescado de río es un alimento recomendable por su valor nutritivo, pero su rendimiento económico - comercial es bajo, puesto que se desperdicia más del 50 % de lo que se adquiere (Espíndola 2008).

En la dieta promedio de los argentinos el consumo de carne es abundante (96 g/hab/día), con mayor contenido graso que el recomendable y con escasa diversificación (MSAL 2016). Es conocida la importancia de la incorporación de carne en la dieta, sin embargo un consumo superior al 12% de la energía total consumida, característico de la dieta promedio argentina, no es estrictamente indispensable y, más aún, puede contribuir al exceso relativo en grasas saturadas. Un estudio realizado en nuestro país indica que la mesa típica de los argentinos supera significativamente ese valor, por lo que una disminución progresiva del consumo de carne es una de las propuestas implícitas en la definición de un patrón alimentario saludable; además de una necesaria diversificación en los tipos de carne consumida.

Si bien en los últimos años ha crecido significativamente el consumo de carne de pollo, hay un incipiente crecimiento en el de carne de cerdo y una notoria disminución del consumo de carne vacuna, estas tendencias deberían profundizarse, en especial las dos últimas junto con una mayor participación de pescado en la canasta de carnes. El grupo de carnes magras se consume en cantidad insuficiente, aunque al sumar los cortes grasos, la brecha se hace positiva. Casi el 60% de la carne consumida es vacuna; el consumo de carne de pollo ha aumentado significativamente su participación en la dieta (30%), no así la carne de cerdo y pescado, ambas entre el 5% y 8% (Britos et al. 2012).

Al estudiar el estado nutricional y los hábitos alimentarios de adultos rosarinos, Zapata (2014) encontró que el consumo de pescado fue inferior al 5%, siendo el atún enlatado en agua la variedad más consumida (4,5%), y los pescados frescos de mar más consumidos que los de río.

Rosario es una ciudad de la provincia de Santa Fe, que linda al este con el río Paraná y cuenta con un gran recurso pesquero de agua dulce. Ofrece a la población sus recursos pesqueros, que hoy en día se ofrecen también eviscerados y congelados en las pescaderías y constituyen una oferta cotidiana en los restaurantes.

Resulta de interés recopilar información actualizada y representativa de los hábitos de consumo de pescado de río y de la percepción y preferencia que los consumidores manifiestan hacia este producto, a los efectos de planificar adecuadamente las recomendaciones para orientar la oferta y proponer modificaciones en la dieta, haciéndola más saludable.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó una encuesta a un total de 147 adultos de la ciudad de Rosario seleccionados por un muestreo al azar por conveniencia. La encuesta que se muestra en la **Figura 1** tuvo como objetivo evaluar el consumo de pescado, especialmente de los pescados de río. También se incluyeron preguntas destinadas a conocer las



causas por las cuales algunas personas no incluyen este tipo de carne en su dieta y la percepción sobre este alimento, referido a los beneficios sobre la salud, la accesibilidad y practicidad en su elaboración. Los resultados se analizaron utilizando Excel 2010 y se muestran como gráficos.



Consumo de pescados de río									
1 Consume carne de pescado?									
Si	<input type="text"/>	No	<input type="text"/>						
2 Consume pescados de río?									
Si	<input type="text"/>	(continúa preg 4)	No	<input type="text"/>	(continúa preg 3)	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
3 La razón por la que no consume pescado de río es....									
No le gusta	<input type="text"/>	Costo elevado	<input type="text"/>						
No los adquiere fácilmente	<input type="text"/>	Tiene espinas	<input type="text"/>						
No tiene el hábito	<input type="text"/>	No se como prepararlos	<input type="text"/>						
No son buenos para la salud	<input type="text"/>	Otras (mencionelas)	<input type="text"/>						
Producen olor al cocinar	<input type="text"/>		<input type="text"/>						
Fin de la encuesta					GRACIAS!!!				
4 ¿Con qué frecuencia?									
3 ó 4 veces x semana	<input type="text"/>	1 vez al mes	<input type="text"/>						
1 ó 2 veces x semana	<input type="text"/>	algunas veces al año	<input type="text"/>						
1 vez cada 15 días	<input type="text"/>		<input type="text"/>						
5 En una escala del 1 al 10, siendo 10 el máximo, cuanto diria que le gusta el pescado de río?									
Puntaje	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
6 Cuál/ es pescados de río son los que más consume?									
Sábalo	<input type="text"/>	Pacú	<input type="text"/>						
Dorado	<input type="text"/>	Bagre	<input type="text"/>						
Boga	<input type="text"/>	Patí	<input type="text"/>						
Surubí	<input type="text"/>	Otro	<input type="text"/>						
Amarillo	<input type="text"/>	NS/NC	<input type="text"/>						
7 En comparación con los pescados de mar....									
Cuáles son más saludables?	<input type="text"/>	Mar	<input type="text"/>	Río	<input type="text"/>	Igual	<input type="text"/>	NS/NC	<input type="text"/>
Cuáles son más sabrosos?	<input type="text"/>	Mar	<input type="text"/>	Río	<input type="text"/>	Igual	<input type="text"/>	NS/NC	<input type="text"/>
Cuáles son más accesibles?	<input type="text"/>	Mar	<input type="text"/>	Río	<input type="text"/>	Igual	<input type="text"/>	NS/NC	<input type="text"/>
Cuáles son más fáciles de cocinar?	<input type="text"/>	Mar	<input type="text"/>	Río	<input type="text"/>	Igual	<input type="text"/>	NS/NC	<input type="text"/>
8 Considera importante el consumo de pescados de río?									
Si	<input type="text"/>	No	<input type="text"/>	NS/NC	<input type="text"/>				
9 Cuando consume pescados de río generalmente lo hace....									
Fuera del hogar	<input type="text"/>	(Fin de la encuesta)	<input type="text"/>						
En el hogar	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Ambos	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
10 Cómo suele consumir el pescado de río en su hogar?									
Frito	<input type="text"/>	A la plancha	<input type="text"/>	Otras	<input type="text"/>				
A la parrilla	<input type="text"/>	Hervido	<input type="text"/>						
Al horno	<input type="text"/>	En rellenos	<input type="text"/>						
11 Donde adquiere el pescado de río para consumirlo en su hogar?									
En la pescadería	<input type="text"/>	En el supermercado	<input type="text"/>						
En los puestos de venta de los pescadores	<input type="text"/>	En la carnicería	<input type="text"/>						
Al pescador	<input type="text"/>	Otros	<input type="text"/>						
Lo pesca usted?	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
12									
Sexo:	FEM	<input type="text"/>	MASC	<input type="text"/>					
Edad (años)	18 -25	<input type="text"/>	36 - 45	<input type="text"/>	56 -65	<input type="text"/>	mas de 75	<input type="text"/>	<input type="text"/>
	26 - 35	<input type="text"/>	46 - 55	<input type="text"/>	66 -75	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

Figura 1. Encuesta sobre el consumo de pescados.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El 81,62% (n = 120) de los encuestados consume carne de pescado, aunque sólo el 59,86% (n = 88) consume pescado de río, tal como se muestra en las **Figura 2.a** y **2.b**.

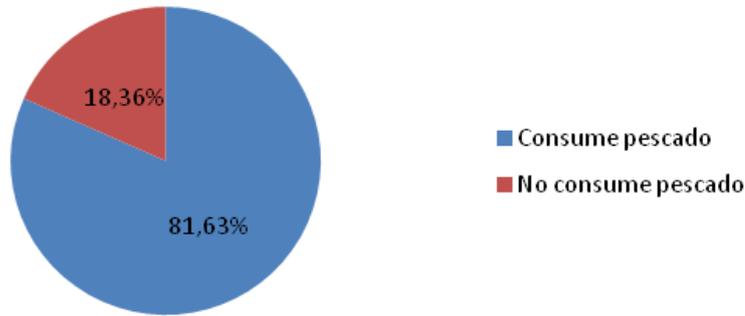


Figura 2.a. Consumo de pescado

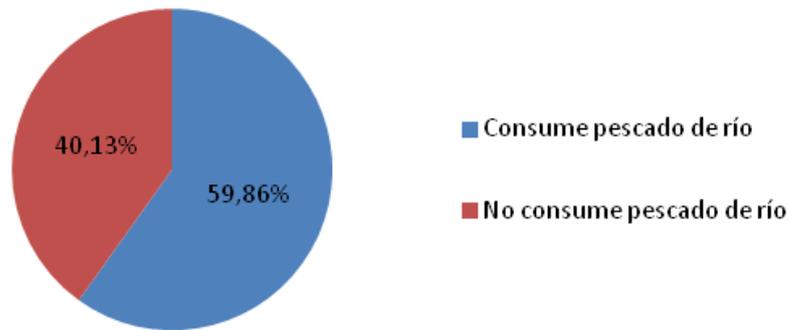


Figura 2.b. Consumo de pescado de río

Si se analiza la frecuencia de consumo, se observa que solo el 8,8% (n = 13) del total de los encuestados (n = 147) puede considerarse consumidor, ya que manifiesta una frecuencia semanal, tal como lo recomiendan los organismos nacionales e internacionales (**Figura 3**).

Estos datos se aproximan a los obtenidos por Zapata (2014), quien encontró que el consumo de pescado fue inferior al 5%, siendo los pescados frescos de mar más consumidos que los de río. Esta autora concluye que los rosarinos consumen en promedio 5,1 g de pescado de mar por día, mientras que esta cifra disminuye a 0,6 g cuando se trata de pescados de río. Datos similares se hallaron en un estudio realizado en Uruguay, que evaluó los conocimientos nutricionales y la frecuencia de consumo de diversos alimentos (Gámbaro 2011).



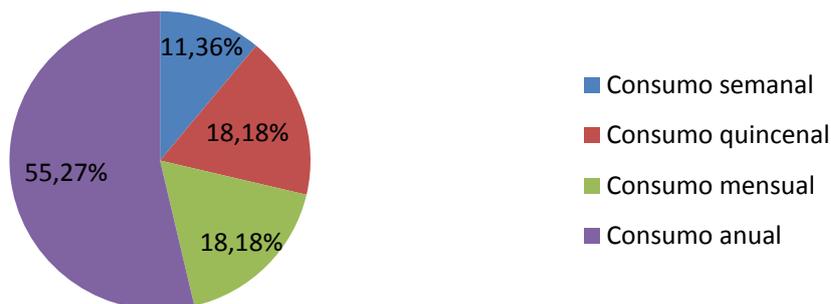


Figura 3. Frecuencia de consumo de pescados de río.

Comparado con países europeos, la ingesta de pescado es en general baja. Por ejemplo, un estudio descriptivo sobre la ingesta de pescados y mariscos en 56 mujeres gestantes pertenecientes al ámbito geográfico del Hospital La Inmaculada (Huércal Overa, España), indicó un consumo de 101 g/día y una frecuencia de consumo medio de 5,53 raciones/semana (Conde Puerta y Carreras Blesa 2015).

También parecen estar muy alejados del consumo publicado por la ONU, que afirma que la contribución del pescado a la dieta mundial ha alcanzado un promedio récord de casi 17 kg por persona por año, suministrando al menos el 15 por ciento de la ingesta media de proteínas de origen animal, a más de tres mil millones de personas (ONU 2011).

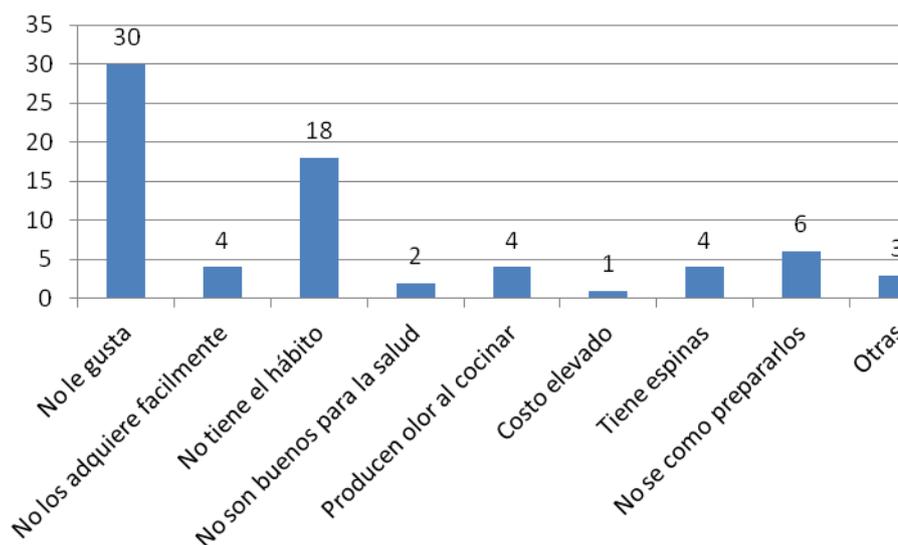


Figura 4. Motivos por los cuales no se consume pescado de río.

La mayoría de los encuestados que no ingieren pescado de río ($n = 48$) indican que la razón por la cual no lo hacen es porque “no les gusta” o “no tienen el hábito” (**Figura 4**). En coincidencia con estos resultados, un estudio realizado en Colombia con el objetivo de identificar los factores relacionados con la limitación en el consumo de pescado, encontró como los principales motivos los hábitos alimentarios, el gusto y la incomodidad por algunas características propias del alimento como olor y sabor (Murillo 2011).

El 85% de los consumidores de pescados, calificó con una puntuación igual o superior a 7 puntos, en una escala del 1 al 10, el agrado que les produce consumirlos (**Figura 5**) y el 78,4% reconoce su consumo como importante.



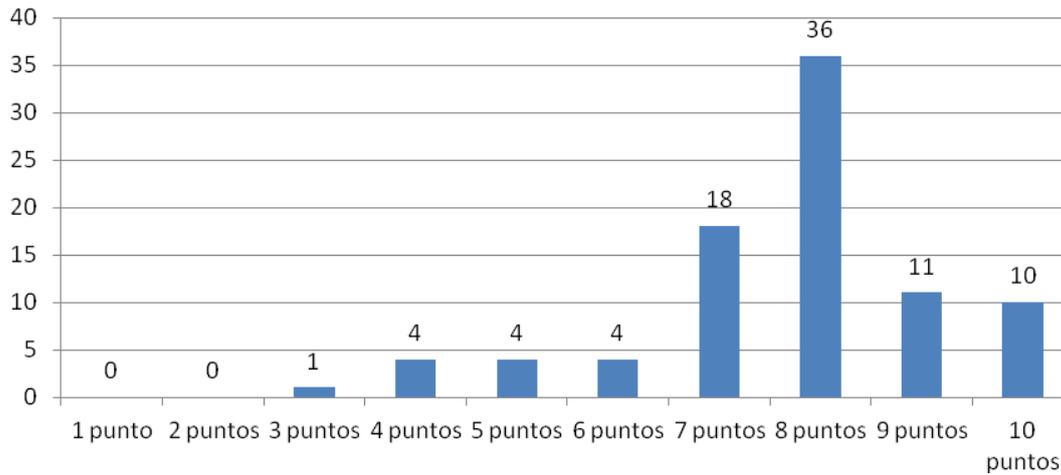


Figura 5. Escala numérica del grado de satisfacción del pescado de río

La **Figura 6** muestra las especies más consumidas, ocupando el primer lugar la boga (n = 65), seguida del dorado (n = 42) y luego el surubí (n = 37).

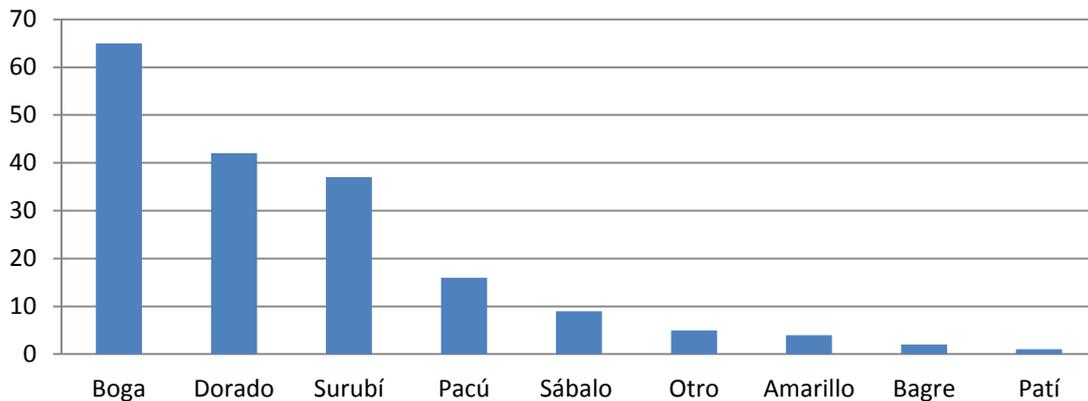


Figura 6. Especies de pescados del río Paraná más consumidas

A excepción del dorado, la boga y el surubí también fueron considerados dentro de las 7 especies más consumidas en la ciudad de Santa Fe y zonas aledañas (Abib et al. 2003). Espíndola (2008) indica que el sábalo es la especie más explotada por la pesquería comercial, representando aproximadamente el 70% del total de las capturas. Le siguen en importancia el surubí con un 20%, la boga (5%), el armado (3%), mientras que el patí, el amarillo y el moncholo (1%) ocupan el sexto lugar. El consumo de este último, si bien es de calidad inferior, se debe a su bajo costo.

Brenner y Bernasconi (1997) estudiaron el perfil de ácidos grasos del dorado, la boga, el patí y el surubí, llegando a la conclusión que son pescados relativamente magros y que sus lípidos contienen sólo entre el 35% y 38% de ácidos grasos saturados. La mayor proporción de ácidos n-3 la tiene el dorado con 183 mg por 100 g de músculo, mientras que la carne de patí es la más rica en ácidos n-6, con un valor índice de 306 mg por 100 g de músculo. Se concluyó además que el contenido en colesterol de estas especies es menor a 4,7 mg por gramo de músculo (Brenner y Bernasconi 1997). Abib et al. (2005) concluyó que el contenido en colesterol en las siete especies estudiadas del río Paraná, no difería del correspondiente a las carnes magras de cordero y cerdo o de pollo y pavo sin piel, recomendados para las dietas saludables.

En relación a la facilidad para cocinar, casi la mitad de los participantes indicó que les resultaba indistinto



cocinar los de mar que los de río. Las formas de preparación más utilizadas fueron a la parrilla (39 personas) o al horno (27 personas), sólo una persona hervía el pescado (**Figura 7**). Estos métodos de cocción son los recomendados por el Ministerio de Salud de la Nación (MSAL 2016) en las Guías Alimentarias para la Población Argentina como los más saludables y los que contribuyen, junto con el corte de carne y la práctica de retirar la grasa visible, a lograr un porcentaje de grasas de 7% en la porción de carne diaria a consumir. Fontanarrosa et al. (2004) estudiaron los cambios producidos por cuatro diferentes formas de cocción sobre el contenido de macronutrientes de siete especies de pescado del río Paraná, llegando a la conclusión que el mayor cambio producido es la pérdida de agua. Las proteínas se mantienen siempre en niveles altos, mientras que las grasas aumentan en la fritura y en la cocción al horno y disminuyen en la parrilla y el hervido.

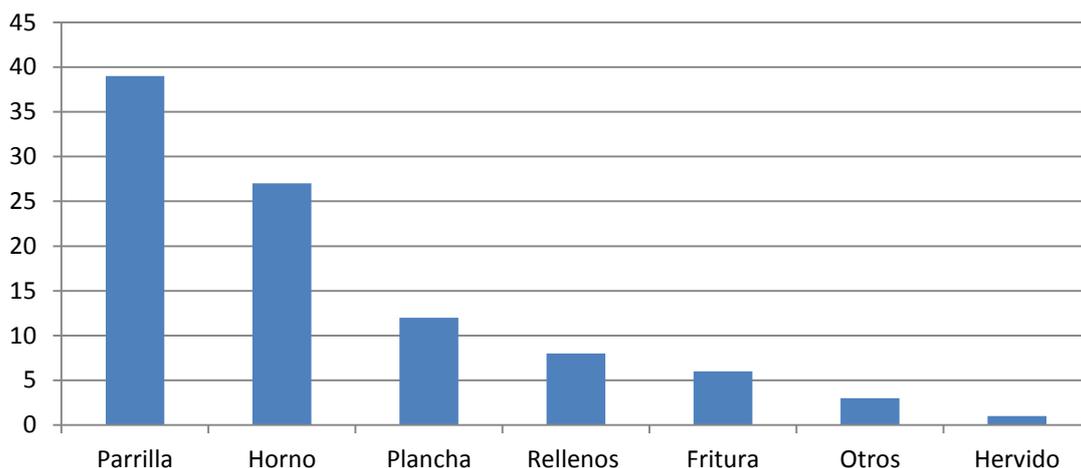


Figura 7. Formas de preparación más utilizadas para cocinar pescados de río.

En comparación con el pescado de mar, el 41 % del total de participantes (n = 60) consideró a este último como más saludable (59,0%) y más sabroso (56,8%).

Con respecto a los lugares de adquisición de los pescados de río, el lugar preferido por los consumidores para la compra fue la pescadería (n = 42), seguido por la compra al pescador ambulante (n = 12). La compra en supermercados, carnicerías y otros tuvo poca importancia, así como la posibilidad de pescarlos.

CONCLUSIONES

La principal causa del bajo índice de consumo de pescado fue la falta de hábito; los consumidores manifestaron además de no gustarles este alimento, que no sabían cómo prepararlo, percibían que los pescados producen mal olor al cocinarlos y que no les resultaba fácil adquirirlos. Sin embargo, consideran importante su consumo.

Los hábitos alimentarios se identificaron entonces como el principal factor relacionado con la limitación en el consumo de pescado. Pero la concepción de que su consumo es importante, abre puertas para modificar estos hábitos, pudiendo trabajar en la difusión de las formas de preparación, promocionar las propiedades nutricionales del pescado, los lugares de venta y hacerlos más accesibles. Actualmente, la oferta de pescados de río congelados en los puntos de venta y de platos preparados en numerosos restaurantes de la ciudad es un inicio para fomentar su consumo.

BIBLIOGRAFÍA

Abib M, Freyre M, Fontanarrosa ME, Del Barco D y Ferraris N. 2003. Calidad nutricional de las grasas de pescados del río Paraná de consumo masivo en Santa Fe. FACIBIB, 7: 127-133.



- Abib M, Freyre M, Palmioli N, Del Barco D y Ferraris, N. 2005. Contenido en colesterol en porción comestible de peces del valle aluvial del Río Paraná. FACIBIB, 9: 111-114.
- Avdalov N. 2014. Beneficios del consumo de pescado. Montevideo: DINARA; INFOPECA. pag 1.
- Brenner R, Bernasconi AM. 1997. Aporte de ácidos grasos esenciales de las series n-6 y n-3 a la dieta humana por pescados comestibles de río Paraná. Medicina, 57 (3): 307-14.
- Britos S, Saraví A, Chichizola N, Vilella F. 2012. Hacia una alimentación saludable en la mesa de los argentinos. 1ª ed. - Buenos Aires: Orientación Gráfica Editora. pag 21-39.
- Ceseri M, Lonardo G, Maggioni AP. 2006. Importancia de los ácidos grasos omega-3 en la prevención secundaria del infarto agudo de miocardio. Rev Esp Cardiol, 6: 62-71
- Conde Puertas E, Carreras Blesa, C. 2015. Evaluación de la ingesta de pescado en población gestante en relación a la exposición al metilmercurio. Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria, 35(3): 66-73.
- EFSA. European Food Safety Authority. 2014. Scientific Opinion on health benefits of seafood (fish and shellfish) consumption in relation to health risks associated with exposure to methylmercury. EFSA Journal, 12(7): 3761.
- Espíndola B. 2008. Variaciones en el contenido de macro y micronutrientes en pescados de ríos sometidos a cuatro formas de cocción. Universidad Nacional del Litoral (Tesis de Maestría). Disponible: <http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8080/tesis/bitstream/handle/11185/465/tesis.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Fontanarrosa ME, Espíndola B y Del Barco D. 2004. Estudio de los cambios producidos por cuatro diferentes formas de cocción sobre el contenido de macronutrientes de siete especies de pescados del Río Paraná. FACIBIB, 8: 183-191.
- Gámbaro A, Raggio L, Dauber C, Ellis AC, Toribio Z. 2011. Conocimientos nutricionales y frecuencia de consumo de alimentos: un estudio de caso. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 61(3), 308-315.
- MSAL. Ministerio de Salud de la Nación. Guías Alimentarias para la Población Argentina, Buenos Aires 2016. Disponible en: http://www.msal.gov.ar/images/stories/bes/graficos/0000000817cnt-2016-04_Guia_Alimentaria_completa_web.pdf
- Murillo, C. Factores que inciden en el consumo de pescado en la población estudiada pertenecientes a la universidad Javeriana en Primer Semestre 2011. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis709.pdf>
- ONU. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura. 2011. El consumo de pescado alcanza niveles históricos. Disponible en: <http://www.fao.org/news/story/es/item/50311/icode/>
- Santana E. 2009. Alimentos funcionales. En: Santana E. Vademecum nutricional. 1ª ed. Buenos Aires: Librería Akadia. pag 29-38.
- Zapata ME. 2014. Primer estudio sobre el estado nutricional y los hábitos alimentarios de la población adulta de Rosario. 1ª ed. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: La Imprenta Digital. pag 150.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad del Centro Educativo Latinoamericano por el financiamiento brindado para efectuar esta investigación.



DESARROLLO DE DOS ENZIMOINMUNOENSAYOS COMPETITIVOS PARA LA DETECCIÓN DE TRAZAS DE SOJA Y DE HUEVO EN PASTAS SECAS

Cellerino K. (1), Rodríguez V.G. (1), Docena G. (2), Polenta G. (3), López L.B. (1)

(1) Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica

(2) IIFP, Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

(3) Laboratorio de Compuestos Proteicos, Instituto de Tecnología de Alimentos, INTA.

kcellerino@ffyb.uba.ar

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar dos enzimoimmunoensayos competitivos, uno para detectar presencia de trazas de soja y otro para detectar trazas de huevo en pastas secas. Se trabajó con dos antisueros policlonales de conejo específicos de proteínas de soja (PS) y de proteínas de huevo (PH) como anticuerpos primarios. Para cada enzimoimmunoensayo se determinó la concentración óptima de antígeno a inmovilizar en la placa y la concentración de anticuerpo primario para ser utilizada en la competencia. Se ajustó la curva de calibración utilizando concentraciones crecientes de un extracto de producto de soja o de huevo entero en polvo extraído con buffer Tris-HCL 0,0625M con 3% de SDS y 2% de mercaptoetanol. El rango de trabajo utilizado en el enzimoimmunoensayo para detectar soja fue 15-420ppm PS y para huevo fue 20-630ppm PH con una adecuada linealidad (R^2 : 0,9880 para soja y 0,9564 para huevo). Todos los parámetros de validación estudiados resultaron adecuados. Se analizaron muestras comerciales de pastas secas con estos enzimoimmunoensayos y con kits comerciales de ELISA. Si bien se observaron diferencias importantes en los resultados cuantitativos obtenidos con ambas metodologías, los enzimoimmunoensayos desarrollados se podrían utilizar como métodos de screening.

Palabras clave: enzimoimmunoensayo competitivo, soja, huevo, pastas secas.

ABSTRACT

The aim of this work was to develop two competitive enzyme immunoassays, one to detect the presence of traces of soy and another to detect traces of egg in dry pasta. Two specific rabbit polyclonal antisera raised against soy protein (SP) and egg proteins (EP) were used as primary antibodies. The optimal antigen concentration to be immobilized on the plate and the concentration of primary antibody to be used in competition was determined, for each enzyme immunoassay. The calibration curve was fitted using increasing concentrations of an extract of soy product or whole egg powder. The soy product and the whole egg powder were extracted with Tris-HCl buffer 0,0625M with 3% SDS and 2% mercaptoethanol. The working range used in the enzyme immunoassay to detect soybean was 15-420ppm SP and to detect egg was 20-630ppm EP with adequate linearity (R^2 : 0.9880 and 0.9564 for soy and egg). All validation parameters studied were appropriate. Commercial samples of dry pasta were analyzed with these enzyme immunoassays and with commercial ELISA kits. Significant differences were observed in the quantitative results obtained with both methods; nevertheless, the developed enzyme immunoassays could be used as screening methods.

Keywords: competitive enzyme immunoassays, soy, egg, dry pasta

INTRODUCCIÓN

Se estima que a nivel internacional el 4-8% de los niños y el 2-4% de los adultos sufren de alergias alimentarias. (Ward R, 2015). Existen 8 grupos de alimentos que son responsables del 90% de este tipo de alergias. Estos alimentos son: leche, huevos, soja, trigo, maní, frutos secos, pescados y crustáceos (Poms R et al, 2004).

La declaración obligatoria de alérgenos en los rótulos de los alimentos en Argentina se encuentra en trámite administrativo. En los próximos meses será publicada en el Boletín oficial y la industria dispondrá de un año



para implementarlo (Acta 111, CONAL, 2016).

Ante la necesidad de contar, en nuestro país, con metodología accesible para el control de alérgenos en alimentos, el presente trabajo plantea el desarrollo de dos enzimoimmunoensayos competitivos, uno para detectar presencia de trazas de soja y otro para detectar presencia de trazas de huevo, ambos en pastas secas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras analizadas

Materias primas proteicas

Se trabajó con un producto de soja que supuestamente correspondía a un concentrado de soja, sin embargo el porcentaje de proteínas obtenido por Kjeldahl fue menor al 70% (63% proteína). Por este motivo se hace referencia a producto de soja y no al concentrado de soja (Código Alimentario Argentino, Capítulo XIX, 2016). También se utilizó huevo entero en polvo (44% proteínas) de origen industrial.

Sistemas modelo de pastas secas con agregado de huevo y con agregado de producto de soja

Se analizaron dos sistemas modelo de pastas secas con 300 y 150ppm de proteína de producto de soja o de huevo entero en polvo. Para obtener el sistema modelo con 300 ppm de proteína de soja se le agregó a una pasta seca elaborada con 0,1% de producto de soja pastas secas sin agregado de alérgenos, hasta obtener una concentración de 300 ppm de proteína de soja. El mismo procedimiento se realizó para obtener el sistema modelo de 150 ppm de proteína de soja.

Para obtener los sistemas modelo con 300 ppm y 150 ppm de proteína de huevo entero en polvo se procedió de la misma manera pero se utilizó una pasta seca elaborada con 0,1% de huevo entero en polvo.

Muestras comerciales

Se analizaron ocho muestras comerciales de fideos secos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7,8) para el análisis de la presencia de soja. Ingredientes: semolín de trigo pan. Se utilizaron siete muestras de pastas secas comerciales (9, 10, 11, 12, 13, 14,15) para el análisis de la presencia de huevo, estas muestras eran Fideos de sémola de trigo candeal, fusilli. Ingredientes: Sémola de trigo candeal.

Obtención de extractos proteicos a partir de producto de soja, de huevo entero en polvo y de pastas secas

Para la extracción de proteínas se pesaron 30mg del producto de soja y 60mg de huevo entero en polvo. Para la extracción de proteínas de pastas secas se pesaron 200 mg de las mismas. Se agregaron 2mL de la solución extractiva de proteínas totales. Dicha solución contiene Tris-HCL 0,0625M con 3% de dodecilsulfato de sodio (SDS) y 2% de mercaptoetanol (ME). Luego se agitó con varilla. Se calentaron los tubos en baño de agua a 100°C durante 5 minutos. Transcurridos 2 minutos en el baño se volvió a agitar con varilla. Se trasvasó el contenido de los tubos de extracción a tubos de plástico y el producto de soja y el huevo entero en polvo se centrifugaron a 3000rpm durante 15 minutos, en el caso de productos farináceos la centrifugación se realizó a 11000rpm. Los sobrenadantes se conservaron a - 20°C hasta su análisis.

Para la cuantificación de proteínas de soja y huevo de cada extracto y cálculo de la recuperación obtenida se utilizó el método de Lowry (Lowry O et al, 1951).

Puesta a punto de los enzimoimmunoensayos competitivos

Se determinó la concentración óptima de antígeno (extracto de soja o huevo) a inmovilizar en la placa y la dilución óptima de anticuerpo primario (antisuero policlonal de conejo específico de proteínas de soja o de huevo) a utilizar en la competencia. Se empleó antisuero policlonal obtenido en conejos inmunizados con extracto de soja o huevo, obtenidos según Rozenfeld P et al., 2002.

Sensibilización de la placa

La sensibilización se refiere al pegado del antígeno (extracto de soja o huevo) en la placa. Se emplearon placas para microelisa (Maxisorp®, NUNC, Denmark). Para esto se sembraron en la placa 100µL por pocillo de dos concentraciones diferentes de antígeno 10µg de proteína de soja o huevo/100µL o 1µg de proteína de soja o huevo/100µL de buffer Carbonato/Bicarbonato, pH: 9,6 (Buffer Carbonato de Sodio 0,015M, Bicarbonato de sodio 0,035M; pH: 9,6). Luego se incubó en cámara húmeda, en oscuridad a 4°C durante 24 hs. Se lavó la placa 5 veces con solución de lavado (0,9 %p/v NaCl y 0,0125% v/v Tween 20 en agua). Se sembraron 200µL de solución de bloqueo (1%p/v gelatina bovina y 0,1%v/v Tween 20 en TBS) en



cada pocillo. Se incubó una hora en cámara húmeda, en oscuridad a 37°C, con agitación. Se lavó la placa 5 veces con solución de lavado. Posteriormente se sembraron 100µL de diferentes diluciones del anticuerpo primario diluido con buffer TBS con 0,1% v/v Tween 20 y 3% polietilenglicol. Se ensayaron diluciones de anticuerpo primario entre 1/156 y 1/10000 en el enzoinmunoensayo para la detección de soja y entre 1/25000 y 1/800000 para la detección de huevo. En los pocillos correspondientes al Blanco (Blanco 1 y Blanco 10) se sembró solamente el buffer utilizado para la dilución del anticuerpo primario. Se incubó una hora en cámara húmeda, en oscuridad a 37°C con agitación. Se lavó la placa 5 veces con solución de lavado. Se sembraron 100µL de anticuerpo secundario, Anti IgG conjugado con fosfatasa alcalina de Bio-Rad (el mismo fue obtenido en cabras inmunizadas con IgG purificada de conejo) diluido 1:3000 con buffer TBS con 0,1% v/v Tween 20 y 3% polietilenglicol. Se incubó una hora en cámara húmeda, en oscuridad a 37°C con agitación. Se lavó la placa 5 veces con solución de lavado. Se sembraron 100µL de solución de revelado (paranitrofenil fosfato 1mg/mL en un buffer que contenía 10% v/v de Dietanolamina y 0,01% de Cloruro de Magnesio, pH: 9,8). Se incubó 20 minutos en cámara húmeda, en oscuridad a 37°C con agitación. Se midió la absorbancia en un lector de placas de ELISA a 405nm. Los valores de absorbancia fueron corregidos con la absorbancia promedio correspondiente al blanco. Se graficaron las curvas de Absorbancia corregida versus ln 1/dilución del anticuerpo primario utilizando una hoja de cálculo de Microsoft Excel 2010.

Validación del enzoinmunoensayo competitivo para la detección/ cuantificación de soja/huevo en pastas secas

Linealidad

Para la determinación de la linealidad del método se utilizaron concentraciones crecientes de un extracto de producto de soja o de huevo extraído con buffer Tris-HCL 0,0625M con 3% de SDS y 2% de 2-ME. Se trabajó con cinco puntos 0; 0,01; 0,03; 0,1 y 0,3µg proteína de soja o de huevo/mL buffer Carbonato/Bicarbonato, pH: 9,6. Para cada punto de la curva se realizó una dilución del extracto original pero se mantuvo constante la concentración de SDS y de ME. De esta manera los componentes de la solución extractiva fueron diluidos 1:175 en el caso del enzoinmunoensayo para detección de soja y 1:260 para el enzoinmunoensayo para detección de huevo, en todos los puntos de la curva. Las diluciones se realizaron en buffer Carbonato/Bicarbonato, pH: 9,6.

Una vez preparadas las diluciones de la curva se prepararon los preincubados en tubos eppendorf conteniendo 75µL de la dilución del anticuerpo primario seleccionada en la puesta a punto del ensayo, y 75µL de cada una de las diluciones de los puntos de la curva previamente preparadas. Además se preparó un control Inespecífico (I) que contenía 200µL del buffer utilizado para diluir el anticuerpo primario y un control de “unión máxima” (M) que contenía 100µL del buffer utilizado para diluir el anticuerpo primario y 100µL de la dilución del Anticuerpo primario seleccionada en la puesta a punto del ensayo. Se incubaron los preincubados a 4°C en cámara húmeda y oscuridad durante 24 hs. Paralelamente se sensibilizó una placa de ELISA sembrando en la misma la concentración de antígeno (proteína de soja o de huevo) previamente seleccionada en la puesta a punto del ensayo. Luego se incubó en cámara húmeda, en oscuridad a 4°C durante 24 hs. Se lavó la placa 5 veces con solución de lavado. Se sembraron 200µL de solución de bloqueo en cada pocillo. Se incubó una hora en cámara húmeda, en oscuridad a 37°C con agitación. Se lavó la placa 5 veces con solución de lavado. Posteriormente se sembraron 100µL de los preincubados en los pocillos. Se incubó una hora en cámara húmeda, en oscuridad a 37°C con agitación. Se lavó la placa 5 veces con solución de lavado. Se continuó con el protocolo como se describió previamente en el ítem sensibilización de la placa. Los valores de absorbancia fueron corregidos con la absorbancia promedio correspondiente al control inespecífico I.

A continuación se construyó una curva de calibración Absorbancia corregida versus ln concentración de soja o huevo (µg proteína de soja o huevo/ mL).

Los test utilizados para el análisis estadístico de los resultados fueron: método de Barlett, para homogeneidad de varianzas y análisis de regresión lineal (Box G et al., 1999).

Límite de detección y Límite de cuantificación

Para determinar los límites de detección y de cuantificación del método se utilizó una muestra de pasta seca sin analito (soja/huevo). La misma se extrajo por quintuplicado como se describió anteriormente. Cada



extracto se analizó por duplicado, como se describió anteriormente, realizando previo a la preparación de los preincubados las diluciones 1:175 (soja) y 1:260 (huevo) con buffer Carbonato/Bicarbonato, pH: 9,6 de cada uno de los extractos. La concentración de analito en cada muestra analizada se determinó según cálculo (1). Se calculó el valor medio del analito para la muestra de pastas secas sin analito y el desvío estándar correspondiente. El límite de detección se calculó como el valor medio más tres veces el desvío estándar. El límite de cuantificación se calculó como el valor medio más diez veces el desvío estándar.

(1) Cálculo de la concentración de proteína de soja/huevo en pastas secas:

Por interpolación en la curva de calibración se obtienen los μg de proteína de soja o huevo/mL. Esto corresponde al contenido de soja/huevo en el extracto diluido analizado.

La cantidad de proteína de soja o huevo en $\mu\text{g}/1000\text{mg}$ de pastas secas se calcula según la siguiente fórmula:

$$\text{Cantidad de proteína de soja/huevo en pastas secas } -\mu\text{g}/1000 \text{ mg} = \frac{\text{cantidad de prot. de soja o huevo (curva)}-\mu\text{g}_{(1)} \times \text{V-mL}_{(2)}}{5,7 \text{ ó } 3,8-\mu\text{L}_{(4)} \times \text{P-mg}_{(5)}} \times 1000\text{-mg}_{(3)}$$

(1)

(1) μg de proteína de soja o huevo interpolados en la curva de calibración.

(2) Volumen de sobrenadante al realizar la extracción de pastas secas con solución extractiva de proteínas totales: 1600 μL

(3) 1000mg: para expresar el contenido en 1000mg de pastas secas.

(4) Volumen de extracto que se toma de los 1600 μL de sobrenadante y se diluyen 1:175 (soja) y 1:260 (huevo). 5,7 μL (soja), y 3,8 μL (huevo), se llevan a 1000 μL con Buffer Carbonato/Bicarbonato; pH: 9,6.

(5) Peso de pastas secas que se extrae con solución extractiva de proteínas totales: 200mg.

De esta manera se calculan los μg de proteína de soja / huevo en 1000mg de pastas secas: ppm de proteína de soja/huevo.

Precisión intradía e interdías

Para evaluar la precisión intradía del método se analizaron tres muestras de pastas secas que contenían igual cantidad de analito (para soja 150ppm de proteína de soja y para huevo 300ppm de proteína de huevo). Cada muestra se extrajo por simplificado como se describió anteriormente (n=3). Cada extracto se analizó con el enzimoimmunoensayo por duplicado como se describió anteriormente, realizando previo a la preparación de los preincubados las diluciones 1:175 (soja) y 1:260 (huevo). 5,7 μL (soja) y 3,8 μL (huevo), se llevan a 1000 μL con Buffer Carbonato/Bicarbonato; pH: 9,6.

La concentración de analito en cada muestra analizada se determinó según cálculo (1).

Para el procesamiento estadístico se promediaron los valores de analito de las tres muestras, se calculó el desvío estándar y el coeficiente de variación (CV). El CV corresponde a la precisión del método en el día. Para evaluar la precisión interdías se realizó el mismo procedimiento que se describió previamente en el ensayo intradía en tres días diferentes (n=9). Para el procesamiento estadístico se calculó el promedio, el desvío estándar y el coeficiente de variación (CV) de los nueve valores obtenidos. El CV corresponde a la precisión del método entre días.

Se adoptó como criterio de aceptación que el CV de la precisión intradía y el CV de la precisión interdías no superara el 15%. (Huber L, 2010).

Recuperación

Para evaluar la recuperación del método se analizaron dos sistemas modelo de mezclas de pastas secas con 300 y 150ppm de proteína de soja o huevo. Los mismos se extrajeron por triplicado como se describió anteriormente. Se analizaron por duplicado como se describió, realizando las diluciones 1:175 (soja) y 1:260 (huevo) de cada una de las muestras antes de la preparación de los preincubados. La concentración de analito en cada muestra analizada se determinó según cálculo (1). Se calculó el valor del analito de cada extracto. Se promediaron los tres valores de analito para cada sistema modelo.

El porcentaje de recuperación se calculó mediante la fórmula que se describe a continuación.

$$\% \text{ de recuperación} = \text{valor obtenido} \times 100 / \text{valor teórico}$$



-Valor obtenido: concentración de proteína de soja o huevo obtenida al aplicar el enzimoimmunoensayo para los SM de 300 y 150ppm de proteína de soja o huevo, respectivamente.

-Valor teórico: 300 o 150ppm de proteína de soja o huevo, respectivamente.

Luego se promediaron las recuperaciones de los dos sistemas modelo. Se consideran valores adecuados de recuperación entre 70-130% (Gatti M y Ferretti C, 2010)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Enzimoimmunoensayo competitivo para la detección de trazas de soja en pastas secas

Cuantificación de proteínas de soja en el extracto

La concentración de proteína de soja obtenida en el extracto fue 8,9mg de proteína de soja/mL de solución extractiva. La concentración teórica en dicho extracto era 9,4mg de proteína de soja/mL de solución extractiva. De manera que el porcentaje de recuperación fue 95%, es decir el 95% de las proteínas de soja resultaron solubles en la solución extractiva de proteínas totales.

Puesta a punto del enzimoimmunoensayo competitivo

En la **Figura 1** se observan las dos curvas obtenidas en la puesta a punto del enzimoimmunoensayo competitivo, para la determinación de la concentración óptima de antígeno soja y la dilución de anticuerpo primario a utilizar en el ensayo final.

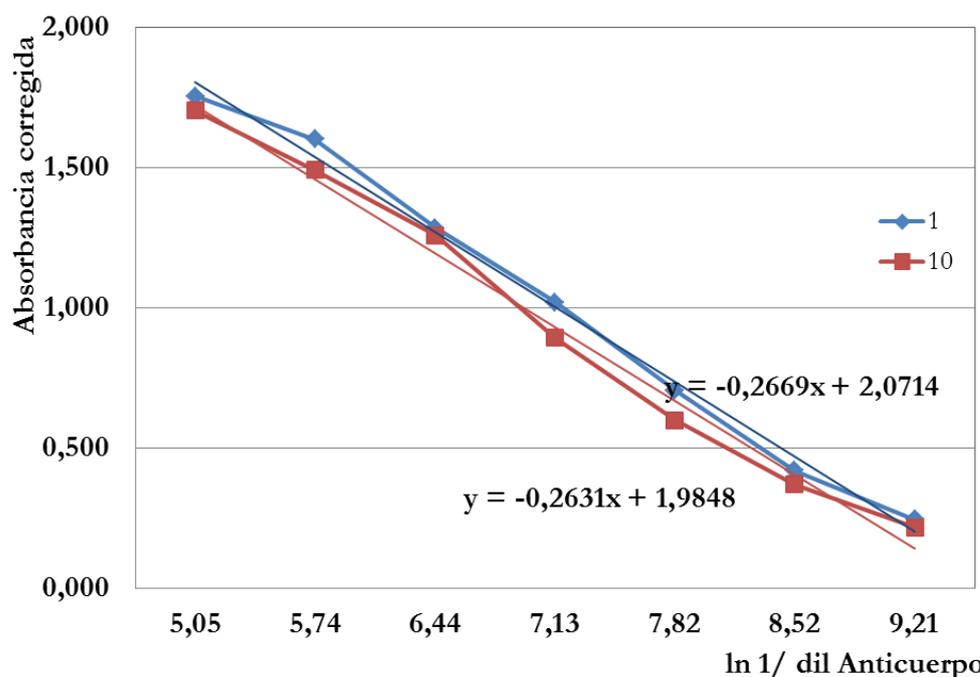


Figura 1: Curvas obtenidas para la determinación de la concentración óptima de antígeno soja y la dilución de anticuerpo primario a utilizar en el enzimoimmunoensayo competitivo final.

En la **Figura 1** se observan las curvas correspondientes a 1µg de proteína de soja /100µL de buffer Carbonato/Bicarbonato, pH: 9,6 y a 10µg de proteína de soja /100µL de buffer Carbonato/ Bicarbonato, pH: 9,6; que se obtuvieron en la puesta a punto del ensayo.

Para la selección de la concentración óptima de antígeno a utilizar en el ensayo se eligió la curva con mayor pendiente. La concentración de antígeno seleccionada fue 1µg de proteína de soja /100µL de buffer Carbonato/ Bicarbonato, pH: 9,6.

Para la selección de la dilución óptima de anticuerpo primario a utilizar en la competencia, se seleccionó en la curva previamente elegida (la correspondiente a 1µg de proteína de soja /100µL de buffer) la zona más



sensible a cambios, obteniendo de esta manera un método con adecuada sensibilidad. La dilución de anticuerpo primario seleccionada para utilizar en la competencia fue de 1/1250. (In 1/dilución Anticuerpo Primario: 7,13).

Validación

Linealidad

El ME y el SDS son efectivos para la extracción de proteínas. El ME cliva puentes disulfuro formados entre los residuos de cisteína de las proteínas y el SDS facilita la solubilización de las proteínas alterando las uniones no covalentes de las mismas (Watanabe Y et al, 2005). Dado que en este ensayo se utiliza un buffer de extracción que contiene agentes reductores y desnaturalizantes (ME y SDS) que interfieren en la reacción antígeno-anticuerpo se evaluó la dilución de la solución extractiva que no afectara la unión antígeno-anticuerpo. Algunos investigadores han observado que generalmente las concentraciones de este buffer suficientemente diluidas, no influyen en la performance del ensayo (Diaz Amigo C y Popping B, 2010; García E et al, 2005).

Se ensayaron tres diluciones de solución extractiva en buffer Carbonato/Bicarbonato, pH: 9,6 (1:50, 1:100, 1:175) realizando el enzimoimmunoensayo competitivo como se describió previamente. Se observó que los valores de Absorbancia con la dilución 1:175 eran similares a los obtenidos en los pocillos de “unión máxima” (M). En cambio con las diluciones de 1:50 y 1:100 los valores de Absorbancia eran inferiores a los valores correspondientes a M. Esto implica cuantificación de analito en una solución que no la contiene (ensayo competitivo). Los valores menores de Absorbancia se deben a una interferencia de los componentes de la solución extractiva en la unión antígeno – anticuerpo y no a la presencia de analito. De acuerdo con estos resultados para cada punto de la curva se realizó una dilución del extracto original de soja pero se mantuvo constante la concentración de SDS y de ME. Esas concentraciones son las que corresponden a una dilución de la solución extractiva 1:175.

Para establecer linealidad se trabajó con cinco puntos de la curva 0; 0,01; 0,03; 0,1 y 0,3µg proteína de soja/mL (Figura 2). A los valores de Absorbancias corregidas obtenidos para cada nivel de concentración se aplicó un Test de Homogeneidad de Varianzas y no se encontró diferencia significativa entre la varianzas de los distintos niveles analizados.

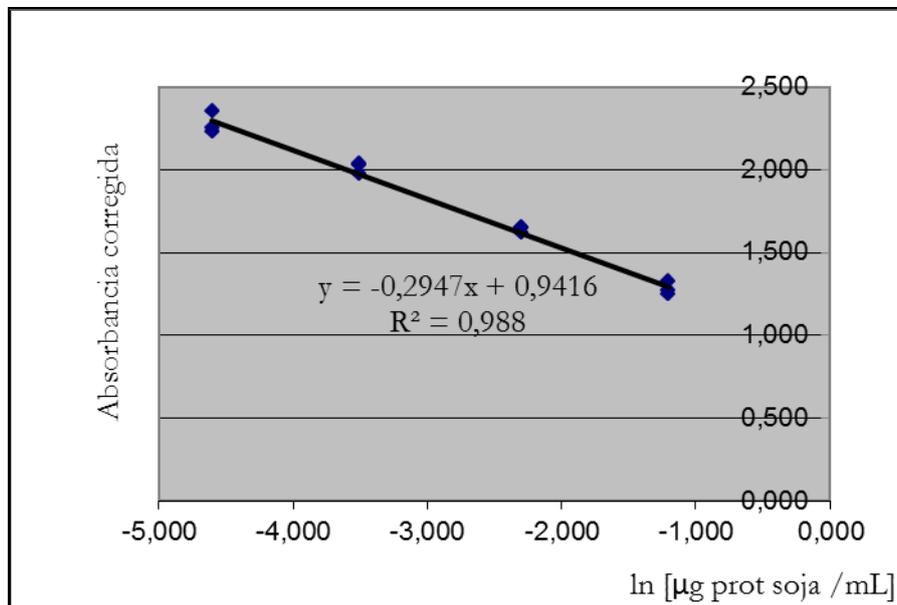


Figura 2: Curva de calibración: Absorbancia corregida en función del ln de la concentración de soja.

Se realizó el test de linealidad sobre los valores de Absorbancia corregida en función del ln de la concentración de soja (µg proteína de soja/mL) utilizando el programa Infostat profesional versión 2004d.1



desarrollado por la Universidad Nacional de Córdoba. Se obtuvo un valor de $F=1,84$ (CM desvío de la linealidad/ CM error puro) y $p=0,2195$ con lo cual se concluyó que el rango 0,01; 0,03; 0,1 y 0,3 μg proteína de soja/mL se comportó en forma lineal. La recta obtenida presentó una pendiente de -0,29 con un límite inferior 95% (LI) de -0,32 y un límite superior 95% (LS) de -0,27, ordenada al origen 0,94 con LI: 0,87 y LS: 1,01 y un coeficiente de correlación de 0,988.

A los valores límites de la curva de calibración (0,01 μg proteína de soja/mL y 0,3 μg proteína de soja/mL) se les aplicó el cálculo (1) presentado anteriormente para calcular el rango de trabajo correspondiente a proteína de soja en pastas secas. El rango de trabajo obtenido fue 15-420ppm de proteína de soja en pastas secas.

Límite de detección y Límite de cuantificación

Los valores de los límites de detección y de cuantificación fueron 47,0 y 76,0 ppm de proteínas de soja, respectivamente.

Precisión intradía e interdías

Las precisiones del método en el día y entre días, expresada como coeficiente de variación (CV) fueron 12,7 (n=3) y 15,0 (n=9), respectivamente. Dichos valores resultaron adecuados.

Recuperación

Se analizaron dos sistemas modelo de pastas secas con 300 y 150ppm de proteína de producto de soja. Los resultados obtenidos para los sistemas modelo fueron 330 y 154, respectivamente. Se calculó la recuperación del método, siendo la misma 106,3%. Esta recuperación resultó apropiada.



Análisis de muestras comerciales

Se analizaron ocho muestras comerciales de pastas secas con el enzimoimmunoensayo competitivo desarrollado y con un kit comercial RIDASCREEN®FAST Soya de R-Biopharm (R-Biopharm RIDASCREEN®FAST Soya, 2011).

En la Tabla N°1 se presentan los resultados obtenidos en la determinación de proteínas de soja en pastas secas, utilizando el kit de R-Biopharm y el enzimoimmunoensayo desarrollado.

Tabla 1: Resultados obtenidos en la determinación de proteínas de soja en pastas secas, utilizando el kit de R-Biopharm y el enzimoimmunoensayo competitivo desarrollado.

Muestras	R-Biopharm ppm proteína de soja	Enzimoimmunoensayo desarrollado ppm proteína de soja
1	>20,0	<76
2	>20,0	>420
3	>20,0	367±55
4	>20,0	>420
5	14,3±1,1	<76
6	9,7±1,4	<76
7	<2,5	<76
8	<2,5	<76

En las muestras 7 y 8 no se detectó soja con ninguno de los dos métodos. En las muestras 2 y 4 los valores obtenidos son mayores al límite superior de la curva de calibración de cada método. En la muestra 3 con el enzimoimmunoensayo desarrollado se detectaron y cuantificaron proteínas de soja mientras que utilizando el kit de R-Biopharm se obtuvo un valor mayor al límite superior de la curva de calibración (>20ppm de proteína de soja). En las muestras 1, 5 y 6 no se detectó soja con el enzimoimmunoensayo desarrollado y sí se detectó soja con el kit de R-Biopharm. Esto se debe a que la sensibilidad del enzimoimmunoensayo desarrollado es menor que la del kit comercial.

Enzimoimmunoensayo competitivo para la detección de trazas de huevo en pastas secas

Cuantificación de proteínas de huevo en el extracto

La concentración de proteína de huevo obtenida en el extracto de solución extractiva de proteínas totales fue 12,4mg de proteína de huevo/mL de solución extractiva. La concentración teórica en dicho extracto era 12,0mg de proteína de huevo/mL de solución extractiva. De manera que el porcentaje de recuperación fue 103%.

Puesta a punto del enzimoimmunoensayo competitivo

En la **Figura 3** se observan las curvas correspondientes a 1µg de proteína de huevo /100µL de buffer Carbonato/Bicarbonato, pH: 9,6 y a 10µg de proteína de huevo /100µL de buffer Carbonato/ Bicarbonato, pH: 9,6; que se obtuvieron en la puesta a punto del ensayo.



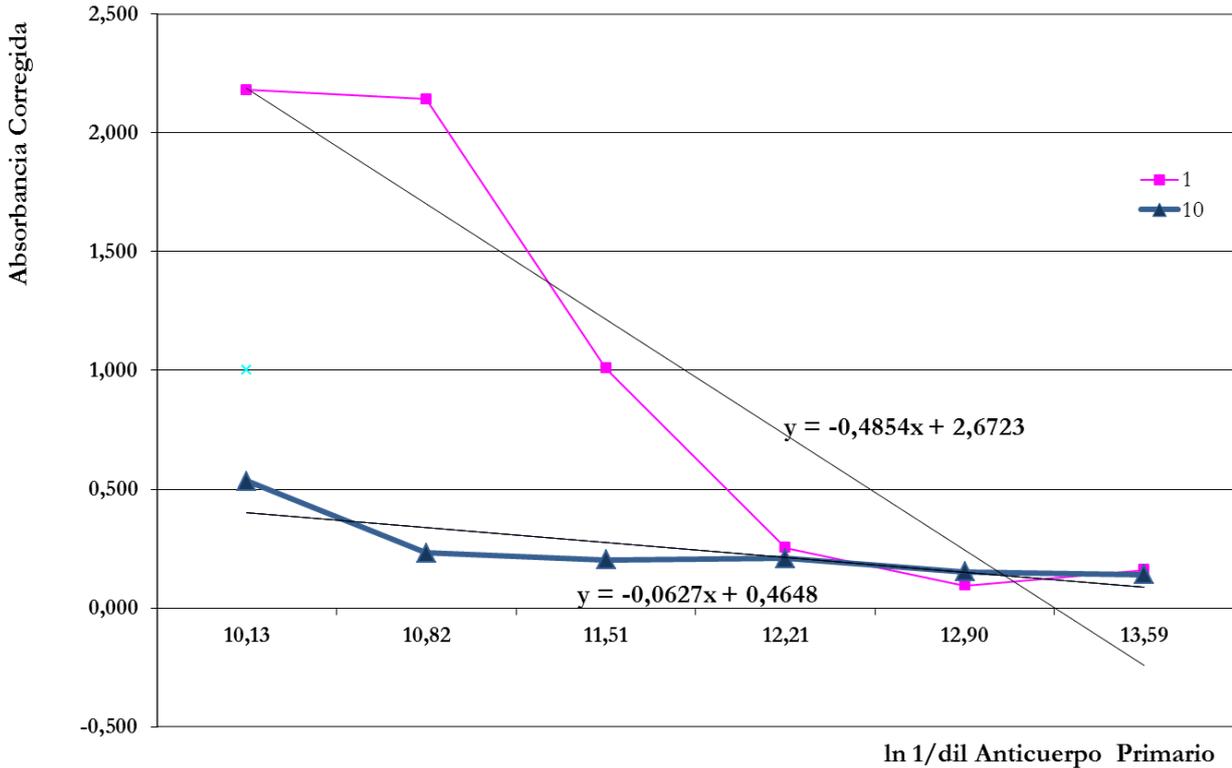


Figura 3: Curvas obtenidas para la determinación de la concentración óptima de antígeno huevo y la dilución de anticuerpo primario a utilizar en el enzoinmunoensayo competitivo final.

La concentración de antígeno seleccionada fue 1µg de proteína de huevo /100µL de buffer Carbonato/Bicarbonato, pH: 9,6. La dilución de anticuerpo primario seleccionado para utilizar en la competencia fue de 1/60000 (ln 1/dilución anticuerpo primario = 11,0).

Validación

Linealidad

La dilución utilizada para trabajar en este enzoinmunoensayo fue 1:260. En el caso del extracto de huevo se utiliza una dilución diferente a la dilución utilizada para el extracto de soja (1:175) ya que ambos contienen diferentes cantidades de proteínas. El extracto original de soja contiene 8,9mg proteína/mL y el extracto original de huevo 12,4mg de proteína/mL.

Para establecer linealidad se trabajó con cinco puntos de la curva 0; 0,01; 0,03; 0,1 y 0,3µg proteína de huevo/mL. A los valores de Absorbancias corregidas obtenidas para cada nivel de concentración se aplicó un Test de Homogeneidad de Varianzas. No se encontró diferencia significativa entre la varianzas de los distintos niveles analizados. Se realizó el test de linealidad sobre los valores de Absorbancia corregida en función del ln de la concentración de huevo (µg proteína de huevo/mL) utilizando el programa Infostat. Se obtuvo un valor de F=0,29 (CM desvío de la linealidad/ CM error puro) y p=0,7538 con lo cual se concluyó que el rango 0,01; 0,03; 0,1 y 0,3µg proteína de huevo/mL se comportó en forma lineal. La recta obtenida presentó una pendiente de -0,31 con un límite inferior 95% (LI) de -0,35 y un límite superior 95% (LS) de -0,26; ordenada al origen 1,20 con LI: 1,05 y LS: 1,35 y un coeficiente de correlación de 0,9564.



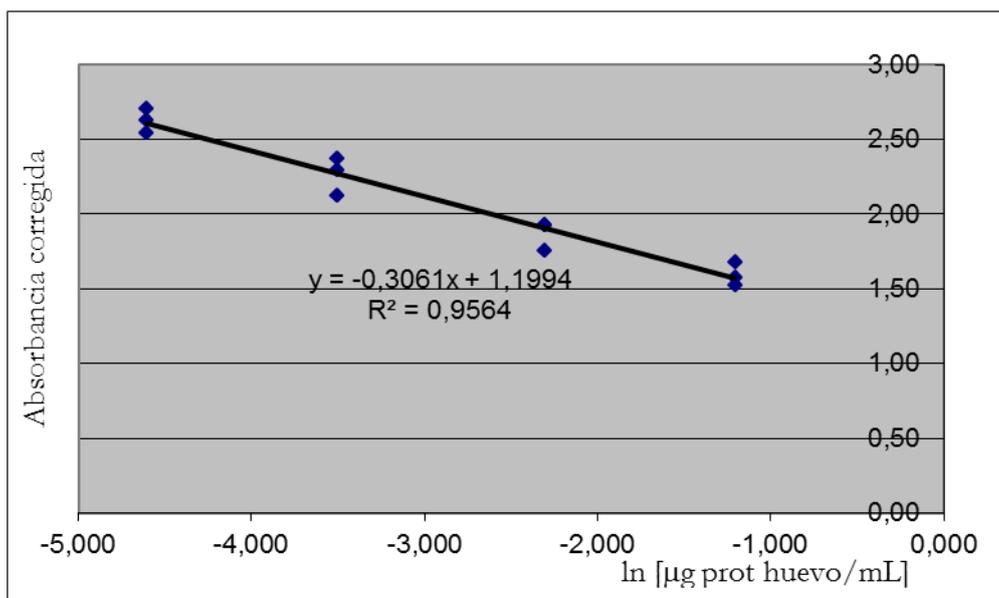


Figura 4: Curva de calibración. Absorbancia corregida en función del ln de la concentración de huevo (μg proteína de huevo/mL). El rango de trabajo fue 20-630ppm de proteína de huevo en pastas secas.

Límite de detección y Límite de cuantificación

Los valores de los límites de detección y de cuantificación fueron 23,0 y 42,0 ppm de proteínas de huevo, respectivamente.

Precisión intradía e interdías

Las precisiones del método en el día y entre días, expresada como coeficiente de variación (CV) fueron 2,7 (n=3) y 6,8 (n=9), respectivamente. Dichos valores resultaron adecuados.

Recuperación

Se analizaron dos sistemas modelo de pastas secas con 300 y 150ppm de proteína de huevo entero en polvo. Los resultados obtenidos para los sistemas modelo fueron 314 y 157 respectivamente. Se calculó la recuperación del método, siendo la misma 104,7%. Esta recuperación resultó apropiada.

Análisis de muestras comerciales

Se analizaron siete muestras comerciales de pastas secas con el enzoinmunoensayo competitivo desarrollado y con un kit comercial de R-Biopharm.

En la Tabla 2 se presentan los resultados obtenidos en la determinación de proteínas de huevo en pastas secas comerciales, utilizando el enzoinmunoensayo competitivo desarrollado y el kit RIDASCREEN® Ei/Egg Protein de R-Biopharm (R-Biopharm RIDASCREEN® Ei/Egg Protein, 2012).

Tabla 2: Resultados obtenidos en la determinación de proteínas de huevo en pastas secas comerciales, utilizando el enzoinmunoensayo competitivo desarrollado y el kit de R-Biopharm.

Muestras	R-Biopharm ppm huevo entero en polvo	Enzoinmunoensayo desarrollado ppm proteína de huevo
9	<0,5	<45,0
10	>13,5	98,0±9,6
11	>13,5	<45,0
12	>13,5	<45,0
13	>13,5	281,0±14,0
14	>13,5	178,0± 13,0
15	>13,5	<45,0



En la muestra 9 ambos métodos presentaron valores inferiores a los límites de cuantificación respectivos.

En tres muestras (10, 13, 14) fue posible detectar la presencia de trazas de huevo. El enzimoimmunoensayo competitivo desarrollado presentó valores en el rango de trabajo del ensayo mientras que con el kit de R-Biopharm se superó el valor más alto de la curva de calibración. Sin embargo se deben tener en cuenta los resultados obtenidos en las muestras 11, 12 y 15. El enzimoimmunoensayo competitivo desarrollado no permitió la cuantificación del alérgeno huevo y el kit de R-Biopharm superó el valor más alto de la curva de calibración. Esto se debe a la diferencia que hay en los límites de cuantificación de ambos métodos.

CONCLUSIONES

Este trabajo permite concluir que se podrían utilizar los enzimoimmunoensayos competitivos desarrollados como método de screening. Si una muestra presenta un resultado positivo con estos enzimoimmunoensayos se puede confirmar la presencia de soja o de huevo en dicha muestra. Sin embargo si el resultado obtenido resulta negativo (menor al límite de cuantificación de estos métodos) es necesario confirmar el resultado con el análisis con un kit comercial de soja o de huevo de adecuada sensibilidad.

BIBLIOGRAFÍA

- Acta N° 111 CONAL. 2016. Disponible en: http://www.conal.gov.ar/actas/Acta_102_AnexoI.pdf. Acceso: Septiembre/2016.
- Box G, Hunter W, Stuart Hunter J. 1999. Estadística para investigadores. Introducción al diseño de experimentos, análisis de datos y construcción de modelos. Editorial Reverté S.A., México D.F.
- Código Alimentario Argentino, [Capítulo XIX](#). 2016. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_XIX.pdf. Acceso: Octubre/2016.
- Diaz Amigo C and Popping B. 2010. Analytical Testing as a Tool for the Enforcement of future Regulatory Thresholds for Food Allergens. *Journal of AOAC International*. 93(2): 434-441.
- Garcia E, Llorente M, Hernando A, Kieffer R, Wieser H, Mendez E. 2005. Development of a general procedure for complete extraction of gliadins for heat processed and unheated foods. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 17(5):529–539.
- Gatti M and Ferretti C. 2010. Chapter 17: Soy Allergen Detection, en Popping B, Diaz Amigo C, Hoenicke K, *Molecular Biological and immunological techniques and applications for food chemists*. John Wiley & Sons, Inc., Canada. pag 335-348.
- Huber L. 2010. Validation of Analytical Methods. Agilent Technologies, Germany. pag 1-65
- Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem*. 193: 265–275.
- Poms R, Klein C, Anklam E. 2004. Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Addit Contam*. 21(1): 1-31.
- R-Biopharm RIDASCREEN® Ei/Egg Protein. 2012. Disponible en: <http://www.r-biopharm.com/wp-content/uploads/4487/R6402-FAST-Ei-Egg-12-04-24.pdf>. Acceso: Septiembre/2016.
- R-Biopharm RIDASCREEN® FAST Soya. 2011. Disponible en: <http://www.r-biopharm.com/wp-content/uploads/16632/R7102-FAST-Soya-15-09-09.pdf>. Acceso: Septiembre/2016.
- Rozenfeld P, Docena G, Añón M, Fossati C. 2002. Detection and identification of a soy protein component that cross reacts with caseins from cow milk. *Clin Exp Immunol*. 130(1): 49-58.
- Ward R. 2015. Chapter 1: Introduction to food allergy, en Flanagan S, *Handbook of Food Allergen Detection and Control*. Woodhead Publishing, Cambridge, UK. Pag 1-15
- Watanabe Y, Aburatani K, Mizumurz T, Sakai M, Muraoka S, Mamegosi S, Honjoh T. 2005. Novel ELISA for the detection of raw and processed egg using extraction buffer containing a surfactant and reducing agent. *J Immunol Methods*. 300: 115-123.



AGRADECIMIENTOS

UBACyT 20020120100175BA.



BIOACCESIBILIDAD Y BIOACTIVIDAD *IN VITRO* DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS PRESENTES EN CARNE BOVINA

Chamorro V. (1); Godoy F. (1,2); Rizzo S. (1); Rossetti L. (1); Pighin D. (1, 3,4,); Pazos A. (1,3)

(1) Instituto Tecnología de Alimentos-INTA. Bs. As, Argentina

(2) Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA. CABA, Argentina.

(3) Facultad de Agronomía y Ciencias Agroalimentarias; Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales – Universidad de Morón. Bs. As, Argentina.

(4) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas-CONICET. Argentina.

chamorro.veronica@inta.gob.ar

RESUMEN

La importancia de una buena alimentación y su relación con la salud ha llevado a que un gran número de investigaciones se enfoquen en la valorización de los alimentos con compuestos beneficiosos para el organismo. La acción de estos compuestos, denominados bioactivos, abarca capacidad antioxidante, antimicrobiana, antihipertensiva, etc. En estos alimentos es necesario tener en cuenta la cantidad presente del compuesto bioactivo y su acción biológica luego de ser consumido, cobrando gran importancia los estudios *in vitro* de bioaccesibilidad y actividad biológica. Los estudios de bioaccesibilidad permiten determinar la cantidad solubilizada de un compuesto durante un proceso digestivo simulado. En los compuestos bioactivos este ensayo resulta esencial ya que ejercen su efecto benéfico cuando llegan al lugar de acción. Los estudios de actividad biológica dan información de la función que el compuesto ejerce en el organismo. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la bioaccesibilidad *in vitro* de carnosina y anserina, los principales dipéptidos bioactivos antioxidantes presentes en la carne bovina, y posteriormente determinar su actividad biológica *in vitro*. Los resultados obtenidos muestran que la digestión favorece la bioaccesibilidad de los dipéptidos estudiados y que estos compuestos poseen capacidad antioxidante aún luego del proceso digestivo.

Palabras claves: bioaccesibilidad, actividad biológica, péptidos bioactivos.

ABSTRACT

The population is increasingly aware of the importance of their diet in relation to health. Consequently, recent studies have been focused on foodstuffs that contain beneficial compounds to health, also called bioactive compounds. These compounds are characterized by exerting a specific biological action such as: antioxidant, antimicrobial and antihypertensive activities, among others. On this regard, it is necessary to study the amount of bioactive compound -by means of *in vitro* bioaccessibility studies- and its biological properties after food intake -by means of *in vitro* biological activity-. Bioaccessibility studies are used in order to determine the amount of compound solubilized by simulated digestive process. On the other hand, studies of bioactivity provide information about the role of these compounds after digestion process. The aim of this work was to study the *in vitro* bioaccessibility of the main bioactive antioxidant dipeptides of beef -carnosine and anserine- and their *in vitro* biological activity. Results indicate that digestion process promotes bioaccessibility of anserina and carnosine peptides from beef; and that these compounds have antioxidant capacity, even after the digestion process.

Keywords: bioaccessibility, biological activity, bioactive peptides.

INTRODUCCIÓN

Existe una creciente concientización en la población acerca de la importancia de una alimentación saludable.



Tal es así que las investigaciones en los últimos años en este ámbito se focalizan en el estudio de compuestos presentes en los alimentos con funciones beneficiosas para el organismo, independientemente de su aporte nutricional. Estos son los llamados compuestos bioactivos, dentro de los cuales se hallan los péptidos bioactivos. Estos péptidos son pequeñas secuencias de aminoácidos inactivos contenidos en las proteínas que ejercen su actividad biológica luego de ser liberados de la matriz (Mulero Cánovas et al. 2011, Sabbione et al. 2016). Se encuentran naturalmente en diversas fuentes como carne, leche, huevos, soja, trigo, etc. (Hartmann y Meisel 2007, Hettiarachy et al. 2012). El desafío en estos alimentos es evaluar la biodisponibilidad del péptido bioactivo ya que eso condicionará la eficacia de su acción fisiológica. Se entiende por biodisponibilidad como la proporción de un nutriente que alcanza circulación sistémica y puede ser utilizado para las funciones fisiológicas normales (Ekmekcioglu 2002). El factor de mayor influencia en la biodisponibilidad es la bioaccesibilidad del compuesto. Este concepto hace referencia a la cantidad de bioactivo que se encuentra solubilizado en el tracto gastrointestinal listo para ser absorbido (Laparra et al. 2003, Hettiarachy et al. 2012). Para ello los péptidos bioactivos son liberados de las proteínas del alimento por acción de los jugos gástricos y deben resistir el pH fisiológico, la acción de las enzimas proteolíticas y la degradación microbiana. A fin de evaluar este factor es que han surgido una variedad de métodos de simulación gastrointestinal (SGI) *in vitro*, en donde se trabaja con distintos parámetros de pH, temperatura, concentración enzimática, tiempos, tipos de agitación, entre otros parámetros (Oomen et al. 2002, Laparra et al. 2003, Minekus et al. 2014). En este trabajo se estudiaron los principales péptidos bioactivos presentes en la carne bovina (anserina y carnosina), cuya característica biológica más importante es su poder antioxidante. Se sabe que estos dipéptidos se encuentran naturalmente libres en la carne, pero que también pueden liberarse de las proteínas por acción de las enzimas digestivas (Marcolini et al. 2015). El objetivo del presente trabajo fue evaluar la bioaccesibilidad de la anserina y la carnosina a través de la simulación de la digestión gastrointestinal y posteriormente determinar la potencial actividad biológica de éstos a través de la medición de la capacidad antioxidante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se planteó el diseño de tres sistemas distintos: estándares de dipéptidos solos (sistema C), carne sola (sistema A) y carne enriquecida con estándar de anserina y carnosina (sistema B) a fin de evaluar la acción de la SGI y su influencia sobre la actividad biológica de los dipéptidos con y sin efecto de la matriz alimenticia.

Simulación gastrointestinal (SGI)

Para la SGI se utilizó un sistema estático. (Oomen et al. 2002, Laparra et al. 2003, Minekus et al. 2014). Reactivos: carnosina, anserina, pepsina, pancreatina: Sigma Aldrich®.

Se utilizaron muestras de carne bovina, bife (*longissimus dorsi*), las cuales fueron cocinadas y posteriormente picadas con cuchilla. Se realizaron tres ensayos en paralelo, sistema A: 5 gramos de carne cocida y picada; sistema B: 5 gramos de carne cocida y picada enriquecida un 50% con una solución de carnosina y anserina (0,2 y 0,033 mg/mL respectivamente) y sistema C: solución de carnosina y anserina (0,2 y 0,033 mg/mL respectivamente). A cada sistema se le añadieron 50 mL de agua, se ajustó el pH a 2 con una solución de HCl 6M y se añadió una solución de pepsina (≥ 400 unidades/ mg de proteína) al 10% en HCl 0,1N. Cada sistema fue sellado, protegido de la luz y mantenido a 37°C durante 2 hs con un movimiento continuo (120 movimientos por minuto). Al cabo de ese tiempo se enfrió en baño de hielo y se ajustó el pH de los sistemas a 6,5 con una solución de NaHCO₃ 1M. Se le adicionó una solución de pancreatina (4 x especificaciones USP) 0.4% y extracto biliar porcino al 2.5%. Nuevamente todo fue sellado e incubado por 2 hs a 37°C con movimiento continuo. Finalmente se enfrió el sistema en baño de hielo, se ajustó el pH de cada extracto a 7.2 con una solución de NaOH 0.5M y se centrifugó a fin de separar la fracción soluble.

Cuantificación de los dipéptidos

Se cuantificó por HPLC (Shimadzu 10A) el contenido de dipéptidos presentes en cada fracción (Sri Kantha et al. 2000, Chamorro et al. 2014). Reactivos: carnosina y anserina (Sigma-Aldrich®) y TCA (ácido tricloro acético) (Biopack®), para la fase móvil: KH₂PO₄, KOH, MeOH grado HPLC (SintorganR®).

La fracción soluble obtenida de la SGI fue tratada con una solución concentrada de TCA para obtener una concentración final de TCA 7,5% y de esta forma precipitar las proteínas solubles. Posteriormente se



centrifugaron las muestras. Se utilizó una columna de intercambio catiónico Zorbax® 300-SCX (4,6x250mm y 5µm) y una fase móvil de KH_2PO_4 90mM pH 5,0 con 10% MeOH. El flujo de corrida utilizado fue de 1 mL/min, la temperatura de la columna de 55°C y la detección se realizó con detector con UV a 210 nm. Previo a la inyección en el HPLC las muestras se diluyeron en fase móvil (KH_2PO_4 90mM pH 5.0). Los péptidos fueron cuantificados con patrones de anserina y carnosina disueltos en fase móvil.



Medición de la capacidad antioxidante

Posteriormente a la SGI se liofilizaron alícuotas de cada extracto a los cuales se le midió la capacidad antioxidante a través de las técnicas de FRAP y ABTS (Re et al. 1999, Descalzo et al. 2007). Ambos ensayos se utilizan para determinar la capacidad antioxidante de la fracción soluble de cada sistema.

FRAP

Las muestras liofilizadas se reconstituyeron en 1,0 mL de PBS pH= 7,4 y se centrifugaron a 10000 rpm a 4°C durante 30 min. Se tomaron 83 uL de esta solución y se mezclaron con 2,5mL de reactivo FRAP conteniendo 10mM de TPTZ en 40mM de HCl y 20mM de FeCl₃ añadido a 300 mM de buffer acetato. La lectura de absorbancia se realizó a 593nm utilizando para la curva de calibración un patrón de FeSO₄ (0-1000 uM).

ABTS

Las muestras liofilizadas se reconstituyeron en 1,0 mL de MeOH:H₂O (20:80). La lectura de absorbancia se realizó a 734 nm utilizando para la curva de calibración un patrón de Trolox (0-300uM en MeOH:H₂O (20:80)). La mezcla de reacción consistió en 900uL de una solución de ABTS (de concentración tal de tener un valor de absorbancia de 0.7±0.02) y 100 uL de muestra o patrón Trolox. Se tomó registro en el tiempo cero y luego de 6 min de realizada la mezcla. Se calculó el porcentaje de inhibición tanto en el patrón como en las muestras.

Tratamiento de datos

Los datos obtenidos en los tres sistemas (A, B y C) fueron comparados usando el procedimiento GML del paquete SAS (SAS 8.0, SAS Institute, Inc., Cary,NC) para las diferentes variables evaluadas (Contenido, FRAP y ABTS). Las medias fueron comparadas usando el test de rango múltiple de Duncan con un nivel de significancia de 0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuantificación de los dipéptidos

En la **tabla 1** se muestra el contenido total hallado de los dipéptido anserina y carnosina en el extracto previo a ser sometido a la SGI (t_0) y posterior a dicho proceso (t_f) en los tres sistemas estudiados.

Tabla 1: Contenido total de dipéptidos en cada sistema.

	Anserina+carnosina (mg)		
	Previo a la SGI (t_0)	Luego de la SGI (t_f)	Diferencia % (t_f vs t_0)
Sistema C	10,605±0.004*A	9,63±0,26 a	-9,2
Sistema A	17,01±0,54 B	24,08±0,44 b	+41,6
Sistema B	28,11±0,46 C	29,47±0,32 c	+4,8

*Se utilizó el promedio de la pesada de los estándares puros con su correspondiente desvío.

Dentro de una misma columna, letras distintas corresponden a valores con diferencias significativas según el método de Duncan con $p \leq 0.05$.

Diferencia % se calcula como $(x_f - x_0) / x_0 * 100$. Donde x_f es el contenido total de dipéptidos hallado en cada sistema luego de la SGI y x_0 es el contenido total de dipéptidos hallado en cada sistema previo a la SGI.

Puede observarse en todos los sistemas que luego de la SGI hubo una variación en el contenido hallado de dipéptidos. Para el caso del sistema C se observa una disminución (9,2%) luego de la SGI. Al tratarse de un sistema en los cuales los dipéptidos presentes no poseen ningún tipo de “protección” por parte de una matriz alimenticia, estos compuestos quedan más expuestos al ataque de las enzimas digestivas y demás condiciones del sistema gastrointestinal. Las enzimas utilizadas en la SGI son proteasas, es decir, hidrolizan específicamente los enlaces peptídicos (Lehninger et al. 1984). En el caso del sistema A esta variación correspondió a un importante aumento del contenido de dipéptidos (41,6%) lo cual hace suponer una liberación de estos compuestos a la fracción soluble por parte de la matriz proteica. Otro aumento, aunque



mucho menos marcado (4,8%) se observa en el sistema B. En este caso se sugiere que pudo haber ocurrido una liberación de los dipéptidos de las proteínas de la matriz cárnica, y al mismo tiempo hidrólisis de los dipéptidos agregados en el estándar. Debe recordarse que en el sistema B el enriquecimiento realizado a la carne fue hecho con estándares de carnosina y anserina puros, por lo cual podría haber ocurrido lo mismo que en el caso del sistema C.

Por otro lado se observa que la cantidad de dipéptidos hallados en cada sistema luego de la SGI fue significativamente diferente ($p \leq 0.05$) por lo cual se considera un buen punto de partida para evaluar posibles diferencias en la actividad biológica entre ellos.

Medición de la capacidad antioxidante

Para los ensayos de capacidad antioxidante (FRAP y ABTS) las muestras utilizadas fueron previamente liofilizadas. Con este tratamiento se logró por un lado alcanzar el límite de cuantificación de ambas técnicas y por otro lado mantener las propiedades bioquímicas de las muestras estables en el tiempo.

Tabla 2: Capacidad antioxidante en cada sistema según el ensayo ABTS y FRAP

	ABTS (umoles de Trolox/L de extracto digerido)	FRAP (umoles de Fe(II)/L de extracto digerido)
Sistema C	91,4±13,7 A	14,5±5,8 a
Sistema A	547,1±2,9 B	29,3±8,7 b
Sistema B	569,5±12,4 C	43,4±3,2 c

Dentro de una misma columna letras distintas corresponden a valores con diferencias significativas según el método de Duncan con $p \leq 0.05$.

En ambos casos el valor obtenido de este parámetro corresponde a la sumatoria de todos los compuestos hidrosolubles presentes en el alimento que pudieran presentar dicha propiedad (Descalzo et al. 2007). Es por ello que para estudiar la acción antioxidante de los péptidos de anserina y carnosina específicamente se debe prestar especial atención a los resultados obtenidos con el sistema C y a la diferencia entre el sistema A y B. En el primero de los casos por tratarse de los estándares de dipéptidos solos y en el segundo de los casos debido a que la contribución al poder antioxidante de los compuestos presentes en la matriz cárnica está contemplado tanto en el sistema A como en el B, por lo que cualquier diferencia hallada entre ambos podría corresponder al aporte dado por el enriquecimiento con los dipéptidos.

La tabla 2 muestra los valores obtenidos para FRAP y ABTS en los tres sistemas. Se puede notar que en ambos ensayos los valores más altos correspondieron al sistema B en los cuales la muestra de carne fue enriquecida con la solución de dipéptidos. Estos valores presentaron diferencias estadísticamente significativas con los sistemas A y C ($p \leq 0.05$). En el caso particular del ensayo de ABTS se observa que en el sistema C el valor obtenido representó alrededor de un 17% del valor del sistema A, sugiriendo de esta forma que además de los dipéptidos en cuestión existirían otros compuestos capaces de secuestrar radicales libres en este alimento. Asimismo, en el ensayo de FRAP el valor obtenido en el sistema C resultó ser de aproximadamente un 50% del valor obtenido en el sistema A.

Estos hallazgos están en concordancia con el contenido de dipéptido presente en cada sistema, es decir, a mayor cantidad de dipéptido encontrado mayor capacidad antioxidante. Se puede inferir entonces que los dipéptidos presentarían propiedades antioxidantes, lo cual está de acuerdo con otros autores (Chan et al. 1994 y Manhiani et al. 2013). Más aún Manhiani *et al.*, utilizando las técnicas de TBARS, ORAC, DPPH y actividad quelante de metales, observaron que la carnosina contenida en distintos tejidos de pollo presenta actividad antioxidante a través del secuestro de radicales libres y la quelación de metales.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el ensayo de SGI permiten concluir que la acción de la digestión favorecería la



formación de los dipéptidos bioactivos de la carne (anserina y carnosina). En cuanto a su capacidad antioxidante vemos que los dipéptidos presentaron acción antioxidante luego de dicho proceso. Estos resultados respaldarían el consumo de carne en una dieta equilibrada no solo desde el punto de vista nutricional sino también por su beneficio para la salud. Futuros estudios *in vitro* (a través del uso de células Caco-2) deberán llevarse a cabo para evaluar la cantidad de péptido bioactivo que, luego de ser solubilizado a través de una digestión simulada, atravesaría las células de la membrana epitelial determinando posteriormente posibles modificaciones de su capacidad antioxidante.

BIBLIOGRAFÍA

- Chamorro V, Giovannini J, Godoy MF y Pazos A. 2014. Optimización de un método cromatográfico para la determinación de anserina y carnosina en carne bovina. IBEROLAB2014: VII Congreso Virtual Iberoamericano sobre Gestión de Calidad en Laboratorios. [Publicación en línea]. <http://www.iberolab.org/opencms/opencms/comunicaciones/Comunicaciones/comunicaciones1/index.html?page=2>
- Chan KM, Decker EA and Feustman C. 1994. Endogenous skeletal muscle antioxidants, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34:4, 403-426
- Descalzo A, Rossetti L, Grigioni G, Irueta M, Sancho AM, Carrete J y Pensel NA. 2007. Antioxidant status and odour profile in fresh beef from pasture or grain-fed cattle. *Meat Science* 75 (2): 309-17. doi:10.1016/j.meatsci.2006.07.015.
- Ekmekcioglu C. 2002. A physiological approach for preparing and conducting intestinal bioavailability studies using experimental systems. *Food Chemistry* 76 (2): 225-30. doi:10.1016/S0308-8146(01)00291-6.
- Hartmann R y Meisel H. 2007. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology* 18 (2): 163-69. doi:10.1016/j.copbio.2007.01.013.
- Hettiarachy N, Sato K, Marshall M and Kannan A. 2012. Bioactive food proteins and peptides applications in human health . Florida. Taylor & Francis Group. Pág. 333.
- Laparra JM, Vélez D, Montoro R, Barbera R y Farré R. 2003. Estimation of arsenic bioaccessibility in edible seaweed by an in vitro digestion method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (20): 6080-85. doi:10.1021/jf034537i.
- Lehninger AL, Calvet Prats F and Fes Bozal J. 1984. Bioquímica: las bases moleculares de la estructura y función celular 2ª ed, Barcelona, Ediciones Omega. Pág 1117.
- Manhiani PS, Northcutt JK, Han I, Bridges WC and Dawson PL. 2013. Antioxidant activity of carnosine extracted from various poultry tissues. *Poultry science* 92 (2): 444-53. doi:10.3382/ps.2012-02480.
- Marcolini E, Babini E, Bordoni A, Di Nunzio M, Laghi L, Maczó A, Picone G, Szerdahelyi E, Valli V y Capozzi F. 2015. Bioaccessibility of the Bioactive Peptide Carnosine during in Vitro Digestion of Cured Beef Meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63 (20): 4973-78. doi:10.1021/acs.jafc.5b01157.
- Minekus M, Alminger M, Alvito P, Ballance S, Bohn T, Bourlieu C, Carri F, et al. 2014. A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct.* *Food Funct* 5 (5): 1113-24. doi:10.1039/c3fo60702j.
- Mulero CJ, Zafrilla Rentero P, Martínez-Cachá Martínez A, Leal Hernández M y Abellán Alemán J. 2011. Péptidos bioactivos. *Clinica e Investigacion en Arteriosclerosis* 23 (5): 219-27. doi:10.1016/j.arteri.2011.04.004.
- Oomen AG, Hack A, Minekus M, Zeijdner E, Cornelis C, Schoeters G, Verstraete W, et al. 2002. Comparison of five in vitro digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants. *Environmental Science and Technology* 36 (15): 3326-34. doi:10.1021/es010204v.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M y Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26 (9-10): 1231-37. doi:10.1016/S0891-5849(98)00315-3.
- Sabbione AC, Nardo AE, Añón MC y Scilingo A. 2016. Amaranth peptides with antithrombotic activity released by simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods* 20. Elsevier Ltd: 204-14. doi:10.1016/j.jff.2015.10.015.



Sri Kantha S, Takeuchi M, Watabe S y Ochi H. 2000. HPLC Determination of Carnosine in Commercial Canned Soups and Natural Meat Extracts. *LWT - Food Science and Technology* 33 (1): 60-62. doi:10.1006/fstl.1999.0602.



VARIABILITY IN OIL YIELD, TOCOPHEROL CONTENT AND ITS ISOMERIC COMPOSITION, FOR ANNUAL CANARYSEED

Cogliatti M. (1), Mateo C.M. (2), Magariño M. (2).

(1) Grupo CIISAS, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, BIOLAB-AZUL, INBIOTEC. Av. Rep. de Italia N° 780 (7300) Azul, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

(2) Grupo TECSE, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (FIO-UNCPBA). Av. del Valle 5737 (7400) Olavarría, Argentina.

cmax@faa.unicen.edu.ar

RESUMEN

El alpiste (*Phalaris canariensis* L.) es un cereal novedoso para el consumo humano. Sus granos son libres de gluten y presentan una composición única, siendo una excelente fuente de proteínas ricas en triptófano, carbohidratos, ácidos grasos esenciales, fibra dietaria, minerales, vitaminas y fitoquímicos con potenciales beneficios para la salud. Trabajos recientes han demostrado que tanto los granos enteros de alpiste como sus harinas pueden utilizarse para la elaboración de panificados, pastas, cereales para desayuno y licuado (conocido como leche de alpiste). Las grasas y los aceites son importantes en la nutrición humana y proporcionan energía, vitaminas y sustancias con actividad antioxidante como los tocoferoles. Ellos son compuestos lipofílicos con actividad como vitamina E, que cumplen una importante función biológica en los seres humanos y aumentan la estabilidad de los aceites en los alimentos. En alpiste existen alrededor de una docena de cultivares. Sin embargo, todos los estudios sobre la composición nutricional y contenido de sustancias bioactivas se han realizado únicamente en dos cultivares CDC María y Keet. Al respecto, se considera relevante ampliar las determinaciones al resto de los cultivares, con el propósito de detectar la existencia de materiales con mejores cualidades nutraceuticas. Su detección permitiría adecuar la selección de las semillas a cultivar según su destino y su utilización como base del mejoramiento genético con miras a obtención de nuevos cultivares. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la variabilidad en el rendimiento de aceite, contenido de tocoferoles y su composición isomérica, en trece genotipos de alpiste. Los resultados mostraron diferencias significativas entre los genotipos para las variables analizadas: el rendimiento medio de aceite en el grano entero de alpiste fue del 7,5%, exhibiendo una marcada superioridad con respecto a otros cereales de invierno. Se determinó un contenido medio de tocoferoles totales de 472,7 g/g de aceite. El análisis de la composición de tocoferoles evidenció la presencia de isómeros alfa, beta y gamma en todos los genotipos, con un promedio de 24.51, 110.3 y 337.91 mg/g, respectivamente. El rendimiento de aceite no mostró correlación significativa con el contenido total de tocoferol ($r = -0,21$; $p = 0,31$). Mientras que el contenido total de tocoferoles se correlacionó positivamente con el contenido de γ -tocoferol ($r = 0,99$; $p < 0,0001$) y α -tocoferol ($r = 0,76$; $p < 0,0001$). La variabilidad observada entre los genotipos estudiados para el rendimiento de aceite, contenido de tocoferoles y su composición isomérica, resultó promisoría para el mejoramiento genético del cultivo.

Palabras claves: Phalaris canariensis; alpiste; aceite; tocoferoles

ABSTRACT

Canaryseed (*Phalaris canariensis* L.) is a new cereal for human consumption. Its grains are gluten-free and have a unique composition, being an excellent source of protein rich in tryptophan, carbohydrates, essential fatty acids, dietary fiber, minerals, vitamins and phytochemicals with potential health benefits. Recent work has shown that canaryseed whole grains as well as its flours can be used to produce bread, pasta, breakfast cereals and smoothie (known as canary seed milk). Fats and oils are important in human nutrition and provide energy, vitamins and substances with antioxidant activity such as tocopherols. They are lipophilic compounds with vitamin E activity, which play an important biological function in humans and increase oil



stability in food. In canaryseed there are about a dozen cultivars. However, all studies on the nutritional composition and content of bioactive substances have been conducted only on two cultivars CDC Mary and Keet. In this sense, it is considered important to broaden the determinations in other cultivars, in order to detect the existence of materials with better nutraceutical qualities. Their detection will allow a better selection of seeds according to their destination and use as a basis for genetic improvement to obtain new cultivars. The aim of this work was to study the variability in oil yield, tocopherol content and its isomeric composition, in thirteen genotypes of canary seed. The results showed that the average oil yield in canaryseed whole grain was 7.5%, emphasizing a marked superiority regarding other winter cereals. The mean content of total tocopherols was 472.7 g/g of oil. The analysis of tocopherol composition showed the presence of alpha, beta and gamma isomers in all genotypes, with averages of 24.51, 110.3 and 337.91 $\mu\text{g/g}$, respectively. The oil yield showed no significant correlation with total tocopherol content ($r = -0.21$; $P = 0.31$). Total tocopherols content was positively correlated with the content of γ -tocopherol ($r = 0.99$; $p < 0.0001$) and α -tocopherol ($r = 0.76$; $p < 0.0001$). The accessions show enough variability in oil yield, tocopherol content and its isomeric composition to represent a useful genetic resource for crop improvement.

Keywords: *Phalaris canariensis*; annual canaryseed; oil; tocopherols

INTRODUCTION

Annual canaryseed (*Phalaris canariensis* L.) is a winter cereal crop, with production practices and cycle similar to those other winter cereals, such as wheat and barley (Robinson 1978; Bodega et al. 1995). Argentina has played an important role in the global annual canaryseed market: until the 1980s, it was the world's leading producer and is currently among the top three producers after Canada and Thailand (FAO, 2015).

P. canariensis is the only species of its genus grown for grains, where, historically, the grains have been used exclusively as food for caged and wild birds. The first studies of the chemical composition of annual canaryseed grains showed that it possesses good nutritional value for human consumption (Robinson, 1978). In this context, in recent studies on the composition of the grain of annual canaryseed, research on new industrial and alimentary uses have been intensified. A complete quality analysis showed that annual canaryseed grain has similarity with wheat in most cases, and has no significant amounts of alkaloids or other antinutritional factors. Additionally, it is gluten free, which could open another market niche for these grains (Hucl et al. 2001). Annual canaryseed provides a source of protein, carbohydrate, essential fatty acids, dietary fiber, minerals and vitamins, as well as phytochemicals with potential health benefits (Paterson, 2013). Currently, canary seed grains are being proposed as an ingredient in bread, flour, breakfast cereals and pasta, and in baked goods such as biscuits, crackers, cookies, granola bars and baking mixes (Paterson, 2013). However, common canary seed is not safe for food consumption, because the attached hulls are covered with small siliceous hairs or spicules that have been linked to cancer of the esophagus (O'Neill et al. 1980). Currently, there are three hairless commercial varieties developed jointly by the Department of Plant Sciences and the Crop Development Centre of the University of Saskatchewan, named CDC-Maria, CDC-Togo and CDC-Bastia.

Fats and oils are important in human nutrition for providing energy, vitamins and substances with antioxidant activity. Cereals are rich sources of vitamin E, but the content and composition differ notably from cereal to cereal (Nielsen & Hansen, 2008). Cereal lipids are complex, but for nutritional purposes they can be regarded as consisting of glycerides containing six fatty acids, plus tocopherols, carotenoids and other unsaponifiable matter (Morrison, 1977). Tocopherols are lipophilic compounds that have vitamin E activity. These exert an effective inhibition of lipid oxidation in oils, fats and foods containing them (in vitro antioxidant activity) as well as in biological systems (in vivo antioxidant activity) (Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996). Therefore, these natural antioxidants increase the stability of food fat and fulfill an important biological requirement in humans. There are four possible forms or isomers named alpha (α), beta (β), gamma (γ) and delta (δ) tocopherol. These isomers differ in their in vivo and in vitro activities. It is known that α -tocopherol is the most efficient as vitamin E and γ -tocopherol is the most powerful as an in



vitro antioxidant (Velasco et al. 2002).

There are few studies of oil content in annual canaryseed grains, and most of them were carried out on one or two genotypes (Paterson, 2011; Abdel-Aal et al. 1997; Hucl, et al. 2001). Also, no references are found in the literature regarding tocopherol content in annual canaryseed grains.

The aim of the current work was to study the variability in oil content, tocopherols concentration in oil and its isomeric composition in a wide range of annual canaryseed genotypes.



MATERIALS AND METHODS

Grain samples

Thirteen genotypes of annual canaryseed were evaluated: ten cultivars (Keet, Elias, Aldén, Cantate, Judita, Abad, Karcsu, Lizard, CDC-María and CDC-Togo) and three experimental lines (Kisvarday-41, S4202 and S4203). CDC-María and CDC-Togo are two glabrous cultivars from Canada. S4202 and S4203 are experimental lines developed at the Facultad de Agronomía de Azul, Argentina (Cogliatti, *et al.* 2014). The S4202 line is currently undergoing registration at the Instituto Nacional de Semillas (INASE).

In 2010, the genotypes were grown in singles rows under the same agronomic conditions, in the Experimental Field Station of the Facultad de Agronomía, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (36° 45' S, 59° 50' W)

Analyzes were performed in duplicate for each of the samples (one sample for each genotype). All parameters were reported on the basis of the dry weight of the samples. To quantify the moisture content, 10 g of each sample was dried at 60 °C until the constant weight was reached.

Oil Extraction

Phalaris canariensis L. oils were extracted with n-hexane in a Soxhlet apparatus (Buenos Aires, Argentina) for 4 hours at 80 °C, using 150 mL of solvent and 50 g of seeds, following the IUPAC Standard Method (Paquot & Hautfenne, 1992). This technique was used for all the cases and is valid for the conditions used. This method is widely employed and very accessible for the extraction of cereal and oleaginous oils. After oil extraction, the solvent was removed using a rotary vacuum evaporator at 40 °C (Büchi, Waterbath B-480, Switzerland). The recovered oil was kept in a caramel-coloured bottle and the residual hexane was removed under a nitrogen stream. (Paquot & Hautfenne, 1992, AOCS, 1998).

Analysis of tocopherols

Tocopherol concentration in the annual canaryseed oil was measured through high-performance liquid chromatography (UHPLC) in normal phase and isocratic mode, according to standard methods IUPAC 2.432 (Paquot & Hautfenne, 1992) and AOCS Ce 8-89 (American Oil Chemists' Society, 1998). A Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 Series equipment (Germering, Germany) with a fluorescence detector (Agilent, 1100 Series, excitation: 292 nm, and emission: 330 nm), a Hichrom column, Lichrosorb Si 60, 250-4.6 mm inner diameter, and 5µ particle size (Merck, Darmstadt, Germany) was used. A solution of isopropanol 0.005 L/L (0.5% v/v) in hexane was used as the mobile phase, with a flow rate of 1.5ml/min. The peaks in the chromatogram were identified by taking into account the retention times of the different tocopherol isomers. The isomers were quantified using the external standard method with α -tocopherol as a reference (Sigma T3251, 95% purity; AOCS Ce 8-89 standard method), and the results were expressed as µg tocopherol/g oil.

Statistical analyses

All statistical analyses were performed using the InfoStat software, version 2015 (Di Rienzo *et al.* 2015).

RESULTS AND DISCUSSION

The results showed significant differences between genotypes for all the variables analyzed: oil yield, tocopherols content and its isomeric composition (**Table 1**).



Table 1. Oil yield, total tocopherol content and its isomeric composition in annual canaryseed whole grain.

Genotype	Grain (%)	oil	Total (µg/g)	Tocopherol composition (µg/g)						
				α	β	γ	α	β	γ	α
S4203	5.7	A	506.6	g	35.5	g	104.7	d	366.4	e
Togo	5.8	ab	528.4	h	25.0	cdef	114.8	e	388.6	g
María	6.0	abc	413.0	b	16.5	a	123.0	g	273.5	a
S4202	6.0	abcd	494.8	fg	28.4	f	86.2	a	380.2	f
Elias	6.1	abcd	415.4	bc	20.6	abc	115.7	ef	279.1	ab
Cantate	6.1	abcd	610.8	j	34.4	g	115.8	ef	460.7	i
Abad	6.1	abcde	394.0	a	21.3	abcd	97.9	b	274.8	ab
Alden	6.2	bcde	557.2	i	28.3	ef	117.8	f	411.1	h
Kisvardai	6.2	bcde	404.8	ab	19.4	ab	114.1	e	271.3	a
Keet	6.2	cde	426.1	c	21.6	abcd	121.7	g	282.9	b
Judita	6.4	def	487.2	f	23.3	abcde	116.6	ef	347.3	d
Lizard	6.5	ef	444.1	d	26.0	def	103.9	cd	314.3	c
Karcsu	6.6	F	462.9	e	18.5	ab	101.7	c	342.7	d
<i>P-value</i>	0.0043		<0.0001		<0.0001		<0.0001		<0.0001	
<i>SE</i>	0.07		24.51		110.3		110.3		337.91	

Means with common letters are not significantly different ($p > 0.05$)

Oil yield

The oil yield in the annual canaryseed grains showed a mean of 7.5%. This average was below those reported by Abdel-Aal *et al.* (1997) (8.7%) and Hucl *et al.* (2001) (8.85%). The oil yield of the whole grain of annual canaryseed showed a marked superiority compared to those reported in the literature for other winter cereals such as wheat (<2.5%), barley (1.5%), rye (1%) and oats (3.1%) (Abdel-Aal *et al.* 1997, 2011; Zielinski *et al.* 2001).

The two glabrous cultivars fit for human consumption (CDC-Maria and CDC-Togo) and the Argentine experimental lines (S4202 and S4203) showed no significant differences between them and were among the seven genotypes with lower oil yield.

Tocopherol content and composition

The mean of total tocopherol in annual canaryseed whole grain oil was 472.7 µg/g, with a range between 394 and 610.8 µg tocopherol/g oil. These results showed a higher content of total tocopherol than other winter cereals like wheat (10.29), barley (3.84), rye (13.74) and oats (1.63) (Zielinski *et al.* 2001).

The analysis of the tocopherol composition revealed the presence of α , β and γ isomers in all genotypes (**Figure 1**), with averages of 24.51, 110.3 and 337.91 µg/g, respectively. These amounts were higher than those reported in the whole grains of wheat (15.82; 7.8; -) and barley (5.4; 0.5; 1.7) µg/g for α , β and γ isomers, respectively (Engelsen & Hansen, 2008).

The percentage of oil in annual canaryseed whole grains showed no significant correlation with the total content of tocopherol ($r = -0.21$; $P = 0.31$). Total tocopherols content was positively correlated with the content of γ -tocopherol ($r = 0.99$; $p < 0.0001$) and α -tocopherol ($r = 0.76$; $p < 0.0001$) (**Figure 2**).



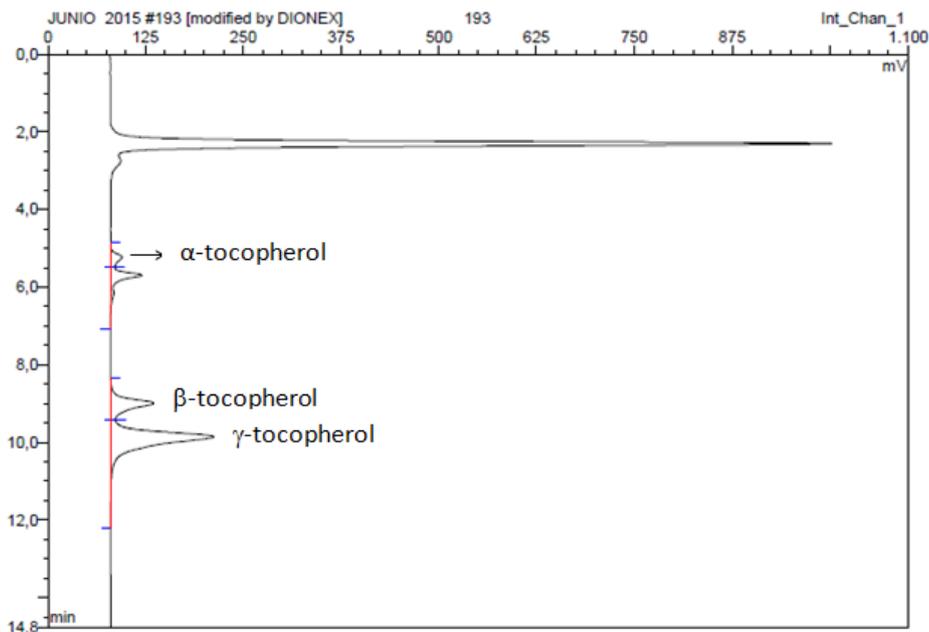


Figure 1. Chromatogram of ultra high pressure liquid chromatography (UHPLC) of the Lizard genotype, showing the patterns of α, β and γ tocopherol isomers.

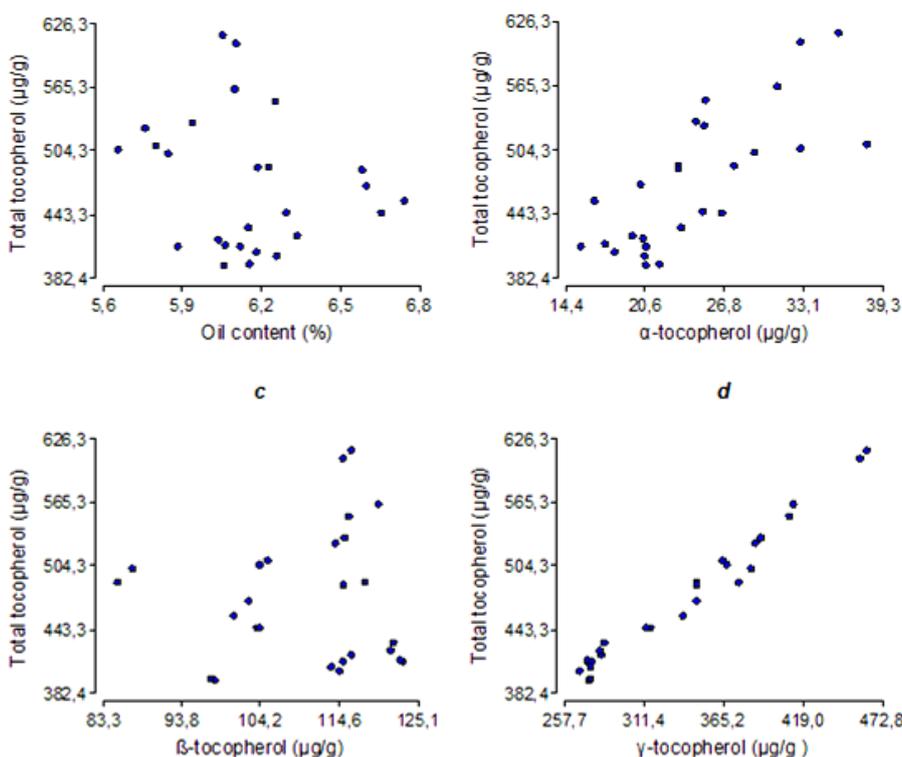


Figure 2. Correlation between: a- oil content and total tocopherol content; b- total tocopherol content and α-tocopherol content; c- total tocopherol content and tocopherol content; d- total tocopherol content and γ-tocopherol content.

CDC-Maria and CDC-Togo did not show significant differences in the oil yield. On the other hand, they showed significant differences in total tocopherol content and for the three isomers (α, β and γ). CDC-Togo



gave the highest content of α -tocopherol. The two Argentine experimental lines (S4202 and S4203) did not differ in oil yield and in total tocopherol content. However, they showed differences in isomeric composition, being 4203 richer than 4202 in α -tocopherol and the overall joint richest of all the genotypes for this isomer.

Cantate appears to be the most promising genotype observed for the characters under study, since it had the highest total tocopherol content, the highest γ -tocopherol content (most powerful in vitro antioxidant) and the joint highest α -tocopherol content (most efficient and most active form of vitamin E). Cantate is a Dutch variety that was evaluated in field trials in Azul, Argentina, as a resource for genetic improvement, and showed a combination of short stature, good yield and high grain weight (Cogliatti *et al.* 2011). Hence it could be a useful genotype as a parent in future breeding programmes aimed at combining, for example, glabrous seeds with superior tocopherol characteristics.

CONCLUSIONS

The results showed significant differences between genotypes for all the variables analyzed: oil yield, tocopherol content and its isomeric composition.

Annual canaryseed oil yield showed a marked superiority compared to other winter cereals such as wheat, barley, rye and oat.

The tocopherol composition of annual canaryseed grain oil showed the presence of α , β and γ isomers in all genotypes, showing amounts notably higher than those reported in the literature for other winter cereals like wheat and barley.

These results are promising and show that annual canaryseed grains are an excellent source of oil, rich in tocopherols.

The annual canaryseed accessions evaluated show enough variability in oil yield, tocopherol content and its isomeric composition to represent a useful genetic resource for crop improvement. Nonetheless, it remains to carry out further evaluation over future years in order to confirm these results.

REFERENCES

- Abdel-Aal ESM, Hucl P, Sosulski FW. 1997 Characteristics of canaryseed (*Phalaris canariensis* L.) starch. *Starch* 49, 475-80. DOI: 10.1002/star.19970491202
- Abdel-Aal ESM, Hucl P, Miller SS, Patterson, CA, Gray, D. 2011. Microstructure and nutrient composition of hairless canary seed and its potential as a blending flour for food use. *Food Chem* 12, 410-416. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.09.021
- American Oil Chemists' Society 1998. Official methods and recommended practices of the AOCS. Champaign, Ill: American Oil Chemists' Society.
- Bodega JL, De Dios MA, Rodríguez RH, Pereyra Iraola M. 1995. Caracterización agronómica de poblaciones comerciales de alpiste. *Revista Facultad de Agronomía* 15, (2-3): 161-170.
- Cogliatti M, Cortizo LV, Rogers WJ. 2014. Mejoramiento genético de alpiste: selección y evaluación de líneas de derivadas de la población marroquí PI284184. *RIA* 40(2) 189-195.
- Cogliatti I, M, Bongiorno F, Dalla Valle H, Rogers WJ. 2011. Canaryseed (*Phalaris canariensis* L.) accessions from nineteen countries show useful genetic variation for agronomic traits. *Can. J. Plant Sci.* 91, 37-48. DOI:10.4141/CJPS09194
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. 2015. InfoStat Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- FAO2015. Faostat. <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>> (access date: 20/10/2015).
- Hucl P, Han HL, Abdel-Aal ESM, Hughes LGR. 2001. Development and quality of glabrous canary seed. AFIF Project # 96000287. <http://www.agriculture.gov.sk.ca/19960287.pdf>. (access date: 04/12/2015)
- Izquierdo N, Nolasco S, Mateo CM, Santos D, Aguirrezába L. 2001. Relationship between oil tocopherol concentration and oil weight per grain in several crop species. *Crop Pasture Sci* 62, 1088-1097. DOI: 10.1071/CP11313



- Kamal-Eldin A, Appelqvist LA. 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 3, 1(7): 671-701.
- Morrison WR. 1997. Cereal Lipids. *Proceedings of the Nutrition Society* 36. 143.
- Engelsen MM, Hansen AS. 2008. Rapid high-performance liquid chromatography determination of tocopherols and tocotrienols in cereals. *Cereal Chem* 85(2), 248-251. DOI: 10.1094/CCHEM-85-2-0248.
- Novas MJ, Jiménez AM, Asuero AG. 2004. Determination of antioxidant activity of canary seed infusions by chemiluminescence. *Anal. Chem* 59 (1): 75-77. DOI: 10.1023/B:JANC.0000011672.20745.54.
- O'Neill CH, Hodges GM, Riddle PN, Jordan PW, Newman RH, Flood R J, Toulson EC. 1980. A fine fibrous silica contaminant of flour in the high oesophageal cancer area of north-east Iran. *Int J Cancer* 26, 617-628.
- Paquot C, Hautfenne A. Eds. 1992. *Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives*, 7th edition, International Union of Pure and Applied Chemistry Blackwell Scientific Publications, Oxford 1992.
- Patterson CA. 2011. Canaryseed - Naturally Gluten- Free. *Canaryseed News*, ISSUE 21: 4.
- Patterson CA. 2013. Novel Food Use Update. *Canaryseed News*, ISSUE 26, 5-6.
- Robinson RG. 1978. Chemical composition and potential uses of annual canarygrass. *Agron. J.* 70, 797-800.

ACKNOWLEDGMENTS

Financial support provided by H.J. Navas y Cia and Secretaría de Ciencia Arte y Tecnología (SeCAT). The translating and text editing provided by Prof. Silvia Benson and Dr. W. John Rogers are greatly appreciated.



VINOS TINTOS ORGÁNICOS CON MAYOR ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE BENEFICIOSA PARA LA SALUD

Di Carlo B.M.(1), Pérez, N.P.(1), Lenz R.M.(1), Gómez R.V.(1), Salomón R.(2), Moyano F.(1), Peñaranda S.S.(1), Zerpa G.(1), Navia F.(1), Rabus P.(1), Buttazzoni R.(1).

(1) Universidad Nacional de Salta, Consejo de Investigación, Facultad de Ciencias Exactas, Avda Bolivia 5150, Salta, Argentina

(2) Universidad Nacional de Salta, Consejo de Investigación, Facultad de Ingeniería, Avda Bolivia 5150, Salta, Argentina 2. Facultad de Ingeniería, Argentina.

bertadcar@yahoo.com.ar

RESUMEN

En los vinos tintos los compuestos fenólicos contribuyen a las características organolépticas del vino y poseen propiedades antioxidantes, protegiendo de lesiones vasculares arterioescleróticas. En los Valles Calchaquíes, Cafayate en Salta, elaboran vinos tintos varietales *Cabernet Sauvignon*, *Malbec* y *Tannat*, de forma tradicional y orgánica. Nuestro objetivo fue determinar la actividad antioxidante y correlacionarla con el contenido fenólico de los vinos elaborados con diferentes técnicas. Se analizaron en 27 muestras de vinos tintos varietales, determinando el contenido fenólico mediante absorbancia a 280 nm y por técnica de Folin-Ciocalteu; actividad antioxidante midiendo la intensidad colorante y parámetros de color X, Y, Z según Casassa-Sari. El contenido fenólico total varió entre 967 a 1530 mg/L ácido gálico con D280 de 0,292 a 0,551 para los vinos tradicionales, mientras que para los orgánicos entre 2185 a 2910 mg/L con D280 de 0,546 a 0,717. La actividad antioxidante fue mayor para el varietal orgánico *Tannat* de 1,41; siguiendo en orden *Malbec* con 1,097 y *Cabernet* con 0,873; con un coeficiente de correlación de 0,94 con el contenido fenólico. Se concluye que los vinos tintos orgánicos de la zona de Cafayate en Salta, poseen mayor acción antiradicalaria que los tradicionales, siendo beneficiosos para la salud.

Palabras Claves: actividad, antioxidante, vinos tintos, orgánico.

ABSTRACT

The phenolic compounds contribute to the organoleptic characteristics of the red wine and possess antioxidant properties, protecting arteriosclerotic vascular lesions. Cafayate in the Calchaquíes Valleys of Salta produces red wines varietals *Cabernet Sauvignon*, *Malbec* and *Tannat*, traditional and organic form. Our objective was to determine the antioxidant activity and correlate with the phenolic content of wines made with different techniques. They were analyzed 27 samples of varietal red wines, determining the phenolic content by absorbance at 280 nm and by Folin-Ciocalteu technique; antioxidant activity by measuring the color intensity and color, parameters X, Y, Z according Casassa-Sari. The total phenolic content ranged from 967 to 1530 mg / L gallic acid with D280 of 0.292 to 0.551 for traditional wine, whereas for organic between 2185 to 2910 mg / L with D280 of 0.546 to 0.717. The antioxidant activity was higher for organic varietal *Tannat* of 1.41; following in order *Malbec* and *Cabernet* with 1,097 to 0,873; being the correlation coefficient of 0.94 with the phenolic content. It is concluded that organic red wines from the area of Cafayate in Salta, have greater antiradical action than traditional, being beneficial to health.

Keywords: activity, antioxidant, red wines, organic.

INTRODUCCIÓN

Los Valles Calchaquíes de la provincia de Salta comprenden una región integrada por los departamentos de Cafayate, San Carlos, Molinos (Colomé) y Cachi de la citada provincia, donde existen 26 bodegas que elaboran vinos tintos varietales *Cabernet Sauvignon*, *Malbec* y *Tannat*. 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 por lo que es de importancia el estudio fenólico y la capacidad antioxidante de los vinos tintos.

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 lipoproteínas).

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 descrito efectos protectores en patologías como diabetes, cáncer, infecciones víricas, úlceras estomacal y duodenal, inflamaciones y hasta acción antialérgica (Martínez-Flores *et al.*, 2002)

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.

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, antocianinas, carotenoides, ácidos fenólicos (Larson, 1997). En los últimos años han surgido numerosos estudios, que demuestran que el consumo moderado de vino tinto es beneficioso para la salud, principalmente en la prevención de enfermedades crónicas asociadas al estrés oxidativo, tales como la aterosclerosis y enfermedades cancerígenas. 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; Azuma *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 estudia la capacidad antioxidante de vinos tintos varietales *Malbec*, *Cabernet Sauvignon* y *Tannat*, producidos con las técnicas tradicional y orgánica en la zona de Cafayate, principal productora de vinos en los Valles Calchaquíes de Salta, correlacionándola con el contenido total de polifenoles, además se determinan parámetros de color X, Y, Z para evaluar luminosidad, saturación, tonalidades roja y amarilla estos resultados serán difundidos a la comunidad y transferidos a las empresas vitivinícolas de la zona.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron en 27 muestras de vinos tintos de las variedades *Malbec*, *Cabernet Sauvignon* y *Tannat*, provenientes de 4 bodegas de Cafayate, producidos en forma tradicional y orgánica. Las bodegas trabajan en la misma zona a igual altitud, sólo que las de producción orgánica no aplican pesticidas, fertilizantes o agroquímicos en el cultivo de la vid, tampoco utilizan starter de levaduras comerciales durante el proceso de vinificación. Se determinó el contenido fenólico por medición de absorbancia a 280 nm según técnica de



Ribéreau-Gayon (2006). 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 según técnica de Ursini y colaboradores (1996). Los fenoles totales se midieron por la técnica de Folin-Ciocalteu de acuerdo a Singleton y Rossi (1965), por medición de la absorbancia a 700 nm, determinando los mg/L con una curva patrón de ácido gálico. Los parámetros de color X, Y, Z según Casassa-Sari (2006), para evaluar luminosidad (L), saturación (C), tonalidades roja (a) y amarilla (b) de los vinos tintos regionales. En el análisis estadístico 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 (2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del contenido fenólico total variaron entre 967 a 1530 mg/L ácido gálico con índices de D280 de 29,2 a 55,1 para los vinos tradicionales, mientras que para los orgánicos entre 2185 a 2910 mg/L con D280 de 54,6 a 71,7; siendo los máximos para los varietales orgánicos *Tannat*, siguiendo *Malbec* y *Cabernet Sauvignon* como se puede observar en las **figuras 1 y 2**.

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

El contenido total de polifenoles en los vinos tintos se correlaciona con su capacidad antioxidante. En estudios realizados en humanos, el consumo moderado de vinos tintos a mediano plazo, demostró la resistencia de las LDL a la oxidación (Friedman y Kimball, 1986). Mientras que estudios de la capacidad antioxidante realizadas *in vitro* dan idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo* (Avalos Llano *et al*, 2003). 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 sinérgico o inhibitorio de cada uno de ellos. (Sato *et al*, 1996).

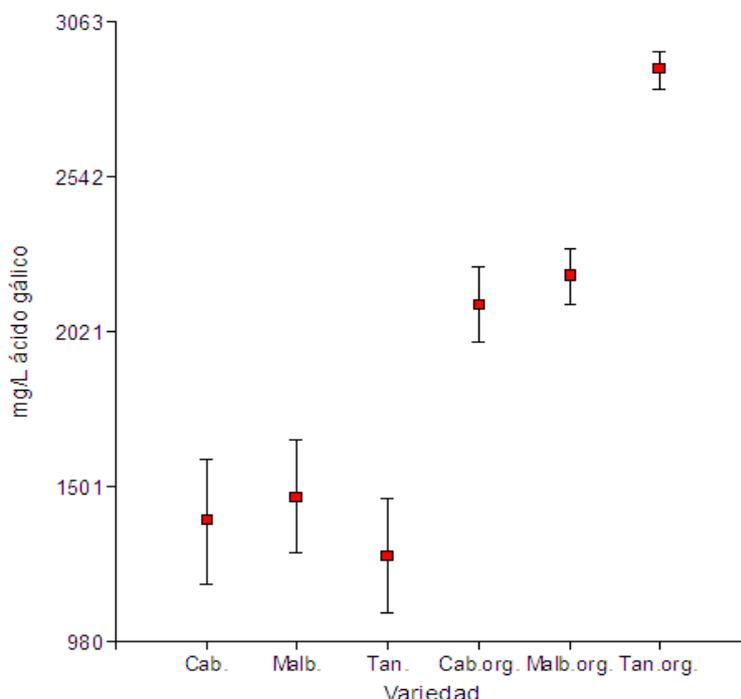


Figura 1. Contenido Fenólico total de vinos orgánicos y tradicionales



Cab (*Cabernet*), Malb (*Malbec*), Tan (*Tannat*), org (orgánicos)

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.

De acuerdo a estos estudios, se puede considerar a los vinos tintos alimentos funcionales por su contenido de antioxidantes naturales, con componentes fisiológicamente activos y biodisponibles, como son los polifenoles.

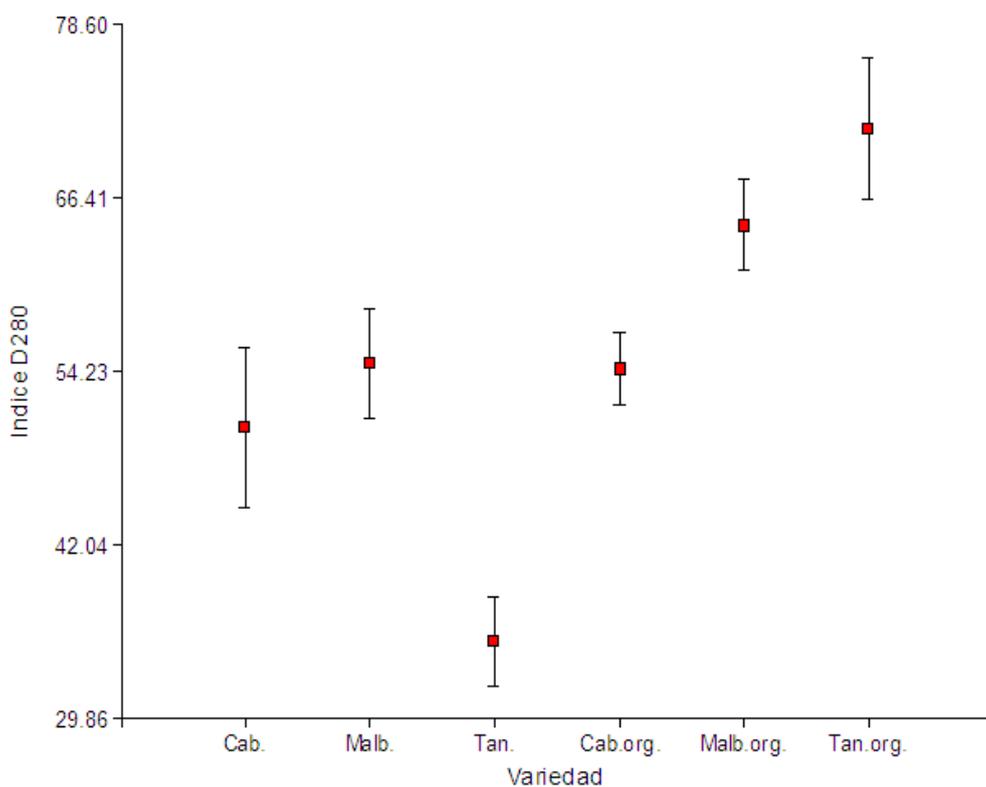


Figura 2. Índices D280- Cab (*Cabernet*), Malb (*Malbec*), Tan (*Tannat*) org (orgánicos)

El consumo moderado de los vinos tintos, por la capacidad antioxidante determinada y su contenido fenólico es beneficiosa para la salud de la población, como lo demostraron los estudios de intervención realizados en humanos por Leighton 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 cuando se suplementó la dieta con vino (Leighton, 1999) .

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 0,87 a 1,41, con mayores valores para el varietal orgánico *Tannat* de 1,41; siguiendo en orden *Malbec* con 1,097 y *Cabernet* con 0,87 como se observa en la



figura 3.

Se determinó que los varietales orgánicos poseen mayor capacidad antioxidante que los vinos producidos con técnicas tradicionales, lo que indica que las prácticas culturales orgánicas protegen el contenido fenólico de las uvas y otorgan a los vinos mejores características antiradicalarias.

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).

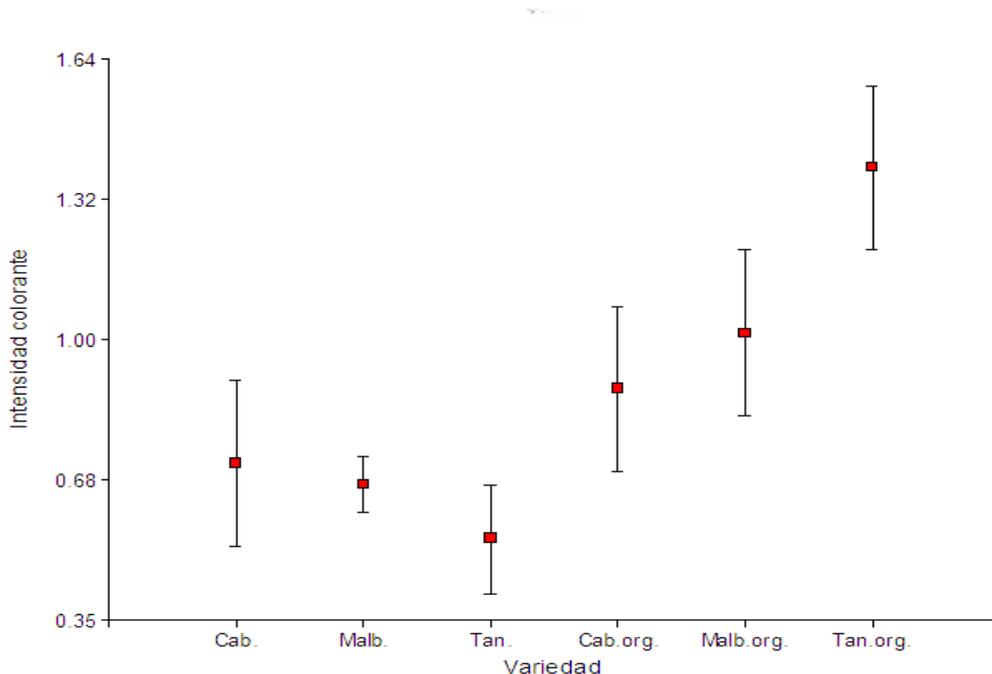


Figura 3. Intensidad colorante de vinos tintos regionales
Cab (*Cabernet*), Malb (*Malbec*), Tan (*Tannat*), org (orgánicos)

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 0,94 como se puede observar en la **figura 4.**



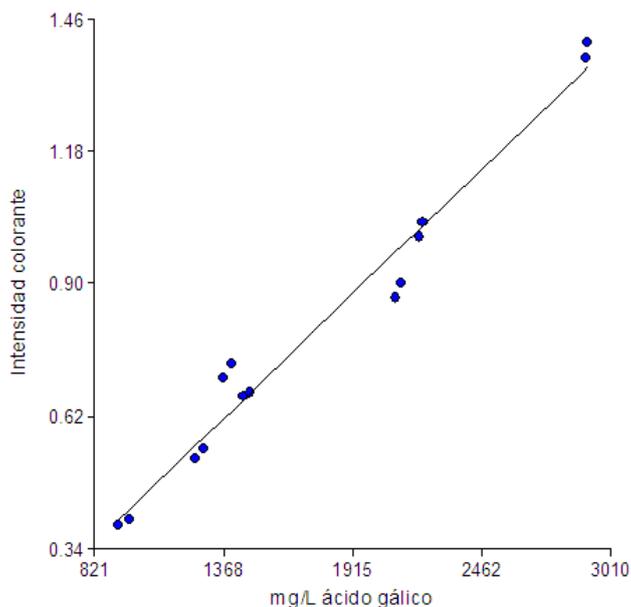


Figura 4. Correlación entre intensidad colorante y contenido fenólico.

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 orgánico *Tannat*, siguiendo en orden los varietales orgánicos *Malbec* y *Cabernet Sauvignon*. 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). También Sato *et al* (1996) encontraron en vinos tintos que el contenido total de polifenoles en los vinos tintos se correlaciona con su capacidad antioxidante.

Se efectuó el análisis estadístico multivariante de los resultados, para comprender su variabilidad, cuya representación mediante las componentes principales se observa en la **figura 5**. Se puede apreciar que la componente 1 participa con el 97,1 % y la componente 2 con el 1,9%.



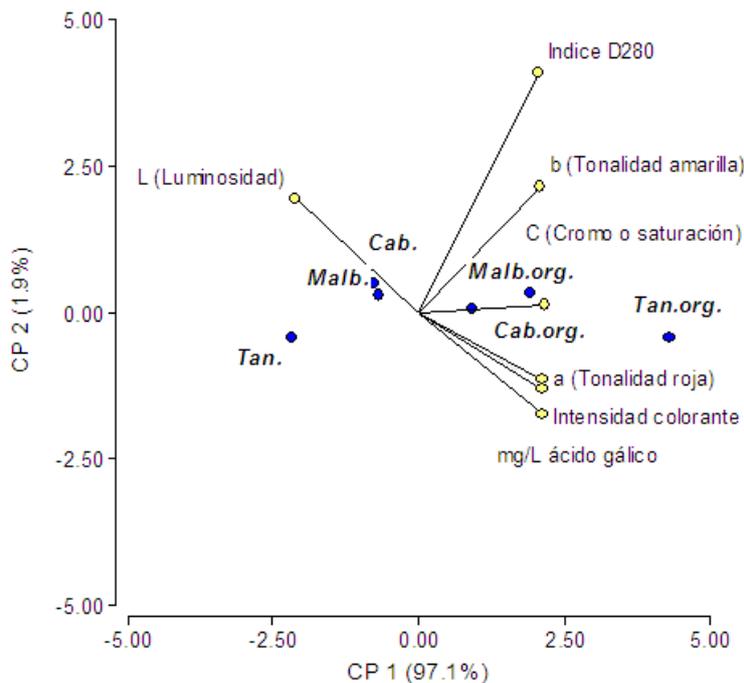


Figura 5. Análisis multivariante de los vinos tintos regionales Cab (*Cabernet*), Malb (*Malbec*), Tan (*Tannat*), org (orgánicos)

Se observa en el gráfico de análisis multivariante la asociación de los vinos de las variedades orgánicas con los mayores valores de intensidad colorante, contenido fenólico, saturación (C), tonalidades roja(a) y amarilla (b), mientras que los varietales tradicionales están asociados con menores valores de éstos resultados y mayor luminosidad (L).

De éste análisis multivariado, destacamos que los varietales orgánicos *Tannat*, *Malbec* y *Cabernet Sauvignon* presentan mejores características polifenólicas y antiradicalarias que los producidos por las técnicas vitivinícolas tradicionales, 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).

De acuerdo a Winter y Davis (2006), las técnicas agrícolas aplicadas en los cultivos ecológicos u orgánicos, en los que la planta no recibe nutrientes artificiales, podrían activar los mecanismos de defensa de los vegetales y aumentar así los niveles de polifenoles en los frutos.

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.

CONCLUSIONES

Los vinos tintos regionales de la zona de Cafayate en Salta, presentaron contenidos fenólicos que variaron entre 967 a 1530 mg/L ácido gálico con D280 de 0,292 a 0,551 para los vinos tradicionales, mientras que para los orgánicos entre 2185 a 2910 mg/L con D280 de 0,546 a 0,717.

La actividad antioxidante medida como intensidad colorante máxima fue para el varietal orgánico *Tannat* de 1,41; siguiendo en orden *Malbec* con 1,097 y *Cabernet* con 0,873; con un coeficiente de correlación de 0,94 con el contenido fenólico. Se determinó asociación de las variedades orgánicas con los mayores valores de



intensidad colorante, contenido fenólico, saturación (C), tonalidades roja (a) y amarilla (b), mientras que los varietales tradicionales están asociados con menores valores de éstos resultados y mayor luminosidad (L). Se concluye que los vinos tintos orgánicos de la zona de Cafayate en Salta, poseen mayor acción antiradicalaria que los vinos con producción tradicional, de importancia por sus beneficios para la salud. La diferencia entre los dos tipos de producciones es fundamentalmente la metodología de cultivo, dado que los cultivos orgánicos no utilizan agroquímicos, además tampoco starters de levaduras comerciales; éstas condiciones naturales promueven la formación de los metabolitos secundarios (polifenoles) como acción defensiva de las plantas. Se destaca que 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.
- 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.
- Avalos Llano KR, Sgroppo SC, Avanza JR. 2003. Actividad antioxidante y contenido en fenoles totales en vinos de origen nacional. *FACENA*, 19: 11-19.
- 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 measure antioxidant activity in organic media: application to lipophilic vitamins. *Redox Report*, 5 (6): 366-370.
- Casassa F, Sari S. 2006. Aplicación del Sistema Cie-Lab a los vinos tintos. Correlación con algunos parámetros tradicionales. *Revista Enología III. Inta. Mendoza. 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 E, Waterhouse A, Teissedre P. 1995. Principal Phenolic Phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *J. Agric. Food Chem.*, 43: 890-894.
- Friedman LA and Kimball A.W. 1986. Coronary heart disease mortality and alcohol consumption in Framingham. *Am.J.Epidemiol.* 124(3): 481- 9.
- Ghiselli A, Nardini M, Baldi A, Scaccini C. 1998. Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an italian red wine. *J. Agric. Food Chem.*, 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. *J. Agric. Food Chem.*, 45: 1283-1289.
- Kanner J, Frankel E, Granit R, German B, Kinsella J. 1994. Natural antioxidants in grapes and wines. *J. Agric. Food Chem.*, 42: 64-69.
- Larson R. 1997. Naturally occurring 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. Clin. Res.* 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, Pardo Minguez F. 2002. Valoración de la calidad de uvas tintas a la entrada de la bodega. Conferencia presentada en las XXIV Jornadas de Vitivinicultura y Enología. Tierra de Barros. Almendralejo 2002. *Actas*.



- Peynaud E. 1996. Balance in wine. New York, USA : 2° Ed. John Wiley & Sons, Inc., 108-209.
- Rapisarda P, Tomaino A, Lo Cascio R, Bonina F, De Pasquale A, Saija A. 1999. Antioxidant effectiveness as influenced by phenolic content of fresh orange juices. *J. Agric. Food Chem.*, 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: Editorial 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 phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. *J. Agricultural 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. *J. 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. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 14, 54-61.
- Singleton VL, Joseph A, Rossi J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-158.
- Simonetti P, Pietta P, Tetolin G. 1997. Polyphenol Content and total antioxidant potential of selected Italian wines. *J. Agric. Food Chem.*, 45: 1152-1155.
- Somers C, Evans M. 1977. Spectral evaluation of young red wines: anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO₂, "chemical age". *J. 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. *J. Agric. Food Chem.*, 43: 401-403.
- Winter CK, Davis SF. 2006. Organic foods. *Journal of Food Science* 2006, 71:117-124.



CALIDAD PROTEICA EN PAN DE MOLDE FORTIFICADO

Erben M. (1,2), de la Torre M.A. (2), Osella C.A. (2)

(1) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas – CONICET.

(2) Instituto de Tecnología de Alimentos (ITA) – Facultad de Ingeniería Química (FIQ) – Universidad Nacional del Litoral. 1 de Mayo 3250, Santa Fe - Santa Fe, Argentina.

erbenmelina@gmail.com

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue determinar la calidad proteica de un pan de molde fortificado (88,8% harina de trigo, 8,2% harina de soja y 3% WPC 35) y compararla con un control (100% harina de trigo). Se realizó la determinación y cuantificación de aminoácidos mediante cromatografía líquida de alta resolución según Alaiz et al. (1992), se estudió la digestibilidad proteica (%DP) según Rudloff y Lönnerdal (1992) y se cuantificó lisina disponible (LD) por el método de Carpenter (1960) modificado por Booth (1971). Se calculó el score químico (SQ) y el SQ corregido por digestibilidad (PDCAAS). Como proteína de referencia se utilizó el patrón de aminoácidos para niños de 3 a 10 años (FAO 2013). La mezcla soja/suero mejoró el perfil aminoacídico, hallándose mayores concentraciones de lisina, treonina y arginina en el pan fortificado ($p<0,05$). La %DP fue del 100% en ambos panes y se encontró que el contenido LD fue significativamente superior ($p<0,05$) en el pan fortificado respecto del control, 33,7 y 22,6 mg/g de proteína, respectivamente. Los datos de SQ y PDCAAS se calcularon teniendo en cuenta la concentración de LD, los resultados hallados fueron: 0,70 y 70 en el pan fortificado y 0,47 y 47 en el control.

Palabras clave: pan de molde, fortificación, digestibilidad proteica, lisina disponible.

ABSTRACT

The objective of this work was to determine the protein quality of a fortified mold bread (88.8% wheat flour, 8.2% soy flour and 3% WPC 35) and compare this results with a control bread (100% wheat flour). The identification and quantification of amino acids were performed using high resolution liquid chromatography according Alaiz et al. (1992), protein digestibility (% DP) was studied according to Rudloff and Lönnerdal (1992) and available lysine (AL) was quantified by the method of Carpenter (1960) modified by Booth (1971). Chemical score (CS) and CS corrected by digestibility (PDCAAS) were calculated. Amino acid patterns for children from 3 to 10 years were used as reference protein. Soy/whey blend improves the amino acid profile. The concentration of lysine, threonine and arginine were higher in the fortified bread ($p<0.05$). Both breads exhibited %DP values of 100%. AL value was significantly higher in fortified mold bread in comparison with control bread ($p<0.05$), 33.7 and 22.6 mg/g protein, respectively. CS and PDCAAS were calculated using AL concentrations. The results found were: 0.70 and 70% in the fortified bread and 0.47 and 47% in the control bread.

Keywords: mold bread, fortification, protein digestibility, available lysine.

INTRODUCCIÓN

El pan es un alimento de consumo masivo por lo que el reemplazo de harina de trigo (HT) por harina de soja (HS), concentrado de proteínas del lactosuero (WPC) o sus mezclas, resulta una estrategia nutricional adecuada para mejorar la cantidad y calidad de las proteínas. Argentina se encuentra posicionada como uno de los principales países consumidores de productos panificados elaborados a base harina de trigo (Lezcano 2013). Según datos de la Federación Argentina de la Industria Molinera (FAIM) durante el año 2015, el consumo de harina de trigo per-cápita en Argentina fue de 90 kg/año, el consumo de pan se estimó en 70,6 kg/hab/año para el pan tradicional de panadería y en 4,6 kg/hab/año para el pan industrial (pan de molde y



bollería). No obstante, es reconocido que aunque aporta energía y otros nutrientes, este cereal es pobre desde el punto de vista nutricional, sus proteínas presentan un bajo valor biológico atribuible a una deficiencia en aminoácidos esenciales como lisina y treonina (Visentín et al. 2009).

La soja o soya *Glycine max* (L.) es un miembro importante de la familia de las leguminosas y representa una rica fuente de proteínas para el hombre y los animales. Las proteínas de soja son altamente digeribles y de buen valor biológico, siendo muy interesante la composición de aminoácidos, ya que si bien estas proteínas son limitantes en los aminoácidos azufrados cisteína y metionina, poseen un elevado contenido de lisina, por lo que se complementan muy bien con los cereales. Por otro lado, las proteínas del WPC presentan alta biodisponibilidad y un elevado contenido en aminoácidos esenciales especialmente lisina, triptófano, metionina y cisteína (Pérez et al. 2008), por lo cual este subproducto de la industria quesera también puede ser bien utilizado como suplemento de las proteínas vegetales en productos panificados.

Tres factores fundamentales determinan la calidad nutricional de una proteína: su composición en Aminoácidos Esenciales (AAe), su digestibilidad y el requerimiento de aminoácidos de quienes la consumen. En 1985, un Comité de Expertos estableció el patrón aminoacídico de referencia que asegura los requerimientos de proteínas para cada grupo etario (FAO/OMS/UNU 1985). Los preescolares son el grupo de más alta exigencia proteica, por lo que se aconseja utilizar el patrón destinado a este grupo para evaluar la calidad de las proteínas de la dieta. De este modo, si el patrón aminoacídico es adecuado al preescolar, también lo será para todos los otros grupos de la población por tener menores requerimientos.

El Score Químico (SQ) es expresado como la cantidad (mg) de AAe por gramo de la proteína en estudio, en relación con la cantidad del mismo compuesto en la proteína de referencia. El valor más bajo es el que corresponde al score y el aminoácido que lo produce se denomina “primer limitante”. Si el valor obtenido para cada aminoácido fuese mayor a 100%, el SQ del alimento se establece en 100 (Millward 2012). Otro factor determinante de la calidad de las proteínas es su digestibilidad, asociada con factores no proteicos, fibra y polifenoles entre otros y por la secuencia de los aminoácidos dentro de la cadena proteica (Suarez López et al. 2006). La digestibilidad condiciona la utilización de las proteínas alimenticias en forma variable, y refiere al porcentaje del nutriente consumido que es absorbido por el tracto gastrointestinal y que no es recuperado como N fecal (Hughes et al. 2011). Para conocer la utilización de los aminoácidos en el organismo es necesario realizar la corrección del valor de SQ según la digestibilidad proteica (Millward 2012). El SQ (basado en el contenido de los aminoácidos limitantes) corregido por la digestibilidad de la proteína, PDCAAS por sus siglas en inglés, es en la actualidad el método elegido para determinar la calidad de proteínas de origen vegetal y de otros alimentos.

Por lo expuesto anteriormente, el objetivo del presente trabajo de investigación fue determinar la calidad proteica de un pan de molde fortificado elaborado con harina de trigo, harina de soja y WPC, y contrastar los resultados con un pan control a base de harina de trigo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materias primas

En la elaboración de pan de molde se utilizó harina de trigo comercial 000 (HT) con las siguientes características: 13,6 g/100 g de humedad, 10,3 g/100 g (N x 5,7) de proteína, 1,0 g/100 g de grasa, 0,68 g/100 g de cenizas, 74,4 g/100 g de carbohidratos y 27,5 g/100 g de gluten húmedo; W (trabajo de deformación - 10^{-4} Joule): 305, P (tenacidad - mm): 110, P/L (relación tenacidad / extensibilidad): 1,2. Harina de soja desgrasada inactivada (HS) provista por Ricedal Alimentos S.A. (Santa Fe-Argentina) con un contenido de 7,5 g/100 g de humedad, 45,1 g/100 g (N x 6,25) de proteína, 1,3 g/100 g de grasa, 5,93 g/100 g de cenizas y 40,2 g/100 g de carbohidratos. Concentrado de proteínas del lactosuero (WPC) provisto por Milkaut (Santa Fe-Argentina) con 6,7 g/100 g de humedad, 30,3 g/100g (N x 6,38) de proteína, 2,3 g/100 g de grasa, 6,3 g/100 g de cenizas y 54,4 g/100 g de carbohidratos. Además se emplearon otros ingredientes de grado alimentario: azúcar refinada comercial; sal fina comercial; oleomargarina PF 36°C; polvo para hornear; leche en polvo descremada granulada de disolución instantánea y levadura prensada comercial.

Ensayo de panificación

Para la elaboración de pan de molde se utilizó el procedimiento propuesto por Tosi y col. (2002). La



formulación empleada para el pan fortificado se describe a continuación: HT (266,5 g), HS (24,6), WPC (8,9), azúcar (18 g), levadura (15 g), grasa (9 g), leche en polvo (6 g), sal (6 g) y agua según absorción farinográfica (500 UB). El pan control se preparó empleando el mismo procedimiento con 100% de HT. Ambas formulaciones fueron realizadas por duplicado.



Estudio de la composición proteica

Proteínas

El contenido de nitrógeno total se determinó por semi-micro Kjeldahl según el Método Oficial 46-13 (AACC 2000). Con este valor se calculó el contenido de proteína bruta, utilizando el factor, para la conversión de nitrógeno a proteína de 5,7 para el pan control, mientras que para el pan fortificado se utilizó el factor de conversión 6,25, correspondiente a mezclas de proteínas (CAA Cap. V).

Perfil de aminoácidos

La determinación y cuantificación de los aminoácidos se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución según la técnica propuesta por Alaiz et al. (1992). Para tal fin se utilizó un equipo HPLC Konik-KNK-500-A, acoplado a un detector Perkin Elmer 785A UV/VIS (EEUU). La adquisición y procesamiento de datos se efectuaron a través de la utilización del Software Turbochrom Navigator, Perkin Elmer (EEUU).

Digestibilidad proteica in vitro (%DP)

La %DP se determinó según el método de Rudloff y Lönnerdal (1992). Las enzimas empleadas (pepsina y pancreatina) fueron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU). La %DP fue definida como el aumento de Nitrógeno No Proteico (NNP) luego de la digestión, en relación con el Nitrógeno de Proteína Verdadera (NPV), expresado como porcentaje, según la siguiente ecuación (1):

$$DP (\%) = 100 \times \Delta NNP / (NT - NNP) \quad (1)$$

Lisina Disponible

Para el análisis de la LD se utilizó el método de Carpenter (1960) modificado por Booth (1971), que involucra la reacción de Sanger. El método se basa en la determinación de lisina reactiva por reacción de grupos NH_2 provenientes del aminoácido con FDNB (fluordinitrobenzeno) y posterior cuantificación espectrofotométrica previa hidrólisis ácida para la formación de dinitro fenil lisina. Las muestras fueron medidas en espectrofotómetro UV-visible Milton Roy Genesys 5 (Ivilyand, EEUU) a una longitud de onda de 435 nm. La curva de calibrado fue realizada con un patrón de EDNP-Lis-CIH Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU) en el rango de 5 – 40 mg/L.

Cómputo aminoacídico o Score Químico

El SQ se calculó aplicando la fórmula que se detalla a continuación (2). Como proteína de referencia se utilizó el patrón de requerimientos de aminoácidos indispensables para niños de 3 a 10 años (FAO 2013).

$$SQ = \frac{\text{mg de aminoácido esencial /g proteína (estudio)}}{\text{mg de aminoácido esencial /g proteína (referencia)}} \quad (2)$$

Score químico de aminoácidos corregido por digestibilidad (PDCAAS)

El PDCAAS se calculó a partir de la siguiente ecuación (3):

$$PDCAAS = \frac{\text{mg de aminoácido esencial /g proteína (estudio)}}{\text{mg de aminoácido esencial /g proteína (referencia)}} \times \%DP \quad (3)$$

Análisis estadístico

Todas las determinaciones fueron realizadas por duplicado. Los valores medios y desvíos estándar fueron calculados utilizando el programa Microsoft Excel 2010. El análisis de la varianza (ANOVA) fue aplicado para comparar medias al 95% de confianza, utilizando el programa Statgraphics Plus 5.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El pan fortificado presentó un contenido de proteínas significativamente mayor al pan elaborado con 100% de HT, siendo los valores hallados 12,6 y 9,6 g/100 g respectivamente. De esta manera, el pan elaborado con harinas alternativas aporta un ~30,0% más de proteínas que el pan control y puede ser considerado de



acuerdo al Reglamento Técnico MERCOSUR sobre el rotulado nutricional de alimentos envasados, un producto con “alto contenido” de proteínas.

El perfil de aminoácidos en la muestra control y fortificada se presenta a continuación en la Tabla 1. Las concentraciones de los aminoácidos valina, isoleucina y triptófano no se presentan en este trabajo ya que no fueron evaluados. Sin embargo, al no ser éstos aminoácidos limitantes de las materias primas empleadas, el SQ fue calculado en función de los aminoácidos esenciales determinados. Como se observa en la tabla, la utilización de harinas mezclas mejoró significativamente los niveles de treonina, arginina y lisina, mientras que los valores de los aminoácidos no esenciales ácidos aspártico y glutámico, y prolina resultaron ser estadísticamente inferiores en el pan fortificado cuando se los comparó con los niveles encontrados en el control ($p < 0,05$).

Tabla 1. Perfil de aminoácidos en pan fortificado y pan control.

AA	mg /g proteína		p
	Pan fortificado	Pan control	
Asp + Glu	375,48 ± 4,33	400,49 ± 2,94	0,0214
Ser	69,02 ± 0,11	68,65 ± 2,88	0,8708
His	87,35 ± 3,59	94,37 ± 2,86	0,1631
Gli	59,67 ± 0,45	60,57 ± 0,11	0,1121
Tre	48,41 ± 0,85	41,96 ± 1,19	0,0247
Arg	57,18 ± 1,12	52,49 ± 0,57	0,0342
Ala	49,56 ± 1,01	42,32 ± 2,90	0,0729
Pro	19,51 ± 1,15	24,15 ± 0,09	0,0296
Tir	48,01 ± 0,85	47,95 ± 0,65	0,9492
Met	17,50 ± 1,25	19,71 ± 0,01	0,1291
Cis	62,08 ± 2,01	58,48 ± 2,25	0,2341
Leu	106,58 ± 0,73	101,10 ± 2,22	0,0797
Fen	73,62 ± 0,50	75,54 ± 8,52	0,7811
Lis	47,95 ± 0,43	31,45 ± 3,49	0,0219

Los resultados hallados están asociados a las diferentes concentraciones de aminoácidos presentes en las materias primas empleadas en la elaboración de cada uno de los productos. Las proteínas del trigo tienen un alto contenido de prolina y glutamina, a expensas de aminoácidos esenciales, en particular lisina y en menor medida treonina (Dewettinck et al. 2008). Por otro lado, la composición de aminoácidos de las proteínas de soja se asemeja a las proteínas de origen animal, con excepción del contenido de aminoácidos azufrados (Singh et al. 2008); y las proteínas del WPC presentan un buen balance aminoacídico, siendo predominante el contenido de los aminoácidos treonina, metionina y cisteína (Boye et al. 2011, Roy et al. 2010, Walzem et al. 2002, Renkema 2001).

Los valores de SQ se presentan en la Tabla 2. Se encontró que la lisina fue el AA limitante, el valor de score fue de 0,65 para el pan control y 0,99 para el pan fortificado. Los cereales son deficientes en lisina, por lo que los productos de panificación y galletería, al tener como ingrediente básico al trigo, presentan valores de SQ inferiores a 1 (Dewettinck et al. 2008).

Tabla 2. SQ en pan fortificado y pan control.

Aae	Proteína de referencia*	SQ	
		an fortificado	Pan control
His	16	5,45	5,89
Tre	25	1,93	1,67
Fen + Tir	41	2,97	3,01
Met + Cis	23	3,46	3,40
Leu	61	1,74	1,65



Lis	48	0,99	0,65
AA limitante		Lis	Lis

*Patrón de requerimientos de aminoácidos indispensables para niños de 3 a 10 años (FAO 2013).

El método de evaluación in vitro aplicado en este trabajo para la determinación de la digestibilidad arrojó valores de 100% en ambos productos, asegurando una muy buena asimilación y aprovechamiento de las proteínas por parte del organismo. A partir de estos valores se calculó el parámetro PDCAAS siendo 99,0 y 65,0 para el pan fortificado y control respectivamente. Estos resultados son similares a los hallados por Endres (2001), quien determinó un valor de PDCAAS de 65,0 para el 100% de HT y un PDCAAS de 98,0 para la mezcla 90-10 de HT y concentrado de proteínas de soja.

Dado que el contenido de lisina total (LT), no siempre se correlaciona bien con el valor nutricional de la proteína (Araújo y Menezes 2005), existiendo además diferencias entre la LT y la LD en productos alimenticios a base de cereales (Torbatinejad et al. 2005), se determinó el contenido de LD o biológicamente activa (Tabla 3). El valor de LD fue de 22,55 mg/g de proteína en el pan control, mientras que el valor hallado en el pan fortificado fue de 33,74 mg/g de proteína, implicando un incremento del 49,6% del valor de este aminoácido esencial a consecuencia de la utilización de harinas mezclas. A partir de los resultados se puede observar que la pérdida en la disponibilidad de lisina es elevada (~29%). La disminución en los niveles de LD con respecto a la LT ha sido observada por otros autores (Sosa 2011, Pérez et al. 2008, Ramírez Jiménez et al. 2001, Tosi et al. 1994). La reacción de Maillard, que da origen a la formación de aromas, compuestos coloreados y antioxidantes, produciendo además la pérdida de aminoácidos esenciales, fundamentaría los resultados hallados. Debido a que son los valores de LD los que representan la cantidad de aminoácido que puede ser utilizado por el organismo, se recalculó el SQ así como también el parámetro PDCAAS (Tabla 3). El cambio en los resultados refleja la importancia en considerar los datos de LD como los valores reales de aminoácido aprovechable.

Tabla 3. SQ y PDCAAS a partir de los valores de lisina total y lisina disponible

Pan de molde	Parámetro				
	Lisina (mg/g proteína)	SQ	%DP	PDCAAS (%)	
Control	LT	31,45 ± 3,49	0,65	100 ± 4,26	65,0
	LD	22,55 ± 0,86	0,47		47,0
Fortificado	LT	47,95 ± 0,43	0,99	100 ± 3,89	99,0
	LD	33,74 ± 1,67	0,70		70,0

67

LT: lisina total; LD: lisina disponible. %DP: digestibilidad proteica in vitro. Los valores de PDCAAS se calcularon a partir de un SQ máximo de 1.

Según un reporte de FAO/OMS/UNU (2007) la ingesta de lisina que cubre las necesidades para todas las edades (excepto menores de 3 años) es de 48 mg por cada g de proteína ingerido. Este informe recomienda además la ingesta de 0,66 g de proteínas por cada kg de peso corporal por día. Con los datos obtenidos en el presente trabajo y las recomendaciones citadas anteriormente, se calculó el porcentaje de lisina que cubre una porción de 50 g del pan fortificado en adultos con un peso promedio de 70 kg. Por medio de estos cálculos se determinó que una porción de pan fortificado cubre ~10% de la ingesta recomendada de lisina en adultos; mientras que una porción de pan elaborado con 100% de HT aporta el ~4%. Teniendo en cuenta que el pan no es el alimento principal de la dieta, un aporte de este tipo podría considerarse suficiente y contribuir junto al consumo de otros alimentos (huevos, carne, leche, legumbres) a aproximar al consumo de lisina recomendado.

CONCLUSIONES

La utilización de harinas compuestas en un nivel de reemplazo de 11,2% permitió desarrollar una formulación de pan de molde con mejores características nutricionales, resultando un producto fuente de proteínas. Este pan presentó excelente digestibilidad y mayores niveles de LT, LD, SQ y PDCAAS respecto



al elaborado con 100% de HT. Finalmente, se puede concluir que el aporte proteico del pan fortificado no solo mejoró en cuanto a la cantidad, sino también cualitativamente dado el equilibrio en el balance de aminoácidos esenciales.

BIBLIOGRAFÍA

- AACC. 2000. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists. American Association of Cereal Chemists. 10^a ed. Minnessota, United States.
- Alaiz M, Navarro JL, Girón J, Vioque E. 1992. Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate. *Journal of Chromatography A*, 591: 181-186.
- Araújo EM, Menezes HC. 2005. Composicao centesimal, lisina disponível e digestibilidade in vitro de proteínas de fórmulas para nutricao oral ou enteral. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 25: 768-771.
- Booth VH. 1971. Problems in the determination of FDNB-available lysine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 22: 658-666.
- Boye J, Zare F, Pletch A. 2011. Pulse proteins: processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*, 43: 414-431.
- Carpenter KJ. 1960. The estimation of available lysine in animal protein foods. *Biochemical Journal*, 77: 604-610.
- Código Alimentario Argentino (CAA). Capítulo V: Normas para la rotulación y publicidad de los alimentos. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo_V.pdf
- Dewettinck K, Van Bockstaele F, Kühne B, Van de Walle D, Courtens TM, Gellynck X. 2008. Nutritional value of bread: Influence of processing, food interaction and consumer perception. *Journal of Cereal Science*, 48: 243-257.
- Endres JG. 2001. Uses in food systems. Soy protein products. Characteristics, nutritional aspects, and utilization. American Oil Chemists' Society. Illinois, United States.
- FAO. 2013. Dietary protein quality evaluation in human nutrition: Report of an FAO Expert Consultation. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy.
- FAO/OMS/UNU. 1985. Energy and protein requirements. Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. WHO Technical Report Series, No. 724. Geneva, Switzerland.
- FAO/OMS/UNU. 2007. Amino acid requirements of adults. Protein and amino acids requirements in human nutrition. United Nations University. Geneva, Switzerland.
- Hughes GJ, Ryan DJ, Mukherjee R, Schasteen CS. 2011. Protein digestibility-corrected amino acid scores (PDCAAS) for soy protein isolates and concentrate: criteria for evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59: 12707-12712.
- Lezcano E. 2013. Informe sectorial N°14: Farináceos. Dirección Nacional de Transformación y Comercialización de Productos Agrícolas y Forestales; Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, Argentina.
- Millward DJ. 2012. Amino acid scoring patterns for protein quality assessment. *British Journal of Nutrition*, 108: 31-43.
- Pérez SR, Osella CA, de la Torre MA, Sánchez HD. 2008. Efecto del mejoramiento proteico sobre los parámetros de calidad nutricional y sensorial de galletitas dulces (cookies). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 58: 403-410.
- Ramírez Jiménez A, García Villanova B, Guerra Hernández E. (2001). Effect of toasting time on the browning of sliced bread. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81: 513-518.
- Renkema JMS. 2001. Formation, structure and rheological properties of soy protein gels. Tesis para la obtención del título de Doctor. Wageningen University. Netherlands.
- Roy F, Boye JI, Simpson BK. 2010. Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. *Food Research International*, 43: 432-442.
- Rudloff S, Lönnerdal B. 1992. Solubility and digestibility of milk proteins in infant formulas exposed to different heat treatments. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 15: 25-33.



- Singh P, Kumar R, Sabapathy SN, Bawa AS. 2008. Functional and edible uses of soy protein products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7: 14-28.
- Sosa M. 2011. Optimización de la aceptabilidad sensorial y global de productos elaborados con amaranto destinados a programas sociales nutricionales. Tesis para la obtención del título de Doctor. Universidad Nacional de la Plata. Facultad de Ciencias Exactas. Argentina.
- Suárez López MM, Kizlansky A, López LB. 2006. Evaluación de la calidad de las proteínas en los alimentos calculando el escore de aminoácidos corregido por digestibilidad. *Nutrición Hospitalaria*, 21: 47-51.
- Torbatinejad NM, Rutherford SM, Moughan PJ. 2005. Total and reactive lysine contents in selected cereal-based food products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4454-4458.
- Tosi EA, Ciappini MC, Masciarelli R, Re E. 1994. Uso de harina integral de amaranto y harina de trigo en la fabricación de galletitas. *Alimentaria*. 258: 51-53.
- Visentín AN, Drago SR, Osella CA, de la Torre MA, Sánchez HD, González RJ. 2009. Efecto de la adición de harina de soja y concentrado proteico de suero de queso sobre la calidad del pan y la dializabilidad de minerales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 59: 325-331.
- Walzem RL, Dillard CJ, German JB. 2002. Whey components: Millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: What we know and what we may be overlooking. *Food Science & Nutrition*, 42: 353-375.



EFFECTO DE LA FIBRA SOLUBLE DE ALCAUCIL EN EL CRECIMIENTO DE BACTERIAS INTESTINALES ASOCIADAS CON LA BUENA SALUD

Fissore E.N. (1), Santo Domingo C. (1), Gerschenson L.N. (1), Gianuzzi L. (2)

(1) Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

(2) Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA). CONICET- Universidad de la Plata (UNLP).

eliana@di.fcen.uba.ar

RESUMEN

Se estudió el efecto de diferentes fracciones enriquecidas en fibra soluble obtenidas a partir de alcaucil usando ácido cítrico o ácido cítrico/hemicelulasa, sobre el crecimiento selectivo de *Lactobacillus plantarum* 8114 y de *Bifidobacterium bifidum* ATCC 11863. El modelado según Gompertz del crecimiento de *Lactobacillus plantarum* 8114 mostró una mayor tasa de crecimiento específico (μ : 0,16 h⁻¹) en presencia de la fracción aislada de tallo utilizando hemicelulasa (fracción A) que en presencia de glucosa (μ : 0,09 h⁻¹). En el caso de *Bifidobacterium bifidum* 11863, el mayor μ se obtuvo para el microorganismo que creció en presencia de la fracción aislada de tallo utilizando buffer citrato, siendo su tasa de crecimiento el doble que la observada para glucosa (μ : 0,04 h⁻¹). A su vez, se obtuvieron scores positivos de actividad prebiótica con respecto a *Escherichia coli* 25922, esto indicó que las fibras ensayadas son metabolizadas tan bien como la glucosa por *Lactobacillus plantarum* 8114 y por *Bifidobacterium bifidum* ATCC 11863, y que son metabolizadas selectivamente por dichos microorganismos. La capacidad potencial de la fracción A de estimular selectivamente el crecimiento de las bacterias intestinales asociadas con la buena salud, se puede atribuir a su alto contenido de inulina y de pectina de bajo grado de metilación.

Palabras claves: prebiótico, fibra dietaria, residuos de alcaucil.

ABSTRACT

The effect of different fractions enriched in soluble fiber obtained from artichoke using citric acid or citric acid / hemicellulase on the selective growth of *Lactobacillus plantarum* 8114 and *Bifidobacterium bifidum* ATCC 11863 was evaluated. Gompertz modeling of *Lactobacillus plantarum* 8114 growth showed a higher specific growth rate (μ : 0.16 h⁻¹) in the presence of fraction isolated from stem using hemicellulase (fraction A) than in the presence of glucose (μ : 0.09 h⁻¹). In the case of *Bifidobacterium bifidum* 11863, the highest μ was obtained for the microorganism grown in the presence of fraction A and for the fraction isolated from stem without hemicellulase, their rate being twice that observed for glucose (0.04h⁻¹). The positive prebiotic activity scores observed with respect to *Escherichia coli* 25922 indicated that fibers assayed are metabolized as well as glucose by *Lactobacillus plantarum* 8114 and *Bifidobacterium bifidum* ATCC 11863 and that they are selectively metabolized by these microorganisms. The potential capacity to selectively stimulate the growth of intestinal bacteria associated with health shown by fraction A can be ascribed to its high inulin and low methylation degree pectin contents.

Keywords: prebiotic, dietary fiber, residues of artichoke.

INTRODUCCIÓN

La microflora intestinal humana se ve afectada por muchos factores tales como la edad, el consumo de medicamentos, la dieta, la fisiología del huésped, el peristaltismo, la inmunidad local y el metabolismo bacteriano "in situ" (Berg 1996). Sin embargo, la dieta es probablemente el factor más importante para determinar el tipo de flora intestinal que se desarrolla, debido a que los productos alimenticios proveen las principales fuentes de nutrientes para las bacterias del colon. Esto ha dado origen al concepto de prebióticos.



La primera definición de prebiótico fue “ingrediente alimenticio no digerible que afecta beneficiosamente al huésped por estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de una o un número limitado de bacterias en el colon, y que por consiguiente mejora la salud del huésped” (Gibson y Roberfroid 1995). En particular, muchos oligosacáridos y polisacáridos de los alimentos han sido reivindicados por tener actividad prebiótica, pero no todos los carbohidratos de la dieta son prebióticos (Gibson et al. 2004). De acuerdo a Roberfroid (2007), la clasificación de un ingrediente alimentario como prebiótico requiere una demostración científica de que el ingrediente:

- (1) resiste la acidez gástrica, la hidrólisis de las enzimas de mamíferos y la absorción gastrointestinal,
- (2) es fermentado por la microflora intestinal,
- (3) estimula selectivamente el crecimiento y/o actividad de bacterias intestinales asociadas con la salud y el bienestar.

En general, los cambios de la flora en respuesta a la dieta han sido estudiados usando cepas de *Bifidobacterium spp.* y *Lactobacillus spp.* y comparando su crecimiento con el de otras bacterias tales como *Bacteroides spp.*, *Clostridium spp.*, *Eubacterium spp.* y *Escherichia coli* (Leach et al. 2006). Actualmente, para la definición de un ingrediente alimentario como prebiótico se propone evaluar el cumplimiento de los tres requisitos mencionados anteriormente, siendo la estimulación selectiva del crecimiento la primera etapa a evaluar (Gibson et al. 2004).

Varios estudios han demostrado que la capacidad de los lactobacilos y las bifidobacterias para fermentar carbohidratos prebióticos es específica del sustrato y de la cepa (Kaplan y Hutkins 2000, Schrezenmeir y Vrese 2001). Además, no está claro qué carbohidratos prebióticos son los sustratos más adecuados para el crecimiento selectivo de cepas específicas.

En este trabajo, se utilizaron fracciones de fibra dietaria soluble aisladas mediante digestión con buffer citrato de sodio o con hemicelulasa /buffer citrato de sodio, a partir de corazón, brácteas y tallo de alcaucil (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*). El objetivo fue cuantificar el grado en que distintas fracciones de fibra estimulan selectivamente el crecimiento de las cepas de *Lactobacillus plantarum* 8114 y *Bifidobacterium bifidum* ATCC 11863 con el propósito de evaluar la potencialidad de las diferentes fibras para que actúen como sustratos prebióticos. Además, se estudiaron los parámetros cinéticos de crecimiento microbiano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del material de pared celular (CWM)

Se utilizaron alcauciles (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) adquiridos en un mercado local. Se separaron el tallo, las brácteas y el corazón y luego de lavarlos, se secaron en estufa con convección a 85°C durante 2,5 horas (velocidad del aire: 0,5 m/s). El residuo seco de cada tejido se molió en un molinillo doméstico (Wemir E 909, Argentina) y constituyó la fracción enriquecida en material de pared celular (CWM) de tallos, brácteas y corazón.

Cada CWM fue tratado de la siguiente manera:

Se colocaron 10g de CWM de cada tejido en un vaso de precipitados con 1000 ml de una solución de buffer citrato de sodio 0,05 mol/L (pH 5,2) con 0,01g cada 100g de azida sódica (concentración final). Cada sistema se calentó durante 5 minutos a 70°C, con agitación constante, se enfrió a 30°C y luego se mantuvo bajo agitación constante durante 20 h con o sin el agregado de 0,25g de hemicelulasa. El residuo insoluble se separó por filtración y al sobrenadante se le agregaron 2 volúmenes de etanol 96% (v/v) para precipitar los polisacáridos de la pared celular. El precipitado fue filtrado bajo vacío, lavado y finalmente se liofilizó. Las fracciones obtenidas se detallan en la tabla 1.

Tabla 1. Diferentes fracciones obtenidas a partir de los tratamientos de material de pared celular de alcaucil (CWM)

Fracción	CWM	Tratamiento con hemicelulasa
A	Tallo	+



B	Tallo	-
C	Brácteas	+
D	Brácteas	-
E	Corazón	+
F	Corazón	-



Cepas bacterianas

Para este trabajo se usaron *Lactobacillus plantarum* 8114 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, EE.UU.), *Bifidobacterium bifidum* ATCC 11863 (MEDICA-TEC, Buenos Aires, Argentina) y *Escherichia coli* 25922 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, EE.UU.). Todas las cepas se mantuvieron a -80°C.

En el caso de *Lactobacillus plantarum* se utilizó caldo MRS (Difco Laboratories, Sparks, MD, USA) conteniendo 15% (p/v) de glicerol mientras que para *E. coli* se utilizó un caldo tríptico de soja (TSB; Difco Laboratories) conteniendo 15% (p/v) de glicerol y para *Bifidobacterium bifidum* se utilizó un caldo MRS (Difco Laboratories Sparks, MD, USA) suplementado con 0,05% de L-cisteína HCl (disminuye el potencial de óxido-reducción).

Score de la actividad prebiótica

Huebner et al (2007) establecieron una puntuación cuantitativa para describir el grado en que los prebióticos permiten el crecimiento selectivo de los lactobacilos y las bifidobacterias. Esta puntuación es calculada como:

$$\text{Score de Actividad Prebiótica} = \left(\frac{\log \text{ UFC probiótico/ml del prebiótico a 48 h} - \log \text{ UFC probiótico/ml del prebiótico a 0 h}}{\log \text{ UFC probiótico/ml de glucosa a 48 h} - \log \text{ UFC probiótico/ml de glucosa a 0 h}} \right) - \left(\frac{\log \text{ UFC entérico/ml del prebiótico a 48 h} - \log \text{ UFC entérico/ml del prebiótico a 0 h}}{\log \text{ UFC entérico/ml de glucosa a 48 h} - \log \text{ UFC entérico/ml de glucosa a 0 h}} \right) \quad (1)$$

UFC = unidades formadoras de colonias.

Los hidratos de carbono tienen un score de actividad prebiótica positivo si las cepas probióticas los metabolizan tan bien como a la glucosa y si son metabolizados selectivamente por los microorganismos probióticos pero no por otras bacterias intestinales.

Ensayo de score de la actividad prebiótica

El procedimiento utilizado se describe en la **figura 1**.

Para el estudio de la actividad prebiótica, se sembraron las cepas en agar MRS para *L. plantarum* 8114, en agar suplementado con 0,05% de L-cisteína HCl para *B. bifidum* 11863 y sobre agar tríptico de soja para *E. coli* ATCC 25922. Luego, *E. coli* fue incubado a 37°C por 24-48 h en condiciones aeróbicas, *L. plantarum* y *B. bifidum* fueron incubados a 37°C por 24-48 h en cámara de anaerobiosis (Oxoid, Cambridge, Reino Unido) bajo atmósfera de anaerobiosis (Anaerocult A, Merck, Darmstadt, Alemania). Luego, una colonia de cada placa fue transferida dentro de 10ml de un caldo de MRS para *L. plantarum* o dentro de un caldo MRS suplementado con 0,05% de L-cisteína HCl para *B. bifidum* y luego incubados toda la noche bajo anaerobiosis. Para *E. coli*, una colonia fue transferida a 10ml de un caldo tríptico de soja e incubado en condiciones de aerobiosis por 48 h.

El ensayo se realizó mediante la adición de un cultivo de una noche de *L. plantarum* 1% (v/v) en tubos que contenían caldo MRS con 1% (p/v) de glucosa o de 1% (p/v) de las distintas fibras. El cultivo de *B. bifidum* (1%, v/v), se añadió en tubos que contenían caldo MRS suplementado con 0,05% de L-cisteína HCl y 1% (p/v) de glucosa o 1% (p/v) de las muestras de fibras. En ambos casos, los cultivos se incubaron a 37 °C durante 48h bajo sistema de generación de atmósfera anaeróbica (Anaerocult A, Merck, Darmstadt, Alemania) en una cámara anaeróbica (Oxoid, Cambridge, Reino Unido). Luego de 0 y 48 h de incubación, las muestras se realizaron por triplicado utilizando el método de dilución en serie en agar MRS (*L. plantarum*) o agar MRS suplementado con 0,05% de L-cisteína HCl (*B. bifidum*) con incubación a 37°C en condiciones anaeróbicas y los resultados fueron calculado como UFC / ml de cultivo.

El cultivo de *E. coli* ATCC 25922 (1%, v/v) se añadió a tubos con caldo Medio Mínimo M9 (Atlas, 1993) conteniendo 1% (p/v) de glucosa o 1% (p/v) de las muestras de fibra y se incubaron a 37°C durante 48 h en condiciones aerobicas como lo describieron Huebner et al. (2007 y 2008) y Marotti et al. (2012). Luego, a las



0 y 48 h de incubación, las muestras inoculadas fueron enumeradas por duplicado en placas de TSA e incubadas a 37°C en condiciones aeróbicas. Los resultados se expresaron como UFC / ml de cultivo. Cada ensayo se repitió un mínimo de tres veces.

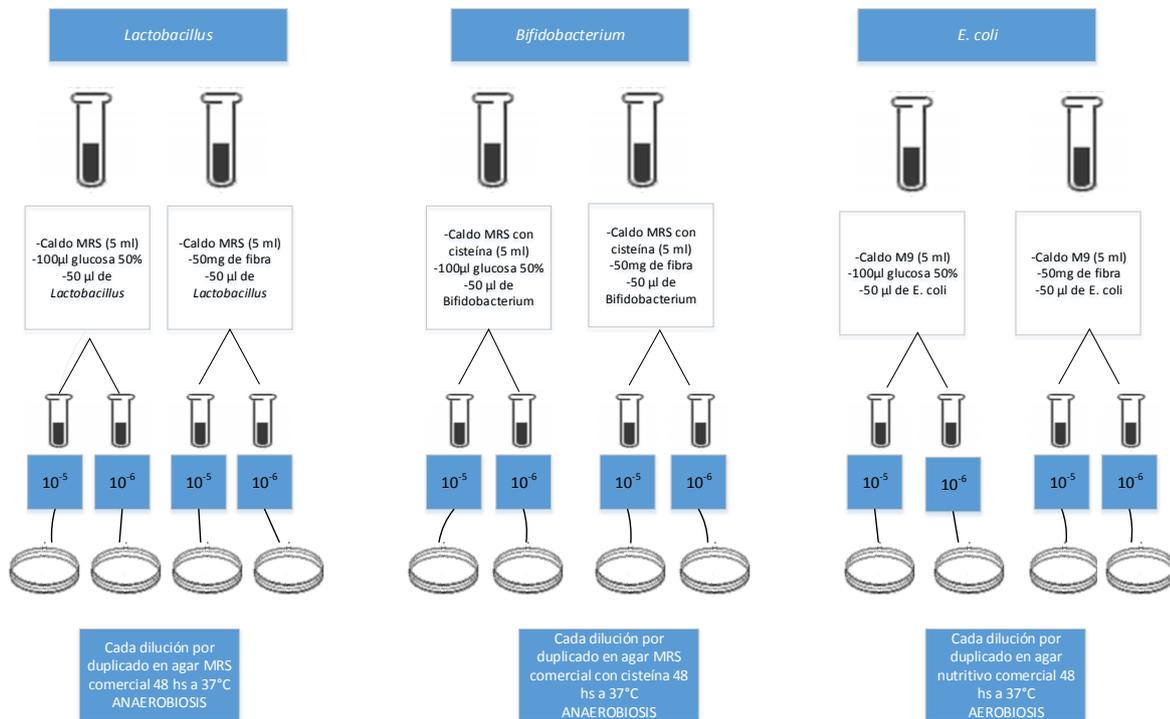


Figura 1 Gráfico de flujo del método usado para el ensayo del score de la actividad prebiótica.

Modelado del crecimiento microbiano

Los recuentos de células se evaluaron por triplicado luego de 12, 24, 36, 48 y 60 h de la fermentación a 37°C. Las muestras (1,0 ml) fueron agregadas a 9,0 ml de agua peptonada estéril (0,1g / 100g); a continuación, se realizaron diluciones adecuadas. Posteriormente, *L. plantarum* 8114 se sembró en agar MRS y se incubaron en condiciones anaerobias a 37°C. *B. bifidum* 11863 se plaqueó en agar MRS suplementado con 0,05% L-cisteína HCl a 37°C en condiciones anaeróbicas. La incubación se realizó durante 60 h.

Los recuentos de *L. plantarum* y *B. bifidum* se modelaron matemáticamente para entender el comportamiento de los cultivos en presencia de las diferentes fracciones de interés.

Se utilizó el modelo de Gompertz que es uno de los modelos matemáticos más recomendados (Zwietering et al. 1990; Giannuzzi et al. 1998) y se expresa a través de la siguiente ecuación:

$$\log N = a + c \exp(-\exp(-b)(t-m)) \quad (2)$$

donde log N es el logaritmo decimal de los recuentos microbianos (log (UFC / ml)) al tiempo *t*; *a* es el log de la asíntota del recuento al tiempo que disminuye de forma indefinida, que es aproximadamente el equivalente del nivel inicial de bacterias (log (UFC / ml)); *c* es el log del incremento del recuento o el número de ciclos log del crecimiento al tiempo de crecimiento indefinido (log (UFC / ml)); *b* es la tasa de crecimiento máximo relativo al tiempo *m* (1/día); *m* es el tiempo requerido para alcanzar la tasa máxima de crecimiento (días). Utilizando estos parámetros, la tasa de crecimiento específico $\mu = bc/e$ con $e = 2,7183$ (log (UFC / mL por día)), duración de la fase lag (LPD = $m - (1/b)$) (días) y la máxima densidad de población, MPD = $a+c$ (log (UFC / ml) pueden ser evaluados.

Análisis estadístico

Los resultados de los ensayos se presentaron como promedio ± desvío estándar de tres determinaciones



independientes. Para comparar los valores promedios (α : 0,05), se realizó el análisis de la variancia de una vía (ANOVA) seguido por un ensayo de rangos múltiples nuevos de Duncan. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con SYSTAT INC, versión 12.0 (Systat Software INC., San Jose, CA, EE.UU.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a lo publicado por Fissore et al (2014), las fracciones utilizadas en esta investigación están enriquecidas en fibra dietaria soluble conteniendo 72,0-96,8g de carbohidratos cada 100g de fracción, compuestos por pectina de bajo grado de metilación (ácidos urónicos: 14,0-18,2g cada 100g), azúcares neutros (0,8-44,3%) e inulina (38,0-55,0%). Los mayores contenidos de inulina fueron observados para todas las fracciones en ausencia de enzima (fracciones B, D y F). Los menores grados de metilación de pectina se observaron en las fracciones obtenidas a partir de tallo en presencia de hemicelulasa (fracción A). Las fracciones aisladas de brácteas (fracciones C y D) fueron las que tenían menor contenido de proteínas y polifenoles.

Comportamiento cinético del crecimiento de *Lactobacillus plantarum* 8114 y *Bifidobacterium bifidum* 11863 en las diferentes fibras

Al estudiar los requerimientos de sustrato y especificidades individuales de las cepas de bifidobacterias y lactobacilos, dos factores son especialmente importantes. El primero es la velocidad a la que un organismo puede crecer sobre una fuente de carbono en particular, ya que esto influirá en su capacidad de competir con otras bacterias en el colon (Hopkins et al. 1998). El otro es el grado en el cual el sustrato se convierte en masa bacteriana, porque el número de células afectará el grado de actividad pre o probiótico. Por esta razón, es importante el estudio del comportamiento cinético de la bacterias probióticas *Lactobacillus plantarum* 8114 y *Bifidobacterium bifidum* 11863 en los diferentes sustratos.

En la **figura 2** se muestra el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* 8114 (panel a) y *Bifidobacterium bifidum* 11863 (panel b) en las diferentes fracciones de fibra dietaria, incubadas a 37°C durante un período máximo de 60 h. Las líneas continuas representan el modelado matemático de los datos con la ecuación de Gompertz. Como se puede observar, se obtuvo un buen ajuste entre el modelo y los datos experimentales; los parámetros obtenidos se muestran en la **Tabla 2**.

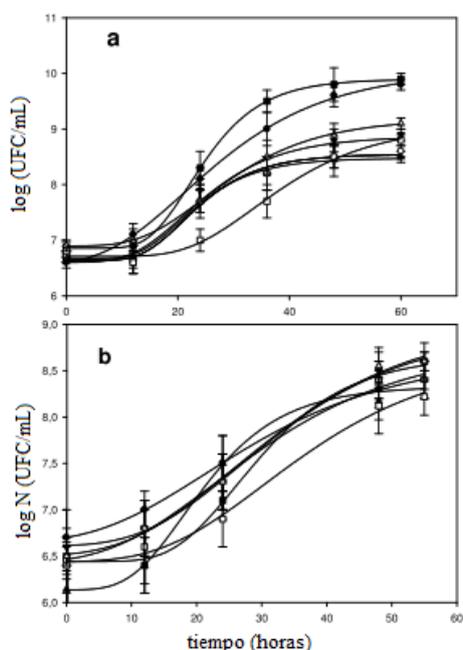


Figura 2. Aplicación del modelo de Gompertz para los datos experimentales en el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* 8114 (a) y *Bifidobacterium bifidum* 11863 (b) en diferentes tipos de fibras:



- caldo MRS con glucosa (1%, p/v), ■ caldo MRS con fibra A (1%, p/v), ▲ caldo MRS con fibra B (1%, p/v), ▼ caldo MRS con fibra C (1%, p/v), ○ caldo MRS con fibra D (1%, p/v), □ caldo MRS con fibra E (1%, p/v) y Δ caldo MRS con fibra F (1%, p/v).

En el caso de las cepas *Lactobacillus plantarum* 8114, la tasa específica más alta de crecimiento (μ : 0,16 h⁻¹) se observó para la fracción A, indicando que, sobre esta fuente de carbono, se produjo una tasa alta de proliferación celular dentro de un período corto de incubación (Tabla 2). Para las fracciones B, C, D, E y F, la tasa de crecimiento específico (μ) fue similar a la observada para la glucosa (0,09 h⁻¹). La máxima densidad de población (MPD) fue similar para la glucosa y la fracción A, y estos fueron los valores más altos observados (9,88 -10,11 log UFC / ml), mientras que para otras fracciones los valores MPD estuvieron en el rango de 8,47 - 9,18 log UFC / ml. La duración de la fase lag (LPD) para las fracciones varió de 11,62 a 21,62 h y para la glucosa tomó un valor significativamente menor de 4,90 h.

Tabla 2. Parámetros de Gompertz: velocidad de crecimiento específico (μ), máxima densidad de población (MPD) y duración de la fase lag (LPD) para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* 8114 y *Bifidobacterium bifidum* 11863 en caldo MRS con glucosa o con las diferentes fracciones aisladas a partir de alcaucil.

Sustrato	μ (h ⁻¹)	LPD (h)	MPD log (UFC/mL)
<i>Lactobacillus plantarum</i> 8114			
Glucosa (MRS)	0,09 ± 0,009A	4,90 ± 0,98 ^a	10,11 ± 0,26A
Fracción A	0,16 ± 0,06B	14,75 ± 0,36BD	9,88 ± 0,05B
Fracción B	0,09 ± 0,02A	13,39 ± 1,88B	8,47 ± 0,18C
Fracción C	0,09 ± 0,04A	11,62 ± 6,07B	8,86 ± 1,67BC
Fracción D	0,09 ± 0,03A	13,53 ± 3,42B	8,54 ± 0,32C
Fracción E	0,07 ± 0,02A	21,62 ± 4,39CD	9,06 ± 0,40C
Fracción F	0,08 ± 0,01A	13,27 ± 0,45B	9,18 ± 0,05C
<i>Bifidobacterium bifidum</i> 11863			
Glucosa (MRS)	0,04 ± 0,001A	4,62 ± 1,23 ^a	8,65 ± 0,10A
Fracción A	0,08 ± 0,05A	16,10 ± 4,25BD	8,66 ± 0,45A
Fracción B	0,09 ± 0,03B	9,70 ± 2,80B	8,32 ± 0,33A
Fracción C	0,05 ± 0,03A	13,54 ± 3,01B	8,83 ± 0,90A
Fracción D	0,05 ± 0,02A	10,20 ± 4,71B	8,63 ± 0,44A
Fracción E	0,07 ± 0,02A	21,16 ± 2,71CD	9,07 ± 0,40A
Fracción F	0,05 ± 0,03A	8,83 ± 5,20B	9,02 ± 0,78A

Las letras mayúsculas describen diferencias en los parámetros en cada columna. Distintas letras corresponden a diferencias significativas entre los valores.

En el caso de las cepas *Lactobacillus plantarum* 8114, la tasa específica más alta de crecimiento (μ : 0,16 h⁻¹) se observó para la fracción A, indicando que, sobre esta fuente de carbono, se produjo una tasa alta de proliferación celular dentro de un período corto de incubación (**Tabla 2**). Para las fracciones B, C, D, E y F, la tasa de crecimiento específico (μ) fue similar a la observada para la glucosa (0,09 h⁻¹). La máxima densidad de población (MPD) fue similar para la glucosa y la fracción A, y estos fueron los valores más altos observados (9,88 -10,11 log UFC / ml), mientras que para otras fracciones los valores MPD estuvieron en el rango de 8,47 - 9,18 log UFC / ml. La duración de la fase lag (LPD) para las fracciones varió de 11,62 a 21,62 h y para la glucosa tomó un valor significativamente menor de 4,90 h.

En el caso de *Bifidobacterium bifidum* 11863, la mayor tasa de crecimiento específico se obtuvo para las fracciones A y B (0,08- 0,09 h⁻¹), duplicando el valor observado para el medio MRS con glucosa (0,04 h⁻¹), pero no hubo diferencias significativas entre el crecimiento en la fracción A y en glucosa. Las otras fibras mostraron una tasa de crecimiento específico de 0,05 - 0,07 h⁻¹, y las diferencias entre las distintas fibras no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Los valores de MPD oscilaron entre 8,32 a 9,07 log (UFC / ml) para las diferentes fracciones mientras que para glucosa, el valor MPD fue 8,65 log (UFC / ml). La duración de la fase de lag (LPD) mostró una variación significativa para las diferentes fracciones (8,83 -



21,16 h), observándose un valor de 4,62 h para la glucosa (Tabla 2).

Se puede concluir que el *L. plantarum* 8114 mostró una tasa de crecimiento específico más alto en la fracción A que en glucosa. Los valores específicos de las tasas de crecimiento fueron más altos para esta cepa que para *Bifidobacterium bifidum* 11863, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

Scores de la actividad prebiótica

Los scores de la actividad prebiótica para *Lactobacillus plantarum* 8114 y *Bifidobacterium bifidum* 11863 se muestran en la **Tabla 3**, donde se puede observar que todos los scores calculados fueron positivos. A mayor score, mayor es el crecimiento relativo del probiótico y / o más bajo el crecimiento relativo de *E. coli*, lo que indica un mayor y más selectivo uso de los prebióticos en relación con la glucosa por parte de los microorganismos probióticos y/o un uso limitado del prebiótico en relación a la glucosa por *E. coli*.

Se observó que el score más alto de actividad prebiótica para *Bifidobacterium bifidum* se obtuvo con la fibra B (0,87) y los scores de las otras fibras no fueron significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Para *Lactobacillus plantarum*, el score más alto fue para la fibra A (0,58), observándose scores más bajos cuando *L. plantarum* creció en presencia de las fibras C, F, D, E y B (0,31, 0,24, 0,19, 0,16 y 0,14, respectivamente), aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Como se puede observar en la **Tabla 3**, hay diferencias significativas ($p < 0,05$) en los scores de actividad prebiótica entre las dos cepas cultivadas en las fracciones B, C, D, E y F, siendo los valores de *Lactobacillus plantarum* menores que los de *Bifidobacterium bifidum*. Esto indica que existirían diferencias en su capacidad metabólica. La utilización de las diferentes fracciones por las bacterias estudiadas requiere la presencia de sistemas de hidrólisis y de transporte específicos y su presencia o ausencia puede ser la causa de los distintos scores observados (Huebner et al. 2007).

Tabla 3. Scores de la actividad prebiótica de los crecimientos de *Lactobacillus plantarum* 8114 y *Bifidobacterium bifidum* 11863 en las diferentes fracciones aisladas a partir de alcaucil

Fracción	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
A	0,58 ± 0,21 Aa	0,79 ± 0,19 Aa
B	0,14 ± 0,18 Aa	0,87 ± 0,20 Ab
C	0,31 ± 0,16 Aa	0,80 ± 0,23 Ab
D	0,19 ± 0,16 Aa	0,81 ± 0,21 Ab
E	0,16 ± 0,20 Aa	0,67 ± 0,19 Ab
F	0,24 ± 0,16 Aa	0,86 ± 0,21 Ab

Letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre los valores dentro de cada columna. Letras minúsculas muestran diferencias significativas entre las filas.

Las Bifidobacterias pueden utilizar una diversa gama de carbohidratos de la dieta que escapan de la degradación en la parte superior del intestino, muchos de los cuales son oligo- y polisacáridos derivados de las plantas. Distintas cepas de bifidobacterias pueden poseer habilidades diferentes para utilizar los hidratos de carbono.

La capacidad de las especies y cepas individuales de Lactobacilos para metabolizar carbohidratos difiere sustancialmente. Esta diversidad metabólica se ajusta a la diversidad filogenética en el género *Lactobacillus*. Varias especies como *L. acidophilus*, *L. casei* y *L. plantarum* metabolizan una gran diversidad de diferentes fuentes de carbono, incluyendo oligo- y polisacáridos. Se ha informado que la inulina y la oligofruktosa son prebióticos efectivos debido a la estimulación de bifidobacterias colónicas, y debido a sus propiedades prebióticas, son cada vez más utilizadas para el desarrollo de nuevos productos alimenticios (Kolida et al. 2002, Olano-Martín 2002, Joossens et al. 2011, Pinheiro de Souza Oliveira et al. 2011).

La fracción A fue la más adecuada para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* 8114 y *Bifidobacterium bifidum* 11863, y ello se puede atribuir a su alto contenido de inulina y de pectina de bajo grado de metilación.



CONCLUSIONES

Las fracciones de fibra dietaria estudiadas mostraron, en general, una capacidad potencial de estimular selectivamente el crecimiento de bacterias intestinales asociadas con la salud. La fracción aislada a partir de tallo de alcaucil con hemicelulasa (fracción A) fue la de mayor score de actividad prebiótica para *Lactobacillus plantarum* 8114 y *Bifidobacterium bifidum* 11863. Este comportamiento podría ser atribuido a su contenido de inulina y de pectina de bajo grado de metilación.

Las otras fracciones también presentaron altos scores de actividad prebiótica para *Bifidobacterium bifidum* 11863 pero los scores fueron más bajos para *Lactobacillus plantarum* 8114.

El potencial de la fibra A para promover el crecimiento de las dos cepas estudiadas es promisorio. Es necesario continuar los estudios para evaluar la resistencia de las fracciones de fibra dietaria a los distintos pHs y a las enzimas presentes en el tracto gastrointestinal humano y para analizar su absorción gastrointestinal y su fermentación por la microflora intestinal, donde la competición por nutrientes puede influenciar la supervivencia, colonización y actividad metabólica bacteriana en el huésped.



BIBLIOGRAFÍA

- Atlas RM. 1993. Handbook of microbiological media. Boca Raton, Florida, Park L. pag 673.
- Berg RD. 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. Trends in Microbiology, 4:430-435.
- Fissore E., Santo Domingo C., Pujol C., Damonte E., Rojas AM, Gerschenson L. 2014. Food & Function, 5, 3: 463-470.
- Gianuzzi L, Pinotti A, Zaritzky N. 1998. Mathematical modeling of microbial growth in packaged refrigerated beef at different temperature. International Journal of Food Microbiology, 39:101-110.
- Gibson G, Roberfroid M. 1995. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. Journal of nutrition, 125:1401-1412.
- Gibson GR, Probert HM, Van Loo J, Rastall RA, Roberfroid MB. 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. Nutrition Research Reviews, 17: 259-275.
- Hopkins MJ, Cummings JH, Macfarlane GT. 1998. Inter-species differences in maximum specific growth rates and cell yields of bifidobacteria cultured on oligosaccharides and other simple carbohydrate sources. Journal of Applied Microbiology, 85:381-386.
- Huebner J, Wehling RL, Hutkins RW. 2007. Functional activity of commercial prebiotics. International Dairy Journal, 17:770-775.
- Huebner J, Wehling RL, Parkhurst A, Hutkins RW. 2008. Effect of processing conditions on the prebiotic activity of commercial prebiotics. International Dairy Journal, 18:287-293.
- Joossens M, Huys G, Van Steen K, Cnockaert M, Vermeire S, Rutgeerts P, Verbeke K, Vandamme P, De Preter V. 2011. High-throughput method for comparative analysis of denaturing gradient gel electrophoresis profiles from human fecal samples reveals significant increases in two bifidobacterial species after inulin-type prebiotic intake. FEMS Microbiology Ecology, 75 (2): 343-349.
- Kaplan H, Hutkins RW. 2000. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. Applied and Environmental Microbiology, 66(6): 2682-2684.
- Kolida S, Tuohy K, Gibson GR. 2002. Prebiotic effects of inulin and oligofructose. British Journal of Nutrition, 87(2): 193-197.
- Leach J, Rastall RA, Gibson GR. 2006. Prebiotics: Development & Application. Chichester, West Sussex, England: John Wiley & Sons Ltd. pag. 237-247.
- Marotti I, Bregola V, Aloisio I, Di Gioia D, Bosi S, Di Silvestro R, Quinn R, Dinelli G. 2012. Prebiotic effect of soluble fibres from modern and old durum-type wheat varieties on Lactobacillus and Bifidobacterium strains. Science of Food and Agriculture, 92(10):2133-2140.
- Olano-Martin E, Gibson GR, Rastall RA. 2002. Comparison of the in vitro bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. Journal of Applied Microbiology, 93: 505-511.
- Palframan R, Gibson GR, Rastall RA. 2003. Development of a quantitative tool for the comparison of the prebiotic effect of dietary oligosaccharides. Letters in Applied Microbiology, 37:281-284.
- Pinheiro de Souza Oliveira R, Perego P, Nogueira de Oliveira M, Converti A. 2011. Effect of inulin as prebiotic and synbiotic interactions between probiotics to improve fermented milk firmness. Journal of Food Engineering, 107:36-40.
- Roberfroid M. 2007. Prebiotics:the concept revisited. Journal of Nutrition, 137: 830S-837S.
- Schrezenmeir J, de Vrese M. 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approaching a definition. The American Journal of Clinical Nutrition, 73 (2): 361S-364S.
- Zwietering MH, Jongenburger FM, Roumbouts M, vantRiet K. 1990. Modelling of the bacterial growth curve. Applied and Environmental Microbiology, 57: 1875-1881.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero brindado por la Universidad de Buenos Aires UBACYT (20020100100726 y 20020130100550BA), ANPCyT (PICT 2005-38239 y 2012-1941) y CONICET (PIP 11220090100531 y 11220120100507).





ACUMULACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE MALTEADO DE CULTIVARES DE SORGO ROJO Y BLANCO

Garzón A. G. (1), Drago S. R. (1)

(1) Instituto de Tecnología de Alimentos, CONICET, FIQ-UNL, 1° de Mayo 3250, Santa Fe, Santa Fe, Argentina.

agarzon@fiq.unl.edu.ar

RESUMEN

Se maltearon dos cultivares de sorgo (blanco, SB y rojo, SR), obteniéndose muestras remojadas y germinadas durante tres días a dos temperaturas (25 y 30°C). Se evaluaron el contenido de GABA por HPLC, y el contenido de polifenoles libres (PL). La actividad antioxidante se evaluó a través del método del ABTS, expresándose como Capacidad Antioxidante Equivalente al Trolox (CAET). En el sorgo germinado a 25°C se observó mayor acumulación de GABA que en el sorgo germinado a 30°C, para ambas variedades, en todos los días de germinación. El contenido fue mayor en el SR que en el SB, observándose un incremento al tercer día, de 16 y 12 veces comparado al nativo, respectivamente. En cuanto al contenido de PL, la germinación lo incrementó gradualmente desde el día 1 al 3, presentando el SB mayor valor que el SR en todos los días de germinación. Se observó una muy buena correlación entre CAET vs PL ($r: 0,9329$). La germinación del sorgo por 3 días a 25°C fue la mejor condición para obtener una harina malteada con muy buenas propiedades antioxidantes y alto contenido de GABA.

Palabras clave: Compuestos bioactivos – Germinación – Sorgo - GABA

ABSTRACT

Two cultivars of sorghum (white, WS, and red, RS) were malted. Soaked and germinated samples for 3 days at 25 or 30°C were obtained. GABA content and free phenolics (FP) were evaluated. Antioxidant activity was evaluated by ABTS assay, and results were expressed as Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC). Sorghum germinated at 25°C showed higher accumulation of GABA than at 30°C, for both cultivars at all germination days. The content was higher for RS than WS, increasing at third day of germination 16 and 12-fold compared with native sorghum, respectively. Regarding FP content, germination gradually increased it from 1 to 3 days, the values being higher for WS than RS in all germination days. A good correlation between TEAC and FP ($r: 0.9329$) was observed. Sorghum germination for 3 days at 25°C was the best condition to obtain a malted flour with good antioxidant properties and high GABA content.

Keywords: Bioactive compounds – Germination – Sorghum - GABA

INTRODUCCIÓN

El sorgo es un cereal con alto potencial para su uso en la alimentación, energía e industria. Representa una importante fuente de proteínas y minerales, y una fuente potencial de constituyentes promotores de la salud, como vitaminas del grupo B, fibra y fenoles antioxidantes (Jacob *et al.* 2013). Tiene un bajo costo de producción y es resistente a la sequía, lo que lo hace un cultivo muy importante en regiones semiáridas (Dlamini *et al.* 2007). Se ubica en el quinto lugar en la producción mundial de cereales, luego del maíz, arroz, trigo y cebada (Faostat 2014). Debido a que es libre de gluten, hay un interés creciente en su utilización para elaborar alimentos destinados a personas que sufren la enfermedad celíaca (Niewinski 2008). El malteado del cereal implica tres etapas: remojo, germinación y secado de los granos. Es sabido que las condiciones de germinación como la temperatura y el tiempo afectan la calidad del producto malteado (Okoli *et al.* 2010). Estudios de la germinación en otros cereales (cebada y arroz) han demostrado que este proceso aumenta el contenido del ácido γ -aminobutírico (GABA), un aminoácido no proteico de cuatro carbonos que



presenta un rol muy importante como neurotransmisor en el cerebro de mamíferos (Zhang *et al.* 2006) y provee efectos beneficiosos en la salud, tales como disminución de la presión sanguínea, inhibición de la proliferación de células cancerígenas, prevención de las enfermedades relacionadas con el alcohol, entre otros (Xu y Hu 2014). Recientemente se ha demostrado que el consumo de arroz integral enriquecido en GABA inhibió la proliferación de células de leucemia (Diana *et al.* 2014). Los valores de GABA en tejidos vegetales son bajos (0,3 a 20 mg/100 g) pero pueden aumentar en respuesta a diversos estímulos, como shock térmico, hipoxia y fitohormonas (Shelp *et al.* 1999).

Por otro lado, el sorgo es reconocido por su alto contenido en compuestos fenólicos (Dicko *et al.* 2005). La germinación aumenta el contenido de estos metabolitos secundarios en varios cereales, como respuesta al estrés generado durante las diversas etapas del malteado (Lu *et al.* 2007). Además, estudios en otros cereales han demostrado la relación directa entre el contenido de compuestos fenólicos del alimento y su actividad antioxidante y el incremento de dicha actividad durante la germinación (Zhao *et al.* 2008).

El proceso de malteado, además de mejorar la calidad nutricional de la harina, incrementa la cantidad de compuestos bioactivos, lo que permitiría obtener un alimento con propiedades beneficiosas para la salud. El objetivo de este trabajo fue determinar las condiciones óptimas de germinación (tiempo y temperatura) para producir una harina de sorgo malteada biofuncional, con altos niveles de GABA y compuestos fenólicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Dos cultivares de sorgo (blanco, SB y rojo, SR) fueron donadas por la empresa Pioneer, Pergamino, Buenos Aires, Argentina. El material fue limpiado cuidadosamente y almacenado a 4°C. Ambos cultivares poseían buen poder germinativo (90% en tres días) y un contenido de humedad de 13%. Para obtener las muestras malteadas, los granos, previo a una desinfección con hipoclorito de sodio (1g/100g) por 20 min, se remojaron 24 h a 25°C en agua destilada (relación 1:3) y posteriormente se germinaron en la oscuridad a 25 o 30°C con una humedad relativa del 95% en estufa (Bioelec, Santa Fe, Argentina) durante 1, 2 o 3 días. Las muestras germinadas se secaron hasta un contenido de humedad menor a 10 %. Se evaluaron ocho muestras: sorgo nativo (N), remojado (R), y germinado por 1 a 3 días (G1, G2 y G3) a 25 o 30°C para ambas variedades.

Para evaluar el contenido de GABA, las muestras (0,2 g) fueron extraídas con ácido tricloroacético (8%) a temperatura ambiente. El extracto se agitó por 60 min y se centrifugó a 3000xg por 10 min. Una alícuota del sobrenadante (500 µL) se mezcló con 1500 µL de buffer borato (1 mol/L, pH 9). El contenido de GABA se determinó de acuerdo a Alaiz *et al.* (1992). El sistema HPLC consistió en una bomba Perkin Elmer Series 200, con un detector Perkin Elmer 785 UV/vis, equipado con una columna de fase reversa de 300 x 3,9 mm (Novapack C18, 4m, Waters). El contenido de GABA del eluato se detectó a 280nm usando el método del patrón interno, y se expresó como mg/100g base seca (b.s.) usando una curva de calibrado Área estándar/Área patrón interno vs Concentración estándar/Concentración estándar interno.

Para evaluar los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante, las muestras N, R y G se extrajeron al 5% en agua destilada, el extracto se sonicó por 30 min, y luego de centrifugar a 3000xg por 15 min se recuperó el sobrenadante, el cual se almacenó a -20°C hasta su análisis.

El contenido de polifenoles libres (PL) se determinó según Schanderl (1950). Se usó para la calibración una curva de ácido gálico (AG) (0-100 mg/L) y el resultado se expresó como µg AG (AG)/ g b.s.

La actividad antioxidante se evaluó utilizando el radical ABTS según Cian *et al.* (2012). La absorbancia se leyó a 734nm luego de 6 min de agregado el reactivo. El resultado se expresó como Capacidad Antioxidante Equivalente al Trolox (CAET) (µmol Trolox/g b.s.).

Todas las experiencias fueron realizadas al menos por duplicado. Los resultados se expresaron como media ± DE y fueron analizados por ANOVA simple y test de múltiples rangos de Duncan, usando el software Statgraphics Centurion XV 15.2.06.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El contenido de GABA fue igual para las dos variedades nativas (7,4 mg/100 g b.s.), aumentando después del remojo a valores que dependieron de la variedad: 36,3 ± 0,4 vs. 44,3 ± 2,6 mg GABA/ 100 g b.s., para el SB



y SR, respectivamente ($p < 0,05$). Este resultado implica que el contenido de GABA aumenta durante el proceso de remojo y que la variedad influye en el contenido final. El agua de remojo genera condiciones de hipoxia debido a la disponibilidad limitada de oxígeno, y el contenido de GABA aumenta rápidamente en los tejidos de plantas en respuesta a esta condición (Chung *et al.* 2009). Además, la concentración de GABA se incrementó luego del proceso completo de malteado (**Figura 1**), y fue dependiente de la temperatura, el tiempo de germinación y la variedad ($p < 0,05$). La germinación a 25°C incrementó el GABA en mayor medida que a 30°C, para ambas variedades en todos los días de germinación, y a su vez, fue mayor para el SR. Al tercer día a 25°C, se alcanzó el valor más alto, lográndose un incremento de 12 y 16 veces para el SB y SR, respectivamente, comparado con los granos nativos. Sin embargo, la germinación a 30°C tuvo un menor efecto en los valores de GABA del SB, siendo 7 veces mayor al día 3, mientras que, para el SR, la acumulación de GABA no dependió del tiempo, alcanzándose un incremento de 7 veces comparado al sorgo nativo para todos los días. Teniendo en cuenta que la síntesis y degradación del GABA en los cereales es mediada por enzimas, es posible que en el caso del sorgo, las actividades de las enzimas de síntesis aumenten a 25°C, o que las enzimas de degradación aumenten a 30°C. Muchos estudios demostraron una relación entre la temperatura de germinación, el tiempo y el cultivar en la acumulación de GABA en cebada (Kihara *et al.* 2007), arroz integral (Cornejo *et al.* 2015) y soja (Xu y Hu 2014). Los máximos valores obtenidos en este trabajo para todas las condiciones y cultivares (47,1 – 120,1 mg/100 g b.s.) fueron relativamente elevados, y se encuentran dentro del rango utilizado en alimentos funcionales enriquecidos con GABA (Diana *et al.* 2014).

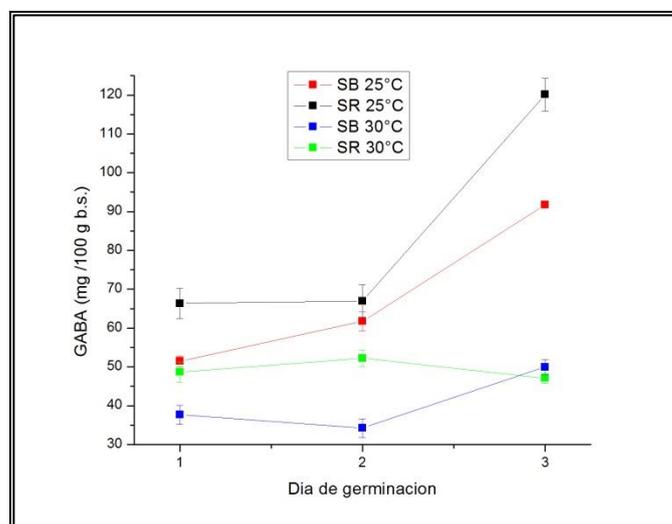


Figura 1. Contenido de GABA (mg/100 g b.s.) durante el proceso de germinación a 25 y 30°C. SB: sorgo blanco. SR: sorgo rojo.

El contenido de PL de los diferentes extractos (N, R, G1, G2 y G3) de ambos cultivares germinados a 25 o 30°C se muestran en la **Tabla 1**. El contenido de PL para el SR-N fue mayor que para el SB-N. Es sabido que los híbridos de sorgo pigmentados poseen mayor contenido de compuestos fenólicos que los no pigmentados (Dicko *et al.* 2002). El remojo tuvo un efecto negativo ya que disminuyó el contenido de PL (31 y 38% de disminución para SB y SR, respectivamente). Esto puede deberse a la lixiviación de compuestos fenólicos localizados en el pericarpio o testa (Lu *et al.* 2007). El contenido de PL se incrementó gradualmente del día 1 al 3 de germinación, ya que los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios sintetizados a través de la vía del ácido shikímico, en respuesta a la germinación y ciertas condiciones de estrés (Dicko *et al.* 2002). Además, el incremento de la actividad proteolítica durante la germinación (Aisien *et al.* 1983) podría disminuir la interacción de las proteínas con los polifenoles (Cian *et al.* 2015) facilitando su liberación, y la hidrólisis del almidón podría liberar los compuestos fenólicos unidos (Sharma y Gujral 2010), facilitando en ambos casos la extracción de PL. Las dos temperaturas y variedades estudiadas presentaron el valor máximo de PL al tercer día de germinación, y fue mayor para SB. Este cultivar no



presentó diferencias debido a la temperatura de germinación, pero sí lo hizo el híbrido de SR, que presentó mayor contenido de PL a 25°C que a 30°C. En este sentido, Dicko *et al.* (2005) reportaron que la germinación disminuye o incrementa el contenido de polifenoles de acuerdo al cultivar de sorgo estudiado.



Tabla 1. Contenido de polifenoles libres de cultivares de sorgo nativo (N), remojado (R) y germinado por 1 a 3 días (G1, G2 y G3).

	Sorgo Blanco ($\mu\text{g AG/ g b.s.}$)		Sorgo Rojo ($\mu\text{g AG/ g b.s.}$)	
	25 °C	30 °C	25 °C	30 °C
N	1095.6 \pm 26.5 ^{cd}		1227.4 \pm 34.7 ^e	
R	753.4 \pm 4 ^a		757.4 \pm 46.8 ^a	
G1	1104.9 \pm 56.8 ^{cd}	1129.1 \pm 21.5 ^d	1081.2 \pm 13.6 ^c	923.2 \pm 15.5 ^b
G2	1396.0 \pm 49.8 ^{fg}	1542.9 \pm 23.6 ^h	1406.6 \pm 12.9 ^s	1357.7 \pm 9.6 ^f
G3	1703.7 \pm 78.1 ^j	1699.9 \pm 37.9 ^j	1642.0 \pm 49.4 ⁱ	1577.5 \pm 23.1 ^h

Media \pm DE (desvío estándar); valores con diferentes letras presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$).

El ensayo de ABTS monitorea la capacidad de los compuestos bioactivos de frenar la reacción de los radicales libres (Zhao *et al.* 2008). En la **Figura 2** se muestran los resultados obtenidos de CAET para las muestras N, R y germinadas (G1-G3).

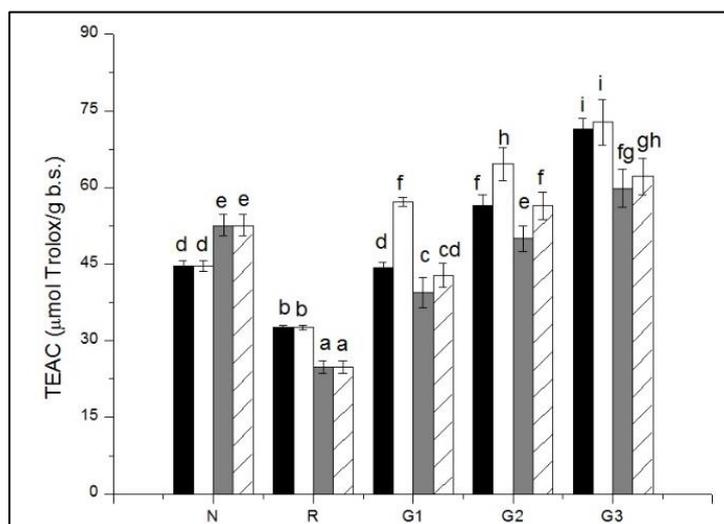


Figura 2. Capacidad antioxidante equivalente al Trolox (CAET) de muestras nativas (N), remojadas (R), y germinadas de uno a tres días (G1, G2 y G3). Color de barra: negro, SB 25°C; blanco, SB 30°C; gris, SR 25°C; rayada, SR 30°C. Barras con diferentes letras indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

La actividad antioxidante disminuyó luego del remojo. Este hecho estuvo en relación con la reducción de los PL en esta etapa. Por otro lado, la CAET aumentó gradualmente desde G1 a G3. Lu *et al.* (2007) evaluaron la actividad antioxidante por el método del ABTS durante el proceso de malteado de la cebada, y observaron también una reducción luego del remojo, y un incremento durante la germinación.

La CAET obtenida para el SB luego del proceso completo de malteado fue mayor que para el SR en ambas temperaturas de germinación. Los valores obtenidos para ambos híbridos de sorgo malteado por tres días, tanto a 25 como a 30°C (60 – 73 $\mu\text{mol Trolox/ g d.b.}$) se encuentran dentro del rango obtenido por Dicko *et al.* (2005), quienes evaluaron la CAET de cincuenta variedades de sorgo rojos y blancos germinados a 27°C por tres días (20-70 $\mu\text{mol Trolox/g b.s.}$) y fueron mayores que aquellos obtenidos para catorce variedades



típicas de cebada malteada (11 – 13 $\mu\text{mol Trolox/g b.s.}$) (Zhao *et al.* 2008).

Para establecer la correlación entre el contenido de polifenoles y la CAET se realizó una regresión simple de CAET vs PL, y se obtuvo un coeficiente de correlación (r) de 0,9329 y un valor $p < 0,05$, lo que indica una fuerte relación entre los PL y las propiedades antioxidantes *in vitro* y que, a mayor contenido de PL, mayor es la CAET. La curva de regresión obtenida fue $\text{CAET} = 1,57 + 0,04 * \text{PL}$.

CONCLUSIONES

El malteado del sorgo incrementó los contenidos de GABA y PL. Las condiciones de germinación (temperatura y tiempo) y el cultivar en estudio tuvieron influencia tanto en la acumulación de GABA y de PL, como en la actividad antioxidante de la harina malteada. La germinación del sorgo por 3 días a 25°C fue la mejor condición para obtener una harina malteada con muy buenas propiedades antioxidantes y alto contenido de GABA. Estas harinas malteadas podrían ser utilizadas como ingredientes para la elaboración de bebidas y alimentos funcionales aptos para celíacos.

BIBLIOGRAFÍA

- Aisien AO, Palmer GH, Stark JR. 1983. The development of enzymes during germination and seedling growth in Nigerian Sorghum Starch/Stärke, 35: 316-320.
- Alaiz M, Navarro JL, Girón J, Vioque EJ. 1992. Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate. *Chromatogr. A.*, 591: 181-186.
- Chung H-J, Jang S-H, Cho H-Y, Lim S-T. 2009. Effects of steeping and anaerobic treatment on GABA (γ -aminobutyric acid) content in germinated waxy hull-less barley. *LWT-Food Sci. Technol.*, 42: 1712-1716.
- Cian RE, Martínez-Augustin O, Drago SR. 2012. Enzyme proteolysis enhanced extraction of ACE inhibitory and antioxidant compounds (peptides and polyphenols) from *Porphyra columbina* residual cake. *Food Res. Int.*, 49: 364.
- Cian RE, Garzón AG, Ancona DB, Guerrero LC, Drago SR. 2015. Hydrolyzates from *Pyropia columbina* seaweed have antiplatelet aggregation antioxidant and ACE I inhibitory peptides which maintain bioactivity after simulated gastrointestinal digestion. *LWT-Food Sci Technol.*, 64: 881-888.
- Cornejo F, Caceres PJ, Martínez-Villaluenga C, Rosell CM, Frias J. 2015. Effects of germination on the nutritive value and bioactive compounds of Brown rice breads. *Food Chem.*, 173: 298-304.
- Diana M, Quílez J, Rafecas MJ. 2014. Gamma-aminobutyric acid as a bioactive compound in foods: a review. *Funct. Food.*, 10: 407-420.
- Dicko MH, Hilhorst R, Gruppen H, Traore AS, van Berkel W, Voragen AGJ. 2002. Comparison of content in phenolic compounds, polyphenol oxidase, and peroxidase in grains of fifty sorghum varieties from Burkina Faso. *J Agri. Food Chem.*, 50: 3780-3788.
- Dicko MH, Hilhorst R, Gruppen H, Traore ASJ. 2005. Evaluation of the effect of germination on phenolic compounds and antioxidant activities in sorghum varieties. *Agric. Food Chem.*, 53: 2581-2588.
- Dlamini NR, Taylor JRN, Rooney LW. 2007. The effect of sorghum type and processing on the antioxidant properties of Afrucan sorghum-based foods. *Food Chem*, 105: 1412-1419.
- Jacob AA, Fidelis AE, Salaudeen KO, Queen KR. 2013. Sorghum: most under-utilized grain of the semi-arid Africa. *Sch. J. Agric. Sci*, 3: 147-153.
- Kihara M, Okada Y, Iimure T, Ito K. 2007. Accumulation and degradation of two functional constituents, GABA and β -glucan, and their varietal differences in germinated barley grains. *Breeding Sci.*, 57: 85-89.
- Lu J, Zhao H, Chen J, Fan WJ. 2007. Evolution of phenolic compounds and antioxidant activity during malting. *Agr. Food. Chem.* 50: 10994-11001.
- Niewinski MMJ. 2008. Advances in celiac disease and gluten-free diet. *Am. Diet. Assoc.* 108: 661-672.
- Okoli EV, Okolo BN, Moneke AN, Ire FS. 2010. Effects of cultivar and germination time on amylolytic potential, extract yield and wort fermentating properties of malting sorghum. *Asian J. Biotechnol.*, 2: 14-26.
- Schanderl S. 1970. Tannins and related phenolics. New York: Academic. 1970: 701-725.
- Shelp BJ, Brown AW, McLean MD. 1999. Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends*



in plant science, 4: 446-452.

Xu J-G, Hu Q-P. 2014. Changes in γ -aminobutyric acid content and related enzymes activities in Jindou 25 soybean (*Glycine max* L.) seeds during germination. *LWT-Food Sci. Technol.*, 55: 341-346.

Zhang H, Yao H-Y, Chen F. 2006. Accumulation of γ -Aminobutyric acid in rice germ using protease. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70: 1160-1165.

Zhao H, Fan W, Dong J, Lu J, Chen J, Shan L, Lin Y, Kong W. 2008. Evaluation of antioxidant activities and total phenolic contents of typical malting barley varieties. *Food Chem.*, 107: 296-304.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por ANPCyT proyecto PICT 1282 y CAI+D 2011 PI 0367.



EFFECTO DE LAS CONDICIONES DE GERMINACIÓN DE CULTIVARES DE SORGO ROJO Y BLANCO EN EL PERFIL DE AMINOÁCIDOS LIBRES

Garzón A. G. (1), Drago S. R. (1)

(1) CONICET - Instituto de Tecnología de Alimentos, FIQ-UNL, 1° de Mayo 3250, Santa Fe, Santa Fe, Argentina.

agarzon@fiq.unl.edu.ar

RESUMEN

Se maltearon dos cultivares de sorgo (blanco, SB y rojo, SR), obteniéndose muestras de sorgos remojados y germinados durante tres días a dos temperaturas (25 y 30°C). Se determinó el contenido de proteínas, el perfil electroforético SDS-PAGE y Tricina-SDS-PAGE, y el perfil de aminoácidos libres (AAL) por HPLC. No se encontraron diferencias significativas en el contenido de proteínas de las muestras germinadas a ambas temperaturas. Sin embargo, el perfil electroforético mostró hidrólisis proteica. Se observó que la interacción tiempo-temperatura afectó el perfil de AAL durante la germinación, lo que estaría relacionado con la diferente actividad enzimática según la temperatura. Cabe destacar que la lisina presentó en ambos cultivares y temperaturas un comportamiento diferente al resto de los AAL ya que su valor disminuyó a lo largo del tiempo de germinación. Por otro lado, la germinación de SR a 25°C generó mayor contenido de AAL ramificados que a 30°C. Las condiciones de germinación afectaron el contenido y perfil de aminoácidos libres y fue posible obtener un producto malteado rico en estos compuestos.

Palabras clave: Aminoácidos libres, Germinación, Sorgo

ABSTRACT

Two sorghum cultivars (white, WS, and red sorghum, RS) were soaked and germinated for 3 days at 25 or 30°C. Protein content, SDS-PAGE, Tricine-SDS-PAGE and free amino acid (FAA) profile were evaluated. Protein content did not differ in both temperatures and cultivars. However, the electrophoresis showed protein hydrolysis during germination. Interaction between time and temperature affected FAA profile during germination, which would be related with different enzymatic activity according to temperature. In both cultivars and temperatures, lysine showed different pattern compared with the rest of FAA, since decreased along germination time. On the other hand, RS germination at 25°C generated higher amounts of branched FAA than at 30°C. Germination conditions affected FAA amount and profile, and was possible to obtain a malted product rich in this compounds.

Keywords: Free amino acids, Germination, Sorghum

INTRODUCCIÓN

El sorgo es un cereal con alto potencial para su uso en la alimentación, energía e industria. Representa una importante fuente de proteínas y minerales, y es una fuente potencial de constituyentes promotores de la salud, como vitaminas del grupo B, fibra y fenoles antioxidantes (Jacob *et al.* 2013). Los granos de sorgo son generalmente esféricos, pesan cerca de 20-30mg, y pueden ser blancos, rojos, amarillos o marrones. Pertenecen a la familia de las gramíneas y es uno de los cereales que a nivel internacional ha demostrado su rentabilidad, basado en su bajo costo de producción y resistencia a la sequía, lo que lo hace un cultivo muy importante en regiones semiáridas y lo ubica en el quinto lugar entre los cereales para la alimentación (Dlamini *et al.* 2007). Posee varios beneficios nutricionales comparado a otros granos debido a su alto potencial antioxidante, a su mayor contenido proteico (10,5 a 16,5%) y calórico (Jacob *et al.* 2013). Debido a que es libre de gluten, hay un interés creciente en su utilización para elaborar alimentos destinados a personas que sufren la enfermedad celíaca, ya que actualmente, el único tratamiento disponible es una dieta



libre de gluten (Niewinski 2008), con lo que es importante aumentar el espectro de alimentos aptos para este grupo de personas.

Los granos germinados poseen mayor valor nutricional que los granos nativos, por su mayor digestibilidad proteica y menor contenido de fitatos, entre otros factores (Jacob *et al.* 2013). El malteado del cereal comprende tres etapas: remojo, germinación y secado. Es sabido que condiciones de germinación, tales como la temperatura y el tiempo afectan la calidad del producto malteado (Okoliet *al.* 2010). La germinación resulta en una movilización de enzimas hidrolíticas como amilasas y proteasas (Leung 2002), y con esto, aumenta el contenido de aminoácidos libres (AAL) y nutrientes disponibles (Donkoret *al.* 2012). Los AAL presentes en el sorgo malteado son generados, por lo tanto, a partir del hidrólisis de las proteínas de reserva del endospermo, por proteasas endógenas y peptidasas y su aumento no sólo incrementa el material nitrogenado capaz de ser asimilable sino que también favorece la liberación de los gránulos de almidón embebidos en la matriz proteica (Hassaniet *al.* 2013).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar los cambios producidos en el perfil de AAL durante el proceso de malteado de dos cultivares de sorgo en función del tiempo y la temperatura de germinación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Dos cultivares de sorgo (blanco, SB y rojo, SR) fueron donadas por la empresa Pioneer, Pergamino, Buenos Aires, Argentina. El material fue limpiado cuidadosamente y almacenado a 4°C. Ambas variedades poseían buen poder germinativo (90% en tres días) y un contenido de humedad de 13%. Para obtener las muestras malteadas, los cultivares (600 g) fueron lavados por inmersión en hipoclorito de sodio (1g cloro activo/100g, 20 min) y luego lavados con agua destilada. Posteriormente, los granos fueron remojados por 24 h a 25°C en agua destilada en una relación 1:3. Luego del remojo, las muestras se lavaron con hipoclorito de sodio (1g cloro activo/100g, 10 min), con el objetivo de retardar el crecimiento microbiano durante la germinación. Para el proceso de germinación, muestras de sorgo remojado (90g) fueron colocadas en bandejas de aluminio de 9cm de diámetro con una base de algodón cubierta por papel de filtro, y se incubaron en la oscuridad a 25 o 30°C con una humedad relativa del 95% en estufa (Bioelec®, Santa Fe, Argentina). Se recolectaron muestras cada 24 h durante 3 días. Para completar el proceso de malteado, las muestras germinadas se secaron a 50°C en una estufa de aire forzado (Bioelec®, Santa Fe, Argentina) hasta un contenido de humedad menor a 10 g/100g. Las raíces y brotes fueron removidos manualmente. Se molieron los granos malteados en un molino de laboratorio (DecalabFbr®, Córdoba, Argentina) y se almacenaron las harinas a 4°C hasta su análisis. Se evaluaron cinco muestras: sorgo nativo (N), remojado (R), y germinado por 1 a 3 días (G1, G2 y G3) a 25 o 30°C para ambos cultivares.

Evaluaciones químicas

Determinación de proteínas y perfil electroforético

El contenido de proteínas (Nx6,25) se determinó por el método de Kjeldahl (AOAC 2000).

El perfil electroforético de las muestras N, R y G3 se obtuvo mediante una electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) de acuerdo a Laemmli (1970) y una electroforesis de péptidos en condiciones desnaturizantes (Tricina-SDS-PAGE) siguiendo el protocolo de Schagger (2006), que permite la separación de proteínas de bajo peso molecular (1-30 kDa). Para ambas electroforesis se sembró 15 µL de cada muestra extraída con buffer de muestra, empleando un porcentaje de acrilamida-bisacrilamida de 12,5% del gel de separación para SDS-PAGE y de 16% para Tricina-SDS-PAGE. Una vez realizada la corrida electroforética, las placas de gel se fijaron y tiñeron con una solución de 0,125% de Coomassie Blue R-250, 50% metanol y 10% ácido acético en agua. Se utilizó un equipo Mini-Protean II Electrophoresiscell-Bio-Rad con una fuente Modelo 200/2.0 Bio-Rad. Los pesos moleculares de las fracciones proteicas fueron estimados mediante el uso de un kit de calibración de pesos moleculares proteicos Bio-Rad (Low-RangeBio-Rad y PeptidesBio-Rad, para SDS-PAGE y Tricina-SDS-PAGE, respectivamente).

Análisis del perfil de aminoácidos libres

Para determinar el perfil de AAL, las muestras (0,2 g) fueron extraídas por 60 min con ácido tricloroacético (8 g/100 ml) a temperatura ambiente, y centrifugadas 10 min a 3000xg. Se recuperaron los sobrenadantes, y



a 500 μ L se le adicionó 1500 μ L de buffer borato (1 mol/L, pH 9). El contenido de los AAL se determinó de acuerdo a Alaiz *et al.* (1992) luego de una derivatización con ethoximetilenmalonatodietilo por cromatografía de alta performance (HPLC), usando ácido α -aminobutírico como patrón interno. El sistema de HPLC consistió en una bomba Perkin Elmer serie 200, con un detector Perkin Elmer 785^a UV/vis, equipado con una columna de fase reversa de 300 x 3,9 mm (Novapack C18, 4m; Waters). Se usó para la elución un gradiente binario a 0,9 mL/min. Los solventes usados fueron acetato de sodio (25 mmol/L) conteniendo azida de sodio (0,02 g/100 mL) pH 6,0 y acetonitrilo. Los AAL eluidos fueron detectados a 280 nm y los resultados se expresaron como mg/100 g base seca (b.s.) usando una curva de calibrado de 0-2400 y 0-4000 pmol/20 μ L para la Cys y el resto de los aminoácidos, respectivamente.

Cada determinación se realizó al menos por duplicado. Los resultados se expresaron como media \pm desvío estándar (DE). Los datos fueron analizados por un análisis de varianza de ANOVA de uno y múltiple factor y las diferencias entre muestras se determinaron por el test de Duncan. Se utilizó para tales efectos el software StatgraphicCenturion XV 15.2.06.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contenido y perfil proteico

El contenido bruto de proteínas de las muestras nativas, remojadas y germinadas a ambas temperaturas para cada cultivar (10,09 g/100 g b.s. y 12,73 g/100 g b.s. para SB y SR, respectivamente) no presentó diferencias significativas ($p < 0,05$). Este hecho fue reportado también en otros estudios que evaluaron el contenido de proteínas por el método de Kjeldahl, del grano de sorgo durante la germinación (Malleshi y Klopfenstein 1998, Elmakiet *et al.* 1999).

En las **Figuras 1 y 2** se muestran los perfiles electroforéticos para proteínas y péptidos, respectivamente, de las muestras de sorgo nativo, remojado y germinado.

Usando la clasificación basada en solubilidad, las proteínas del sorgo pueden dividirse en albuminas (solubles en agua), globulinas (solubles en solución salina), kafirinas (prolaminas solubles en una solución de etanol), kafirinas entrecruzadas (prolaminas solubles en una solución de etanol más un agente reductor), glutelinas entrecruzadas (solubles en una solución de detergente, agente reductor y pH alcalino) y residuos de proteínas estructurales. Debido a la importancia de las kafirinas, actualmente se considera una nueva clasificación para las proteínas del sorgo que se divide en dos grupos: kafirinas y no-kafirinas. Este esquema se basa en la naturaleza homogénea de las prolaminas de reserva del sorgo y la naturaleza heterogénea del resto de las proteínas (albuminas, glutelinas y globulinas) que están involucradas en diversas funciones celulares (Wong *et al.* 2009). Las kafirinas constituyen un 50-70% del total de las proteínas y sus subunidades tienen un peso molecular entre 16-28 kDa (Dicko *et al.* 2006), mientras que las no-kafirinas presentan un rango de pesos moleculares más amplios (10-100 kDa, aproximadamente) (Taylor *et al.* 1983). En ambas muestras remojadas (calles 3 y 7) se observó una leve disminución de intensidad en bandas proteicas comprendidas en el rango de 45 – 66 kDa, y en un componente de aproximadamente 32 kDa, hecho que puede estar relacionado a una lixiviación de proteínas (Taylor 1983), y al hidrólisis de las mismas (Kihara *et al.* 2007). Por otro lado, se observó un componente de aproximadamente 22 kDa, que aumentó su intensidad comparado a sus correspondientes muestras nativas. Esto podría deberse a que durante el remojo hay un cierto grado de síntesis proteica, principalmente de enzimas sintetizadas *de novo* (Dicko *et al.* 2006).



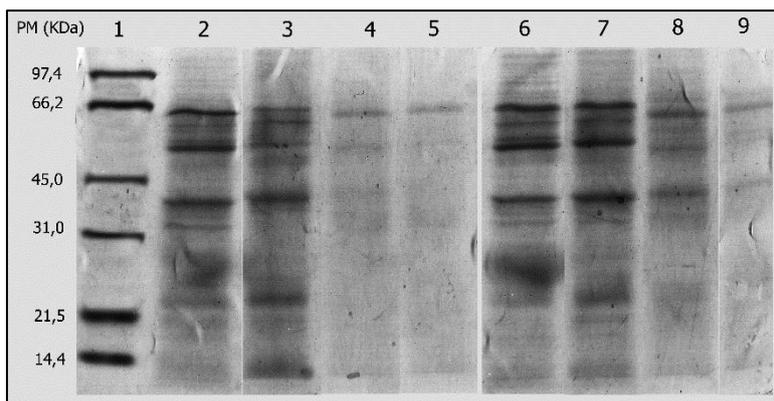


Figura 1. Electroforesis SDS-PAGE. Patrón de pesos moleculares (1); Sorgo blanco (SB) nativo (2); SB remojado (3); SB germinado por tres días (G3) a 25°C (4); SB-G3 a 30°C (5); Sorgo rojo (SR) nativo (6); SR remojado (7); SR-G3 a 25°C (8); SR-G3 a 30°C (9).

En las calles 4 y 5 de la **Figura 1**, se muestra el perfil electroforético de las muestras germinadas de SB y en las calles 8 y 9, las de SR. Se observa claramente que las muestras germinadas por tres días de los dos cultivares y a ambas temperaturas presentan hidrólisis de proteínas, aunque la muestra de SB se encuentra más hidrolizada que la de SR. Además, a 30°C se produjo una proteólisis más intensa que a 25°C, sobre todo para el SR.

En la **Figura 2** se pueden observar con mayor detalle las bandas proteicas comprendidas entre los 14 y 26 KDa. En el SB germinado a ambas temperaturas no se distinguen proteínas o subunidades proteicas dentro de ese rango. Sin embargo, en el SR hay presencia de bandas de aproximadamente 20 KDa, que podrían corresponder a las kafirinas resistentes a proteasas (Dicko *et al.* 2006).

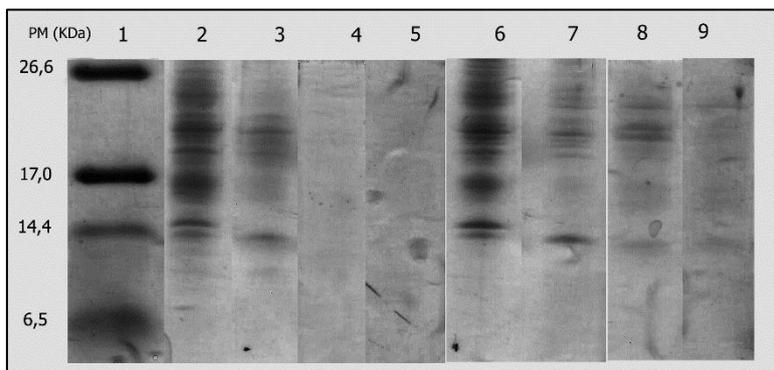


Figura 2. Electroforesis Tricina-SDS-PAGE. Patrón de pesos moleculares (1); Sorgo blanco (SB) nativo (2); SB remojado (3); SB germinado por tres días (G3) a 25°C (4); SB-G3 a 30°C (5); Sorgo rojo (SR) nativo (6); SR remojado (7); SR-G3 a 25°C (8); SR-G3 a 30°C (9).

Además, al no observar nuevas bandas electroforéticas en las muestras de SB al día 3, en un rango de 97,4 a 6,5 KDa (**Figura 1 y 2**), se puede suponer que las proteínas son hidrolizadas directamente a péptidos de bajo peso molecular o amino ácidos, sin la formación de polipéptidos de peso molecular intermedio. Este resultado también fue observado por Taylor (1983), quien estudió el efecto de la composición proteica durante el malteado de sorgo. Durante la germinación, las proteasas endógenas hidrolizan la matriz proteica para favorecer la disponibilidad de nutrientes nitrogenados y liberar los gránulos de almidón embebidos en la matriz (Hassaniet *al.* 2013).

Este resultado condice con lo obtenido en el perfil electroforético, al observar una leve disminución de bandas proteicas luego del remojo (**Figura 1**).

Perfil de aminoácidos libres



Los valores de AAL totales en los granos de sorgo nativo fueron bajos (4,1 y 5,3 μEq AAL totales/g b.s., para el SB y SR, respectivamente), y se incrementaron 3 veces luego del remojo (14,9 y 16,9 μEq AAL totales/g b.s., para el SB y SR, respectivamente). Kihara *et al.* (2007) encontraron que los valores de todos los AAL en granos de cebada aumentaron luego de 48 h de remojo.

El contenido de cada AAL de las muestras germinadas se muestra en la **Tabla 1**. En general, hubo interacción entre el tiempo y la temperatura ($p < 0,05$) para ambos cultivares. Esto significa que la relación de ambos factores es relevante en la distribución de AAL durante la germinación. En el primer día (G1) a 30°C hubo un mayor incremento en el contenido de la mayoría de los AAL que a 25°C, para ambos híbridos. Además, a medida que aumentó el tiempo de germinación se observó un incremento de los AAL, excepto para la lisina, cuyo contenido incrementó a G1, pero luego disminuyó. Malleshi y Klopfenstein (1998) encontraron una mayor proporción de lisina en los brotes que en los granos germinados, debido a una migración de una porción rica en lisina del germen y endospermo.

Adicionalmente, pudo verse un incremento hasta el segundo día de germinación para la mayoría de los AAL a 30°C, luego del cual el valor disminuye o se mantiene constante, mientras que a 25°C el contenido en general aumenta hasta el tercer día. La actividad de las proteasas depende de la temperatura y del tiempo en que dichas enzimas se mantienen a esa temperatura. En este sentido, Aisien *et al.* (1983) estudiaron la actividad proteolítica durante la germinación a 25°C por 96 h y encontraron que dicha actividad se incrementó hasta las 72 h y luego disminuyó. Agu y Palmer (1997) encontraron que temperaturas menores de germinación produjeron mayor contenido de aminoácidos libres en granos de sorgo malteados. Por otro lado, la hidrólisis de proteínas no sería el único factor que aumenta el contenido de AAL durante la germinación, sino que además se puede producir síntesis a partir de, por ejemplo, reacciones de transaminación (Taylor 1983) que también podrían estar afectadas por la temperatura.

Tabla 1. Contenido de aminoácidos libres (AAL) de muestras de sorgo germinado^a

AAL (mg /100 g b.s.)	Sorgo Blanco					
	25°C			30°C		
	G1	G2	G3	G1	G2	G3
Asp+Glu*	27.93±1.66 ^a	61.77±0.67 ^c	79.21±2.85 ^d	54.86±2.86 ^b	55.91±2.51 ^{bc}	84.43±1.01 ^d
Ser*	14.69±0.12 ^a	60.85±2.85 ^b	79.42±1.14 ^c	20.63±1.14 ^a	75.76±2.29 ^c	79.64±3.71 ^c
His*	26.83±0.57 ^a	34.04±0.53 ^{cd}	37.88±3.08 ^d	32.43±2.55 ^{bcd}	51.61±4.21 ^e	30.37±0.14 ^{bc}
Gly*	20.00±0.43 ^a	29.26±0.28 ^{bc}	39.20±0.74 ^d	29.01±1.49 ^b	32.30±1.49 ^c	37.13±1.59 ^d
Thr*	27.42±0.25 ^a	45.68±3.66 ^b	54.06±0.94 ^c	39.84±3.66 ^b	61.79±2.71 ^d	56.20±0.07 ^{cd}
Arg*	40.95±0.64 ^a	42.27±1.45 ^a	53.34±3.46 ^b	54.90±5.49 ^b	76.71±6.86 ^c	62.84±3.36 ^b
Ala*	47.19±1.72 ^a	91.74±1.56 ^{cd}	97.98±2.36 ^d	68.70±2.36 ^b	70.19±4.36 ^b	87.84±1.79 ^c
Pro***	14.59±0.32 ^a	31.80±1.38 ^c	22.82±0.25 ^b	15.11±1.38 ^a	30.18±2.34 ^c	23.79±1.87 ^b
Tyr*	26.02±0.60 ^a	47.09±0.68 ^b	62.90±7.50 ^c	39.34±4.56 ^b	85.64±1.30 ^d	58.50±2.84 ^c
Val*	39.35±1.42 ^a	45.53±2.34 ^a	56.68±3.25 ^b	55.87±1.42 ^b	73.42±7.24 ^c	57.54±1.77 ^b
Met*	4.16±0.12 ^a	11.26±1.19 ^b	16.35±0.66 ^c	14.92±0.49 ^c	22.22±0.50 ^e	18.61±0.63 ^d
Cys*	0.93±0.09 ^a	5.01±0.66 ^{bc}	6.81±0.25 ^d	3.84±0.09 ^b	9.98±0.66 ^e	6.35±0.69 ^{cd}
Ile*	18.71±0.50 ^a	29.89±0.78 ^b	41.94±0.33 ^c	29.74±0.91 ^b	41.34±2.64 ^c	39.83±0.45 ^c
Leu*	31.84±0.94 ^a	64.21±2.21 ^b	114.70±1.30 ^d	77.61±2.21 ^c	110.35±8.26 ^d	105.78±2.86 ^d
Phe*	22.51±0.42 ^a	44.19±2.32 ^b	62.06±1.16 ^c	42.65±1.22 ^b	92.32±7.68 ^d	61.99±4.65 ^c
Lys*	29.71±0.58 ^a	31.47±1.80 ^a	32.90±2.04 ^a	44.02±1.80 ^b	32.71±0.60 ^a	33.77±0.97 ^a
Total	30,4	52,8	66,1	47,3	69,5	64,5
	Sorgo Rojo					
Asp+Glu*	20.21±1.72 ^a	51.26±1.58 ^b	62.54±1.94 ^{bc}	66.88±2.02 ^c	59.76±2.51 ^{bc}	98.30±0.08 ^d
Ser***	17.82±1.62 ^a	64.38±3.64 ^b	79.84±2.08 ^c	13.68±0.45 ^a	59.95±2.03 ^b	77.92±2.08 ^c
His**	16.21±0.57 ^{Aa}	43.63±1.85 ^{Ab}	52.10±2.54 ^{Ac}	22.91±1.39 ^{Ba}	48.42±0.95 ^{Bb}	60.89±4.87 ^{Bc}
Gly*	17.11±0.01 ^a	30.34±1.48 ^b	73.60±5.27 ^e	23.67±0.06 ^{ab}	45.10±0.81 ^c	63.84±4.27 ^d
Thr*	24.34±0.18 ^a	38.89±0.13 ^c	78.00±0.13 ^f	31.50±0.35 ^b	59.00±1.74 ^d	68.85±0.48 ^e



Arg**	28.05±4.07 ^{Aa}	40.85±1.30 ^{Ab}	85.19±7.56 ^{Ac}	46.84±0.39 ^{Ba}	60.89±7.74 ^{Bb}	84.96±5.24 ^{Bc}
Ala*	41.41±0.94 ^a	77.78±1.03 ^c	124.15±2.10 ^e	53.23±2.10 ^b	86.27±6.96 ^d	78.58±1.11 ^{cd}
Pro**	8.18±0.37 ^{Aa}	19.87±1.19 ^{Ab}	42.81±2.28 ^{Ac}	12.79±0.42 ^{Ba}	21.32±1.87 ^{Bb}	47.80±0.20 ^{Bc}
Tyr*	13.42±1.22 ^a	43.10±0.59 ^c	123.97±6.50 ^e	29.60±0.25 ^b	53.29±6.64 ^c	110.65±6.50 ^d
Val*	2.84±0.11 ^a	45.06±0.66 ^c	74.69±2.38 ^f	38.69±1.92 ^b	67.55±2.34 ^e	56.67±2.38 ^d
Met*	3.75±0.14 ^a	8.77±0.33 ^b	22.99±2.43 ^{cd}	12.11±0.49 ^b	19.91±2.08 ^c	23.64±1.11 ^d
Cys*	ND	2.15±0.03 ^a	9.04±0.68 ^c	1.86±0.09 ^a	4.00±0.06 ^b	5.06±0.13 ^b
Ile*	13.43±0.92 ^a	25.39±0.12 ^b	48.22±5.22 ^d	22.60±0.91 ^b	38.25±3.52 ^c	34.22±0.41 ^c
Leu*	21.08±0.90 ^a	48.89±0.24 ^b	137.13±14.91 ^d	56.21±1.47 ^b	99.80±10.77 ^c	90.57±2.98 ^c
Phe*	15.28±1.22 ^a	39.10±0.93 ^b	119.76±12.24 ^e	30.66±0.91 ^b	67.06±1.99 ^c	95.84±1.14 ^d
Lys*	26.98±1.70 ^b	27.63±1.31 ^b	19.16±1.86 ^a	39.58±1.49 ^c	48.20±3.42 ^d	23.17±3.65 ^{ab}
Total	21,4	47,7	89,9	37,1	65,0	76,6

^aAAL: aminoácidos libres; Total: contenido total de AAL en $\mu\text{Eq/g}$ b.s. Valores con la misma letra entre filas de cada columna no presentan diferencias significativas ($p < 0,05$); *interacción significativa entre tiempo y temperatura ($p < 0,05$); **efectos principales de tiempo y temperatura ($p < 0,05$), letra mayúscula para el tiempo, letra minúscula para la temperatura; ***efecto principal sólo para el tiempo ($p < 0,05$). ND: no detectado.

Se observó que el sorgo germinado a 25°C por tres días presentó el mayor contenido de AAL. Los aminoácidos en su forma libre y péptidos pequeños son absorbidos mucho más rápido y más eficientemente por el tracto gastrointestinal (GI) que las proteínas completas, por lo que los alimentos ricos en estos nutrientes pueden ser usados durante y luego de entrenamientos deportivos (Di Pascuale 2008). Por otro lado, resulta interesante destacar que la germinación de SR a 25°C generó mayor contenido de AAL ramificados (Val, Ile, Leu) que a 30°C (2,1 vs 1,4 mEq/g b.s.). La importancia de los alimentos suplementados con aminoácidos ramificados radica en que éstos son los únicos que se metabolizan extra-hepáticamente en el músculo esquelético (Platell *et al.* 2000) y durante la práctica de deportes de alta resistencia atenúan la degradación de proteínas musculares, promoviendo la síntesis proteica en el músculo esquelético y previniendo la fatiga muscular (Pátek 2007).

CONCLUSIONES

Aunque el contenido de proteína bruta no se modificó, el perfil electroforético obtenido por SDS-PAGE y Tricina-SDS-PAGE mostró que durante el remojo se produce un equilibrio entre la síntesis de enzimas y pérdida de proteínas por lixiviación e hidrólisis. Además, al tercer día de germinación fue posible observar proteólisis, cuyo producto son aminoácidos libres y péptidos de bajo peso molecular que no son retenidos en el gel electroforético.

El tiempo y la temperatura de germinación afectaron el contenido y perfil de aminoácidos libres. El sorgo rojo germinado a 25°C por tres días constituye un producto rico en aminoácidos libres, que pueden ser fácilmente absorbidos por el tracto gastrointestinal. Además, la malta de sorgo puede ser utilizada como materia prima para la elaboración de alimentos destinados a atletas, debido al contenido en aminoácidos ramificados. Por otro lado, al ser el sorgo un cereal libre de gluten, estos productos malteados podrían destinarse a personas que sufren de enfermedad celíaca.

BIBLIOGRAFÍA

- Agu RC, Palmer GH. 1997. The effect of temperature on the modification of sorghum and barley during malting. *Process Biochem.* 32(6): 501-507.
- Aisien AO, Palmer GH, Stark JR. 1983. The development of enzymes during germination and seedling growth in Nigerian Sorghum Starch/Stärke, 35: 316-320.
- Alaiz M, Navarro JL, Girón J, Vioque EJ. 1992. Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate. *Chromatogr. A.*, 591: 181-186.
- AOAC.2000. International. Diastatic Power of Malt. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. Official Method 935.31.



- Di Pascuale MG. 2008. Amino acids and proteins for the athlete. Theanabolicedge. 2^{da} edición. Ontario, Canada. CRC Press. Pág 427.
- Dicko MH, Gruppen H, Traoré AS, Voragen AGJ, van Berkel WJH. 2006. Sorghum grain as human food in Africa: relevance of content of starch and amylase activities. *African J Biotechnol.* 5(5): 384-395.
- Dlamini NR, Taylor JRN, Rooney LW. 2007. The effect of sorghum type and processing on the antioxidant properties of Afrucan sorghum-based foods. *Food Chem*, 105:1412-1419.
- Donkor ON, Stojanovska L, Ginn P, Ashton J, Vasiljevic T. 2012. Germinated grains – Sources of bioactive compounds. *Food Chem.*, 135: 950-959.
- Elmaki HE, Babiker EE, El Tinay AH. 1999. Changes in chemical composition, grain malting, starch and tannin contents and protein digestibility during germination of sorghum cultivars. *Food chem.* 64: 331-336.
- Hassani A, Zarnkow M, Becker T. 2013. Influence of malting conditions on sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) as a raw material for fermented beverages. *Food Sci and Tech Inter.* 0(0):1-11.
- Jacob AA, Fidelis AE, Salaudeen KO, Queen KR. 2013. Sorghum: most under-utilized grain of the semi-arid Africa. *Sch. J. Agric. Sci.*, 3: 147-153.
- Kihara M, Okada Y, Iimure T, Ito K. 2007. Accumulation and degradation of two functional constituents, GABA and β -glucan, and their varietal differences in germinated barley grains. *Breeding Sci.*, 57: 85-89.
- LeungShuk-ching J. 2002. Analysis of changes in starch and other components in the production and post-fermentation of opaque beer. Rights Creative Commons: Attribution 3.0 Hong Kong License. Pp:1-112.
- Malleshi NG, Klopfenstein CF. 1998. Nutrient composition, amino acid and vitamin contents of malted sorghum, pearl millet, finger millet and their rootlets. *International Journal of Food Science and Nutrition.* 49: 415-422.
- Niewinski MMJ. 2008. Advances in celiac disease and gluten-free diet. *Am. Diet. Assoc.* 108: 661-672.
- Okoli EV, Okolo BN, Moneke AN, Ire FS. 2010. Effects of cultivar and germination time on amylolytic potential, extract yield and wort fermentating properties of malting sorghum. *Asian J. Biotechnol.*, 2: 14-26.
- Pátek M. 2007. Branched-chain amino acids. *Microbiol Monogr.*, 5: 129-162.
- Platell C, Kong S-E, McCauley R, Hall JC. 2000. Branched-chain amino acids. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 15: 706-717.
- Schägger H. 2006. Tricine SDS-PAGE. *Nature Protocols.*, 1: 16-22.
- Taylor JRN. 1983. Effect of malting on the protein and free amino nitrogen composition of sorghum. *J. Sci Food Agric.* 34: 885-892.
- Wong JH, Lau T, Cai N, Singh J, Pedersen JF, Vensel WH, Hurkman WJ, Wilson JD, Lemaux PG, Buchanan BB. 2009. Digestibility of protein and starch from sorghum (*Sorghum bicolor*) is linked to biochemical and structural features of grain endosperm. *Journal of Cereal Science*, 49: 73-82.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por ANPCyT proyecto PICT 1282 y CAI+D 2011 PI 0367.



EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL TÉ VERDE Y DEL TÉ NEGRO MEDIANTE EL MÉTODO DE FENOLES TOTALES

Lauceri (1) A., Lorente (1) J., Ciappini (1) M.C.

(1) Facultad de Química. Universidad del Centro Educativo Latinoamericano. Avda. Pellegrini 1372. Rosario. Argentina.

laboratorio@ucel.edu.ar

RESUMEN

Los beneficios para la salud relacionados al consumo de té verde están más estudiados y mejor documentados que los del té negro. El objetivo de este trabajo fue comparar el contenido de fenoles totales de ambas variedades de té, determinados a través del método de Folin Ciocalteu. Se realizó un estudio transversal, analítico y cuantitativo en veinticuatro cajas de té negro y té verde en saquitos, de las cuatro marcas comerciales más difundidas que fueran adquiridas en supermercados de Rosario. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante el programa SAS 9.2. Se detectaron mayores concentraciones de compuestos fenólicos en el té verde. Se presume que la fermentación que sufre el té negro sería responsable del menor contenido. Considerando que el consumo promedio de té en la ciudad de Rosario es de 88 ml por día, según antecedentes publicados, los consumidores de té negro estarían incorporando 22 mg de ácido gálico equivalente (AGE) de compuestos fenólicos y 59 mg AGE, si bebieran té verde. A pesar de la gran cantidad de información sobre las diversas interacciones de los compuestos fenólicos y los seres humanos, es escaso el conocimiento acerca de la toxicidad que produciría un consumo excesivo. Se conoce, en cambio, que la presencia de éstos como parte de una dieta equilibrada puede mejorar la salud, particularmente si provienen de fuentes naturales.

Palabras clave: té verde, té negro, antioxidantes, fenoles totales

95

ABSTRACT

The health benefits related to the consumption of green tea are more studied and better documented than those of black tea. The aim of this study was to compare the total phenolic content of both varieties of tea, through the Folin Ciocalteu method. A cross-sectional, analytical and quantitative study was conducted in twenty-four boxes of black tea and green tea bags, of the four most widespread trademarks, which were acquired in supermarkets in the city of Rosario. The results were statistically analyzed using SAS version 9.2. Higher concentrations of phenolic compounds in green tea were detected. It is presumed that the fermentation suffering black tea would be responsible for the less content. Whereas the average consumption of tea in the city of Rosario is 88 ml per day, according to evidence published, consumers of black tea would be adding 22 mg equivalent gallic acid (AGE) of phenolic compounds and 59 mg AGE, if they drank green tea. Despite the wealth of information on the various interactions of phenolic compounds and humans, there is little knowledge about the toxicity that would produce excessive consumption. It is known, however, that the presence of these as part of a balanced diet can improve health, particularly if they come from natural sources.

Keywords: green tea, black tea, antioxidants, total phenolic compounds.



INTRODUCCIÓN

En el cuerpo humano se desarrollan procesos que generan radicales libres, como por ejemplo la exposición a los rayos UV solares, rayos X y algunas reacciones que tienen lugar durante los procesos metabólicos normales. Aunque los radicales libres pueden intervenir en diferentes funciones celulares fisiológicas beneficiosas para el organismo, también son capaces de reaccionar con suma rapidez con distintas moléculas y causar efectos negativos. Como producto de esas reacciones, pueden intervenir en la aparición de enfermedades como cáncer, Alzheimer, diabetes, aterosclerosis o el deterioro asociado al envejecimiento. El interés por determinar la capacidad antioxidante de un alimento se basa en la posibilidad de incorporar estos alimentos a la dieta para aprovechar los beneficios que aportan en la prevención de enfermedades de variada naturaleza (Tórtora y Derrickson 2006).

Se define como capacidad antioxidante de un alimento al potencial de inhibir la formación de radicales libres o de capturarlos. En los alimentos, esta acción se debe principalmente a los flavonoides y a otros polifenoles presentes en su composición. Los tres grupos más importantes de los compuestos fenólicos son los flavonoides, los ácidos fenólicos y los polifenoles. Otros antioxidantes de importancia en la dieta son el selenio, el zinc, los beta-carotenos y las vitaminas C y E (Rodríguez y col. 2007).

La capacidad antioxidante de un producto alimenticio se puede determinar mediante diversos métodos *in vitro*, entre los que se pueden mencionar aquellos basados en la captura de radicales o iones metálicos, tales como: TEAC, ORAC, DDPH, ABTS y FRAP. Otros, considerando que el contenido de compuestos fenólicos de los alimentos está relacionado con su capacidad antioxidante, prefieren determinar ese parámetro. Varios autores revisaron los métodos para la determinación de compuestos fenólicos totales y recomendaron su determinación mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu. (Salas Coronado y col. 2007).

Algunos de los compuestos antioxidantes, como los polifenoles, se encuentran en frutas y verduras, en café, en vino tinto y en té (Avello y Suwalsky 2006). El té negro representa el 73% del consumo de té en el mundo. De esa totalidad, el 85% es consumido en saquitos, un 10% en hebras y el 5% restante, en forma de té instantáneo y refrescos. Por otra parte, el té verde representa el 23% del consumo mundial, debido a que la población conoce sus efectos beneficiosos. Comparándolo con el café y otras infusiones, el consumo de té se ha incrementado un 15% en la última década (De Bernardi 2013).

En nuestro país, el consumo de té ronda los 0,14kg anuales por habitante, lo que equivale en promedio a 70 saquitos por año (Parra 2011, De Bernardi 2013). No predomina un momento del día particular para su consumo. Los consumidores aprecian su sabor, sienten “placer” al tomarlo, ponderan su calidad, lo asocian a un bienestar cuando hace frío o cuando están enfermos y lo beben principalmente como un ritual de la tarde o como un colaborador a la digestión (Parra 2011).

Los resultados de un estudio realizado en la ciudad de Rosario, arrojaron que el 39,1% de las infusiones que se consumen diariamente corresponden al té, obteniéndose un consumo promedio de 88ml de té por día por persona. A pesar de que la evidencia en relación a los efectos preventivos del té verde es mayor y más consistente en comparación con el té negro, el consumo del primero en la población rosarina fue considerablemente más bajo (Molinas y col. 2012).

Entre los beneficios, la capacidad antioxidante solo está documentada para el té verde (Sinija y Mishra 2008, Domingues y col. 2009, Prat Kricun 2011, Sandip y col. 2013, Oh y col. 2013).

En el presente trabajo, se investigó si el té negro posee o no la mencionada capacidad y se comparó con el té verde mediante la determinación de compuestos fenólicos totales por el método de Folin Ciocalteu.



MATERIALES Y MÉTODOS

Se visitaron las tres principales cadenas de supermercados de Rosario, donde se adquirieron 24 cajas de té verde y 24 cajas de té negro. El grupo analizado estuvo compuesto por las marcas: “La Virginia”, “La Morenita”, “Green Hills” y “Taragüi” ya que son las más conocidas por los consumidores y se encontraban presentes en todos los supermercados recorridos. Las marcas se identificaron como A, B, C y D, para preservar su identidad.

Para la determinación de fenoles totales se empleó la técnica espectrofotométrica de Folin-Ciocalteu. Considerando que los antecedentes metodológicos para la determinación de fenoles totales mediante la técnica de Folin Ciocalteu sugieren la lectura de la absorbancia de la solución coloreada a diferentes longitudes de onda, comprendidas en el rango entre 670nm (González Lorente y col. 2008), 725nm (Swain y Hillis 1959; Singleton y col. 1999, Meda y col. 2005) y 760nm (Vinson y col. 2001), y que la longitud de onda del método original era de 765nm (Folin y Ciocalteu, 1927), se consideró necesario establecer la longitud de onda de máxima absorbancia para estas determinaciones. Se realizó una corrida testigo en el rango de 600 a 800nm. El máximo de absorbancia se produjo a la longitud de onda de 725nm, la cual fue seleccionada para el ensayo.

Se utilizó un espectrofotómetro Varian Cary 50 Scan. Los reactivos usados eran de calidad Sigma-Aldrich. Los resultados se expresaron como miligramos de ácido gálico equivalentes en 100 ml de té (mg AGE/100 ml) utilizando una curva de calibración construida a partir de las absorbancias de soluciones de ácido gálico de 0, 20, 50, 100, 200, 300 mg/100 ml. Se obtuvo una curva de ecuación: $\text{Absorbancia} = 0,0237 \times [\text{mg AGE}/100 \text{ ml}] - 0,005$ ($R^2 = 0,998$).

Se ensayó la linealidad realizando repeticiones de las soluciones de calibración seguidas de una regresión lineal, así como también gráficamente, representando el factor de respuesta del analito versus su concentración. La precisión de los ensayos se determinó para los estándares de calibración y para las muestras mediante 10 repeticiones de la misma solución o muestra respectivamente, seguida del cálculo de la desviación estándar relativa.

Se obtuvo una muestra representativa de cada caja de té reuniendo y homogeneizando el contenido de 10 saquitos. De esta muestra, se pesaron 2 gramos de té y se hizo una extracción con 100ml de agua a 90°C durante 5 minutos, de acuerdo a lo recomendado en las cajas de té para su preparación. Se filtró el extracto, se tomó 1ml, se le agregó 1ml de reactivo de Folin-Ciocalteu y 3ml de carbonato de sodio al 20%. Se llevó a volumen en un matraz de 25ml y se dejó desarrollar el color, manteniendo esa solución en la oscuridad durante 30 minutos. Se leyó la absorbancia a 725nm y se informó la concentración encontrada. Si no se desarrollaba color para esta dilución, se ensayaron diluciones menores.

Se realizó un análisis descriptivo de los datos obtenidos mediante gráficos estadísticos y medidas estadísticas de resumen tales como media, mediana, moda, desvío estándar, entre otras. En un segundo paso, se evaluaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios de ácido gálico observados en las diferentes muestras. Se utilizó el paquete estadístico SAS v9.2.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La distribución de la concentración de ácido gálico en los saquitos de té presentó una forma bimodal, cuyos picos se observan entre los 0 y 15mg AGE/100ml y entre 75 y 90mg AGE/100ml, cuando se consideran los resultados obtenidos para té verde y té negro en conjunto (**Figura 1**). En promedio, los saquitos de té presentaron una concentración de 45,35mg AGE/100ml de ácido gálico con una dispersión de 35,57mg AGE/100 mililitros. El valor mínimo observado fue de 0mg



AGE/100ml, mientras que el máximo resultó ser de 98,27mg AGE/100ml. Un 50% de los saquitos de té presentó niveles de ácido gálico por encima de los 46,79mg/100ml.

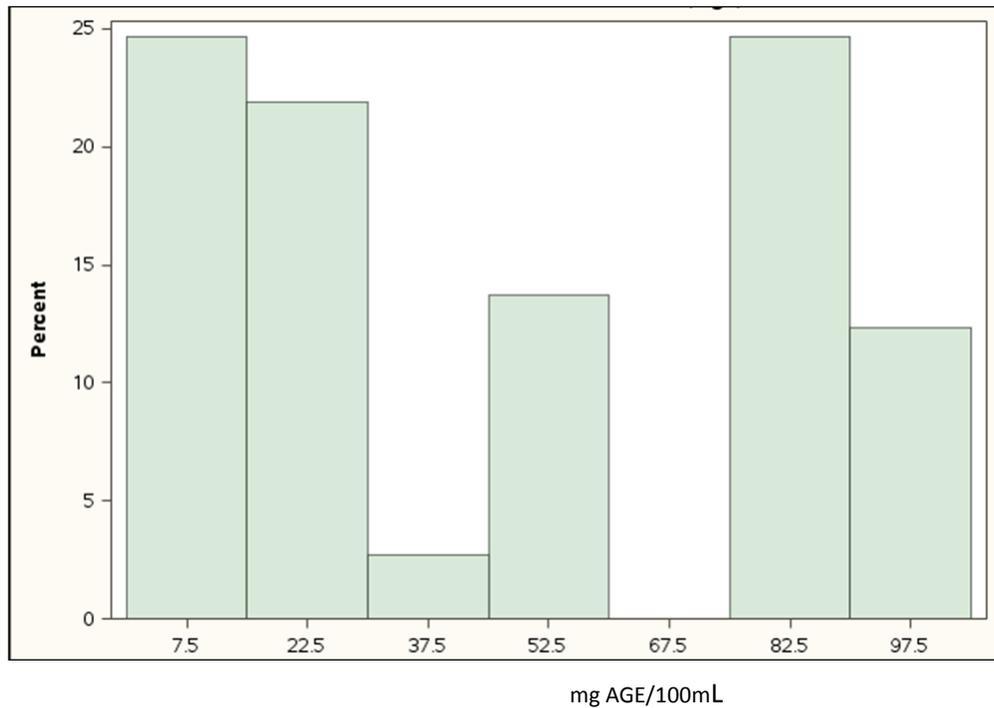


Figura 1. Distribución general del nivel de ácido gálico en saquitos de té

Considerando los resultados obtenidos para té verde y té negro en conjunto, la distribución de ácido gálico resultó heterogénea según marca comercial. Las marcas A y B presentaron valores medios cercanos a los 53mg AGE/100ml, mientras que la mayor concentración media se observa en la marca C con 67,88mg AGE/100ml y la menor en la marca D, con un valor promedio de 6,13mg AGE/100ml y una desviación de 9,03mg AGE/100ml. En base a la evidencia muestral, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles medios de ácido gálico provenientes de las diferentes marcas de té ($p < 0,0001$) (**Figura 2**).



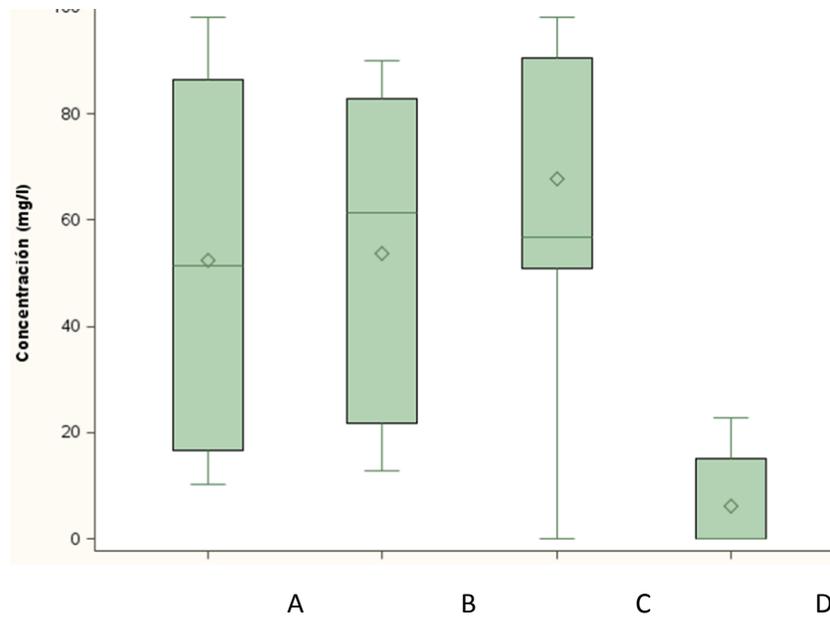


Figura 2. Distribución del nivel de ácido gálico en saquitos de té según marca

Al comparar el té verde y el té negro, como se puede observar en la **Figura 3**, la concentración de ácido gálico difiere significativamente. Mientras que en el caso del té negro, el valor medio fue de $25,10 \pm 18,86$ mg AGE/100ml, para el té verde dichos valores ascendieron a $66,87 \pm 35,92$ mg AGE/100ml. En el caso del té negro, el 50% de las muestras sólo superó los 20,5mg AGE/100ml, mientras que para el té verde, el 50% de los casos superó los 83,44mg AGE/100ml.

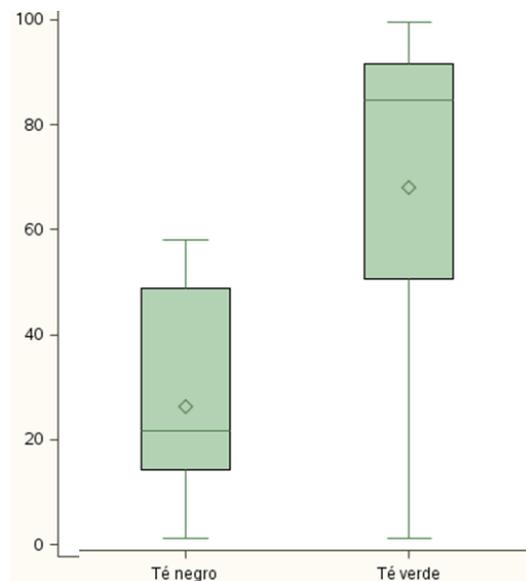


Figura 3. Distribución del nivel de ácido gálico según tipo de té

Al comparar por tipo de té y por marca (**Figura 4**) se conservan las diferencias entre el té negro y el



té verde ya observadas. Las marcas A, B y C alcanzaron valores de 87,10mg AGE/100ml, 82,77mg AGE/100ml y 90,81mg AGE/100 ml, respectivamente, para el té verde. La marca D, en cambio, alcanzó un valor promedio de 6,80mg AGE/100ml, significativamente diferente del resto ($p < 0.01$).



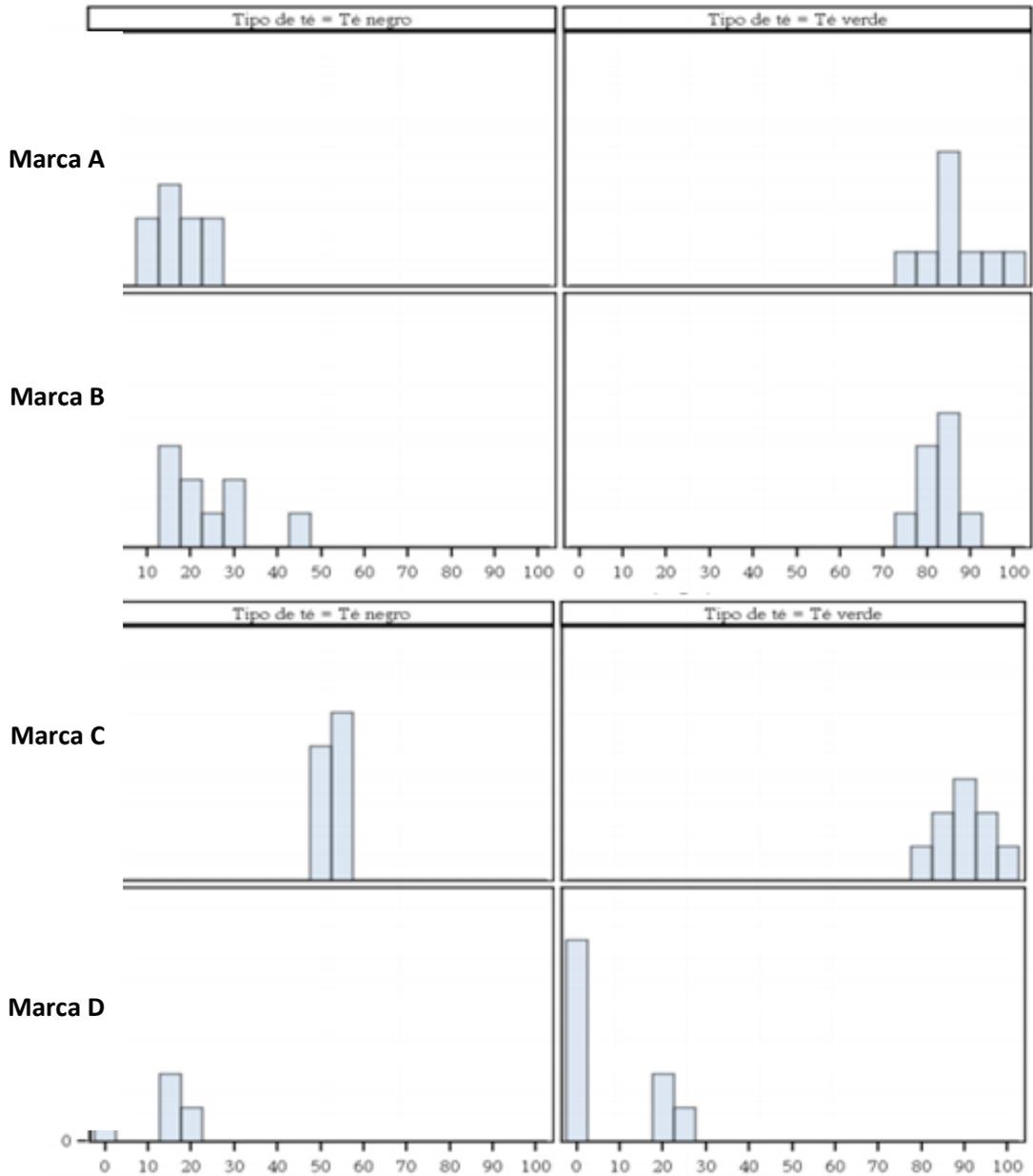


Figura 4. Distribución de compuestos fenólicos expresados en mg AGE/100 ml en té verde y té negro de cuatro marcas comerciales

Para el té negro, la marca C presentó un nivel mayor (54,48mg AGE/100ml) que las marcas A y B, cuyos valores son más próximos (17,90 y 24,50mg AGE/100ml, respectivamente). Al igual que en el caso del té verde, la marca C mantuvo el menor nivel de concentración media de ácido gálico (5,50mg AGE/100ml).

Los resultados coincidieron con lo encontrado por otros autores (Besold y Romero 2015, Gayoso del Villar 2014); en particular, Feria Cardet (2011), informó valores entre 88 y 182mg AGE/100ml, habiendo encontrado también una amplia dispersión de resultados en sus determinaciones sobre



muestras de diferentes orígenes.

Considerando que la diferencia en la obtención del té verde y el té negro radica principalmente en el proceso de fermentación, se presume que este proceso es el responsable de las diferencias en los contenidos de compuestos fenólicos totales determinados en el presente estudio. Durante la fermentación, la enzima polifenol oxidasa, presente en los cloroplastos, oxida y condensa las catequinas a los flavanoles teaflavinas (dímeros) y, posteriormente, a tearrubiginas (poliméricos). Las teaflavinas, que se forman cuando los flavanoles se oxidan, pueden sumar hasta el 2% del peso seco en el té negro. Otras de las sustancias que se encuentran en el té negro son las estructuras poliméricas denominadas tearrubiginas, que constituyen del 7 al 20% del peso seco del mismo. A medida que procede la fermentación, las tearrubiginas (café rojizas) aumentan y las teaflavinas (anaranjadas brillantes) disminuyen (Charley 2000). Es probable que estas estructuras más complejas (diméricas y poliméricas) no participen de la reacción de Folin Ciocalteu, lo que podría estar explicando los menores valores encontrados para el té negro que para el té verde.

No resulta posible explicar las variaciones encontradas en los contenidos de compuestos fenólicos por marca para los datos de los que se dispone sobre las muestras.

Si se considera que el consumo promedio de té en la ciudad de Rosario es de 88ml por habitante y por día (Molinas y col. 2012), los consumidores estarían incorporando en promedio un equivalente a 22mg de compuestos fenólicos, expresados como ácido gálico equivalente cuando consumen té negro; y si consumieran té verde, incorporarían en promedio 59 mg de ácido gálico equivalente.

Tabla 1. Contenido de polifenoles en las distintas bebidas, determinados por el método de Folin Ciocalteu

Bebida	Fenoles totales (mg AGE/100 ml)
Jugo de naranja	62,56 ± 0,49
Vino tinto	195,68 ± 1,78
Vino rosé	41,36 ± 0,67
Vino blanco	18,98 ± 0,59
Infusión de té negro en saquitos	93,63 ± 2,02
Infusión de té verde en saquitos	116,22 ± 1,07
Infusión de yerba mate en saquitos	148,4 ± 7,40
Mateada simulada	586,5 ± 73,90
Tereré simulado	217,5 ± 41,50

AGE: Ácido Gálico Equivalente. Los datos se expresan como media ± desvío estándar.

Fuente: Besold y Romero, 2015.

En comparación con los datos de la **Tabla 1** y de acuerdo a los resultados obtenidos, la contribución del té verde está próxima a la infusión de yerba mate y la del té negro, al jugo de naranja. Ambas son inferiores al aporte del vino tinto en cantidades similares pero no aportan alcohol, por lo que se puede aumentar la cantidad consumida sin riesgos colaterales. El mate en bombilla supera ampliamente los aportes realizados por las demás bebidas (ver mateada simulada en Tabla 1).

A su vez trabajos realizados por Vinson y col. (2001) estudiaron la concentración de polifenoles



totales en distintos vegetales, encontrándose los valores más altos en frambuesa congelada, frutilla y arándano, con valores de 2.701mg EGA/ 100g, 1.229mg EGA/ 100g y 1.054mg EGA/ 100g, respectivamente. Estos frutos resultan entonces una fuente mucho más rica que el té en cualquiera de sus variedades.

Cabe destacar la importancia de obtener los compuestos fenólicos de fuentes naturales. El uso de suplementos, particularmente las formulaciones antioxidantes y mezclas herbales, puede ser potencialmente tóxico. Por ejemplo, en los suplementos comerciales de quercetina, la dosis recomendada está en un intervalo de entre 500 y 1000mg diarios, lo cual es de 10 a 20 veces más que el consumo obtenido en una dieta vegetariana típica (Estrada Reyes y col. 2012).

La exposición a niveles altos de flavonoides, ya sea por medio de la dieta o por consumo de suplementos, puede saturar potencialmente al sistema, generándose una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y produciendo posteriormente daño al ADN y a sus procesos de replicación. Estos efectos pueden ser mayores durante el desarrollo fetal, donde el crecimiento celular es rápido, lo cual puede incrementar la sensibilidad a la exposición a diversos flavonoides (Estrada Reyes y col. 2012).

CONCLUSIONES

El té verde aporta mayor cantidad de compuestos fenólicos a la dieta que el té negro que también los contiene. Ambos son superados por el mate particularmente de bombilla. A pesar de la gran cantidad de información que se ha generado sobre las diversas interacciones de los compuestos fenólicos y los seres humanos, es escaso el conocimiento acerca de la toxicidad producida por su consumo excesivo. Sin embargo, la presencia de éstos como parte de una dieta equilibrada puede mejorar la salud.

BIBLIOGRAFÍA

- Avello M, Suwalsky M. 2006. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. Concepción: Atenea. pag 494.
- Besold C, Romero R. 2015. La yerba mate posee alto nivel de antioxidantes. Instituto Nacional de la Yerba Mate. Posadas: Argentina. Pag 3
- Charley H. 2000. Tecnología de los alimentos: procesos químicos y físicos en la preparación de alimentos. México DF, México: Limusa. p.152-158.
- De Bernardi, L. 2013. Té: más allá de la taza. Alimentos Argentinos, 8.
- Domingues Lima J, Mazzafera P, Da Silva Moraes W, Barboza Da Silva R. 2009. Chá: aspectos relacionados à qualidade e perspectivas. Ciencia Rural, Santa Maria. 39(4): 1258-1266.
- Estrada Reyes R, Ubaldo Suárez D, Araujo Escalona AG. 2012. Los flavonoides y el Sistema Nervioso Central. Salud Mental, 35(5): 375-384.
- Feria Cardet F. 2011. Caracterización de la composición fenólica y capacidad antioxidante del té (*Camellia sinensis*) en productos de diferentes marcas comercializadas en Chile. Tesis. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile.
- Folin C, Ciocalteu V. 1927. Tyrosine and tryptophan determination in proteins. Journal Biol. Chem. 73: 627-650.
- Gayosos del Villar S. 2014. Estudio de la calidad antioxidante de diferentes tés de Asia y Africa. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Valladolid, España: s.e.
- González Lorente M, De Lorenzo Carretero C, Perez Martin RA. 2008. Sensory attributes and antioxidant capacity of Spanish Honeys. Journal of Sensory Studies. 23: 293-302.



- Meda A, Lamien C, Romito M, Millogo J, Niculma O. 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.
- Molinas J, Torrent MC, Benza N, Weiskoff A. 2012. Consumo de café, té y mate en adultos de la ciudad de Rosario. Tesina LN. Facultad de Química. Universidad del Centro Educativo Latinoamericano. Rosario. Argentina.
- Oh J, Jo H, Cho AR, Kim SJ, Han J. 2013. Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. *Food Control*, 31(2), 403-409.
- Parra P. 2006. Cadena Alimentaria del té. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Argentina: Subsecretaría de Política Agropecuaria y Alimentos. Dirección Nacional de alimentos. s.d.
- Prat Kricun, SD. 2011. Contenido de catequinas en cultivares argentinos de té (*Camellia sinensis*), elaborados como té verde. *Sencha. RIA*. 37(3): 249-255.
- Rodríguez AJ, Pérez EM, Vit P. 2007. Capacidad Antioxidante de mieles venezolanas de los géneros *Apis*, *Melipona* y *Tetragonisca*, evaluada por tres métodos. *INHRR*. 38(2), 13-18.
- Salas Coronado R, Cardador Martínez MA, Martínez Vásquez JB. 2007. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos orgánicos de semillas de *Heliocarpus Terebinthinaceus*". [Tesina Ingeniería en Alimentos UTM]. Huajuapán de León, México: s. e.
- Sandip P, Chabita S, Subrata KD. 2013. Studies on black tea (*Camellia sinensis*) extract as a potencial antioxidant and a probable radioprotector. *Radiat Environ Biophys*. 52: 269-278.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela Raventos RM. 1999. Analysis of total phenol and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. 299: 152-178.
- Sinija VR, Mishra HN. 2008. Green tea: Health benefits. *Journal of Nutritional & Environmental Medicine*. 17(4): 232-242.
- Smith JB, Jones LB, Rackly KR. 1999. Maillard browning in apples. *Journal of Food Science*, 64: 512-518.
- Swain T, Hillis WE. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of Science of Food and Agriculture*. 10: 63-68.
- Tortora GJ, Derrickson B. 2006. *Principios de Anatomía y Fisiología*. 11a ed. México: Panamericana. Cap 2: p.32.
- Vinson JA, Proch, J, Bose P. 2001. *Methods Enzymol*. 335: 119-127; Citado por Gómez Caravaca. 2006. *Advances in analysis of phenolic compounds*". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41: 1220-1234.



EFECTO DE LA DIGESTIÓN SIMULADA EN LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE LA UVA Y EL VINO

Lingua M.S. (1), Fabani M.P. (2), Wunderlin D.A. (1), Baroni M.V. (1)

(1) ISIDSA-UNC/ ICYTAC-CONICET, Ciudad Universitaria, Córdoba, Argentina.

(2) Facultad de Ingeniería, IBT, Universidad Nacional de San Juan, San Juan, Argentina.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la digestión gastro-intestinal simulada sobre las propiedades antioxidantes de la uva y el vino tinto. La digestión de la uva en la boca y el estómago incrementaron la bioaccesibilidad de sus PT, mientras que en el vino estos compuestos ya se encontraban todos bioaccesibles. La digestión en intestino redujo los polifenoles bioaccesibles de ambos alimentos, debido principalmente al pH alcalino del fluido digestivo. Menos del 50% de los polifenoles iniciales fueron biodisponibles y colon viable. La CA a lo largo de la digestión mostró la misma tendencia que la de los PT, encontrándose una disminución mayor al 50% con respecto a la actividad inicial. Los antocianos se encontraron entre los polifenoles en mayor proporción luego de la digestión de ambos alimentos, siendo entonces los más resistentes a la misma y por lo tanto serían los principales responsables de la actividad biológica de la uva y el vino tinto.

Palabras clave: digestión gastro-intestinal simulada, uva tinta, vino tinto, polifenoles, capacidad antioxidante.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of the simulated gastro-intestinal digestion on the antioxidant properties of the grape and red wine. Digestion of grapes in the mouth and stomach increased the bioavailability of the PT, while in wine these compounds were already bioaccessible. Intestinal digestion reduced the bioaccessible polyphenols of both foods, mainly due to the alkaline pH of the digestive fluid. Less than 50% of the initial polyphenols were bioavailable and viable colon. The CA along digestion showed the same trend as the PT, being greater than 50% reduction compared to the initial activity. Anthocyanins were among the polyphenols in greater proportion after digestion of both food, being the most resistant to it and therefore primarily responsible for the biological activity of the grapes and red wine.

Keywords: simulated gastro-intestinal digestion, red grape, red wine, polyphenols, antioxidant capacity.

INTRODUCCIÓN

La uva tinta *Vitis vinifera* L. es una de las frutas más cultivadas en todo el mundo y su producto de vinificación, el vino tinto, es ampliamente consumido. En los últimos años, las posibles implicancias positivas del consumo de ambos alimentos sobre la salud del hombre han tenido un creciente interés.

La uva y el vino tinto constituyen una de las principales fuentes ricas en polifenoles (Manach et al., 2004). Estudios epidemiológicos y ensayos clínicos han demostrado que el consumo de este tipo de alimentos reduce el riesgo de enfermedades crónicas como diferentes tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Naissides et al., 2006), y este efecto beneficioso ha sido atribuido, al menos en su mayor parte, al elevado poder antioxidante demostrado por sus compuestos fenólicos (Liu, 2004). Previamente investigaciones realizadas por nuestro grupo de trabajo demostraron que la uva y el vino tinto de diferentes variedades *Vitis vinifera* L. argentinas presentan un alto contenido y gran variedad de polifenoles, siendo los antocianos aquellos que principalmente contribuyen a la actividad antioxidante tanto *in vitro* (Lingua et al., 2016a) como *in vivo* (Lingua et al., 2016b) de ambos alimentos. Sin embargo, estos compuestos deben estar biodisponibles para ejercer dicha bioactividad. La biodisponibilidad define la proporción del compuesto



ingerido que llega al sistema circulatorio, y dependerá de su liberación desde la matriz alimenticia a lo largo del sistema digestivo o bioaccesibilidad, su estabilidad, y en consecuencia de los cambios estructurales que sufran frente a las condiciones fisiológicas (físico-químicas y bioquímicas) que atraviesen, y su capacidad de absorción en el intestino delgado desde donde ingresan al torrente sanguíneo para distribuirse a órganos y tejidos, y ejercer así su acción (Manach et al., 2004).

Diferentes modelos de digestión *in vitro* han sido desarrollados y ampliamente utilizados en los últimos años para el estudio de la bioaccesibilidad, estabilidad y biodisponibilidad de los compuestos polifenólicos presentes en los alimentos (Hur et al., 2011). En este sentido se ha demostrado que la digestión del vino tinto disminuye los polifenoles totales con importantes cambios cuantitativos en su perfil (Gumienna et al., 2011). Se ha observado que los antocianos del vino son inestables a las condiciones alcalinas encontradas en el intestino (McDougall et al., 2005). Por otro lado, se ha observado que las proantocianidinas de la uva tinta se degradan a lo largo de todo el proceso (Fernández & Labra, 2013).

La mayoría de los estudios evalúan el efecto de la digestión *in vitro* sobre los extractos fenólicos de los alimentos, incluso algunos usan compuestos fenólicos puros, pero pocos los realizan teniendo en cuenta la matriz alimenticia y menos aún cuando ésta es de tipo sólida como en el caso de la uva (Tagliazzuchi et al., 2010). En adición, pocos estudios incluyen una etapa final de diálisis, la cual permite determinar aquellos compuestos que potencialmente podrían atravesar el epitelio intestinal (Podio et al., 2015).

El principal objetivo de este estudio fue evaluar la bioaccesibilidad, estabilidad y capacidad antioxidante de la uva y del vino tinto a lo largo de un ensayo de digestión *in vitro*, incluyendo una etapa final de diálisis para identificar aquellos potencialmente biodisponibles.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Se estudiaron 3 muestras de uvas tintas *Vitis vinifera* L. cv Syrah (cada una conformada por 10 racimos seleccionados aleatoriamente de los camiones procedentes de los viñedos) y los respectivos vinos obtenidos de su vinificación. Las muestras fueron adquiridas de la bodega "Antonio de la Torre" localizada en la provincia de San Juan, Argentina. La variedad Syrah fue seleccionada debido a que en estudios previos demostró ser una variedad caracterizada por un alto contenido en antocianos y dichos compuestos estarían contribuyendo a su mayor actividad antioxidante (Lingua et al. 2016a; Lingua et al. 2016b). La realización de este nuevo estudio permitiría avanzar en el entendimiento de la capacidad antioxidante de los antocianos y el resto de los polifenoles presentes en la uva y el vino, indagando en la influencia del proceso digestivo sobre dicha bioactividad.

Digestión gastrointestinal *in vitro*

La metodología empleada para llevar a cabo el ensayo se basó en los trabajos publicados por Hu et al. (2013), McDougall et al. (2005) y Tagliazzuchi et al. (2010) con algunas modificaciones. El modelo consistió de tres etapas consecutivas: brevemente, en la primera, el alimento se homogenizó con saliva humana para simular la digestión en la boca; esta mezcla fue luego tratada con pepsina (450 unidades/ g de uva o mL de vino digerido) a pH 2 durante 2 h a 37°C para simular la digestión en el estómago; por último, este homogenato en presencia de pancreatina (1,2 mg/g de uva o mL de vino digerido) y sales biliares (5,6 mg/g de uva o mL de vino digerido) se colocó dentro de un segmento de membrana de diálisis (10 KDa) y se dializó por 2 h a 37°C en una solución de NaHCO₃ pH 7,5 para imitar en simultáneo la digestión y la absorción en el intestino. Los compuestos encontrados en el interior de la membrana representaron a aquellos que quedarían retenidos en el intestino y que serían colon viable, mientras que aquellos encontrados afuera de la membrana representaron a los absorbidos y que estarían biodisponibles. Los dos tipos de alimentos evaluados (uvas y vino Syrah) se procesaron por triplicado y cada una de estas réplicas fue muestreada al final de cada etapa del ensayo. Simultáneamente se procesó por duplicado un blanco de muestra que permitió descontar en cada etapa la influencia de los reactivos de digestión sobre la CA de los alimentos. Todas las muestras se filtraron, fraccionaron y almacenaron a -80°C hasta análisis.

Análisis de:

Compuestos Polifenólicos



-Polifenoles Totales (PT): El contenido de PT de las muestras se determinó por el método de Folin Ciocalteu de acuerdo a Arnous et al. (2001). Los resultados obtenidos para las muestras de uvas se expresaron como miligramos de polifenoles equivalentes al ácido gálico en 1kg de peso fresco de uva (mg EAG/ kg). En el caso de los vinos, los resultados se informaron como miligramos de polifenoles equivalentes al ácido gálico en 1L de vino (mg EAG/ L).

-Perfil de Polifenoles: Cada uno de los compuestos fenólicos presentes en las muestras se determinó mediante HPLC-DAD-Q-TOF según la metodología descrita por Lingua et al. (2016a). Los resultados se expresaron como mg/ kg de peso fresco de uva, mientras que para los vinos se expresaron como mg/ L.

Capacidad Antioxidante (CA) in vitro

Se midió a través de tres ensayos y los resultados en todos los casos se expresaron como mmol equivalentes de Trolox/ kg de peso fresco de uva o L de vino.

-Poder Antioxidante de Reducción del ión Férrico (FRAP): El ensayo se realizó de acuerdo a Benzie & Strain (1996). Brevemente, se añadieron 100 μ L de muestra apropiadamente diluida a 3 ml del reactivo FRAP, y se midió la absorbancia a 593 nm luego de 6 min de incubación en oscuridad a temperatura ambiente.

-Capacidad de Captación de Radicales Libres (ABTS): El ensayo se realizó de acuerdo a Re et al. (1999). Brevemente, se añadieron 100 μ L de muestra apropiadamente diluida a 3ml de ABTS⁺ (disuelto en metanol), y se midió la absorbancia a 734nm luego de 4 min de incubación en oscuridad a temperatura ambiente.

-Capacidad de Captación de Radicales Libres (DPPH): El ensayo se realizó de acuerdo a Brand-Williams et al. (1995). Brevemente, se añadieron 100 μ L de muestra apropiadamente diluida a 3ml de 60 μ M de DPPH[•] (disuelto en metanol), y se midió la absorbancia a 515nm luego de 15 min de incubación en oscuridad a temperatura ambiente.

En todos los análisis los resultados obtenidos para cada muestra de digestión se compararon con los de las respectivas muestras sin digerir (extracto metanólico de uva, obtenido de acuerdo a Lingua et al. (2016a), y vino).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Compuestos Polifenólicos

El efecto de la digestión sobre los compuestos polifenólicos de la uva y del vino tinto, se estudió mediante el análisis de 4 muestras tomadas a lo largo del ensayo: Boca, Gástrico, Colon Viable y Biodisponible.

En la **Figura 1** se muestran los cambios en el contenido de PT y en las distintas familias de polifenoles (como la sumatoria de los compuestos individuales) a lo largo de la digestión gastrointestinal simulada de la uva. Luego de la masticación solo el 24% de los PT se encontraron bioaccesibles en comparación al extracto metanólico de la uva. El análisis de las familias fenólicas demostró que la masticación extrajo el 100% de los flavanoles, el 54% de flavonoles, un 52% de ácidos fenólicos y un 22% de antocianos.

La digestión gástrica incrementó ($p < 0,05$) la bioaccesibilidad de los polifenoles hasta un 29% con respecto al extracto de uva, sugiriendo que la incubación con las enzimas gástricas favorece la extracción de los polifenoles desde la matriz alimenticia. Todas las familias incrementaron ($p < 0,05$) su contenido en comparación a la digestión en la boca. El 45% del total de los antocianos, el 73% de los flavonoles y el 80% de los ácidos fenólicos se hizo bioaccesible luego de la digestión gástrica. El incremento (38%) de los flavanoles dio lugar a un contenido que superó al inicial de la uva. Este hecho podría deberse a la hidrólisis que sufren, como consecuencia de las condiciones ácidas en esta etapa del proceso, los precursores poliméricos de los flavanoles (proantocianidinas), que no se habrían detectado por nuestro método de análisis inicialmente en la uva, pero que fue evidenciada por el incremento observado por ejemplo en el monómero de epicatequina (**Tabla 1**) (Fernández & Labra, 2013).

La digestión en el intestino disminuyó significativamente el contenido de PT con una consecuente disminución en todas las familias de polifenoles. En comparación a la digestión gástrica, el 56% de los PT fue degradado bajo las condiciones de digestión en el intestino hecho que podría asociarse principalmente a la inestabilidad química de los polifenoles al medio alcalino intestinal (Tagliazucchi et al., 2010). Solo el



10% de los PT de la uva se encontraron colon viable, y un 6% biodisponibles.

En la **Tabla 1** se observa que solo 15 compuestos, de los 34 inicialmente cuantificados en la uva, fueron capaces de atravesar la membrana de diálisis y representarían a los compuestos biodisponibles. Los más abundantes fueron los flavanoles monoméricos (+)-catequina y (-)-epicatequina con % R del 88% y 63%, respectivamente, y los antocianos peonidina-3-O-glucósido, con % R del 26%, petunidina-3-O-acetilglucósido, % R del 58%, y peonidina-3-O-acetilglucósido, % R del 57%. En cuanto al colon viable, solo 15 compuestos fueron encontrados. Los más abundantes fueron los antocianos delphinifina-3-O-glucósido, peonidina-3-O-glucósido y peonidina-3-O-acetilglucósido con % R del 44%, 26% y 53%, respectivamente.

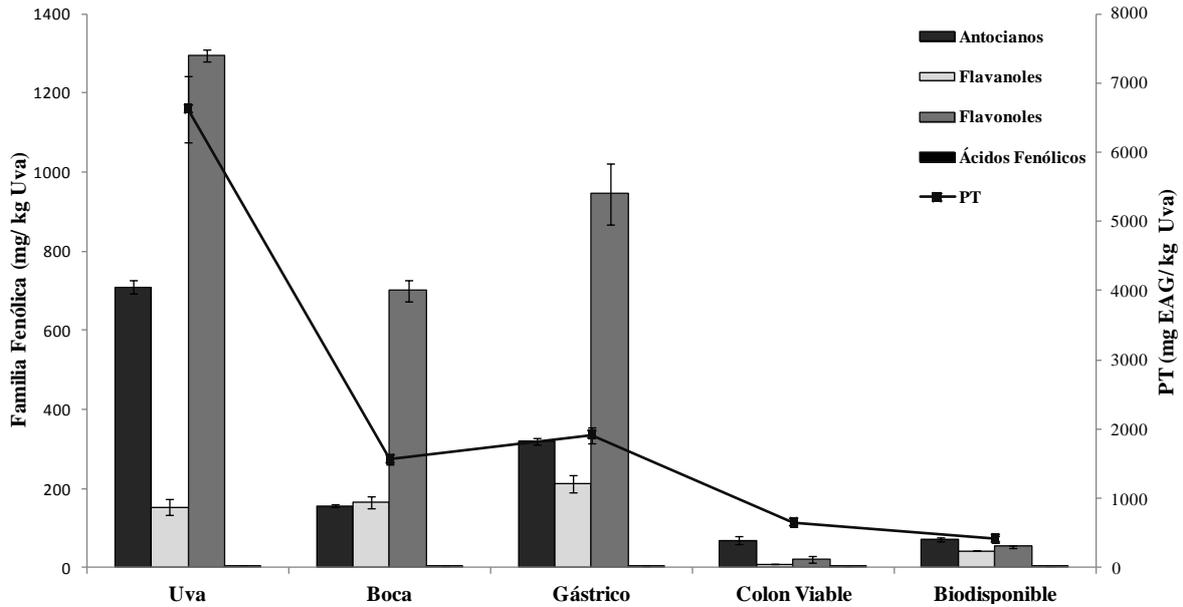


Figura 1. Cambios en los PT y en las familias de polifenoles a lo largo de la digestión *in vitro* de la uva tinta.



Tabla 1. Contenido (mg/ kg peso fresco de uva) de polifenoles individuales en la uva y en las distintas etapas de digestión del alimento. % de Recuperación (%R) con respecto a la uva.

Compuesto	Uva	Boca	Gástrico	Colon (%R)	Viable Biodisponible (%R)
Dímero de Procianidina Dim. Proc. Monogalato	5,62 ± 0,58	6,72 ± 0,56 b	7,88 ± 1,19 b	<LD a	<LD a
(+)-Catequina	25,57 ± 4,76	79,87 ± 19,41 b	83,24 ± 3,04 b	4,78 ± 0,09 a (19)	22,41 ± 0,24 a (88)
(-)-Epicatequina	31,49 ± 7,32	76,4 ± 4,63 b	119,64 ± 19,11 c	4,01 ± 0,60 a (13)	19,82 ± 0,72 a (63)
(-)-Epicatequin-3-O-galato	88,35 ± 12,91	1,95 ± 0,93	<LD	<LD	<LD
Ácido Gálico	5,3 ± 0,55	0,48 ± 0,06 b	0,59 ± 0,06 c	<LD a	<LD a
Ácido Fertárico	<LD	2,29 ± 0,40 b	3,66 ± 0,40 c	1,31 ± 0,37 a	3,19 ± 0,11 c
Miricetina-3-O-glc	46,65 ± 4,24	15,96 ± 0,55 b	23,82 ± 1,43 c	<LD a	<LD a
Astilbina	5,24 ± 0,49	6,51 ± 1,55 b	8,35 ± 0,55 c	<LD a	<LD a
Laricitrina-3-O-glc	36,57 ± 8,40	18,17 ± 1,98 b	20,75 ± 3,50 b	<LC a	<LC a
Quercetina-3-O-glc	37,30 ± 6,46	36,78 ± 0,47 c	29,65 ± 4,46 b	3,63 ± 1,63 a (10)	6,79 ± 1,05 a (18)
Isoquercetina	494,36 ± 47,34	381,93 ± 13,13 b	506,74 ± 51,73 c	7,94 ± 2,96 a (2)	17,19 ± 9,06 a (4)
Kaempferol-3-O-glc	61,66 ± 6,62	19,07 ± 0,32 b	26,11 ± 0,81 c	3,39 ± 1,52 a (6)	12,04 ± 7,06 b (20)
Siringetina-3-O-glc	183,25 ± 15,25	28,78 ± 3,15 b	30,36 ± 3,58 b	2,15 ± 0,58 a (1)	3,66 ± 0,18 a (2)
Isorhamnetina-3-O-glc	417,07 ± 6,92	193,59 ± 16,09 b	299,61 ± 25,95 c	4,79 ± 1,74 a (1)	14,01 ± 3,03 a (3)
Miricetina	0,86 ± 0,06	<LD	<LD	<LD	<LD
Quercetina	4,38 ± 0,41	<LD	<LD	<LD	<LD
Kaempferol	0,84 ± 0,01	<LD	<LD	<LD	<LD
Siringetina	1,45 ± 0,25	<LD	<LD	<LD	<LD
Isorhamnetin a	3,41 ± 0,26	<LD	<LD	<LD	<LD
Delfinidina-3-O-glc	4,22 ± 1,14	1,66 ± 0,16 b	3,43 ± 0,35 c	1,87 ± 0,41 b (44)	<LC a
Cianidina-3-O-glc	17,17 ± 11,42	0,47 ± 0,17 b	<LD a	1,21 ± 0,09 c (7)	<LD a
Petunidina-3-O-glc	13,25 ± 1,92	4,39 ± 0,09 b	7,32 ± 0,65 c	0,83 ± 0,30 a (6)	1,29 ± 0,22 a (10)
Peonidina-3-O-glc	49,81 ± 5,83	8,76 ± 1,13	15,73 ± 0,23	12,75 ± 0,10 (26)	12,78 ± 6,05 (26)
Malvidina-3-O-glc	334,63 ± 22,53	105,18 ± 1,28 b	185,69 ± 1,50 c	30,75 ± 6,15 a (9)	31,45 ± 3,81 a (9)
Petunidina-3-O-acglc	2,51 ± 0,40	1,03 ± 0,04 b	1,67 ± 0,19 c	<LD a	1,46 ± 0,16 c (58)
Malvidina-3-O-acglc	166,35 ± 15,79	29,85 ± 0,61 b	93,76 ± 3,90 c	15,19 ± 1,97 a (9)	14,57 ± 0,90 a (9)
Peonidina-3-O-acglc	11,89 ± 0,66	5,56 ± 1,00 a	11,9 ± 0,72 b	6,34 ± 0,27 a (53)	6,73 ± 3,41 a (57)
Malvidina-3-O-cafglc	4,43 ± 0,36	<LD	<LD	<LD	<LD
Delfinidina-3-O-cmglc	1,87 ± 0,05	<LD	<LD	<LD	<LD
Petunidina-3-O-cmglc	5,32 ± 0,46	<LD	<LD	<LD	<LD
Malvidina-3-O-cmglc	86,47 ± 5,30	<LD c	<LD c	0,86 ± 0,07 b (1)	2,53 ± 0,52 c (3)
Peonidina-3-O-cmglc	10,96 ± 0,71	<LD	<LD	<LC	1,5 ± 0,50 (14)



Abreviaturas: glc, glucósido; glcr, glucurónido; ac, acetil; caf, cafeoil; cm, cumaroil; < LD, menor al límite de detección; < LC, menor al límite de cuantificación. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) entre etapas de la digestión.

En el caso del vino, se observó que en comparación al incremento observado en la bioaccesibilidad de los PT de la uva con la masticación y la digestión gástrica, el contenido de PT luego de estas dos etapas de digestión no mostró diferencias estadísticas respecto al encontrado inicialmente en el vino (**Figura 2**).

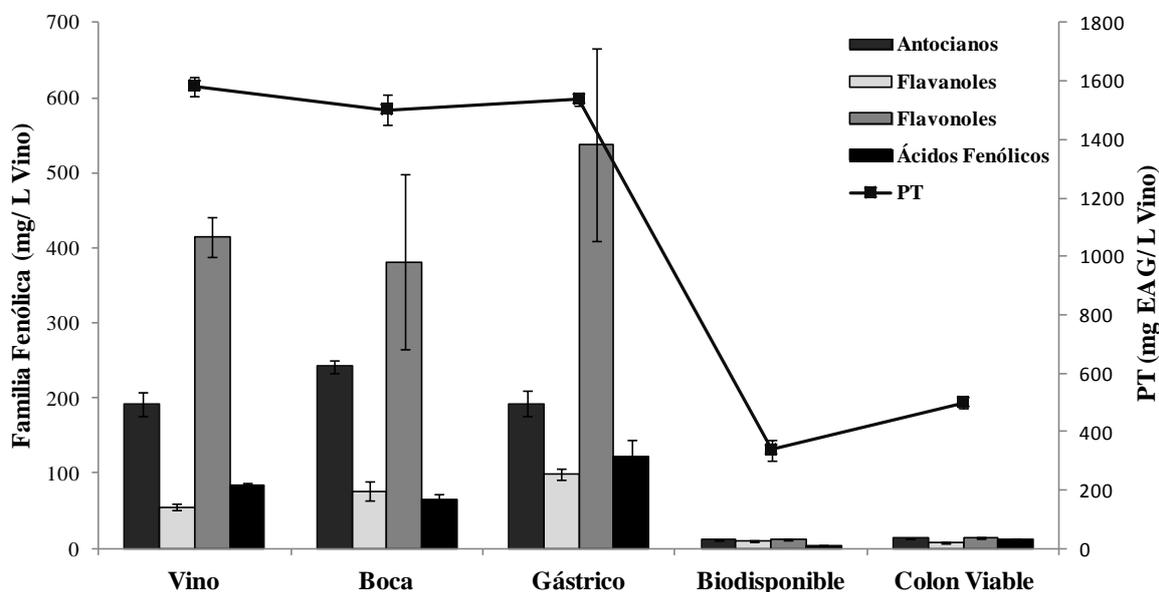


Figura 2. Cambios en los PT y en las familias de polifenoles a lo largo de la digestión *in vitro* del vino tinto.

Dicho resultado podría estar asociado a que el vino es un alimento líquido y en este tipo de alimentos todos los polifenoles se encuentran bioaccesibles, sin necesidad de ser extraídos del tejido vegetal que presentan los alimentos sólidos durante la masticación y la digestión en el estómago (Tagliazucchi et al., 2010). Se observó que luego de la masticación el 100% de los flavanoles y flavonoles del vino están bioaccesibles, mientras que se encontró un 77% de los ácidos fenólicos. En el caso de los antocianos se observó un incremento del 26% el cual podría explicarse por la hidrólisis de sus pigmentos poliméricos precursores durante la masticación, los cuales no pudieron ser detectados bajo nuestro método de análisis inicialmente en el vino. Así por ejemplo se puede observar en la **Tabla 2** que pigmento A y acetil pigmento A no pudieron ser cuantificados luego de la masticación, mientras que se observó un incremento en sus precursores (malvidina-3-O-glucósido y malvidina-3-O-acetilglucósido, respectivamente).

La digestión gástrica no modificó el contenido de los flavonoles, mientras que incrementó el contenido de flavanoles y ácidos fenólicos hasta concentraciones mayores a las inicialmente encontradas en el vino (incremento del 80% y 43% en comparación al vino, respectivamente). Se redujo levemente el contenido de antocianos hasta concentraciones inicialmente encontradas en el alimento. El incremento de los flavanoles, al igual que en las uvas, pone en evidencia la inestabilidad de las proantocianidinas bajo las condiciones ácidas gástricas (evidenciado por el incremento observado por ejemplo en epicatequina, **Tabla 2**).

La digestión en el intestino disminuyó significativamente los PT bioaccesibles, con una consecuente disminución en todas las familias fenólicas. En comparación a la digestión gástrica, el 46% de los PT se degradó luego de la etapa intestinal hecho que, al igual que en las uvas, pone en evidencia la inestabilidad química de los polifenoles a la alcalinidad del intestino. Solo el 31% de los PT del vino se encontraron en la fracción colon viable, y un 21% en la fracción de polifenoles biodisponibles.



Tabla 2. Contenido (mg/ L de vino) de polifenoles individuales en el vino y en las distintas etapas de digestión del alimento. % de Recuperación (%R) con respecto al vino.

Compuesto Fenólico	Vino	Boca	Gástrico	Colon Viable (%R)	Biodisponible (%R)
Dímero de					
Procianidina	7,8 ± 0,42	9,05 ± 0,71 b	9,38 ± 0,23 b	< LD a	< LD a
(+)-Catequina	31,28 ± 3,71	47,69 ± 3,94 b	50,18 ± 4,21 b	5,44 ± 0,96 a (17)	6,75 ± 0,45 a (22)
(-)-Epicatequina	15,98 ± 0,82	19,64 ± 9,30 b	39,36 ± 3,96 c	3,03 ± 0,57 a (4)	2,25 ± 0,50 a (14)
Ácido Gálico	8,80 ± 0,51	7,77 ± 5,52 b	18,8 ± 0,62 c	< LC a	< LD a
Etil galato	60,37 ± 1,58	36,05 ± 9,66 b	69,44 ± 18,18 c	6,25 ± 1,05 a (10)	< LC a
Ácido Caftárico	7,47 ± 0,61	10,09 ± 2,73 b	14,02 ± 2,88 b	1,70 ± 0,46 a (23)	0,52 ± 0,10 a (7)
Ácido Coutárico	3,51 ± 0,23	4,22 ± 1,90 b	7,12 ± 0,74 c	1,57 ± 0,43 a (45)	1,29 ± 0,17 a (37)
Ácido Fertárico	2,81 ± 0,15	4,90 ± 0,48 b	8,6 ± 0,84 c	1,96 ± 0,22 a (70)	1,91 ± 0,27 a (68)
Ácido Cafeico	1,84 ± 0,06	2,14 ± 0,75 b	3,38 ± 0,89 c	< LC a	< LD a
Miricetina-3-O-glc	44,93 ± 4,82	28,76 ± 9,20 b	98,84 ± 2,93 c	< LD a	< LD a
Miricetina-3-O-glcr	4,33 ± 0,38	5,88 ± 1,36 b	7,99 ± 0,81 c	< LD a	< LD a
Astilbina	33,30 ± 1,11	27,29 ± 1,43 b	26,53 ± 1,54 b	2,48 ± 0,23 a (8)	2,43 ± 0,46 a (7)
Laricitrina-3-O-glc	31,18 ± 1,30	15,93 ± 1,46 b	32,48 ± 3,1 c	< LC a	1,16 ± 0,03 a (4)
Quercetina-3-O-glcr	171,54 ± 15,12	185,52 ± 77,42 b	219,59 ± 104,93 b	6,01 ± 0,41 a (4)	4,98 ± 0,39 a (3)
Isoquercetina	14,16 ± 0,92	16,41 ± 2,74 b	17,32 ± 6,51 b	2,76 ± 1,02 a (20)	< LC a
Siringetina-3-O-glc	24,98 ± 4,54	29,41 ± 4,77 b	116,48 ± 13,81 c	2,65 ± 0,20 a (11)	2,98 ± 0,35 a (12)
Isorhamnetina-3-O-glc	12,30 ± 0,90	11,59 ± 4,92 b	18,56 ± 0,71 c	< LC a	< LC a
Miricetina	8,69 ± 0,37	2,53 ± 1,42	< LD	< LD	< LD
Quercetina	45,86 ± 2,37	44,23 ± 29,26	< LD	< LD	< LD
Laricitrina	0,99 ± 0,05	< LD	< LD	< LD	< LD
Kaempferol	6,38 ± 0,85	< LD	< LD	< LD	< LD
Isorhamnetina	16,14 ± 0,60	14,33 ± 10,28	< LD	< LD	< LD
Delfinidina-3-O-glc	2,25 ± 0,28	3,84 ± 0,21 c	3,15 ± 0,36 b	< LC a	< LD a
Petunidina-3-O-glc	5,35 ± 0,58	8,24 ± 0,44 c	6,49 ± 0,78 b	< LD a	< LD a
Peonidina-3-O-glc	4,44 ± 0,35	7,24 ± 0,50 c	5,58 ± 0,74 b	0,67 ± 0,23 a (15)	0,69 ± 0,13 a (16)
Malvidina-3-O-glc	126,27 ± 14,73	161,77 ± 9,34 b	146,88 ± 18,38 b	9,09 ± 0,06 a (7)	6,04 ± 0,26 a (5)
Delfinidina-3-O-acglc	0,39 ± 0,04	0,47 ± 0,04 c	0,39 ± 0,06 b	< LD a	< LD a
Petunidina-3-O-acglc	1,17 ± 0,12	1,34 ± 0,12 d	0,71 ± 0,06 c	< LC a	0,47 ± 0,12 b (40)
Malvidina-3-O-acglc	41,1 ± 1,32	54,24 ± 1,01 c	25,37 ± 1,58 b	3,46 ± 0,21 a (8)	2,86 ± 0,03 a (7)
Peonidina-3-O-acglc	4,80 ± 0,39	5,18 ± 0,31 d	4,59 ± 0,44 c	< LC a	1,70 ± 0,15 b (36)
Petunidina-3-O-cmglc	0,28 ± 0,05	< LD	< LD	< LD	< LD
Malvidina-3-O-cmglc	2,60 ± 0,43	< LC	< LC	< LC	< LC
Peonidina-3-O-cmglc	0,46 ± 0,03	< LC	< LC	< LC	< LC
Pigmento A	2,02 ± 0,25	< LC	< LC	< LC	< LC
Acetil Pigmento A	0,45 ± 0,06	< LD	< LD	< LD	< LD

Abreviaturas: glc, glucósido; glcr, glucurónido; ac, acetil; caf, cafeoil; cm, cumaroil; < LD, menor al límite de detección; < LC, menor al límite de cuantificación. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p < 0.01) entre etapas de la digestión.



En la **Tabla 2** se observa que solo 14 compuestos, de los 35 inicialmente cuantificados en este alimento, se encontraron en biodisponibles. Los más abundantes fueron los ácidos coutárico y fertárico con % R del 37% y 68%, respectivamente, y los antocianos petunidina-3-O-acetilglucósido y peonidina-3-O-acetilglucósido, con % R del 40% y 36%, respectivamente. Respecto a la fracción colon viable, solo se encontraron 13 compuestos. Los más abundantes fueron ácido coutárico y fertárico con % R del 45% y 70%, respectivamente.

A la fecha no se han encontrado trabajos que estudien la biodisponibilidad de cada uno de los polifenoles de la uva y/o el vino tinto. Asumiendo que la diálisis durante el ensayo simuló la absorción de los polifenoles a través del intestino delgado, podría afirmarse que los compuestos observados en la fracción biodisponible de dichos alimentos estarían disponibles para su absorción *in vivo*, influyendo en la actividad celular para ejercer su potencial efecto benéfico sobre la salud. Por otro lado, los resultados de los polifenoles colon viable tanto para uva como para vino, indican que cantidades sustanciales de antioxidantes permanecerían en el tracto intestinal, dirigiéndose al colon. Estos polifenoles podrían servir como sustratos para la comunidad microbiana del colon, ejerciendo así su actividad biológica. Es así que algunos autores demuestran que reducen la incidencia de cáncer de colon (Kontou *et al.*, 2012).

Capacidad Antioxidante (CA) *in vitro*

Las **Figuras 4 y 5** muestran el efecto de la digestión sobre la CA determinada por FRAP, ABTS y DPPH de la uva y el vino, respectivamente. La CA determinada por los 3 ensayos para ambos alimentos mostró una tendencia similar a lo largo del proceso digestivo. Para la uva, su CA disminuyó luego de la masticación, lo cual concuerda con el bajo contenido de PT extraídos luego de dicha etapa del proceso. La digestión gástrica no modifica la CA en comparación a la boca, a pesar de que el contenido de PT había aumentado, señalando la influencia de la composición fenólica en esta etapa del proceso. La digestión en el intestino disminuye la CA, lo que podría asociarse a la disminución previamente observada en los PT. En el caso de los vinos, se observó que la digestión en la boca disminuye la CA del vino a pesar de que el contenido de PT entre el alimento y la digestión en la bocas no había sido modificado, indicando que la CA del vino estaría afectando por la composición fenólica derivada de la masticación; la CA del resto de las etapas de digestión mostró la misma tendencia que el contenido de PT observado.

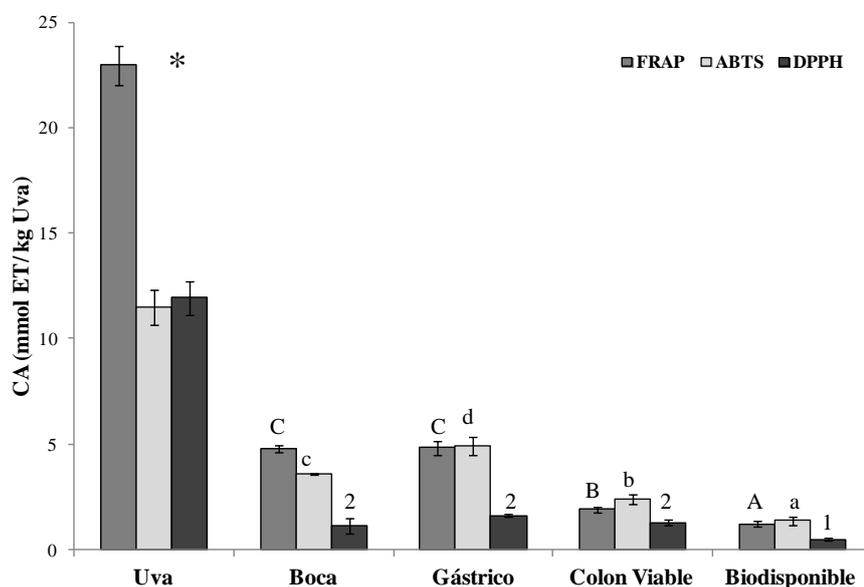


Figura 4. CA *in vitro* de la uva tinto a lo largo de la digestión simulada.

* indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) entre el extracto de la uva y la boca. Letras y números diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) entre etapas de la digestión.



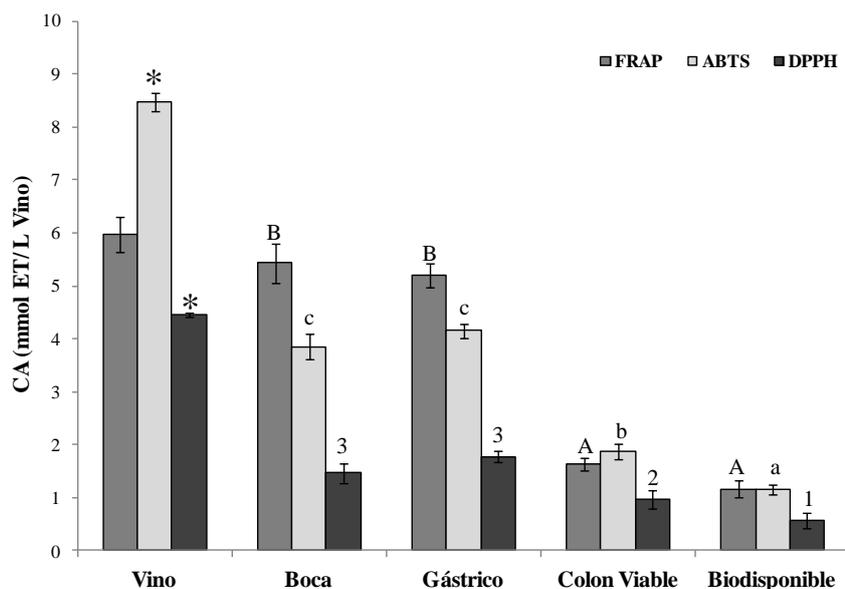


Figura 5. CA *in vitro* del vino tinto a lo largo de la digestión simulada.

* indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) entre el vino y la boca. Letras y números diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) entre etapas de la digestión.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos demostraron que la digestión de la uva en la boca y en el estómago incrementaron lo bioaccesibilidad de sus PT mientras que en el vino, estos compuestos ya se encontraban todos bioaccesibles. En ambos alimentos la digestión en el intestino reduce los polifenoles bioaccesibles como consecuencia principalmente del pH alcalino del fluido digestivo. Menos del 50% de los polifenoles iniciales se detectaron biodisponibles y colon viable. Los antocianos fueron encontrados entre los compuestos en mayor proporción luego de la digestión de ambos alimentos, indicando que son los más resistentes a las condiciones físico-químicas del ensayo. La CA a lo largo de la digestión mostró la misma tendencia que la de los PT, encontrándose una disminución mayor al 50% con respecto a la actividad inicial. Los resultados sugieren que la digestión gastrointestinal afecta el perfil y la CA de los alimentos, siendo probablemente los antocianos los principales responsables de los efectos benéficos de la uva y el vino tinto sobre la salud del hombre.

BIBLIOGRAFÍA

- Arnous, A., Makris, D., & Kefalas, P. (2001). Effect of Principal Polyphenolic Components in Relation to Antioxidant Characteristics of Aged Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 5736-5742.
- Benzie, I., & Strain, J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239: 70-76.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., & Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28: 25-30.
- Fernández, K., & Labra, J. (2013). Simulated digestion of proanthocyanidins in grape skin and seed extracts and the effects of digestion on the angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. *Food Chemistry*, 139: 196-202.
- Gumienna, M., Lasik, M., & Czarnecki, Z. (2011). Bioconversion of grape and chokeberry wine polyphenols during simulated gastrointestinal *in vitro* digestion. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*,



62: 226-233.

Hu, J.-L., Nie, S.-P., Min, F.-F., & Xie, M.-Y. (2013). Artificial simulated saliva, gastric and intestinal digestion of polysaccharide from the seeds of *Plantago asiatica* L. *Carbohydrate Polymers*, 92: 1143-1150.

Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2011). In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125: 1-12.

Kontou, N., Psaltopoulou, T., Soupos, N., Polychronopoulos, E., Xinopoulos, D., Linos, A., & Panagiotakos, D. (2012). Alcohol Consumption and Colorectal Cancer in a Mediterranean Population: A Case-Control Study. *Diseases of the Colon & Rectum*, 55: 703-710.

Lingua, M., Fabani, P., Wunderlin, D., & Baroni, V. (2016a). From Grape to Wine: Changes in Phenolic Composition and its Influence on Antioxidant Activity. *Food Chemistry*, 208: 228-238.

Lingua, M., Fabani, P., Wunderlin, D., & Baroni, V. (2016b). In vivo antioxidant activity of grape, pomace and wine from three red varieties grown in Argentina: Its relationship to phenolic profile. *Journal of Functional Foods*, 20: 332-345.

Liu, R. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *The Journal of Nutrition*, 134: 3479S-3485S.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79: 727-747.

McDougall, G., Fyffe, S., Dobson, P., & Stewart, D. (2005). Anthocyanins from red wine - Their stability under simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry*, 66: 2540-2548.

Naissides, M., Mamo, J., James, A., & Pal, S. (2006). The effect of chronic consumption of red wine on cardiovascular disease risk factors in postmenopausal women. *Atherosclerosis*, 185: 438-445.

Podio, N., López-Froilán, R., Ramirez-Moreno, E., Bertrand, L., Baroni, V., Pérez-Rodríguez, M., Sánchez-Mata, M-C., & Wunderlin, D. (2015). Matching in Vitro Bioaccessibility of Polyphenols and Antioxidant Capacity of Soluble Coffee by Boosted Regression Trees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63: 9572-9582.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26: 1231-1237.

Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D., & Conte, A. (2010). In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, 120: 599-606.



EMPLEO DE CARBOHIDRATOS DE BAJA DIGESTIBILIDAD COMO SUSTITUTOS DE SACAROSA EN LA ELABORACIÓN DE CEREZAS EN CONSERVA

Robles M. N. (1), Maldonado M. B. (1)

(1) CONICET, EEA Luján INTA Mendoza y la Universidad Tecnológica Nacional. Facultad Regional Mendoza.

cicloidea@hotmail.com

RESUMEN

El propósito del presente trabajo fue evaluar y cuantificar los procesos físico-químicos del fenómeno de difusión y deshidratación osmótica en el endulzado de cerezas en conserva, al efectuar la sustitución parcial y total de la sacarosa por diversos polialcoholes, considerados Carbohidratos de Baja Digestibilidad (CBD) y que tienen efecto edulcorante, mediante el método lento o Francés. Se realizaron tres tratamientos: sacarosa al 100% como tratamiento testigo, y dos restantes donde ésta fue reemplazada en un 50% y 100%, con maltitol e isomaltitol, en formulaciones combinadas. Se ensayaron distintas temperaturas y tiempos, para estudiar la cinética de deshidratación osmótica, durante el proceso de confitado. Se evaluó la evolución de variables físico-químicas tales como: pérdida de peso, humedad, sólidos solubles (°Brix) de la pulpa y jarabe, como así también la velocidad de penetración de la sacarosa y sus sustitutos y la de salida del agua a través de la epidermis y el mesocarpio. Se consiguió obtener un producto reducido en azúcares y/o valor calórico, con un contenido de sólidos solubles de 55 °Brix como mínimo, con propiedades nutraceuticas, apto para diabéticos y personas con sobrepeso.

Palabras clave: cerezas, deshidratado osmótico, carbohidratos de baja digestibilidad.

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate and quantify the physico-chemical variables of diffusion phenomenon and osmotic dehydration in sweetened canned cherries, to effect partial and total replacement of sucrose by various polyols, considered low digestible carbohydrates (LDC) and having sweetening effect, by the slow or French method. Three treatments were performed: 100% sucrose as the control treatment, and two remaining where it was replaced with 50% and 100%, with maltitol and isomalt, in combined formulations. Different temperatures and times were tested to study the kinetics of osmotic dehydration, during the assay.

The evolution of physicochemical variables such as weight loss, moisture, pulp and syrup soluble solids °Brix, as well as the rate of penetration of sucrose and their substitutes and water outlet through the epidermis and the mesocarp were evaluated. As a result, it was obtained a low sugar and/or caloric value product, with a soluble solids content of at least 55°Brix, with nutraceutical properties, suitable for diabetics and overweight people .

Keywords: cherries, osmotic dehydration, low digestible carbohydrates.

INTRODUCCIÓN

Según el Censo Frutícola Provincial (2010) “La provincia de Mendoza ha sido históricamente la principal productora de cereza de Argentina, concentrando alrededor del 60% de la producción nacional. Las características agroecológicas, los avances en materia comercial y las nuevas tecnologías de cultivo, han permitido posicionar a la provincia en los principales mercados del mundo”.

La producción total de cereza de Mendoza efectivamente cosechada, alcanzó en el año 2008 las 6881,2 toneladas, con un rendimiento promedio de 6 t/ha. De este total, el 45% fue destinado a consumo en fresco y el 55% restante fue destinado a industrias para confitado (IDR, 2008).



El Censo Frutícola Provincial 2010 muestra que la superficie total con cereza de Mendoza es de 1151,4 ha. Sin embargo la producción estimada de cereza para la provincia de Mendoza, en la campaña 2015, fue de 2035 t, ocupando una superficie de 879 ha entre Bing, Rainier, Lapins y otras variedades, correspondiendo al 50% la variedad estudiada. (IDR, 2015).

El destino de la producción, según el censo productivo de cerezas 2008-2009, es el 24% a exportación, el 15% al mercado interno y el 55% a industria (6% restante comercializado como venta directa y otros).

Las características agroecológicas propias de la región permiten que el cultivo de esta fruta apunte hacia mercados de excelencia. La demanda de cerezas de primicia, insatisfecha a nivel mundial, la calidad de la producción y la actualidad de las exportaciones, aseguran la expansión del mercado.

El mercado internacional de las cerezas, en 2009 representó cerca de 207000 toneladas entre los diez principales países exportadores del mundo (World Sweet Cherry Review, 2009), pues resulta un producto commodity para los países europeos, principalmente el Reino Unido, Holanda, Francia y España (Villarreal y col., 2006).

Actualmente la producción de cerezas en el hemisferio Sur cuenta con una situación de mercado donde la demanda es superior a la oferta. La mejora económica de muchos países y el crecimiento del consumo hacen que más personas hoy estén deseosas de consumir cerezas. Con el tiempo, el consumidor final de cerezas ha ido sofisticando sus gustos y preferencias, debiendo orientar la producción de cerezas a las exigencias cualitativas de éstos. Todos estos antecedentes técnicos y económicos permiten concluir que el cerezo es una alternativa rentable de inversión y de diversificación de la producción en Mendoza, y que se complementa perfectamente con el modelo vitivinícola (IDR, 2015).

Una forma de aumentar la estabilidad de las frutas es reducir la cantidad y disponibilidad del agua presente en ellas, ya que esta es un componente mayoritario que controla muchos de los cambios fisicoquímicos y bioquímicos que tienen lugar en las frutas y que aumentan la estabilidad de las mismas (Ceballos Chan, 2005). En frutas este objetivo puede lograrse a través del empleo de tratamientos osmóticos. La deshidratación osmótica (DO) es un método ampliamente utilizado para eliminar parcialmente el agua de las frutas por inmersión del tejido celular en soluciones hipertónicas acuosas de azúcar (Nowacka et al., 2014).

Por otro lado, desde hace ya varios años, la OMS (Organización Mundial de la Salud) y la OPS (Organización Panamericana de la Salud) vienen advirtiendo sobre el creciente aumento de la obesidad y la diabetes alrededor del planeta y en nuestro continente.

Según la OMS, en 2014 más de 1900 millones de adultos de 18 o más años tenían sobrepeso, de los cuales, más de 600 millones eran obesos; y alrededor del 13% de la población adulta mundial (un 11% de los hombres y un 15% de las mujeres) eran obesos. Entre 1980 y 2014, la prevalencia mundial de la obesidad se ha más que duplicado. En este escenario, la industria alimentaria puede desempeñar un papel importante en la promoción de dietas sanas reduciendo el contenido de grasa, azúcar y sal de los alimentos procesados.

En cuanto a los azúcares, Edwards (2008) mencionó que existen en el mercado hoy en día varios edulcorantes y productos de baja en calorías. Sin embargo, los problemas de obesidad continúan creciendo en todo el mundo. Esta paradoja se debe probablemente al hecho de que, según la investigación de mercado, los consumidores no están dispuestos a sacrificar el sabor dulce por menos calorías.

Los alimentos bajos en calorías, que pueden facilitar los enfoques más recientes de reducción de peso, como la modificación del comportamiento, a menudo carecen de palatabilidad adecuada debido a la ausencia de carbohidratos o grasa.

Según Edwards (2002), los ingredientes más comunes en los alimentos para diabéticos son los polioles, ya que estas sustancias sólo se absorben lentamente y se evita un aumento en los niveles de glucosa en la sangre. También hay individuos que, debido a problemas metabólicos, no pueden consumir sacarosa. Los polioles son considerados CBD.

Los CBD son aquellos que son poco digeridos y absorbidos en el intestino delgado y son parcialmente fermentados en el intestino grueso. Como resultado, proveen bajos contenidos de energía respecto de los carbohidratos totalmente digeribles como la sacarosa: aproximadamente 1 a 3kcal/g para los CBD comparados con las 4kcal/g de los totalmente digeribles (Grabitske y Slavin, 2008).

Por otro lado, los edulcorantes constituyen uno de los grupos de aditivos alimentarios que están experimentando un mayor incremento en su consumo y es una de las áreas donde ha tenido mayor impacto la



biotecnología, no sólo desde el punto de vista tecnológico sino económico y social. Esto es debido a la creciente demanda de alimentos bajos en calorías que no quieren renunciar al sabor dulce (Cubero et al., 2002). Ronda et al. (2004) describieron que los CBD tienen propiedades semejantes a la fibra dietaria y son parcialmente metabolizados en el intestino delgado, permitiendo la reducción calórica del producto.

Por tanto, siendo Mendoza la mayor productora de cerezas del país y considerando la importancia creciente de los mercados externos para las cerezas procesadas y la necesidad de alimentos reducidos en su valor calórico y que benefician la salud, se considera importante: Estudiar los procesos difusivos de sustitutos de la sacarosa, que tienen lugar durante la elaboración de conserva de cerezas con alto contenido de sólidos solubles, los cuales son agentes de deshidratación osmótica y tienen potencial efecto edulcorante. Entre ellos el uso de polialcoholes considerados Carbohidratos de Baja Digestibilidad (CBD), que cumplen con dicha necesidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron tres tratamientos para el confitado de cerezas en conserva mediante el método lento o Francés (**Figura 1**). El tratamiento testigo correspondió a la formulación 100% sacarosa. En el segundo tratamiento, ésta fue reemplazada en un 50% con maltitol, y en el tercer tratamiento en un 100%, con 50% de maltitol y 50% de isomaltitol. Se ensayó cada tratamiento a 40°, 50° y 60°C, para estudiar la cinética de deshidratación osmótica, a distintas temperaturas, durante el proceso de confitado.

Se caracterizó la evolución de variables físico-químicas tales como: humedad y sólidos solubles (°Brix) de la pulpa; y pH y densidad de la solución edulcorante a fin de verificar que las condiciones de frontera se mantuvieran constantes a lo largo de todo el proceso. Para lograr dicha condición se trabajó con una relación sólido-líquido 1:2,5.



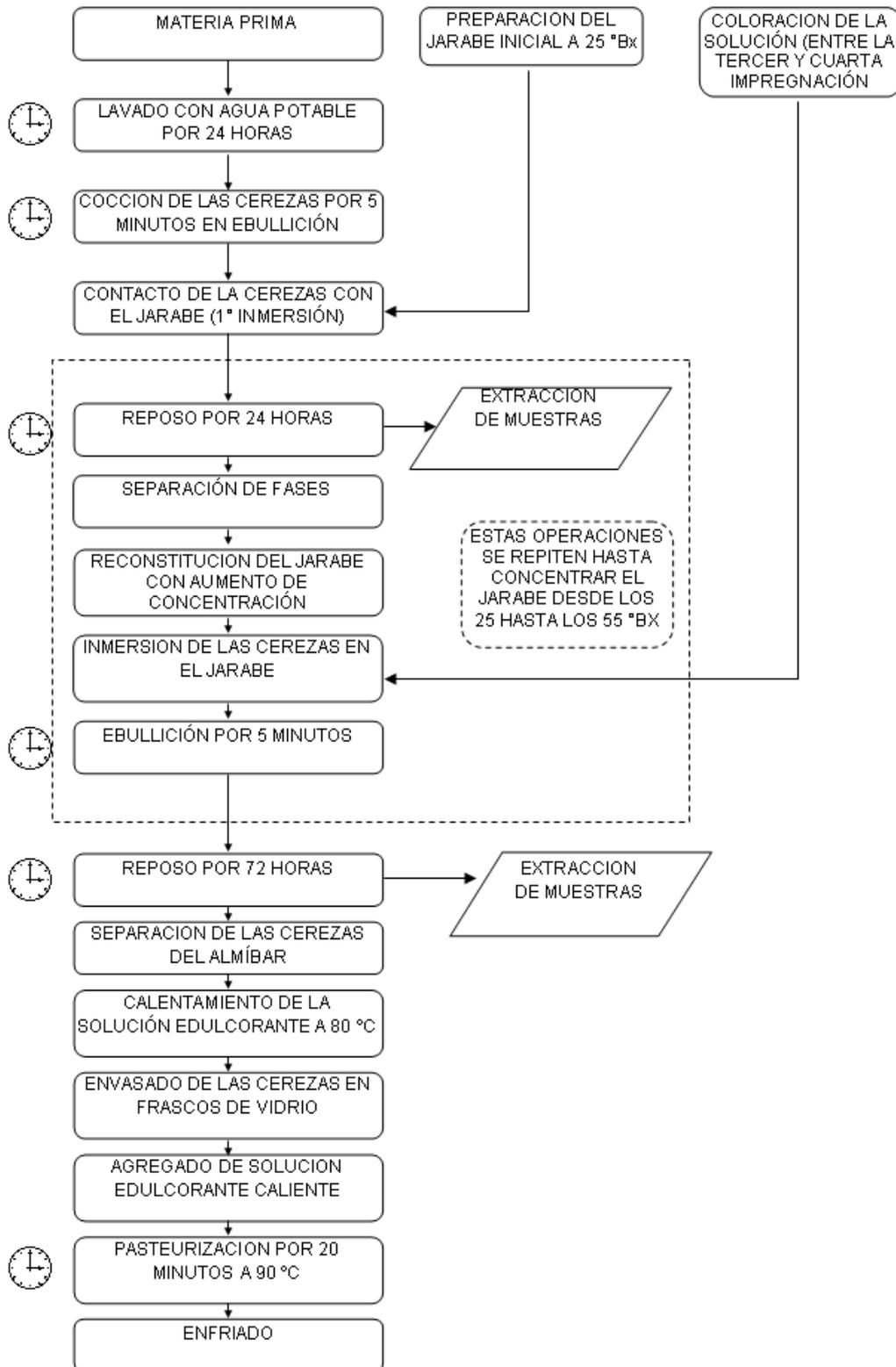


Figura 1. Diagrama de Flujo del proceso de impregnación para los diferentes tratamientos.

Se tomaron muestras de cereza por triplicado en distintos tiempos. De cada cereza se obtuvo la sección ecuatorial, mediante dos cortes con bisturí, y sobre ella se realizaron tres cortes concéntricos con el sacabocado manual, que consta de tres cuchillas. (Figura 2). Cada sección transversal circular obtenida, se



dividió en dos mitades: En una sección semicircular se midió Humedad según AOAC (1995) adaptado, debido a que, por trabajar con una porción de muestra pequeña, no se podían pesar los 5g que sugiere el método, y en la otra °Brix. Esto se realizó por triplicado en cada tiempo y por cada temperatura de ensayo.

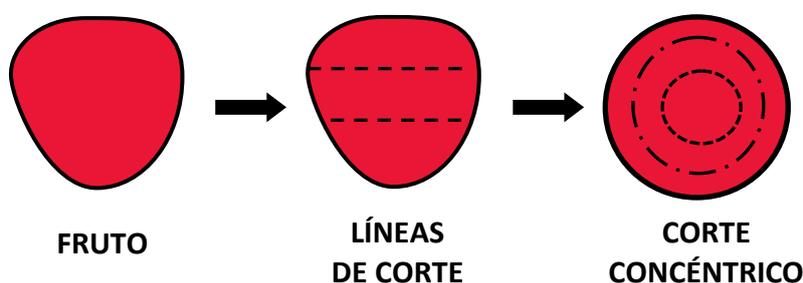


Figura 2. Esquema de corte en la extracción de muestras

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observó que el equilibrio de concentraciones entre la pulpa de las cerezas y el jarabe se alcanza en un tiempo inferior cuanto mayor es la temperatura del ensayo, es decir que la velocidad de transferencia de soluto es mayor a mayores temperaturas. Así, en general, para los tratamientos a 60°, transcurridas las 3 primeras horas, se alcanza la misma concentración en °Brix en promedio en la pulpa, que en 6 horas para 40°C, y que en 5 horas para 50°C, lo cual fue consistente en las distintas formulaciones. Similar comportamiento presenta la velocidad de salida de agua de la pulpa, es decir, la velocidad de deshidratación es mayor cuanto mayor es la temperatura del ensayo. Esto es consistente con la existencia de dos flujos en contracorriente: a medida que el fruto se concentra en soluto, pierde una cantidad proporcional de agua, que produce la deshidratación del mismo (Ceballos Chan, 2005). La superficie celular actúa como una membrana semipermeable, por lo que la solución de diferentes azúcares tales como sacarosa, glucosa o fructosa se mueve en el espacio libre del tejido mientras el agua sale de las células (Deng y Zhao, 2008).

Evolución de la concentración de sólidos solubles y de la humedad en cerezas deshidratadas osmóticamente para el tratamiento maltitol50%-isomaltitol50% a 40°C, 50°C y 60°C.

Para el caso del ensayo maltitol50%-isomaltitol50% se alcanzó una concentración de 60°Brix en las cerezas, en 4 horas para el tratamiento a 40°C (**Figura 3**), en 2 horas para el de 50°C y en 45 minutos para el de 60°C (**Figura 4**), es decir la concentración en °Brix creció ligeramente por aumento de la difusión con la temperatura. Consistentemente con lo anterior, los valores de humedad en las cerezas decrecieron con el mismo patrón de comportamiento al hallado para el aumento de °Brix en las mismas, ya que el agua que sale da lugar a la entrada de sólidos, tal como lo explica la teoría de deshidratación osmótica. En esta formulación, y a 40°C, se alcanzó al cabo de 6 horas de tratamiento, una humedad del producto final de alrededor del 38%, valor que se obtuvo a las 3 horas cuando la temperatura del ensayo fue de 50°C y al cabo de una hora para el tratamiento a 60°C, para el cual la humedad final fue del 34% al cabo de 2,5 horas. Se observó que la velocidad de transferencia de soluto fue mayor a mayores temperaturas. Similar comportamiento presentó la velocidad de salida de agua de la pulpa, es decir, la velocidad de deshidratación fue mayor cuanto mayor fue la temperatura del ensayo.



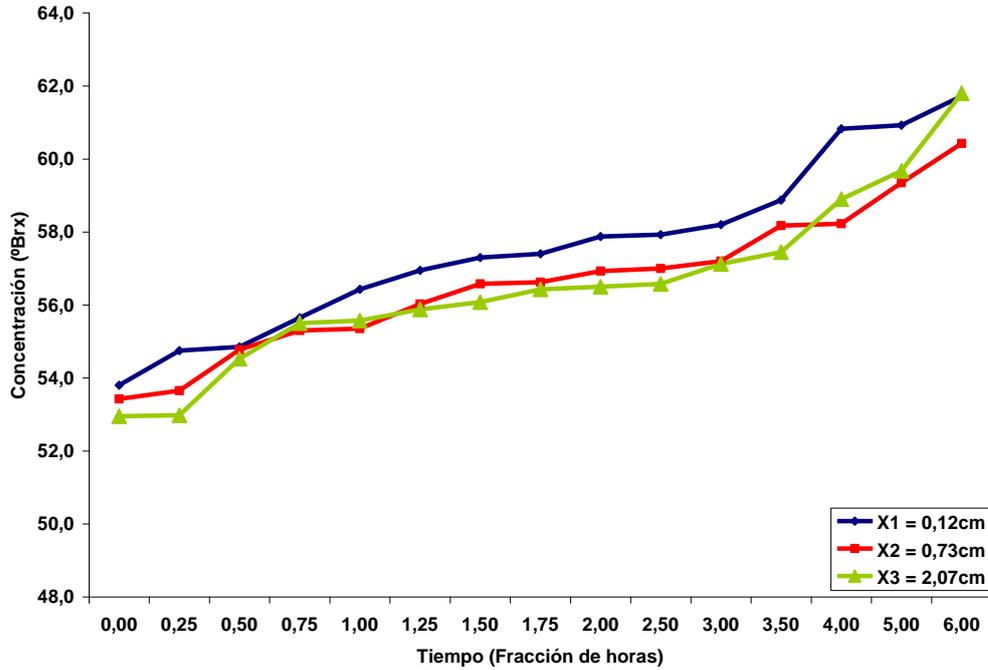


Figura 3. Evolución de sólidos solubles en cerezas deshidratadas osmóticamente con malt50%-isomalt50%, a 40°C. Quinta impregnación. (Promedios)

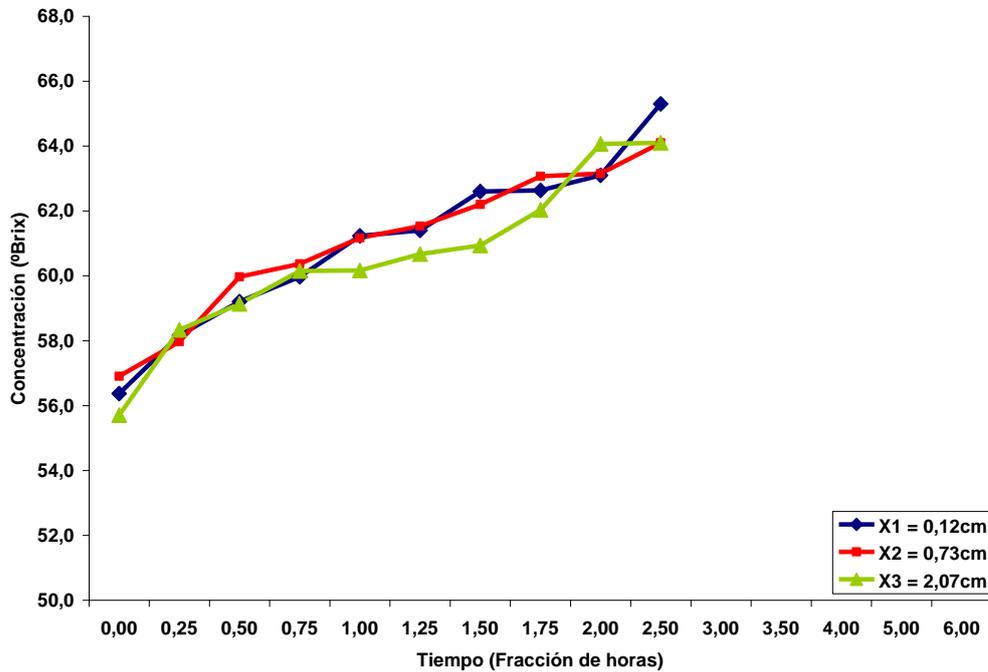


Figura 4. Evolución de sólidos solubles en cerezas deshidratadas osmóticamente con malt50%-isomalt50%, a 60°C. Quinta impregnación. (Promedios)

Evolución de la concentración de sólidos solubles y de la humedad en cerezas deshidratadas osmóticamente para el tratamiento sacarosa50% maltitol50% a 40°C, 50°C y 60°C.



En el caso del tratamiento 50sacarosa-50maltitol la diferencia fue menos notable, ya que concentraciones similares se alcanzaron en 5 horas para el tratamiento a 40°C (**Figura 5**), en 4 horas para 50°C y en 3 horas para 60°C (**Figura 6**). Para el tratamiento a 40°C el valor de humedad alcanzado fue de 32% aproximadamente a las 6 horas de iniciado el ensayo, mientras que dichos valores de humedad se obtuvieron a las 2,5 horas de tratamiento para 50°C y 60°C.

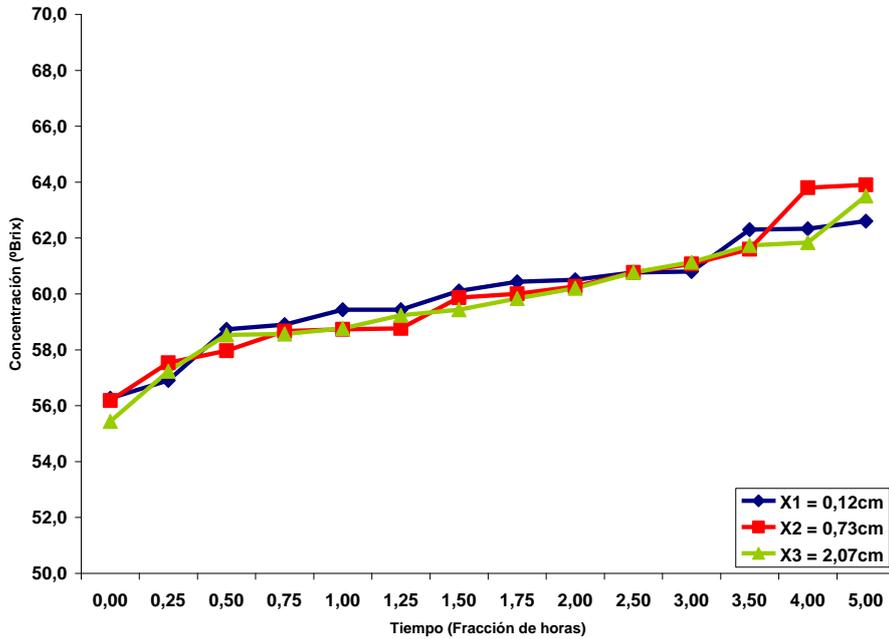


Figura 5: Evolución de sólidos solubles en cerezas deshidratadas osmóticamente con sac50%-malt50%, a 40°C. Quinta impregnación. (Promedios).

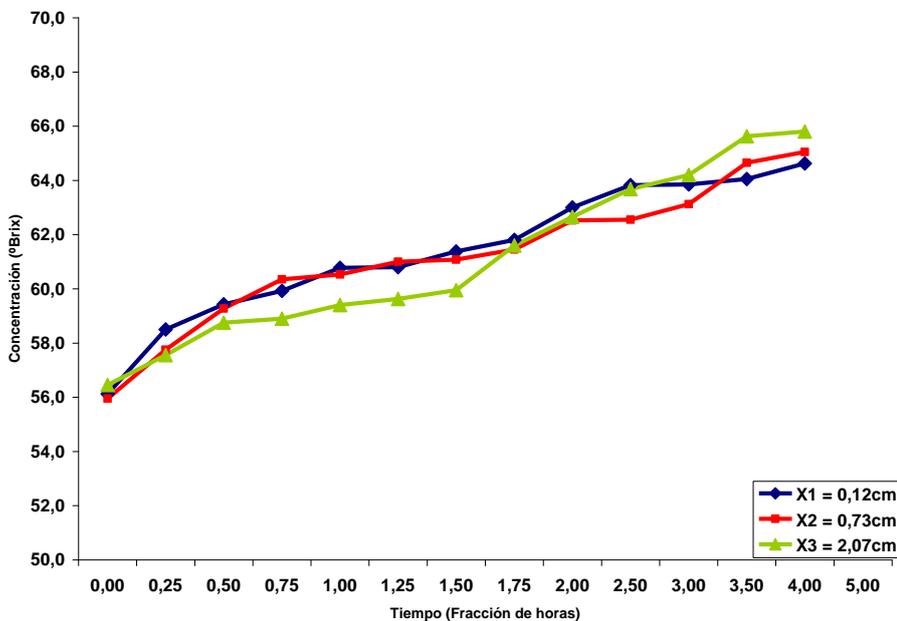


Figura 6. Evolución de sólidos solubles en cerezas deshidratadas osmóticamente con sac50%-malt50%, a 60°C. Quinta impregnación. (Promedios).



Evolución de la concentración de sólidos solubles y de la humedad en cerezas deshidratadas osmóticamente para el tratamiento sacarosa 100% a 40°C, 50°C y 60°C.

En el caso del tratamiento testigo, fue más marcada la diferencia. Para el tratamiento a 40° se lograron 61°Brix de concentración final, al cabo de 5 horas (Figura 7), mientras que para los tratamientos a 50°C y 60°C se alcanzaron 65 °Brix en 6 horas y 3 horas respectivamente (Figura 8), pero también hubo una diferencia inicial de partida de 2 °Brix para las distintas temperaturas al inicio de la quinta impregnación. Las humedades para dicho tratamiento también presentaron un comportamiento acorde con la concentración de sólidos solubles. Para el tratamiento a 40°C la humedad a las 5 horas fue de 37%, obteniéndose un valor similar a las 3 horas para el tratamiento a 60°C. Sin embargo se alcanzó un descenso de humedad de 28% a 50°C.

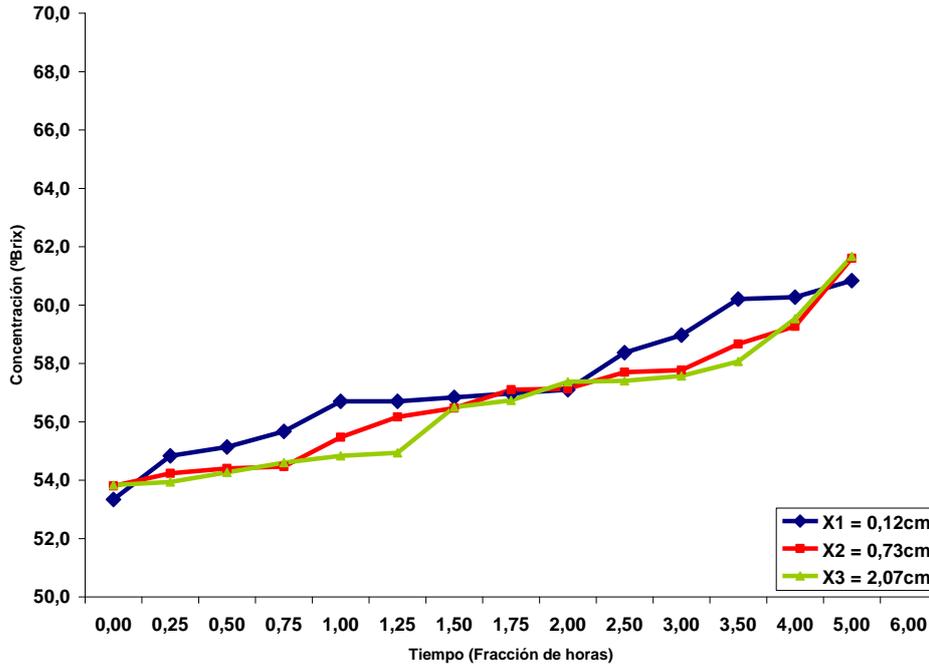


Figura 7. Evolución de sólidos solubles en cerezas deshidratadas osmóticamente con sac100%, a 40°C. Quinta impregnación. (Promedios)



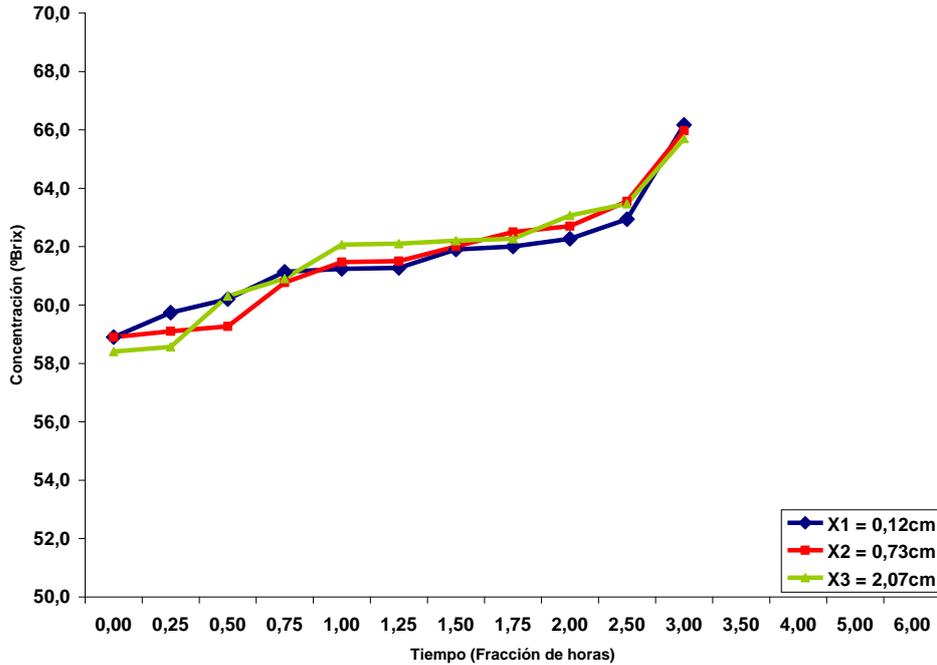


Figura 8. Evolución de sólidos solubles en cerezas deshidratadas osmóticamente con sac100%, a 60°C. Quinta impregnación. (Promedios)

En general, aproximadamente el 80% de la variación de los sólidos solubles dentro de la pulpa, se produjo en las primeras 4 horas de contacto entre la fruta y el edulcorante, lo cual fue consistente con lo hallado por Maldonado et al. (2015). Este fenómeno, si bien fue más notable en las primeras impregnaciones, se observó hasta la quinta impregnación.

Se observó un aumento en la concentración de sólidos solubles medidos en °Brix en el interior de la cereza a medida que transcurría el tiempo, y las diferencias de concentración, a distancias intermedias de cada sección extraída de la pulpa con el sacabocado, desde el centro (0,59cm), donde la concentración siempre fue mayor, descendiendo generalmente el valor en la distancia intermedia (0,91cm), y el de la distancia más externa de la pulpa, que incluía la epidermis (1,46cm), donde la concentración de °Brix fue, generalmente, mayor que en la distancia intermedia, pero menor que la central. Esto evidenció la existencia de dos flujos, uno que penetra desde el centro y otro por afuera, desde la epidermis de la cereza. Los resultados obtenidos fueron consistentes en todas las impregnaciones, con algunas diferencias, dependiendo de la formulación y la temperatura empleadas.

CONCLUSIONES

El procesamiento es una etapa cardinal en el negocio de la cereza ya que, en el valor agregado que se le otorgue al tratamiento de la fruta radica el potencial beneficio económico.

Con el presente trabajo se obtuvieron cerezas en conserva de alto contenido de sólidos solubles, reducidas en azúcares y/o calorías.

Se comprobó que los polialcoholes en estudio y otros polioles presentan distinta capacidad de hidratación y distintos tipos de interacciones agua-azúcar y azúcar-azúcar en sistemas meta estables y pueden cristalizar si estas interacciones últimas aumentan (Multon, 2000).

A partir de los resultados obtenidos, se determinarán los coeficientes de difusividad de los solutos ensayados y del agua en la epidermis y el mesocarpio, pudiendo establecer la cinética de difusión, a las distintas temperaturas y para las diversas formulaciones planteadas. Finalmente, se modelará el fenómeno de difusión que tiene lugar en la elaboración de cerezas en conserva.



BIBLIOGRAFÍA

- Ceballos Chan G. 2005. Estudios en papaya mínimamente procesada por deshidratación osmótica. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Tecnología de Alimentos. Valencia. España. 196 p.
- Chenlo F, Moreira R, Fernández-Herrero C, Vázquez G. 2007. Osmotic dehydration of chestnut with sucrose: mass transfer processes and global kinetics modelling. *Journal of Food Engineering*.78, 765-774.
- Della Rocca P, Mascheroni R. 2010. Secado de alimentos por métodos combinados: Deshidratación osmótica y secado por microondas y aire caliente. TESIS de Maestría en Tecnología de los alimentos. UTN: Facultad Regional Bs. As.
- Deng Y, Zhao Y. 2008. Effect of pulsed vacuum and ultrasound osmopretreatments on glass transition temperature, texture, microstructure and calcium penetration of dried apples (Fuji). *LWT – Food Science and Technology*. 41, 1575-1585.
- Edwards, W. 2002. La ciencia de las golosinas. Ed. Acribia. Zaragoza. España. 184 p.
- Edwards W. 2008. Science Treats. Bardfield Consultants Essex, UK. 200 p.
- Grabitske H; Slavin J. 2008. Low-Digestible Carbohydrates in Practice. *Journal of de American Dietetic Association*. 1677-1681.
- Fundación IDR. Instituto de Desarrollo Rural. 2008. 2015.
- Instituto de Desarrollo Rural (IDR). 2008. 2010. Cereza: Censo Frutícola Provincial Mendoza.
- Instituto de Desarrollo Rural (IDR). Pronóstico de Cosecha de Cereza 2015. (Producción y Comercialización de Cerezas en Mendoza, Argentina Fundación Instituto de Desarrollo Rural Mendoza Cherries Pro Mendoza. Producción y comercialización de cereza en Mendoza – Argentina). 158 p.
- Instituto de Desarrollo Rural (IDR) - Producción y Comercialización de Cerezas en Mendoza, Argentina Fundación Instituto de Desarrollo Rural Mendoza Cherries Pro Mendoza. Producción y comercialización de cereza en Mendoza - Argentina / Fabio Marcos Tacchini [et.al.] ; coordinado por Fabio Marcos Tacchini.- 1a ed. - Mendoza: Fundación IDR, 2015. 373 p.; ISBN: 978-987-45812-0-4.
- Maldonado M, Fonzar M, Carparelli A, Polenta G, Vaudagna S, Denoya G, Sanow C, Robles. N. 2015. Cerezas en Conserva. Los Polialcoholes: Una alternativa para consumidores con regímenes especiales. *La Alimentación Latinoamericana* 317. p. 46.
- Maldonado M, Zuritz C. 2004. El fenómeno de difusión de sodio durante el desamarizado de aceitunas verdes de mesa. Tesis Doctoral. Programa de Posgrado en Biología. Universidad Nacional de Cuyo.
- Multon J. 2000. Aditivos y Auxiliares de Fabricación en las Industrias Agroalimentarias. Ed. Acribia. Zaragoza. España. 806 p.
- Nowacka M., Tylewicz U, Laghi L, Dalla Rosa M, Witrowa-Rajchert D. 2014. Effect of ultrasound treatment on the water state in kiwifruit during osmotic dehydration. *Food Chemistry*, 144, 18-25.
- Ronda F, Gómez M, Blanco C, Caballero P. 2004. Effects of polyols and nondigestible oligosaccharides on the quality of sugar-free sponge cakes. Departamento de Ingeniería Agrícola y Forestal, Tecnología de los Alimentos, E.T.S. Ingeniería Agrarias, Universidad de Valladolid, 34004 Valencia, Spain. Received 16 February 2004. Revised 10 May 2004. Accepted 10 May 2004. Available online 19 July 2004. [<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.05.023>].
- Villarreal P, Santagni A; Romagnoli S. 2006. Pautas Tecnológicas: cerezo. Manejo y análisis económico financiero. INTA. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Estación Experimental del Alto Valle. 140 p.
- World Sweet Cherry Review. Edición 2009. Belrose, Inc. 1045 NE Creston Lane, Pullman, WA 99163-3806, U.S.A.

AGRADECIMIENTOS

Quiero destacar que esta publicación es el fruto de la participación y esfuerzo conjunto entre CONICET, INTA EEA Mendoza, y UTN-FRM, sin cuyo apoyo nada de esto hubiera sido posible.





EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE TANINOS SOBRE EL PERFIL LIPÍDICO EN CARNE DE VACAS DE REFUGO ALIMENTADAS A CAMPO NATURAL

Urbani V. (1), Biolatto A. (1), Vittone J. S. (1), Lado M. (1), Munilla M. E. (1), Perlo F. (2), Tisocco O. (2), Teira, G. (2).

(1) Estación Experimental Agropecuaria, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Ruta 39 Km 143,5. Concepción del Uruguay, Entre Ríos, Argentina.

(2) Laboratorio de Industrias Cárnicas, Facultad de Ciencias de la Alimentación, Universidad Nacional de Entre Ríos (UNER). M. Monseñor Tavella 1450, Concordia, Entre Ríos, Argentina.

urbani.valeria@inta.gob.ar

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la suplementación de taninos sobre la composición de ácidos grasos del músculo longissimus dorsi (LD) de carne de vaca de refugio alimentadas a campo natural. Se utilizaron 24 vacas de refugio (Hereford y Polled Hereford). Se asignaron aleatoriamente a dos tratamientos, T1: campo natural con suplementación energética/proteica sin agregado de taninos y T2: campo natural con suplementación energética/proteica con agregado de taninos de quebracho colorado (*Schinopsis balansae*) 80g/día. Las muestras de carne obtenidas del LD se procesaron para determinar el perfil lipídico. Los resultados obtenidos mostraron que los tratamientos estudiados no provocaron diferencias significativas ($P>0,05$) en el contenido de ácidos grasos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) y poliinsaturados (AGPI). Lo mismo ocurrió con las relaciones AGPI/AGS y n-6/n-3. Sin embargo, el ácido esteárico (C18:0), evidenció un menor contenido en el T2 comparado al T1 (389,64 vs 435,61 mg/100g músculo, respectivamente). El contenido del isómero cis-9, trans-11 del ácido linoleico conjugado (CLA) fue similar para ambos tratamientos. Acorde a los resultados obtenidos se puede concluir que la dosis de taninos utilizada en la presente investigación no provocó cambios apreciables en la composición de ácidos grasos de la carne de vaca de refugio.

Palabras claves: taninos, ácidos grasos, vaca de refugio.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of tannin supplementation on fatty acid composition in the muscle longissimus dorsi (LD) of cull cow fed natural field. Cull 24 cows (Hereford and Polled Hereford) were used. They were randomly assigned to two treatments, T1: natural field with energy / protein supplementation without addition of tannin and T2: natural field with energy / protein supplementation with addition of tannins from quebracho (*Schinopsis balansae*) 80 g / day. The meat samples obtained from LD were processed for determination of lipid profile. The results showed that the treatments did not promote significant differences ($P> 0.05$) in the amount of SFA, MUFA and PUFA. The same result was obtained for PUFA / SFA and n6 / n3 PUFA ratio. However, stearic acid (C18: 0) showed a lower amount in T2 compared to T1 (389.64 v. 435.61 mg/100g of muscle, respectively.). The amount of isomer cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid (CLA) was similar for both treatments studied. According to the results, it can be concluded that the dose of tannins, used as feed supplementation in natural field, did not promote appreciable changes in the fatty acid composition of beef cull.

Keywords: tannins, fatty acid, cull cows.

INTRODUCCIÓN

La carne y los productos cárnicos contienen importantes niveles de proteínas, vitaminas, minerales y micronutrientes esenciales para el crecimiento y el desarrollo. La carne bovina es un alimento esencial que



forma parte de una dieta equilibrada, aportando valiosos nutrientes beneficiosos para la salud (FAO 2014). La vaca de refugio representa un importante ingreso para la empresa de cría llegando a componer hasta el 50% de los kilos producidos y de los ingresos brutos anualmente. Asimismo, las vacas son vendidas a precios de invernada para ser engordadas en pasturas o encierres o directo para faena como vaca conserva. Vittone y Biolatto (2012) estudiaron estrategias de producción a fin de mejorar la calidad en esta categoría vacuna tanto en volumen de producción como en calidad de carne. Los mismos demostraron que la inclusión del destete hiperprecoz en vacas que son refugadas del sistema en pastizal natural y sin pasar por un proceso de invernada (engorde) adicional, presentan a la faena reses con valores de cortes valiosos comparables a vacas destetadas convencionalmente y terminadas a corral.

El consumo alimenticio en base a la cantidad y tipo de grasa está relacionado a la ocurrencia de enfermedades cardiovasculares en los individuos, especialmente el alto contenido en ácidos grasos saturados (AGS) produce un aumento del nivel del colesterol malo para la salud conocido como LDL (lipoproteína de baja densidad). Por el contrario, algunos ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) y los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) tienen efectos beneficiosos sobre la salud humana (Sacks y Katana 2002, Simopoulos 1999). Asimismo, el isómero cis9-trans11 del ácido linoleico conjugado (CLA) demostró reducir la incidencia de la aterosclerosis (Lee et al., 2005), diabetes (Houseknecht et al., 1998) y cáncer (Ip et al., 1991) en experimentos con animales. Las fuentes naturales principales del isómero cis9-trans11 del CLA son la carne y la leche de los rumiantes.

De acuerdo a Pordomingo et al. (2005) los sistemas pastoriles permiten mejorar el tipo de ácidos grasos presentes en la carne bovina debido al mayor contenido de AGPI de los forrajes y en particular del precursor C18:3n-3 (ácido linolénico) en comparación con los granos de cereales (Mandell et al., 1998; Lorenz et al., 2002; García et al., 2003; Wood et al., 2003; Raes et al., 2004). El balance en la dieta humana de ácidos grasos omega 6 (n-6) y omega 3 (n-3) es un factor importante asociado a la prevención de las enfermedades cardiovasculares. La relación ideal de ácidos grasos n-6/n-3 de la dieta es de 5 o menor (Pordomingo et al., 2005).

En los rumiantes, el contenido de ácidos grasos en el músculo se ve afectado por el proceso de biohidrogenación ruminal. Por lo tanto, el aumento de la biosíntesis de ácidos grasos beneficiosos para la salud y la reducción de los AGS resultaría alentador para mejorar la calidad nutricional de la carne vacuna (Vasta et al., 2009). Acorde a Pordomingo et al. (2005), en vaquillonas los ácidos grasos insaturados son hidrogenados en el rumen de manera eficiente, sin embargo, cierta proporción de los mismos escapa a la hidrogenación y son absorbidos como tal. El CLA se genera como metabolito intermedio durante el proceso de biohidrogenación ruminal del C18:2 y una porción del mismo escapa al rumen y es incorporado al tejido graso. Raes et al. (2003) demostraron que el contenido del isómero cis-9, trans-11 del CLA C18:2 varía entre 0,2 y 1,0 g/100g del total de ácidos grasos en la grasa intramuscular del LD.

Los taninos son compuestos polifenólicos que no se identifican como nutrientes esenciales, sin embargo, se les atribuyen efectos positivos sobre la salud por su actividad como antioxidantes (Vázquez Flores et al. 2012). Barragan et al. (2014), mostraron que los taninos presentes en plantas forrajeras ejercen un efecto antioxidante en la carne, cuando son utilizados como suplemento en la dieta suministrada a bovinos. Se conoce que los mismos ejercen su acción sobre la biohidrogenación del rumen. (Vasta et al., 2009). Priolo et al. (2000, 2005) y Vasta et al. (2007), mostraron que los taninos afectan el color y la composición de ácidos grasos de la carne de pequeños rumiantes.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la suplementación de taninos sobre la composición de ácidos grasos del músculo LD de carne de vaca de refugio alimentadas a campo natural.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y diseño experimental

El estudio se llevó a cabo con veinticuatro vacas de refugio de raza Hereford y Polled Hereford alimentadas sobre una base forrajera de campo natural (dominado por especie C4). Los animales se distribuyeron homogéneamente en 2 grupos de 12 animales cada uno, y alojados en potreros individuales. Cada grupo se asignó aleatoriamente a dos tratamientos: T1 = Dieta basada a campo natural en suplementación



energética/proteica a base de maíz molido y urea (1% peso vivo). T2 = Dieta basada a campo natural con incorporación de taninos de Quebracho colorado (*Schinopsis balansae*) en polvo a una ración de 80g/día por animal en suplementación energética/proteica a base de maíz molido y urea (1% peso vivo). Los datos de aumento de peso se analizaron tomando al animal como unidad experimental y luego que los mismos alcanzaron una condición corporal igual o mayor a 6 puntos (escala de 1 a 9) y un espesor de grasa dorsal igual o mayor a 6mm, se faenaron en un frigorífico de la ciudad de Concordia. Las reses se refrigeraron en cámaras con circulación forzada de aire ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) durante 24 h. Las muestras de carne se tomaron del músculo LD, se envasaron al vacío y se congelaron a -18°C hasta su análisis. El ensayo se estableció de acuerdo a un diseño completamente aleatorizado, con 12 animales por tratamiento. El factor fue la suplementación a dos niveles, con y sin taninos, conformando un arreglo factorial de 1x2.

Análisis de ácidos grasos

El análisis de la composición de ácidos grasos se realizó sobre muestras del músculo LD, en el laboratorio de cromatografía gaseosa de la Estación Experimental Agropecuaria del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), en Concepción del Uruguay, Entre Ríos. Las muestras de LD se procesaron por triplicado de acuerdo a O'Fallon et al. (2007). Los metil ésteres de ácidos grasos (FAME) se separaron por cromatografía de gases utilizando un cromatógrafo modelo Clarus 680 marca PerkinElmer equipado con un detector de ionización de llama y un sistema de inyección automática CombiPAL usando una columna capilar HP-88 (100 m x 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 μm de espesor de película). Se utilizó nitrógeno como gas portador con un caudal de 1,0 ml / min. El inyector y detector se mantuvieron a temperatura constante de 250°C y 270°C , respectivamente. La programación de las condiciones del horno fue la siguiente: 80°C a 220°C , a $4^{\circ}\text{C} / \text{min}$ y se mantuvo durante 5 min; posteriormente se incrementó a 240°C a $2^{\circ}\text{C} / \text{min}$ y se mantuvo durante 10 min. La identificación se realizó mediante la comparación del tiempo de retención de los FAME desconocidos con mezcla estándar de FAME (37 FAME, Supelco Inc., Bellefonte, PA, Estados Unidos) y con el estándar cis y trans-9,11- y -10,12-octadecadienoico (O5632 Sigma). El análisis cuantitativo se realizó utilizando ácido undecanoico como estándar interno (94090 Fluka).

Se efectuó el análisis de varianza (ANOVA) de los datos para evaluar el efecto del tratamiento a un nivel de confianza del 95%, utilizando el software estadístico INFOSTAT v.2016.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de varianza del estudio del efecto del tratamiento estudiado sobre el perfil de ácidos grasos no resultó significativo ($P>0,05$).

En la **Tabla I** se muestran los resultados de la composición de los ácidos grasos en las muestras de LD para cada tratamiento estudiado. Los resultados obtenidos muestran que los tratamientos estudiados no provocaron diferencias significativas ($P>0,05$) en el contenido de ácidos grasos saturados (AGS mg/100g músculo, T1: 1221,54 y T2: 1223,41); monoinsaturados (AGMI mg/100g músculo, T1: 1204,91 y T2: 1200,48); y poliinsaturados (AGPI mg/100g músculo, T1: 127,71 y T2: 124,41). Si bien el contenido de AGS resultó similar en los tratamientos ensayados, en la **Tabla I** se observa que el ácido esteárico (C18:0), un importante ácido graso saturado hallado en carne roja, evidenció un menor contenido en la carne proveniente del tratamiento con suplementación de taninos (T2: 389,64 mg/100g músculo) comparado al tratamiento sin suplementar (T1: 435,61 mg/100g músculo). El contenido del isómero cis-9, trans-11 del ácido linoleico conjugado (CLA), el más abundante del total de isómeros de CLA en productos de rumiantes y considerado el principal promotor de efectos benéficos hacia la salud humana, fue similar para ambos tratamientos: 11,28 y 11,73 mg/100g músculo para T1 y T2, respectivamente. Asimismo, el valor de la relación AGPI/AGS fue el mismo para ambos tratamientos; siendo el valor de 0,1. El agregado de taninos a la alimentación base no modificó la relación n6/n3 ($P>0,05$) resultando 6,04 para el T1 y 6,75 para el T2. Estos resultados concuerdan con aquellos publicados por Pordomingo et al. (2005) quienes no encontraron diferencias ($P>0,05$) en la relación n-6/n-3 de la carne proveniente de vaquillonas alimentadas con distintos niveles de grano y adición de taninos. Asimismo, Vasta et al. (2009) no hallaron diferencias significativas en la relación n-6/n-3 en carne ovina de animales alimentados a campo natural suplementados con taninos (8,93% en base seca).





Tabla I. Media \pm desviación estándar de los ácidos grasos del músculo LD provenientes de vacas de refugio alimentadas a campo natural sin agregados de taninos (T1) y con agregado de taninos (T2), en mg AG/100g músculo.

Ácidos grasos	T1	T2
C14:0	72,69 \pm 29,14	86,77 \pm 24,47
C14:1	15,06 \pm 5,42	24,7 \pm 9,75
C15:0	10,81 \pm 4,38	11,93 \pm 4,07
C16:0	665,65 \pm 251,36	700,19 \pm 241,96
C16:1	99,42 \pm 35,62	115,78 \pm 28,03
C17:0	26,3 \pm 11,3	25,11 \pm 12,53
C18:0	435,61 \pm 204,38	389,64 \pm 235,5
C18:1 n-9 c	1051,19 \pm 415,21	1025,36 \pm 465,62
C18:2 n-6 c	87,04 \pm 23,92	85,02 \pm 23,12
C18:3 n-6	3,82 \pm 1,98	4,08 \pm 1,16
C18:3 n-3	17,89 \pm 7,96	15,07 \pm 5,33
C20:1	2,27 \pm 1,84	2,76 \pm 0,78
CLA c9, t11 ^a	11,28 \pm 4,68	11,73 \pm 5,63
C22:0	10,46 \pm 2,62	9,75 \pm 4,14
C22:1 n-9	37,99 \pm 8,44	33,37 \pm 10,36
C22:2 n-6 c	11,49 \pm 2,19	10,34 \pm 2,61
AGS ^b	1221,54 \pm 491,04	1223,41 \pm 501,78
AGMI ^c	1204,91 \pm 454,65	1200,48 \pm 493,99
AGPI ^d	127,71 \pm 36,35	124,41 \pm 34,52
n-6 ^e	100,98 \pm 27,49	97,59 \pm 27,01
n-3 ^f	17,89 \pm 7,96	15,07 \pm 5,33
AGPI/AGS ^g	0,1 \pm 0,01	0,1 \pm 0,01
n-6/n-3 ^h	6,04 \pm 1,57	6,75 \pm 1,44

^a CLA: ácido linoleico conjugado cis 9, trans 11.

^b \sum AGS = C14:0 + C15:0 + C16:0 + C17:0 + C18:0 + C22:0.

^c \sum AGMI = C14:1 + C16:1 + C18:1 n-9 cis + C20:1 + C22:1 n-9

^d \sum AGPI = C18:2 n-6 cis + C18:3 n-6 + C18:3 n-3 + cis-9, trans-11 + C22:2

^e n-6 = C18:2 n-6 cis + C18:3 n-6.

^f n-3 = C18:3 n-3 + C22:6 n-3.

^g Relación entre \sum AGPI y \sum AGS.

^h Relación entre \sum n-6 y \sum n-3.

CONCLUSIONES

Los resultados hallados en el presente ensayo mostraron que la dosis de taninos condensados de quebracho colorado adicionados a la dieta base de campo natural, no afectó de manera significativa la composición de los ácidos grasos en el músculo longissimus dorsi de la carne de vaca de refugio. Los AGS resultan similares en los tratamientos estudiados (1221,54 mg/100 g músculo para el T1 y 1223,41mg/100 g músculo para el T2). Sin embargo, el contenido de C18:0 en el tratamiento sin suplementación de taninos resultó mayor que el del tratamiento suplementado (436 mg/100g músculo para el T1 y 390mg/100g músculo para el T2). Futuras investigaciones podrían abordar el estudio del impacto de la adición de taninos sobre la calidad



nutricional en otro tipo de alimentación, como ser el sistema feedlot crecientemente usado en los últimos años por los productores ganaderos. Esto último, podría generar una estrategia alentadora de agregado de valor a la carne de vaca de refugio tanto para el productor como así también para el consumidor final a quien le resulta un factor importante la calidad nutricional de la carne vacuna.

BIBLIOGRAFÍA

- Barragán González H., Hernández Mendo O., Hernández Sánchez D., Saturnino Mora J., Aranda Osorio G. y Ponce A. 2014. XLI Reunión de la Asociación Mexicana para la Producción Animal y Seguridad Alimentaria A.C. (AMPA) y VII Reunión Nacional de Sistemas Agro y Silvopastoriles. México. Estabilidad oxidativa de la carne de bovino en respuesta a suplementación con taninos en la dieta, Págs.: 241-244.
- FAO. 2014. Producción y Sanidad Animal: Consumo de Carne. Disponible en: URL: <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/background.html>. Acceso Junio 2016.
- García, P.T., Pensel N.A., Margaría C.A, Rosso O. and J.J.Casal. 2003. Steer serum fatty acids as indicators of grass or grain based diets. *Fleischwirtschaft International*, 2: 42- 43.
- Houseknecht, K., Vanden Heuvel, J. P., Moya-Camarena, S. Y., Portocarrero, C. P., Peck, L. W., Nickel, K. P., et al. 1998. Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty/fa rat. *Biochemical Biophysical Research Communication*, 244: 678–682.
- Ip, C., Chin, S. F., Scimeca, J. A., & Pariza, M. W. 1991. Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Research*, 51:6118–6124.
- Lee, J. H., Cho, K. H., Lee, K. T., Kim, M. R. 2005. Antiatherogenic effects of structured lipid containing conjugated linoleic acid in C57BL/6J mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 7295–7301.
- Lorenz, S., Buettner A., Ender K., Nürnberg G., Papstein H.J. Schieberle P. and Nürnberg K. 2002. Influence of keeping system on the fatty acid composition in the longissimus muscle of bulls and odorants formed after pressure-cooking. *Eur. Food Res. Technol.*, 214: 112-118.
- Mandell, I.B., Buchanan-Smith J.G., and Campbell C.P. 1998. Effects of forage vs. grain feeding on carcass characteristics, fatty acid composition, and beef quality in Limousin-cross steers when time on feed is controlled. *J. Anim. Sci.*, 76: 2619-2630.
- O'Fallon, J. V., Busboom, J. R., Nelson, M. L., Gaskins, C. T. 2007. A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: Application to wet meat tissues, oils and feedstuffs. *Journal of Animal Science*, 85: 1511-1521.
- Pordomingo A. 2015. Producción bovina para carne en Argentina. Disponible en: URL:http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_produccion_de_carne_bovina_en_argentina.pdf. Acceso Junio 2016.
- Pordomingo A., Volpi Lagreca G., Garcia Pilar T., Grigioni G. 2005. Efecto del agregado de taninos en dietas de distinto nivel de grano en vaquillonas para carne alimentadas en confinamiento sobre la calidad de la carne. Sitio Argentino de Producción Animal. Boletín de Divulgación Técnica N°88. Disponible en: http://www.produccionbovina.com/informacion_tecnica/invernada_o_engorde_a_corral_o_feedlot/20-agregado_taninos.pdf
- Raes, K., De Smet S. and Demeyer D. 2004. Effect of dietary fatty acids on incorporation of long chain polyunsaturated fatty acids and conjugated linoleic acid in lambs, beef and pork meat: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 113: 199-221.
- Sacks F., Katan M. 2002. Randomized clinical trials on the effects of dietary fat and carbohydrate on plasma lipoproteins and cardiovascular disease. *The American Journal of Medicine*, 113: 13-24.
- Vasta V., Priolo A., Scerra M., Hallett K., Wood J., Doran O. 2009. Δ^9 Desaturase protein expression and fatty acid composition of longissimus dorsi muscle in lambs fed green herbage or concentrate with or without added tannins. *Meat Science*, 82: 357-364.
- Vázquez Flores A., Alvarez Parrilla E., Lopez Diaz J., Wall Medrano A., De la Rosa L. 2012. Taninos hidrolizables y condensados: naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo. *Tecnociencia Chihuahua*. Vol. 6. Págs.: 84-93.
- Vittone S. y Biolatto A. 2012. Destete hiperprecoz y calidad de carne de vacas de refugio. Disponible en: URL: <https://fcvinta.files.wordpress.com/2014/03/gacetilla-nc2ba-4-calidad-carne-vaca-refugio-inta-aca.pdf>.
- Wood, J. D. and M. Enser. 1997. Factors influencing fatty acids in meat and the role of antioxidants in



improving meat quality. *British J. Nutr.*, 78: 49.



DESARROLLO DE UN MÉTODO *IN VITRO* PARA ESTIMAR LA BIOACCESIBILIDAD DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN FRUTAS FINAS

Van de Velde F. (1, 2); Rico M.N. (1), Pirovani M.E. (1), Drago S.R. (1, 2)

(1) Instituto de Tecnología de Alimentos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

(2) Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

fvandavelde@fiq.unl.edu.ar

RESUMEN

Este trabajo presenta un modelo de digestión, fermentación y diálisis *in vitro* para determinar la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos de frutas finas (frutillas 'Camino Real' y zarzamoras 'Jumbo', 'Black Satin' y Dirksen'). Además, se cuantificó la retención de capacidad antioxidante (CA) en cada una de las fracciones digeridas. La bioaccesibilidad intestinal (BI) de fenoles totales (FT) fue del 11% para todas las zarzamoras y del 16% para las frutillas. La bioaccesibilidad colónica (BC) de FT fue mayor para todas las frutas estudiadas en comparación con la BI. 'Black Satin' exhibió 61% de BC, 1,4 veces mayor a BC de 'Dirksen' y 'Black Satin' y 1,9 veces mayor a la BC de las frutillas. La BI de antocianinas totales (AT) de las frutillas (15,3%) fue 2 veces mayor a la BI las zarzamoras. Además, las frutillas presentaron mayor BC de AT (16%), 3 veces mayor que para las zarzamoras. Los compuestos fenólicos que dializaron a nivel intestinal representaron el 10% de la CA original de las zarzamoras y el 6% de las frutillas. Además, la retención de CA a nivel colónico fue más alta que a nivel intestinal, en concordancia con los mayores niveles de FT dializados en esta etapa.

Palabras clave: zarzamoras, frutillas, antocianinas totales, intestino delgado, colon.

ABSTRACT

This work presents an *in vitro* model of digestion, fermentation and dialysis to determine the bioaccessibility of phenolic compounds from berries (strawberries 'Camino Real' and blackberries 'Jumbo', 'Black Satin' and Dirksen'). In addition, the antioxidant capacity (AC) retention of each fraction obtained after each gastrointestinal step was quantified. The intestinal bioaccessibility (IB) of total phenolics (TP) was 11% for all blackberries varieties and 16% for strawberries. The colonic bioaccessibility (CB) of TP was higher for all studied fruits compared to IB. 'Black Satin' exhibited 61% CB, 1,4 times higher than CB obtained for 'Dirksen' and 'Black Satin' blackberries, and 1,9 times higher than CB analyzed for strawberries. The IB of total anthocyanins (TA) for strawberries (15.3%) was 2 times higher than IB for blackberries. In addition, strawberries presented higher CB of TA (16%), almost 3 times higher than CB observed for blackberries. Phytochemicals that have dialyzed at intestinal level represented 10% of the AC of undigested blackberries and 6% of undigested strawberries. Moreover, the retention of AC at colonic level was higher than values obtained at intestinal level, in agreement with the highest amounts of dialyzed TP observed at that gastrointestinal step.

Keywords: blackberries, strawberries, anthocyanins, small intestine, colon

INTRODUCCIÓN

Los compuestos fenólicos o polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas y representan los antioxidantes más abundantes de la dieta. Comprenden una amplia variedad de compuestos simples o polimerizados formados por uno o varios anillos aromáticos unidos a uno o más grupos hidroxilos (Hannum 2004). Los polifenoles se pueden clasificar en diferentes grupos en función del número de anillos fenólicos



que contienen y de los elementos estructurales que se unen a estos últimos. Estos grupos son: flavonoides, ácidos fenólicos, taninos (hidrolizables y condensados), estilbenos y lignanos (D'Archivio et al. 2007).

Las frutas finas (frutillas, arándanos, zarzamoras, etc.) son muy populares debido a su atractivo color y sabor y son reconocidas por ser muy ricas en compuestos fenólicos con propiedades promotoras de la salud (Van de Velde et al. 2016a). Las antocianinas son los compuestos fenólicos flavonoides más importantes de las frutas finas, responsables del color de las mismas. Las antocianinas más comúnmente encontradas en frutillas están basadas en pelargonidina y cianidina, siendo pelargonindin-3-*O*-glucosido la principal antocianina reportada (Lopes da Silva et al. 2007, Van de Velde et al. 2013, 2016b). Para las zarzamoras, cianidin-3-*O*-glucósido es la principal antocianina reportada, representando más del 85% del total de antocianinas y más del 65% del total de los compuestos fenólicos (Van de Velde et al. 2016a). Otros compuestos fenólicos importantes en frutas finas son los taninos hidrolizables (ácido gálico y elagitaninos), flavonoles y flavanoles, incluyendo proantocianidinas (Mertz et al. 2007).

Estudios epidemiológicos indican que el consumo de frutas y verduras protege contra el desarrollo de enfermedades degenerativas, tales como ciertos tipos de cáncer, enfermedades cardio-cerebrovasculares, y el control de la diabetes y la obesidad. Estos beneficios estarían vinculados con una combinación óptima de compuestos antioxidantes y anti-inflamatorios presentes en estos productos, tales como los polifenoles, vitaminas C y E, etc. (Álvarez-Suárez et al. 2014).

Los efectos de los compuestos fenólicos sobre la salud dependen de su bioaccesibilidad, es decir de la cantidad presente en el alimento que llega a la luz intestinal como consecuencia de su liberación de la matriz alimentaria, y que puede ser absorbido para ejercer un efecto sistémico o local (Saura-Calixto et al. 2007). El metabolismo de los polifenoles se produce a través de una vía común, en donde las agliconas pueden ser absorbidas directamente por el intestino delgado. Sin embargo, la mayoría de los polifenoles están presentes en los alimentos en forma de ésteres, glucósidos, o polímeros, por lo que no pueden ser absorbidos en su forma nativa. Por lo tanto, estas sustancias deben ser hidrolizadas por las enzimas intestinales o por la microflora del colon antes de que puedan ser absorbidas (Manach et al. 2004).

Entonces, además de identificar y cuantificar el contenido total de compuestos fenólicos de un producto vegetal determinado, se vuelve fundamental conocer la bioaccesibilidad de estos compuestos.

La bioaccesibilidad de nutrientes debería ser evaluada idealmente en estudios humanos. Sin embargo, la complejidad y los costos limitan su aplicabilidad (Lutten et al. 1996). Los métodos de digestión y diálisis *in vitro* pueden simular las condiciones gastrointestinales y permiten el estudio de los cambios en los componentes dietarios durante las fases gástrica e intestinal de forma rápida, reproducible y segura (You et al. 2010). En la bibliografía existen algunos métodos *in vitro* para determinar la bioaccesibilidad de los polifenoles a nivel de intestino delgado (Tagliacruz et al. 2010, Bouayed et al. 2011, Quiros-Sauceda et al. 2015), pero estas metodologías no consideran la fracción de polifenoles metabolizados por la microflora del colon que pueden ser absorbidos por el intestino grueso, aumentando su bioaccesibilidad. Saura-Calixto et al. (2007) han estudiado la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos y han propuesto una metodología *in vitro* que incluye una etapa de fermentación que simula los procesos que tienen lugar a nivel colónico, lo cual también permite estimar los compuestos fenólicos bioaccesibles a nivel de intestino grueso. Basados en esta metodología, los autores reportaron que cerca del 48% de los polifenoles de la dieta española son bioaccesibles en el intestino delgado, mientras que el 42% es bioaccesible a nivel de intestino grueso. Además, determinaron que una pequeña cantidad de los polifenoles dietarios (10%) es inaccesible y permanece en la matriz del alimento luego del proceso digestivo completo. Esta metodología cuantifica la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos a nivel del intestino delgado, pero podría sobreestimar la cantidad de compuestos fenólicos bioaccesibles a nivel colónico, dado que evalúa la fracción soluble luego del proceso fermentativo, no discriminando compuestos de alto y bajo peso molecular potencialmente absorbibles. Por lo tanto, la incorporación de membranas de diálisis en la etapa fermentativa permitiría conocer de manera efectiva la fracción de los compuestos fenólicos que serían potencialmente absorbibles por el intestino grueso.

En este trabajo se propone aplicar un modelo de digestión y diálisis *in vitro* para determinar la bioaccesibilidad de los polifenoles presentes en frutas finas, simulando tanto la digestión y absorción en el



intestino delgado, como en el colon. Para ello se incorporará una etapa de fermentación y diálisis que permitirá estimar la fracción de polifenoles que tras ser metabolizada por las enzimas de las bacterias colónicas puede ser absorbida en el intestino grueso. Además, se cuantificará el porcentaje de capacidad antioxidante remanente en cada porción obtenida luego de la digestión gastrointestinal en relación a la capacidad antioxidante de la fruta sin digerir.



MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se emplearon frutillas (*Fragaria ananassa* Duch. variedad 'Camino Real') y zarzamoras (*Rubus fruticosus* variedades 'Jumbo', 'Blacksatin' y 'Dirksen'), provenientes de Coronda (Santa Fe). Las frutas se transportaron 60 kilómetros desde el campo al laboratorio, se congelaron a -80°C y se liofilizaron en un liofilizador Flexy-dry (SP Scientific, EE.UU.).

Preparación de extractos de frutas finas

A 0,1g de zarzamoras liofilizadas y 0,2g de frutillas liofilizadas se le agregaron 25mL de acetona (80%) /agua (20%). Las mezclas se homogeneizaron, se sonicaron por 10 min, y se centrifugaron a 12000g por 20 min a 4°C . Los sobrenadantes se separaron y usaron para los análisis correspondientes a las frutas sin digerir.

Modelo gastrointestinal con fermentación colónica *in vitro*

Para simular las condiciones de las fases gástrica e intestinal del proceso digestivo se empleó el método de Drago et al. (2005). Se partió de porciones de frutas finas liofilizadas, las cuales fueron hidratadas antes de comenzar las experiencias de digestión. Para la etapa gástrica, se utilizó una solución de pepsina 16% en ácido clorhídrico 0,1 N (pH 2) y se incubó por 2 h a 37°C en baño con agitación. Para la etapa intestinal, se incorporaron membranas de diálisis (cut-off: 6-8 kDa) conteniendo una solución de bicarbonato de sodio que permite ajustar el pH a 6,5, simulando el pH del duodeno, y se incubó por 50 min. Posteriormente, se agregó una solución de bilis-pancreatina en bicarbonato de sodio 0,1 N (Bilis 1%, Pancreatina 0,4%) y se incubó por 2 h a 37°C con agitación. Se prepararon blancos de digestión reemplazando el peso de muestra por agua, los cuales fueron sometidos al mismo proceso digestivo.

Para simular la etapa de fermentación colónica se empleó y modificó la metodología de Saura-Calixto et al. (2007). Se preparó un inóculo (100 g/L) a partir del contenido cecal de ratas macho 'Wistar' en caldo de cultivo tioglicolato con indicador (Laboratorios Britania S.A., Argentina) para microorganismos anaerobios. Se agregaron membranas de diálisis (6-8 kDa) antes de comenzar la etapa fermentativa y se incubó en anaerobiosis por 24 h a 37°C en baño con agitación. Se preparó un control positivo con rafinosa, hidrato de carbono totalmente fermentable. Finalmente, la etapa de fermentación se detuvo adicionando 2,5 mL de NaOH 1 M a cada muestra. Los dializados de ambas etapas digestivas se usaron para los análisis.

Análisis de fenoles totales (FT)

El contenido de FT se determinó espectrofotométricamente utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu según Singleton y Rossi (1965). A alícuotas de extracto, dializado o estándar se agregaron 0,125 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu, 0,5 mL de solución de carbonato de sodio (10%) y agua destilada hasta completar a 2,5 mL. Se dejó reaccionar durante 30 min y se midió la absorbancia a 760nm. Los blancos se prepararon reemplazando el volumen de muestra por acetona (80)/ agua (20). Se realizó una curva de calibrado de ácido gálico (AG) de 10-100 mg/L y los resultados se expresaron en mg de AG/g peso seco (PS).

Análisis de antocianinas totales (AT)

El contenido de AT se determinó con el método diferencial de pH según Heo y Lee (2005). Se midió la absorbancia de los extractos, dializados a 510 y 700 nm en soluciones reguladoras a pH 1 y 4,5 usando un lector de placas ASYS UVM 340 (Biochrom, Inglaterra). La absorbancia se convirtió a mg pelargonin-3-*O*-glucósido (frutillas) o cianindin-3-*O*-glucósido (zarzamoras)/g PS, usando un coeficiente de extinción molar de 22.400 L/(mol.cm) y una absorbancia expresada en la Ecuación 1:

$$A = [(A_{510} - A_{700})_{\text{pH}=1} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}=4,5}]^{(1)}$$

Análisis de capacidad antioxidante (CA)

La CA de las muestras se estimó espectrofotométricamente mediante la determinación de la capacidad de neutralización de radicales libres utilizando el radical DPPH, de acuerdo Brand-Williams et al. (1995) con algunas modificaciones. Para esto, se tomaron alícuotas de extracto, dializado o estándar y se mezclaron con 190 μL del radical DPPH (0,08 mmol/L en metanol). Las muestras se mantuvieron en oscuridad durante 90 min de reacción y luego se registró la absorbancia a 517nm en lector de placas. La diferencia entre el blanco



(DPPH en metanol) y la muestra se utilizó para calcular el porcentaje de inhibición (Ecuación 2):



$$\text{Inhibición (\%)} = \left(\frac{A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra/estándar}}}{A_{\text{blanco}}} \right) \times 100 \quad (2)$$

Donde A_{blanco} : es la absorbancia del blanco de reacción y $A_{\text{muestra/estándar}}$: es la absorbancia de la muestra o estándar, respectivamente.

Se determinó la capacidad antioxidante equivalente al butilhidroxitolueno (BHT), para la cual se construyó una curva de calibrado con BHT en el rango de concentraciones de 20 a 100 mg/L. Los resultados se expresaron como mg de BHT/g PS.

Cálculos para estimar la bioaccesibilidad y la retención de CA

La bioaccesibilidad intestinal (BI) y colónica (BC) se estimaron como la fracción dializable de FT y AT en cada etapa, en relación al contenido total de fenoles o antocianinas de la muestra sin digerir. La bioaccesibilidad total (BT) se calculó como la suma de la BI y BC de FT y AT. El porcentaje de retención de CA se estimó como la CA de los dializados intestinales (CA I) y colónicos (CA C), en relación a la CA de la muestra sin digerir. El porcentaje de retención de CA total (CA T) se calculó como la suma de CA I y CA C.

Análisis estadísticos

Todos los análisis se realizaron por triplicado. La comparación de las medias se realizó por medio del análisis de la varianza (ANOVA) usando el software STATGRAPHICS Centurion XV 15.2.06 (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, Virginia, EE.UU.). Las diferencias significativas entre las medias se determinaron mediante la prueba de Tukey al 5% de nivel de significación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fenoles totales (FT), antocianinas totales (AT) y capacidad antioxidante (CA) de las frutas sin digerir

Los contenidos totales de FT, AT y CA de las frutillas y zarzamoras sin digerir se muestran en la **Tabla 1**. Los resultados están de acuerdo con los publicados por otros investigadores para estas frutas (da Silva Pinto et al. 2008, Koca et al. 2009). El contenido de FT de las zarzamoras ‘Jumbo’ y ‘Black Satin’ no presentó diferencias estadísticamente significativas. Las zarzamoras ‘Dirksen’ presentaron un contenido de FT 19% menor al contenido hallado en las frutas ‘Jumbo’ y ‘Black Satin’. Por su parte, las frutillas ‘Camino Real’ exhibieron un contenido de FT aproximadamente 50% menor al contenido hallado en las zarzamoras.

Tabla 1: Fenoles totales (FT), antocianinas totales (AT) y capacidad antioxidante (CA) de las frutas analizadas.

Atributo	Zarzamoras			Frutilla
	‘Jumbo’	‘Blacksatin’	‘Dirksen’	‘Camino Real’
FT (mg AG/g PS)	36 ± 3 ^c	37 ± 2 ^c	30 ± 1 ^b	18 ± 2 ^a
AT (mg/g PS)	6,1 ± 0,1 ^c	5,5 ± 0,2 ^b	5,4 ± 0,2 ^b	1,7 ± 0,2 ^a
CA (mg BHT/g PS)	30,6 ± 0,1 ^b	29,5 ± 0,7 ^b	29,8 ± 0,7 ^b	17,9 ± 0,6 ^c

Letras distintas en la misma fila son estadísticamente diferentes ($p \leq 0,05$).

El contenido de AT más alto se encontró en las zarzamoras ‘Jumbo’, presentando las zarzamoras ‘Dirksen’ y ‘Black Satin’ un contenido de AT 10% menor. Las frutillas mostraron un contenido de AT 3,5 veces menor al de las zarzamoras. Por su parte, la CA no mostró diferencias entre los tres cultivos de zarzamoras, siendo 1,7 veces mayor a la CA registrada para las frutillas (**Tabla 1**).

Estimación de la bioaccesibilidad intestinal (BI) y colónica (BC) de FT y AT en frutas finas

Los resultados de la bioaccesibilidad de FT de las zarzamoras y frutillas se muestran en la **Tabla 2**. De acuerdo a los resultados, no se encontraron diferencias significativas entre los resultados de BI para las tres variedades de zarzamoras estudiadas. Sin embargo, las frutillas pese a presentar un contenido de FT menor al registrado para las zarzamoras mostraron una pequeña pero significativa mayor BI. Como puede observarse,



la BI de los compuestos fenólicos analizada con este método *in vitro* fue baja para ambas frutas y representó menos del 20% del contenido inicial de FT de las frutas sin digerir. De acuerdo con nuestros resultados, Saura-Calixto et al. (2007) reportaron que la bioaccesibilidad intestinal de fenoles totales en frutas de la dieta española era de 11,57%. Sin embargo, según Quiros-Sauceda et al. (2015) un 38% de los compuestos fenólicos iniciales de mangos ‘Ataulfo’ fueron dializados luego de esta etapa intestinal simulada. Según Williamson y Clifford, (2010) la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos en los alimentos es un proceso complejo influenciado por su estructura química, tamaño, solubilidad, grado de glicosilación, y/o conjugación con otros compuestos; y es generalmente un porcentaje bajo de la cantidad inicial ingerida. En este sentido, según Chitindingu et al. (2015) la baja bioaccesibilidad de compuestos fenólicos en el intestino delgado indica que las enzimas digestivas humanas son incapaces de hidrolizar los polifenoles que se encuentran conjugados.

Tabla 2: Bioaccesibilidad de fenoles totales (FT) en las frutas estudiadas

	Zarzamoras		Frutilla	
	‘Jumbo’	‘Blacksatin’	‘Dirksen’	‘Camino Real’
% BI	10 ± 2 ^b	11 ± 1 ^b	11 ± 1 ^b	16 ± 2 ^a
% BC	44 ± 6 ^b	61 ± 7 ^c	48 ± 6 ^b	32 ± 4 ^a
% BT	53 ± 3 ^b	73 ± 7 ^{b^c}	58 ± 4 ^b	48 ± 3 ^a

BI: bioaccesibilidad intestinal, BC: bioaccesibilidad colónica, BT: bioaccesibilidad total. Letras minúsculas distintas en la misma fila son estadísticamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Por su parte, la BC de FT resultó mayor para todas las frutas estudiadas en comparación con la BI (**Tabla 2**). Esto es debido a que las bacterias fermentativas del colon provocan la escisión, liberación y/o solubilización de nuevas especies fenólicas desde la matriz de la fruta digerida, lo cual incrementa la diálisis de estas especies hacia el interior de las membranas, lo que se traduciría como un aumento en su absorción. ‘Black Satin’ exhibió el mayor valor de BC (61%), siendo 1,4 veces mayor a los valores observados para ‘Dirksen’ y ‘Jumbo’ y 1,9 veces mayor al valor hallado para las frutillas ‘Camino Real’ (**Tabla 2**). Estas diferencias pueden explicarse por la diferente naturaleza de los compuestos fenólicos entre especies y variedades de frutas y los distintos metabolitos producidos por la fermentación de las bacterias del colon con diferente capacidad de diálisis. Las transformaciones metabólicas que la microflora del colon es capaz de producir sobre los compuestos fenólicos incluyen O- y C- deglicosilaciones, hidrólisis de ésteres y amidas, etc. Además, las agliconas son susceptibles a dehidroxilación aromática, demetoxilación y demetilación, α y β -oxidación de los elementos alifáticos generados, seguido de ruptura de anillo aromático, etc. (Williamson y Clifford, 2010).

Saura-Calixto et al. (2007) estimaron la bioaccesibilidad colónica de fenoles totales luego de la fermentación *in vitro* como la diferencia entre los polifenoles del digerido antes de la fermentación y el contenido de polifenoles del pellet obtenido luego de la fermentación, asumiendo que todos los compuestos fenólicos que se presentaban en el sobrenadante eran bioaccesibles a nivel de intestino grueso. Los resultados que obtuvieron los autores de bioaccesibilidad colónica para frutas de la dieta española fue del 13,84 %, bastante más bajo de los resultados obtenidos con nuestras estimaciones (**Tabla 2**). La modificación propuesta en nuestro trabajo al método reportado por Saura Calixto et al. (2007) de incorporar membranas de diálisis antes de comenzar la fermentación, permitió que ocurra la diálisis de los compuestos fenólicos que se iban metabolizando y/o liberando desde la matriz por las enzimas bacterianas hacia adentro de las membranas y de esa forma impedir la subsiguiente metabolización de los compuestos fenólicos por las bacterias colónicas hasta dióxido de carbono, con la consecuente pérdida de polifenoles. Por lo tanto, consideramos que esta modificación metodológica brindaría una mejor estimación de la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos a nivel colónico.

Tabla 3: Bioaccesibilidad de antocianinas totales (AT) en las frutas estudiadas

	Zarzamoras		Frutilla	
	‘Jumbo’	‘Blacksatin’	‘Dirksen’	‘Camino Real’
% BI	6,2 ± 0,5 ^a	7,5 ± 0,5 ^b	8,8 ± 0,6 ^b	15,3 ± 0,8 ^c
% BC	7 ± 2 ^a	5 ± 1 ^a	4 ± 1 ^a	16 ± 3 ^b



% BT	13 ± 1^a	13 ± 1^a	13 ± 1^a	32 ± 4^b
-------------	--------------	--------------	--------------	--------------

BI: bioaccesibilidad intestinal, BC: bioaccesibilidad colónica, BT: bioaccesibilidad total. Letras minúsculas distintas en la misma fila son estadísticamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Los resultados de la estimación de la B de AT de las zarzamoras y frutillas se muestran en la **Tabla 3**. Según los resultados, las frutillas exhibieron casi 2 veces más BI de antocianinas que la observada para las zarzamoras. También las frutillas presentaron mayor BC de AT, casi 3 veces más a la observada para las tres variedades de zarzamoras. Por lo tanto, como puede observarse, si bien el contenido de AT de las zarzamoras fue mayor que el de las frutillas (**Tabla 1**), su bioaccesibilidad fue menor. Según Wu et al. (2004), las diferencias entre las bases agliconas y los compuestos esterificados en las distintas antocianinas influyen significativamente en su absorción y metabolismo. Carkeet et al. (2008) reportaron, usando un método *in vivo*, que las antocianinas de las frutillas (mayormente basadas en pelargonidina) eran más efectivamente absorbidas que las de otras frutas como las zarzamoras (mayormente basadas en cianidina). De la misma forma, Wu et al. (2004) estudiaron la bioaccesibilidad de antocianinas en cerdos alimentados con zarzamoras ‘Marion’, reportando que la absorción y excreción de pelargonidin-3-*O*-glucósido era mayor que la de cianidin-3-*O*-glucósido. Por lo tanto, puede observarse que los resultados obtenidos por otros investigadores utilizando métodos *in vivo* estarían de acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo en forma *in vitro*.

Retención de CA de las frutas finas luego de cada etapa del proceso digestivo

Los porcentajes de retención de CA de los dializados con respecto a la CA de la fruta original se muestran en la **Tabla 4**. Los compuestos bioactivos que dializaron a nivel de intestino delgado (CA I) representaron el 10% de la CA original de las zarzamoras y el 6% de las frutillas. Estos resultados estarían en concordancia con el mayor contenido de compuestos fenólicos dializados por las zarzamoras en esta etapa intestinal (**Tabla 1**) y su capacidad antioxidante asociada.

Tabla 4: Porcentaje de retención de CA de los dializados obtenidos en relación a la CA de las frutas sin digerir.

CA	Zarzamoras			Frutilla
	‘Jumbo’	‘Blacksatin’	‘Dirksen’	‘Camino Real’
% CA I	$8,6 \pm 0,2^a$	$10 \pm 0,8^b$	$9,7 \pm 0,7^b$	6 ± 1^c
% CA C	60 ± 7^b	77 ± 9^c	42 ± 5^a	79 ± 2^c
% CA T	68 ± 8^b	87 ± 5^c	52 ± 6^a	85 ± 8^c

CA I: retención de capacidad antioxidante a nivel intestinal, CA C: retención de capacidad antioxidante a nivel colónico, CA T: retención de capacidad antioxidante total. Letras minúsculas distintas en la misma fila son estadísticamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Por su parte, el porcentaje de retención de CA a nivel colónico (CA C) fue más alto que el porcentaje de CA I, de acuerdo con los mayores niveles de FT dializados (**Tabla 1**). Las zarzamoras ‘Blacksatin’ y las frutillas ‘Camino Real’ mostraron los mayores valores de retención de CA C. En el caso de las frutillas, si bien la cantidad de FT dializados a nivel colónico fue menor en relación al de las zarzamoras, la mayor cantidad de antocianinas dializadas y/o sus metabolitos (**Tabla 2**), podrían estar relacionados con esta mayor CA observada. Según Prior y Cao (2000) los alimentos vegetales son las principales fuentes de antioxidantes en la dieta, los cuales son mezclas complejas de cientos de compuestos y el tracto gastrointestinal es el sitio principal para su acción sinérgica. Además, las vitaminas C, E y los carotenoides pueden ayudar a aumentar la capacidad antioxidante de estos alimentos.



CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos mediante la aplicación de este método *in vitro* brindan una estimación novedosa de la bioaccesibilidad de los polifenoles y su capacidad antioxidante asociada tanto a nivel de intestino delgado como colónico. La bioaccesibilidad total de FT fue del 53-73% para las zarzamoras y del 48% para las frutillas y la bioaccesibilidad de AT fue del 13% para las zarzamoras y del 32% para las frutillas. La retención total de CA luego del proceso digestivo completo fue del 53-87% para las zarzamoras y del 85% para las frutillas. Hay varios aspectos del estudio que deberán ser profundizados, como por ejemplo conocer los compuestos fenólicos individuales de las frutas finas dializables en cada etapa del proceso digestivo y las modificaciones químicas que sufren estos compuestos tras el proceso digestivo completo.



BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez-Suarez J M, Giampieri F, Tulipani., Casoli T, Di Stefano G, Gonzalez-Paramas A M, Santos-Buelga C, Busco F, Quiles J L, Cordero M D, Bompadre S, Mezzetti B, Battino M. 2014. One-month strawberry-rich anthocyanin supplementation ameliorates cardiovascular risk, oxidative stress markers and platelet activation in humans. *The Journal of Nutrition Biochemistry*, 25(3): 289-294.
- Bouated J, Hoffmann L, Bohn T. 2011. Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, 128: 14-21.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28: 25-30.
- Carkeet C, Clevidence B A, Novotny J A. 2008. Anthocyanin excretion by humans increases linearly with increasing strawberry dose. *The Journal of Nutrition*, 138, 897-902.
- Chitindingu K, Benhura M A N, Muchuweti W. 2015. In vitro bioaccessibility assessment of phenolic compounds from selected cereal grains: A prediction tool of nutritional efficiency. *LWT - Food Science and Technology*, 63: 575-581.
- D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. 2007. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 43: 348, 61.
- da Silva Pinto M, Lajolo F, Genovese M. 2008. Bioactive compounds and quantification of ellagic acid in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Food Chemistry*, 107: 1629-1635.
- Drago SR, Binaghi M J, Valencia M E. 2005. Effect of gastric digestion pH on iron, zinc and calcium availability from preterm and term starting infant formulas. *Journal of Science Food*, 70 (2): 107-112.
- Hannum S M. 2004. Potential impact of strawberries on human health: A review. *CRC critical reviews in food science and nutrition*, 44: 1- 17.
- Heo H J, Lee CY. 2005. Strawberry and its anthocyanins reduce oxidative stress-induce apoptosis in PC12 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1984–1989.
- Koca I, Karadeniz B. 2009. Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the Black Sea region of Turkey. *Science Horticulturae*: 121, 447–450.
- Lopes da Silva F, Escribano Bailón M, Pérez Alonso J, Rivas Gonzalo J, Santos Buelga C. 2007. Anthocyanin pigments in strawberry. *LWT – Food Science and Technology*, 40: 374– 382.
- Luten J , Crews H , Flynn A , van Dael P , Kastenmayer P , Hurrell R , Deelstra H , Shen LH , Fairweather-Tait S , Hickson K , Farré R , Schemmer U , Frohlich W. 1996. Interlaboratory trial on the determination of the in vitro iron dialysability from food. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 72; 415-24.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79:727–47.
- Mertz C, Cheynier V, Gánata Z, Brad P. 2007. Analysis of phenolic compounds in two blackberry species (*Rubus laucus* and *Rubus adenotrichus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 8616–24.
- Prior R, Cao G. 2000. Analysis of botanicals and dietary supplements for antioxidant capacity: a review. *Journal of AOAC International*, 57: 1275-1282.
- Quiros-Sauceda A, Ayala-Zavala J F, Ornelas-Paz J, Wall-Medrano A, Alvarez-Parrilla E, Gonzalez-Aguilar G. 2015. Bioaccessibility, bioavailability and antioxidant stability of phenolic compounds present in mango (cv.'Ataulfo') following an *in vitro* digestion and microbial fermentation. *The FASEB Journal*, 29: 606.4
- Saura-Calixto F, Serrano J, Goñi I. 2007. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101: 492–501
- Singleton V L, Rossi J A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144- 158.
- Tagliazucchi D, Verzelloni E, Bertolini D, Conte A. 2010. *In vitro* bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, 120: 599-606.
- Van de Velde F, Tarola A, Güemes D, Pirovani M. 2013. Bioactive compounds and antioxidant capacity of



Camarosa and Selva strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Foods*, 2: 120- 131.

Van de Velde F, Grace M H, Esposito D, Pirovani M E, Lila M A. 2016a. Quantitative comparison of phytochemical profile, antioxidant, and anti-inflammatory properties of blackberry fruits adapted to Argentina. *Food Composition and Analysis*, 4: 82-91.

Van de Velde F, Grace M H, Pirovani M E, Lila, M A. 2016b. Impact of a new postharvest disinfection method based on peracetic acid fogging on the phenolic profile of strawberries. *Postharvest Biology and Technology*, 117: 197-205.

Williamson G, Clifford, M N. 2010. Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity? *British Journal of Nutrition*, 104: S48–S66.

Wu X, Pittman H E III, Prior R L. 2004. Pelargonidin is absorbed and metabolized differently than cyanidin after marionberry consumption in pigs. *The Journal of Nutrition*, 134: 2603-2610

You L, Zhao M, Regenstein J M, Ren J. 2010. Changes in the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates during a simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 120, 810-16.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Nacional del Litoral y a la ANPCYT por el financiamiento de este trabajo a través de los proyectos UNL-CAID y PICT-2015-0673.



EVALUACIÓN DE PROPIEDADES FUNCIONALES DE UN ADITIVO NUTRACÉUTICO A BASE DE QUERCETINA MICROENCAPSULADA EN QUITOSANO EN MODELO MURINO DE COLITIS

Vanden Braber N.L. (1), Novotny Núñez I. (2), Bohl L. (1), Porporatto C. (1), Montenegro M.A. (1), Correa S.G. (2)

(1) Centro de Investigaciones y Transferencia de Villa María (CIT VM-CONICET), Universidad Nacional de Villa María, Argentina.

(2) Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI- CONICET), Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

noeliavanden@gmail.com

RESUMEN

En la industria alimentaria la microencapsulación de compuestos bioactivos constituye una barrera de protección física para sustancias lábiles, permitiendo una liberación controlada de las mismas. El secado por aspersión es la operación unitaria más usada para formular microcápsulas debido a su bajo costo y eficiencia. El objetivo del presente trabajo fue aplicar quercetina microencapsulada (MCQ) en quitosano funcionalizado con glucosamina en un modelo murino de colitis generada con dextrán sulfato de sodio (DSS). Se evaluaron los animales clínicamente durante 10 días a los fines de determinar el índice de enfermedad, tomando el peso y recolectando heces. Finalizado el experimento se analizaron citoquinas pro y anti-inflamatorias, estrés oxidativo y actividad de mieloperoxidasa como indicador de la infiltración de neutrófilos. El índice de enfermedad de los animales que consumieron flavonoide microencapsulado fue un 83% menor que el grupo colitis ($P < 0,05$); los niveles de citoquinas pro-inflamatorias mostraron una disminución significativa con la administración de MCQ observándose además el aumento de la citoquina regulatoria IL-10. La mejora observada en los parámetros clínicos muestra un efecto protector de las MCQ en suplementos adecuados (≈ 3 mg quercetina/kg peso corporal) para el diseño de un aditivo alimentario destinado a la formulación de alimentos funcionales.

144

Palabras Clave: microencapsulación, quercetina, quitosano funcionalizado, aditivo alimentario, colitis.

ABSTRACT

Microencapsulation of bioactive compounds is a physical protection barrier to labile substances and it allows release them in a controlled mode. Spray-Drying technique is the process most widely used to microencapsulate due to its low cost and efficiency. The aim of the present work was apply microencapsulated quercetin (MCQ) in functionalized chitosan with glucosamine in a murine model of colitis generated with dextran sulfate sodium (DSS). The animals were evaluated clinically during 10 days in order to determine the disease index, measurement the weight and stool collecting. At the end of the experiment, pro- and anti-inflammatory cytokines, oxidative stress and myeloperoxidase activity, like as an indicator of neutrophils infiltration, were analyzed. In MCQ treated animals, the disease index was 83 % lower than in colitis group ($P < 0.05$); the pro-inflammatory cytokines levels showed a significant decrease with MCQ administration while the regulatory cytokine IL-10 increased. The improvement in clinical parameters shows a protective effect of MCQ in appropriate supplements (≈ 3 mg quercetin per body weight kg) as food additive for the functional foods formulation.

Keywords: microencapsulation, quercetin, functionalized chitosan, food additive, colitis.



INTRODUCCIÓN

El tracto gastrointestinal de mamíferos está continuamente expuesto a numerosos microorganismos como así también a toxinas provenientes del ambiente o presentes en los alimentos consumidos, lo que lo convierte en una zona de alta vulnerabilidad. Dos de las más importantes enfermedades inflamatorias intestinales (EII), la enfermedad de *Crohn* y la colitis ulcerosa (CU), se caracterizan por una inflamación crónica del intestino con etiología multifactorial (Xavier y Podolsky 2007).

Dextrán sulfato de sodio (DSS) es un polisacárido sulfatado, soluble en agua, cargado negativamente, con una variación de peso molecular (PM) desde 5 a 1400 kDa, utilizado para desarrollar modelos de estudio de colitis *in vivo*. El potencial colitogénico del DSS es PM dependiente. El modelo murino de colitis más próximo a la patología en humanos se alcanza con la administración de DSS de 40-50 kDa en el agua de bebida, a una concentración promedio del 3% (p/v) (Kitajima et al. 2000).

Las características clínicas inducidas por el suministro de DSS al 3% (p/v) en agua de bebida son un reflejo de lo que acontece en CU en humanos. Se inducen cambios histológicos agudos a partir de 4 a 7 días de dosificación, acompañándose con pérdida de peso, diarrea, sangrado en heces y encorvamiento. La disrupción de la integridad de barrera induce un influjo de neutrófilos en la lámina propia y submucosa (Chassaing et al. 2014).

Por sus propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias, los flavonoides, y los polifenoles en general (Formica y Regelson 1995, Havsteen 2002, Heim et al. 2002, Manach et al. 2004, Williamson y Manach 2005), han sido ampliamente estudiados en modelos de inflamación intestinal ya que, frente a la cronicidad de estas patologías, resulta de gran interés la modulación de la inflamación desde la dieta (Sánchez-Fidalgo et al. 2010, Shigeshiro et al. 2013, Yao et al. 2010). Incluso, su consumo desde fuentes naturales muestra con el tiempo una menor tendencia a contraer cáncer de colon a través de un efecto protector relacionado a su actividad anti-mutagénica y anti-proliferativa (Messina et al. 1994, Murakami et al. 2008). Quercetina, por ser el flavonoide más abundante en la naturaleza, ha ocupado un rol fundamental en la nutrición humana; a su vez, dado que su actividad antioxidante es la más elevada en esta familia de fitonutrientes, su estudio está en permanente desarrollo (Heim et al. 2002). Su empleo en estado puro para la formulación de alimentos nutracéuticos y funcionales no asegura su arribo a colon, ya que su absorción es a nivel de estómago e intestino delgado (Hollman et al. 1999).

La microencapsulación es una herramienta de gran utilidad para el desarrollo de este tipo de aditivos alimentarios. Lorenzo-Lamosa et al. (1998) y Caddeo et al. (2014) sugieren que quitosano (Ch) es un material de pared adecuado para soportar las condiciones gástricas y dispensar el activo encapsulado en intestino grueso. Ch es un polisacárido obtenido del exoesqueleto de crustáceos con propiedades biológicas destacadas, está compuesto por monómeros de β -(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-D-glucosa y β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-D-glucosa, por lo que, al igual que la celulosa, es una sustancia incapaz de ser aprovechada por el tracto gastrodigestivo humano, adoptando la definición de fibra alimentaria; es completamente biodegradable y soluble sólo en medio ácido (Aranaz et al. 2009); la transformación de la molécula nativa con glucosamina mediante reacción de *Maillard* es una fehaciente alternativa para vehicularlo a pH neutro (Chung et al. 2005).

En este contexto, el derivado obtenido por reacción de *Maillard* entre Ch nativo y clorhidrato de D-glucosamina (ChF), soluble a pH fisiológico, se convertiría en un material de pared de características mejoradas dado que, pasadas las condiciones gástricas, su capacidad de hinchamiento y liberación controlada en intestino arrojarían un efecto potencialmente más eficaz de quercetina. La densa capa de *mucus* en intestino grueso, constituida por mucina altamente glicosilada (Shan et al. 2013), juega un rol fundamental en la actividad de las microcápsulas. He et al. (1998) y Dhawan et al. (2004) corroboraron la capacidad mucoadherente de microcápsulas de Ch *in vitro*, haciendo un análisis detallado de las diferentes características del biopolímero, y del tipo de mucina, que optimizan la adherencia. Paralelamente, Schipper et al. (1999), comprobaron que la absorción de drogas escasamente aprovechadas en intestino mejora considerablemente al encapsularlas en matrices de Ch, dada la posibilidad del mismo de interactuar con el *mucus* y mejorar el contacto con las células del epitelio.

A su vez, Zhang y Neau (2002), comprobaron la degradación *in vitro* de Ch a partir de enzimas bacterianas



(quitinasas) en contenido aislado de ciego y colon de rata, lo cual contribuiría a la liberación de los activos en el lumen de colon, dada la degradación del material de pared.

El objetivo del presente trabajo fue aplicar quercetina microencapsulada (MCQ) en ChF en un modelo murino de colitis generada con DSS y evaluar la actividad anti-inflamatoria y antioxidante de las MCQ en el contexto inflamatorio de la inducción de colitis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ratones

Para el modelo animal se utilizaron ratones hembra de entre 6 y 8 semanas de edad de la cepa C57BL/6. Estos animales fueron mantenidos en condiciones libres de patógenos específicos, alojados en jaulas colectivas a 22 ± 1 °C en ciclos de 12 h de luz/oscuridad con acceso libre a comida de laboratorio y agua potable. Los experimentos se llevaron a cabo durante la fase de luz del ciclo. Todos los experimentos con animales se realizaron en conformidad con las directivas del comité institucional de bioética de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba.

Reactivos

DSS fue provisto por Dextran Products Limited (Canadá). Ch nativo de PM medio, tripolifosfato de sodio (TPP), clorhidrato de nitroazul de tetrazolio (NBT), metionina, riboflavina, ácido tricloroacético (TCA), bromuro de hexadecil-trimetil amonio, se obtuvieron de Sigma-Aldrich (MO). Los ácidos tiobarbitúrico (TBA) y etilendiaminotetraacético (EDTA), fueron provistos por Merck (Alemania). Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4), fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4) y fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4), ácido acético glacial (CH_3COOH), cloruro de sodio (NaCl), ácido sulfúrico (H_2SO_4), todos ellos de grado analítico, se obtuvieron de Cicarelli (Argentina). El reactivo de *Bradford* para ensayo de contenido de proteínas fue provisto por Bio-Rad (USA) y tetrametilbenzidina (TMB) por BD Biosciences (USA).

Obtención de ChF

Este procedimiento fue ajustado conforme a Chung et al. (2005). A una solución al 1% (p/v) de Ch nativo en CH_3COOH 0,25 M, se le añadió clorhidrato de D-(+)-glucosamina al 1% (p/v), manteniendo la mezcla en un *orbital shaker*, en estufa (DALVO, Instrumentos OJALVO S.A.) a 65°C durante 48 h. Una vez terminado el período de incubación, la muestra fue centrifugada (Centrífuga SORVALL ST 16R, Thermo SCIENTIFIC, USA.) a 5.000 rpm durante 20 min. El sobrenadante fue dializado durante 96 h contra agua destilada a través de una membrana de diálisis con un corte de PM de 12.000 – 14.000 Da (Sigma-Aldrich).

Preparación de MCQ

En el producto de diálisis que se obtuvo en el proceso de funcionalización con un contenido de sólidos evaluado por método gravimétrico de, aproximadamente, 0,5% (p/v) se le añadió el compuesto bioactivo quercetina en una proporción del 5% (p/p) de material de pared. La mezcla fue homogeneizada a 18.000 rpm durante 5 min, en recipiente al resguardo de la luz. A continuación, bajo constante agitación, se adicionó TPP al 1% (p/v), como agente de entrecruzamiento, en una relación del 5% respecto del volumen de la solución del material de pared.

Preparada la mezcla se procedió al secado por aspersión en un equipo BÜCHI Mini B-290 (BÜCHI Labortechnik AG, Suiza) bajo las siguientes condiciones de trabajo: T° de ingreso de 130°C, T° de salida de 76/78°C, flujo de aire de 1,05 m³/h, caudal de líquido 4 mL/min y velocidad de bombeo del 10%.

Se obtuvieron microcápsulas vacías (MCv) sin el agregado de quercetina, siguiendo el mismo procedimiento planteado en los puntos anteriores.

La eficiencia de microencapsulación arrojó un valor de 77 ± 5 con un contenido de quercetina total en peso de $3,23 \pm 0,25$ % (p/p).

Modelo de colitis ulcerosa (CU) generada con DSS

Se llevó a cabo un modelo de 10 días conforme a Pedrotti et al. (2016). Los grupos ensayados (n=3/4; realizado 2 veces) fueron separados en Control Normal, Colitis, Colitis + MCQ y Colitis + MCv. El DSS fue suministrado al 3% (p/v) en agua de bebida durante los primeros 5 días, luego se reemplazó por agua 4 días y al día 10 se procedió al sacrificio. Las microcápsulas en estudio se administraron diariamente, durante la



inducción de colitis, en 3 dosis de 75 μL /animal de una suspensión de 1 mg/100 μL en CH_3COOH 0,25% (v/v). Los grupos Control Normal y Colitis recibieron dosis equivalentes de mezcla solvente. Los animales se evaluaron clínicamente, a diario, tomando su peso y recolectando heces para valorar la consistencia y posible presencia de sangre oculta o evidente en las mismas. Se determinó, de esta manera, el índice de enfermedad (IE) que es el resultado combinado de la pérdida de peso, la consistencia de las heces y el sangrado (Bento et al. 2011). Para la pérdida de peso, se asignó un valor de 0 si el peso corporal aumentó o se mantuvo dentro del 1% de la línea de base, 1 para un 1% a 5% de pérdida, 2 para un 5% a un 10% de pérdida, 3 para un 10% a 15% de pérdida, y 4 para una pérdida de peso mayor al 15%. Para consistencia de las heces, 0 correspondió a heces formadas y duras, 2 para heces húmedas y de menor consistencia y 4 para heces líquidas. En la determinación de sangre se asignó 0 a la ausencia de la misma en las heces, 2 a la presencia de sangre oculta y 4 para la hemorragia evidente.

Una vez finalizado el experimento se evaluaron longitud y peso de colon y se procedió a su muestreo para análisis de citoquinas pro y anti-inflamatorias, estrés oxidativo e infiltración de neutrófilos a través del ensayo de mieloperoxidasa (MPO).

Preparación de homogenatos de colon

Después del sacrificio, se tomó inmediatamente muestra del tejido en estudio y se lavó con amortiguador fosfato salino (PBS). Las determinaciones siguientes se hicieron en homogenato de colon de 0,05g de tejido en 1,5mL de amortiguador de lisis. El homogenato fue centrifugado a 10.000 rpm (Centrífuga Micro 17R, Thermo Fisher Sorvall Legend, USA) durante 5 min, a 4°C, se separó el sobrenadante y se evaluó el contenido de proteínas totales a través del método de *Bradford*.

Medición de citoquinas y quimioquinas

Factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y la proteína quimiotractorante de monocitos-1 (MCP-1) (BD Biosciences) y las interleuquinas IL-6 e IL-10 (BD Pharmingen) se midieron en los homogenatos de colon mediante el uso de kits de ELISA, tal como está especificado por los fabricantes. La lectura de las diferentes densidades ópticas se llevó a cabo con un lector de microplacas Multiskan™ FC Microplate Photometer (Thermo Scientific, USA).

Actividad de MPO

Los ensayos de la actividad de MPO, indicativa del infiltrado de neutrófilos en colon, se realizaron conforme a Bento et al. (2011). Los segmentos de tejido de colon obtenidos luego del sacrificio se homogeneizaron en una solución amortiguadora al 5% (p/v) de EDTA/NaCl (pH 4,7) y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 15 min a 4°C. El sedimento se resuspendió en bromuro de hexadecil-trimetil amonio al 0,5% (p/v) (pH 5,4), y las muestras se congelaron, y se descongelaron, en una mezcla de hielo seco/etanol anhidro tres veces consecutivas. Las muestras se centrifugaron nuevamente y el sobrenadante se utilizó para el ensayo de MPO. Para determinar la actividad enzimática a 50 μL del sobrenadante recogido se adicionaron 50 μL de TMB y se frenó la reacción con 25 μL de H_2SO_4 2 N La absorbancia se midió en un lector de microplacas a 450 nm, dentro de los 30 min, y los resultados se expresaron como DO a 450 nm por mg de tejido.

Actividad de Superóxido dismutasa (SOD)

La actividad de SOD se estimó, conforme a Liaudat et al. (2014), a través de su capacidad para inhibir la reducción fotoquímica del NBT en una mezcla EDTA 1 μM , amortiguador fosfato de potasio 50 mM pH 7,8, metionina 13 mM, NBT 75 μM y riboflavina 40 μM . Las determinaciones se realizaron en homogenato de colon mediante medidas espectroscópicas (Espectrofotómetro de arreglo de diodos Specord S600, Analytik Jena, Alemania) a 560 nm. Los resultados se expresaron como U SOD/mg de proteína (una unidad SOD se define como la cantidad de enzima que causa el 50 % de inhibición de la reducción fotoquímica del NBT).

Peroxidación lipídica: malondialdehído (MDA)

Conforme a Esterbauer et al. (1982), un volumen de 1 mL de homogenato de colon se mezcló con 2 mL de TCA al 10% (p/v) y 2 mL de TBA 0,67 % (p/v), llevándolo luego a un baño de agua a 85°C durante 15 min. Se enfrió la mezcla 5 min bajo agua corriente y se evaluó la absorbancia a 532 nm. Atendiendo a un ϵ para el MDA de $1,54 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, los resultados se expresaron en μmoles de MDA/mg de proteína.

Análisis estadístico



Todos los ensayos fueron llevados a cabo por duplicado y los experimentos se realizaron 2 veces. Los datos se presentan como el valor de media de cada grupo de análisis \pm error estándar (EE). Los resultados se evaluaron estadísticamente mediante análisis de la varianza (ANOVA) a una vía seguido del test Tukey como test post-hoc con la ayuda del programa InfoStat versión 2014 (Di Rienzo, Casanoves, Balzarini, Tablada & Robledo, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Las diferencias entre grupos se consideraron significativas a $P < 0,05$.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Seguimiento clínico

La **Figura 1.A** muestra el seguimiento clínico de la suplementación con MCQ. Como puede observarse, a partir del quinto día, el grupo Colitis comienza a mostrar síntomas clínicos que no se manifiestan en los grupos tratados con el flavonoide encapsulado. El tratamiento con MCv muestra una diferencia estadística respecto de los grupos Colitis y Control Normal, evidenciando al día 9 un IE 1,5 veces menor que el grupo Colitis (IE Colitis = 12; IE Colitis + MCv = 8)

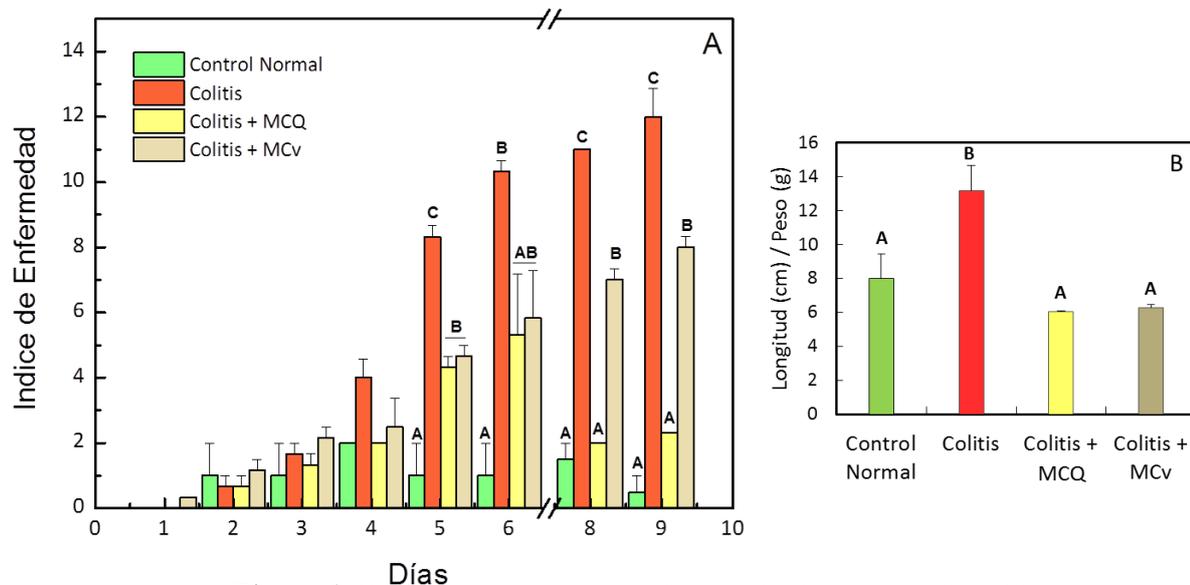


Figura 1. Gráficos de IE (A) y relación longitud/peso de colon (B). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$).

La **Figura 1.B** muestra que los animales suplementados con MCQ o MCv conservaron la relación longitud/peso de colon, lo cual ilustra la magnitud del proceso inflamatorio, caracterizado por un acortamiento y pérdida de peso del mismo (Chassaing et al. 2014).

El resultado apreciable del seguimiento clínico muestra un efecto protector de las MCQ frente al DSS, dado que el efecto tóxico del mismo comienza entre los días 5 y 7 de suministro (Chassaing et al. 2014) y los animales bajo tratamiento no evidenciaron el decaimiento esperado. Los animales tratados con MCv retrasan la pérdida de peso un día en el tratamiento, sin embargo, su ingesta no logra aminorar el efecto del DSS a lo largo del tiempo.

Citoquinas y quimioquinas

Las citoquinas son mediadores claves en el sistema inmune intestinal y son fundamentales para mantener la homeostasis (Mowat y Agace 2014). Los niveles de citoquinas en tiempo y espacio coordinan el desarrollo, recurrencia y gravedad del proceso inflamatorio en las enfermedades inflamatorias intestinales.

La **Figura 2** muestra los resultados obtenidos en el ensayo de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias. Para los animales que recibieron MCQ, los niveles de IL-6 y TNF- α (**Figuras 2.A, 2.B**) presentaron valores equivalentes a los animales Control Normal, sin diferencia estadística; lo mismo mostraron los animales tratados con MCv.

MCP-1, también denominada CCL-2, regula la migración e infiltración de monocitos y macrófagos (Deshmane et al. 2009). Los resultados obtenidos para MCP-1 muestran que MCQ, como así también MCv, son capaces de restablecer y/o mantener a este mediador en niveles basales sin diferencia estadística con el grupo Control Normal (**Figura 2.C**).

IL-10 es una citoquina anti-inflamatoria capaz de inhibir la presentación de antígenos y la subsecuente producción de citoquinas pro-inflamatorias, por lo tanto, es capaz de atenuar los efectos de las mismas sobre



la mucosa (Sanchez-Muñoz et al. 2008). La **Figura 2.D** muestra que los tratamientos con MCQ incrementaron los niveles de IL-10. Los valores para Colitis + MCv fueron tan bajos como para el grupo Colitis. Estos resultados, podrían claramente explicar la razón por la cual el grupo Colitis + MCv no evidenció aminorar los síntomas clínicos.

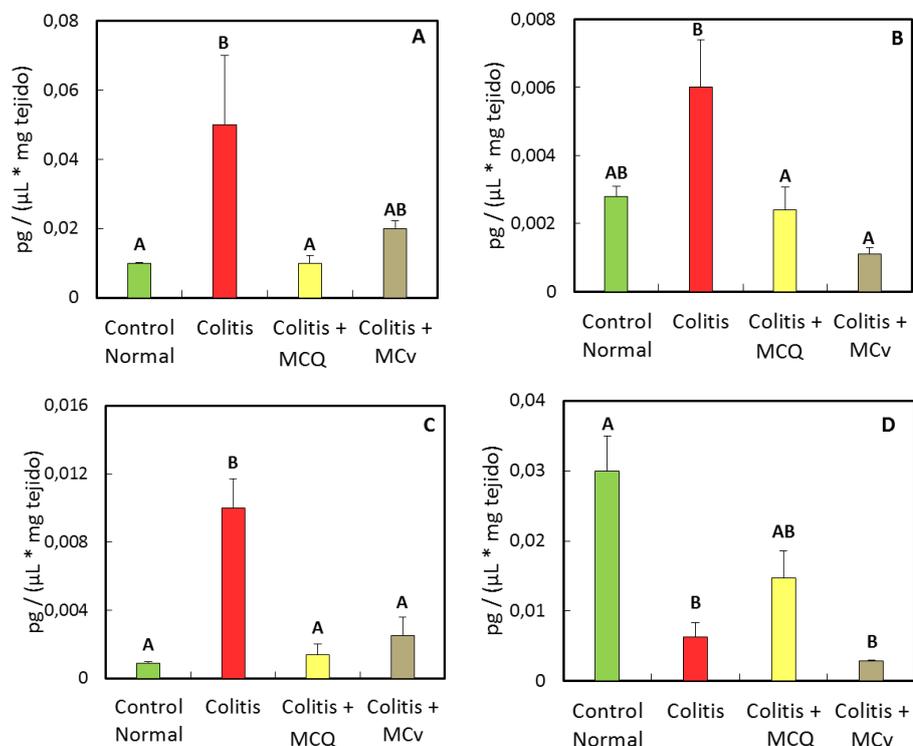


Figura 2.: Citoquinas y quimioquinas.

IL-6 (A), TNF-α (B), MCP-1 (C), IL-10 (D).

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$).

Actividad de MPO

La enzima MPO está presente en los fagosomas de neutrófilos y monocitos. Es responsable de la actividad microbicida contra un amplio espectro de microorganismos. MPO es un nexo entre procesos inflamatorios y oxidativos.

Los resultados obtenidos (**Figura 3**), muestran que la actividad de MPO en animales Colitis + MCQ ha sido comparable a la de animales Control Normal, en los que el tejido colónico está intacto. Así mismo, los animales que ingirieron MCv presentan una actividad intermedia entre el grupo Colitis y Control Normal, mostrando que el efecto es dependiente de la actividad anti-inflamatoria propia del flavonoide.

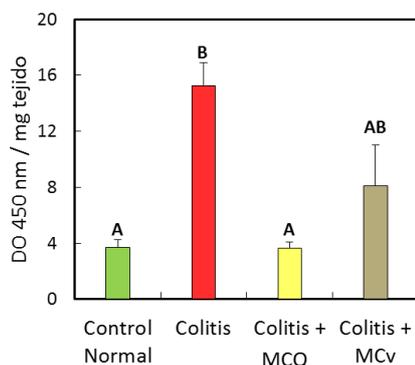


Figura 3.: Actividad de MPO.
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$).



Actividad de SOD

Numerosa evidencia clínica y experimental ha demostrado que las inflamaciones agudas y crónicas se asocian con una exacerbada producción de especies reactivas de oxígeno (EROS) de alta reactividad química, entre ellas: radicales libres, como anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y radical hidroxilo (HO^{\cdot}), y moléculas no radicalarias, como oxígeno molecular singulete $O_2 (^1\Delta_g)$ y H_2O_2 . Las mismas inducen un grado de estrés oxidativo crítico en la patofisiología de la inflamación intestinal. El aporte de sustancias antioxidantes desde la dieta coopera en la regulación y desactivación de especies reactivas intrínsecamente vinculadas al proceso inflamatorio porque actúan, también, como mediadores en el reclutamiento de células inmunes (Karp y Koch 2006).

La **Figura 4** ilustra la actividad de SOD en homogenatos de colon de los animales sometidos a los diferentes suplementos. Los animales Control Normal mostraron una actividad SOD *per se* dado que todo tejido, aún en condiciones fisiológicamente estables, se expone a EROS derivados de la respiración celular. Ahora bien, aquellos animales que consumieron flavonoides encapsulados en ChF, junto con DSS, mostraron un nivel de actividad SOD inferior al grupo Control Normal resaltando la importancia de la presencia de estos fitonutrientes desde la dieta y el aporte de ChF en la formulación.

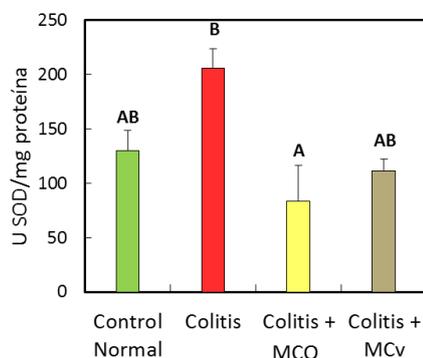


Figura 4.: Actividad de SOD.

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$).

MDA

La peroxidación lipídica es un indicador de la magnitud del daño generado por especies oxidantes, que se traduce como daño de membrana y posible acceso de las mismas al núcleo celular (Korenaga et al. 2002). El resultado expuesto en la **Figura 5** muestra que, en instancias agudas del proceso inflamatorio, el daño puede regularse desde la dieta, donde incluso MCv presenta un efecto estadísticamente tan significativo como el de quercetina microencapsulada.

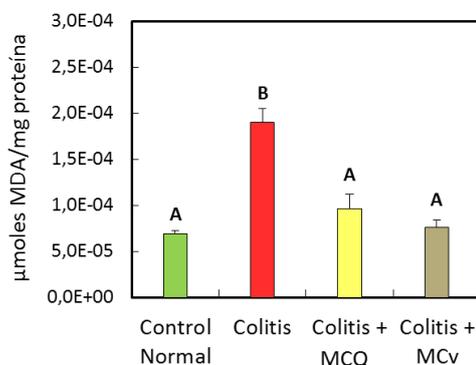


Figura 5.: Peroxidación lipídica: MDA.

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$).



CONCLUSIONES

El presente trabajo permite concluir que quercetina encapsulada en ChF llegaría a colon y actuaría reduciendo los síntomas clínicos inducidos por el consumo de DSS, atenuando la inflamación y cooperando en el restablecimiento del balance de las especies oxidantes. Es importante destacar que la efectividad se ha logrado en dosis adecuadas al diseño de un aditivo destinado a la formulación de alimentos nutraceuticos (\approx 3 mg quercetina/kg peso corporal).

El empleo de ChF como material de pared se convierte en una opción eficaz para formular partículas complejas de liberación controlada en la porción más distal del tracto gastrointestinal, sorteando condiciones de extrema exposición, como lo es el pH gástrico. Por su parte, ChF deja de ser un mero excipiente para cooperar con la actividad del flavonoide.

La funcionalización de Ch para ampliar sus posibilidades de uso muestra la versatilidad del biopolímero para adecuarse a la necesidad en cuestión y ser utilizado como un coadyuvante más que un mero excipiente.

BIBLIOGRAFÍA

- Aranaz I, Mengibar M, Harris R, Panos I, Miralles B, Acosta N, Heras A. 2009. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Current Chemical Biology*, 3:203–230.
- Bento AF, Marcon R, Dutra RC, Claudino RF, Cola M, Leite DFP, Calixto JB. 2011. β -caryophyllene inhibits dextran sulfate sodium-induced colitis in mice through CB2 receptor activation and PPAR γ pathway. *American Journal of Pathology*, 178:1153–1166.
- Caddeo C, Nácher A, Diez-Sales O, Merino-Sanjuán M, Fadda AM., Manconi M. 2014. Chitosan-xanthan gum microparticle-based oral tablet for colon-targeted and sustained delivery of quercetin. *Journal of Microencapsulation*, 2048:1–6.
- Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, Vijay-Kumar M. 2014. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Current Protocols in Immunology*, 29:997-1003.
- Chung YC, Kuo CL, Chen CC. 2005. Preparation and important functional properties of water-soluble chitosan produced through Maillard reaction. *Bioresource Technology*, 96:1473–1482.
- Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. 2009. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 29: 313–326.
- Dhawan S, Singla AK, Sinha VR. 2004. Evaluation of mucoadhesive properties of chitosan microspheres prepared by different methods. *AAPS PharmSciTech*, 5:e67.
- Esterbauer H, Cheeseman KH, Dianzani MU, Poli G, Slater TF. 1982. Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe²⁺ in rat liver microsomes. *The Biochemical Journal*, 208:129–140.
- Formica JV, Regelson W. 1995. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology*, 33:1061–1080.
- Havsteen BH. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96:67-202
- He P, Davis SS, Illum L. 1998. *In vitro* evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, 166:75–88.
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. 2002. Flavonoid antioxidants : chemistry , metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13:572–584.
- Hollman PC, Bijlsman MN, van Gameren Y, Cnossen EP, de Vries JH, Katan MB. 1999. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radical Research*, 31:569–573.
- Karp SM, Koch TR. 2006. Oxidative stress and antioxidants in inflammatory bowel disease. *Disease-a-Month : DM*, 52:199–207.



- Kitajima S, Takuma S, Morimoto M. 2000. Histological Analysis of Murine Colitis Induced by Dextran Sulfate Sodium of Different Molecular Weights. *Experimental Animals*, 49:9–15.
- Korenaga D, Takesue F, Kido K, Yasuda M, Inutsuka S, Honda M, Nagahama S. 2002. Impaired antioxidant defense system of colonic tissue and cancer development in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *The Journal of Surgical Research*, 102:144–149.
- Liaudat AC, Bohl LP, Tolosa de Talamoni NG, Maletto B, Pistoiresi-Palencia MC, Picotto G. 2014. Oxidative stress, cell cycle arrest and differentiation contribute toward the antiproliferative action of BSO and calcitriol on Caco-2 cells. *Anti-Cancer Drugs*, 25:810–8.
- Lorenzo-Lamosa ML, Remuñán-López C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. 1998. Design of microencapsulated chitosan microspheres for colonic drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 52:109–118.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79:727–747.
- Messina MJ, Persky V, Setchell KDR, Barnes S. 1994. Soy intake and cancer risk: A review of the *in vitro* and *in vivo* data. *Nutrition and Cancer*, 21:113–131.
- Mowat AM., Agace WW. 2014. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nature Reviews Immunology*, doi:10.1038/nri3738.
- Murakami A, Ashida H, Terao J. 2008. Multitargeted cancer prevention by quercetin. *Cancer Letters*, 269:315–325.
- Pedrotti LP, Barrios BE, Maccio-Maretto L, Bento AF, Sena AA, Rodriguez-Galán MC, Correa SG. 2016. Systemic IL-12 burst expands intestinal T-lymphocyte subsets bearing the $\alpha 4\beta 7$ integrin in mice. *European Journal of Immunology*, 46:70–80.
- Sánchez-Fidalgo S, Cárdeno A, Villegas I, Talero E, de la Lastra CA. 2010. Dietary supplementation of resveratrol attenuates chronic colonic inflammation in mice. *European Journal of Pharmacology*, 633:78–84.
- Sanchez-Muñoz F, Dominguez-Lopez A, Yamamoto-Furusho JK. 2008. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 14:4280–4288.
- Schipper NGM, Varum KM, Stenberg P, Ocklind G, Lennernäs H, Artursson P. 1999. Chitosans as absorption enhancers of poorly absorbable drugs. 3: Influence of mucus on absorption enhancement. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8:335–343.
- Shan M, Gentile M, Yeiser JR, Walland AC, Bornstein VU, Chen K, Cerutti A. 2013. Mucus Enhances Gut Homeostasis and Oral Tolerance by Delivering Immunoregulatory Signals. *Science*, 342:447–453.
- Shigeshiro M, Tanabe S, Suzuki T. 2013. Dietary polyphenols modulate intestinal barrier defects and inflammation in a murine model of colitis. *Journal of Functional Foods*, 5:949–955.
- Williamson G, Manach C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81:243S–255S.
- Xavier RJ, Podolsky DK. 2007. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 448:427–434.
- Yao J, Wang JY, Liu L, Li YX, Xun AY, Zeng WS, Wang LS. 2010. Anti-oxidant Effects of Resveratrol on Mice with DSS-induced Ulcerative Colitis. *Archives of Medical Research*, 41:288–294.
- Zhang H., Neau SH. 2002. *In vitro* degradation of chitosan by bacterial enzymes from rat cecal and colonic contents. *Biomaterials*, 23:2761–2766.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigaciones y Transferencia (CIT VM CONICET)–Universidad Nacional de Villa María y al Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI CONICET)–Departamento de Bioquímica Clínica–Facultad de Ciencias Químicas–Universidad Nacional de Córdoba.

