

EFECTO DE LA DIETA SOBRE LA COMPOSICIÓN EN ÁCIDOS GRASOS Y LOS ÍNDICES DE INTERÉS NUTRICIONAL EN LA GRASA SUBCUTÁNEA DE NOVILLOS DE DIFERENTES GENOTIPOS.

DIET EFFECTS ON SUBCUTANEOUS FAT FATTY ACID COMPOSITION AND INDICES OF NUTRITIONAL INTEREST OF STEERS FROM DIFFERENT GENOTYPES.

Maria Zarlenga ³, Néstor Latimori ², Ana. M. Sancho ^{1,3}, Pilar T. Garcia ^{* 1,3}

¹ Instituto Tecnología de Alimentos· Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - INTA, Buenos Aires, Argentina

² Estación Experimental INTA Marcos Juárez, Ruta Prov. 12, Marcos Juárez, Córdoba Argentina

³ Facultad de Agronomía y Ciencias Agroalimentarias· Universidad de Morón, Cabildo 134, Morón, Argentina.

* Correspondencia: pitegarcia@yahoo.com

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue analizar la composición de la grasa subcutánea de novillos Hereford, Bradford ½, Bradford ¼ y Bradford 3/8, alimentados con tres dietas diferentes: Pasturas, Pasturas + 0.7% de suplementación y "Feedlot". La dieta totalmente pastoril presentó niveles más altos de ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido linolénico (C18:3 n-3) y CLA y menores de los ácidos oleico (C18:1) y linoleico (C18:2 n-6) que la dieta de pasturas con 0.7% de suplemento y la de Feedlot. El genotipo afectó los niveles de ácidos mirístico (C14:0), pentadecanoico (C15:0), margárico (C17:0), oleico trans (C18:1t), oleico (C18:1) y CLA. Los niveles más altos de CLA se presentaron en los novillos B1/4 y los menores en los de raza B3/8. La relación C18:2 n-6/C18:3 n-3 fue significativamente menor (<0.001) cuando la dieta fue exclusivamente pastoril. Los valores más altos se presentaron en las razas H y B1/4. La proporción de MUFA fue mayor en la grasa de los animales bajo el régimen "feedlot" y en aquellos del genotipo B3/8. La proporción de SFA se vio afectada por la dieta con un mayor grado de significación que por el genotipo ($p < 0.001$ y $p < 0.05$, respectivamente). Fue notablemente mayor el porcentaje encontrado en animales con dieta pastoril. El genotipo H presentó el mayor porcentaje de SFA. La dieta pastoril y el genotipo H presentaron los menores valores para la relación MUFA/SFA. Ni el genotipo ni la dieta afectaron significativamente los niveles de colesterol. H fue la raza con mayor porcentaje, pero con un bajo nivel de significación ($p < 0.05$). El análisis discriminante determinó grandes diferencias entre las dietas, pero no así entre los grupos genéticos.

Palabras claves: grasa subcutánea, composición ácidos grasos, genotipo, dieta.

Abstract

The effects of breed and diet on several indices of fatty acids involved in MUFA metabolism in subcutaneous fat for 54 Hereford (H), Bradford ½ (B½), Bradford ¼ (B1/4) and Bradford 3/8 (B3/8) steers under three production systems, pasture exclusive (P), pasture and 0.7% corn grain (P+0.7%), and feedlot (F) were determined. Samples of subcutaneous fat were taken at the height of the 11-13 rib and stored at -20°C until analysis. The FA methyl esters (FAME) were analyzed on a Chrompack 900 gas chromatograph with a 100 m CP-Sil 88 capillary column. Treatments were compared by analysis of variance using the GML procedure (SAS 8.0 SAS Institute, Inc., Cary, NC). Mean values were compared using the Tukey test. The ratios MUFA/SFA, C16:1/C16:0 and C18:1/C18:0 were affected by diet and breed. F had higher MUFA/SFA ratios than P and P+0.7% and was higher in B1/2, B1/4 and B3/8 compared with H. The ratio C18:1/C16:1 was only affected by breed. The C18:2/C18:3 ratio was lower in P compared to F and higher in H and B3/8 compared to B1/2 and B3/8. The CLA concentrations were lower in F and in B3/8. The discriminant analysis shows significant differences according with the diet.

Keywords: subcutaneous fat, fatty acid, diet, genotype

Introducción

En las últimas décadas la relación, entre el consumo de ácidos grasos de configuración trans y el de grasas saturadas (SFA), con la incidencia de enfermedades cardiovasculares (CVD) ha llevado a recomendaciones para limitar el consumo de carne y grasa de bovinos y ovinos (Mapiye et al., 2015; Nantapo et al., 2015; Vahmani et al., 2015).

Ello ha generado numerosos estudios para disminuir el aporte de ácidos grasos saturados y en aumentar en los lípidos de los rumiantes el aporte de ácidos grasos polinsaturados (PUFA) y de productos de la biohi-

drogenación ruminal, particularmente del ácido ruménico (cis-9, trans-11 C18:2) y de su precursor el ácido vaccénico (trans-11 C18:1) los cuales tendrían potenciales efectos positivos. La composición de los PUFAs y de los productos de la biohidrogenación ruminal en grasas bovinas está influenciada por la ubicación anatómica de los depósitos grasos, presentando la grasa subcutánea y la grasa perirrenal las mayores concentraciones de los ácidos ruménico y vaccénico (Jiang et al. 2013; Mapiye et al. 2013 y 2015). Actualmente la grasa subcutánea es usada al preparar “carne picada” y es considerada como la grasa más versátil de todos los productos cárnicos (Brewer, 2012).

La calidad cuali y cuantitativa de la alimentación de los animales para carne es determinante de la composición de los ácidos grasos presentes en la grasa y en la carne. Otros factores a considerar en la composición lipídica son: la raza, el sexo, la genética, el peso y la edad al momento del sacrificio, la velocidad de crecimiento, la edad, el clima, etc. (Marmer et al., 1984). Factores genéticos y la dieta animal alteraran la deposición grasa indicando la influencia de factores adipogénicos y lipogénicos. Sin embargo, los mecanismos involucrados en la deposición grasa y la composición en ácidos grasos en ganado bovino no son aun completamente comprendida. Pese a ello hay suficiente evidencia de que el origen genético debe ser tenido en cuenta al aplicar estrategias de alimentación para manipular la composición en ácidos grasos de bovinos (Costa et al. 2013)

Un importante indicador del valor nutricional de una grasa es la relación entre los PUFAs n-6/n-3. Investigadores de diversos países estudian distintos métodos para modificar el perfil de ácidos grasos y disminuir esta relación, aumentando, a su vez, la concentración de los PUFA n-3 (García et al. 2008, 2011, 2012, 2017). Ya se ha demostrado en rumiantes que, disminuyendo la proporción de concentrado en la dieta e incrementando el consumo de pasturas, disminuye la concentración de grasa intramuscular y la relación de ácidos grasos n-6/n-3 (García et al. 2008; French et al. 2000). Los granos son fuente de ácido linoleico C18:2 n-6, mientras las pasturas son ricas en ácido linolénico C18:3 n-3 (García et al., 2015). Los lípidos bovinos son una de las pocas fuentes naturales con bajas cantidades de PUFA n-6, y una dieta basada en pasturas aumenta la concentración de ácido linolénico y, por lo tanto, disminuye el valor final de la relación n-6/n-3 a valores más saludables.

Varios estudios (Mir et al., 2000) demostraron también un efecto positivo del sistema pastoril en la acumulación de isómeros conjugados del ácido linoleico cis 9, trans 11, denominados CLA, en los lípidos de rumiantes. CLA se refiere a una mezcla de isómeros geométricos y posicionales de conjugados dienoicos del ácido linoleico. La mayoría de los CLA provienen de la síntesis endógena, a partir de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). Algunas bacterias tienen la capacidad de isomerizar los dobles enlaces cis de los PUFA para formar dobles enlaces conjugados cis/trans y de hidrogenar estos ácidos grasos conjugados. El producto final de este proceso es el trans ácido vaccénico (t11-C18:1), a partir del cual se forma el ácido esteárico (C18:0) mediante la hidrogenación por otra bacteria ruminal. Para otros PUFA, como el ácido linolénico, la secuencia principal también conduce al ácido vaccénico y luego al ácido esteárico, pero con otros intermediarios distintos de CLA. Se ha descubierto que por acción de la Δ^9 desaturasa, el ácido vaccénico sufre una desaturación formándose, CLA C18:2 cis 9, trans 11, isómero mayoritario en la grasa vacuna (Fritsche & Steinhardt, 1998); también se presenta el isómero trans 10, cis 12, dependiendo de la dieta que reciba el animal. Existe un gran interés en estos compuestos conjugados debido a su poder anticarcinogénico y antiaterogénico. Además, tienen la capacidad de reducir la grasa corporal, mientras se incrementa la masa corporal magra, teniendo un efecto antiobesidad en ratas (Tsuboyama et al., 2000).

El objetivo del presente trabajo fue analizar la composición de la grasa subcutánea de novillos de cuatro genotipos Hereford, Bradford $\frac{1}{2}$, Bradford $\frac{1}{4}$ y Bradford $\frac{3}{8}$, alimentados con tres dietas diferentes: Pasturas, Pasturas + 0.7% de suplementación y “Feedlot”. Indicadores nutricionales también fueron considerados.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Animales y dietas

Se extrajeron muestras de grasa subcutánea de 72 novillos correspondientes a los genotipos Hereford (H) y cruza Bradford ½ (B1/2), Bradford 3/8 (B3/8) y Bradford ¼ (B1/4). Cada lote, de acuerdo con el genotipo, se dividió en 3 dietas:

Dieta 1: pastoreo estricto;

Dieta 2: suplemento de grano de maíz partido (0.7 % de peso vivo) diario y libre acceso a pasturas;

Dieta 3: Feedlot (80% de concentrado con base de maíz, heno de alfalfa y porotos de soja, sin libre acceso a pasturas).

2.2. Análisis de lípidos

Luego de 24 horas a 4°C, se extrajeron muestras del músculo Longissimus dorsi de la 11ª costilla, de cada tratamiento. A cada una de ellas se le extrajo la grasa subcutánea destinada al análisis químico. Todas las muestras se conservaron a -20°C, hasta su posterior análisis. Se tomaron alícuotas de cada muestra de grasa subcutánea, que previamente fueron picadas cuidadosamente. Luego, se tomaron 5g de cada muestra y se llevaron a 50 ml con cloroformo. El extracto clorofórmico se utilizó para analizar los ácidos grasos y para la determinación de colesterol total, una vez saponificadas las muestras con una solución de KOH 4% en etanol absoluto, con un reactivo enzimático y colorimétrico (BioSystem S.A.). Los metil ésteres de ácidos grasos (FAME) fueron preparados de acuerdo con el método de Pariza et al. (2001), y medidos usando un equipo Chrompack CP 900 equipado con un detector de llama ionizante. Los correspondientes metil ésteres fueron separados mediante una columna capilar CP-Sil 88 (100m x 0.25mm i.d.); Chrompack Inc., Middleburg, The Netherlands, con nitrógeno como gas carrier. La temperatura del horno se programó a 70°C por 4 minutos, incrementándose de 70 a 170°C con un rango de 13°C/min, y luego, hasta 200°C a 1°C/min. Los ácidos grasos individuales fueron identificados comparándolos con tiempos de retención relativos a los estándares (PUFA-2 Animal Source. Supelco). Los ácidos grasos de los componentes de las dietas fueron determinados de la misma manera.

2.3. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó un diseño factorial de dos vías, dieta y genotipo, con 3 (pastoril, pasturas con 0,7% de granos y feed-lot) y 4 (H, B1/4, B1/2 y B3/8) niveles, respectivamente. El test de Tukey se aplicó para las comparaciones múltiples en los casos en que se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$). Para observar la relación existente entre las variables se aplicó la correlación de Pearson. El análisis discriminante mediante el método de "stepwise" (0.05 y 0.10 de probabilidad para el ingreso y egreso, respectivamente, de la variable al modelo) fue aplicado para identificar las variables de mayor peso en la clasificación de las dietas y/o de los genotipos. Todas las variables estudiadas se estandarizaron antes de realizar el análisis discriminante, para que tuvieran igual peso. El análisis estadístico fue realizado por medio del software SAS 6.1 1996 y SPSS V12.

3. Resultados y discusión

3.1. Efecto de la dieta en la composición en ácidos grasos de la grasa subcutánea

En la Tabla 1 se presentan los porcentajes de los distintos ácidos grasos de acuerdo con la dieta. En el caso de los ácidos grasos saturados, el ácido mirístico (C14:0) no mostró un efecto significativo respecto de la dieta. En cambio, los valores de los ácidos palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0) sí fueron significativos y mostraron un mayor porcentaje en los animales alimentados con pasturas. En cuanto a los impares, encontramos que el ácido pentadecanoico (C15:0) no presentó un efecto significativo respecto de la dieta, pero sí lo hizo el ácido margárico (C17:0), mostrando el mismo efecto que el C16:0 y el C18:0. Al observar los ácidos grasos monoinsaturados vemos que el miristoleico (C14:1) mostró un decrecimiento a medida que aumentaba la cantidad de concentrado en la dieta, es decir, presentó el menor porcentaje cuando la alimentación fue con 80% de concentrado. El ácido palmitoleico (C16:1) no fue afectado por el tipo de dieta. El ácido oleico trans (C18:1 t) y el oleico (C18:1) sí fueron significativamente afectados por la misma ($p < 0.001$). Los porcentajes más altos correspondieron a los animales que recibieron alimentación "feedlot", mostrando un progresivo incremento de estos ácidos grasos a medida que aumentaba la proporción de granos en la dieta. En cambio, el ácido heptadecenoico (C17:1) no fue afectado por de la dieta. En el caso de los ácidos grasos poliinsaturados,

linoleico n-6 (C18:2 n-6) y linolénico n-3 (C18:3 n-3), el efecto de la dieta fue muy significativo. La alimentación con pasturas provocó un mayor porcentaje de C18:3 n-3 ($p < 0.001$) y menor de C18:2 n-6 ($p < 0.001$), siendo este último mayor cuando la alimentación era "feedlot", con una notable diferencia. Estos resultados concuerdan con la composición de cada alimento, dado que las pasturas contienen gran cantidad de C18:3 n-3, mientras los granos tienen gran cantidad de C18:2 n-6 (García et al. 2015). La mayor proporción de CLA se presentó en la dieta en base a pasturas con un 0.7% de suplementación y en segundo lugar en la dieta estrictamente pastoril. Dicho de otra manera, la menor proporción de CLA se presentó en animales cuya alimentación fue a base de grano.

La dieta tuvo un efecto muy importante en la composición en ácidos grasos de la grasa subcutánea. Shingfield et al. (2013) destacan la influencia de las distintas velocidades para una completa biohidrogenación de los PUFA a C18:0 y el efecto de las altas concentraciones de C18:2 n-6 en la dieta. De acuerdo a Nakamura et al. (2004) altos niveles de C18:2 n-6 pueden inhibir la actividad de la delta 9 desaturasa y reducir así la síntesis de novo de C9-16:1 a partir de 16:0. Cruz-Fernández et al. (2007) demostraron que aumentando C18:2 n-6 en la dieta es posible inhibir la biohidrogenación ruminal llevando a la acumulación de productos intermediarios en el tejido adiposo. Variaciones en los cis-MUFA resultan difíciles de interpretar porque los mismos se originan por la dieta y la síntesis endógena. Johnson et al. (2012) sugieren que altas concentraciones de C18:2 n-6 en la dieta pueden reducir la elongación de C18:3 n-3 a C22:5 n-3 al competir por la delta 6 desaturasa. Generalmente la inclusión de PUFA n-6 en la dieta animal aumenta las proporciones de PUFA n-6 en los tejidos debido mayormente a una disminución de los PUFA n-3 y afectando así la relación n-6/n-3 (Raes et al., 2014). Consumo de carnes de animales que consumen pasturas comparadas con animales en sistemas con base a grano aumentan, los niveles en plasma y plaquetas de los PUFA n-3, en consumidores (McAfee et al. 2011). Hesley et al. (2016) relacionan el contenido de alfa linolénico en tejido adiposo con la resistencia a la insulina. El C12:0 y C14:0 son considerados más hipercolesterolemicos que C16:0 pero desde que se presentan en menores concentraciones su importancia como hipercolesterolemico es menor que el C16:0. Se considera que C12:0 y C16:0 elevan el colesterol total, LDL y HDL y aumentan algunos factores hemostáticos/trombóticos que promueven trombosis (Ntsomboh NG et al. 2016). Oliveira et al. (2012) consideran que C14:0 eleva el colesterol plasmático cuatro veces más que C16:0. El consumo de CLA es muy limitado y solo existen estimaciones sobre el mismo. Los datos informados para productos derivados de rumiantes oscilan entre 0,12 a 1,20 % (Reizenthaler et al. 2001). La alta concentración de C18:3 n-3 en las pasturas se relaciona con las mayores concentraciones de CLA en la grasa subcutánea de los animales que consumieron pasturas (Fiorentini et al., 2015). Hay una alta correlación entre la C18 delta 9 -desaturasa y el contenido de C18:1 n-9 de la dieta (Oliveira et al., 2011) lo cual explica nuestros resultados. La proporción de CLA depende de los factores dietarios, incluyendo la fuente y los niveles de lípidos en el alimento (French et al, 2000).

La grasa perirrenal es un depósito poco utilizado, pero tiene un mayor porcentaje de C18:3 n-3 y CLA que la grasa subcutánea y es más accesible durante el proceso de sacrificio. Ello sugiere la necesidad de desarrollar estrategias para aumentar las concentraciones de PUFA n-3 y CLA en carne y grasa de los rumiantes mediante el diseño de dietas y explotar la heterogeneidad de los distintos depósitos grasos (Mapiye et al., 2014).

3.2. Efecto del genotipo en la composición en ácidos grasos de la grasa subcutánea

En la Tabla 1 se presentan los porcentajes de los distintos ácidos grasos de acuerdo con el genotipo. Respecto del genotipo, los valores que presentaron los ácidos grasos saturados mostraron efectos significativos sobre el C14:0 y el C18:0. Mientras el C14:0 se presentó con mayores concentraciones en el genotipo Bradford ½, el C18:0 fue mayor en los novillos Hereford. En cambio, el C16:0 no mostró efecto significativo alguno respecto del genotipo. En cuanto a los impares, el C15:0 fue significativamente afectado y presentó mayor porcentaje en animales Bradford ½, coincidiendo con el C14:0. Asimismo, el C17:0 también presentó un efecto considerable, con un mayor valor para la raza Hereford. Entre los ácidos grasos monoinsaturados, sólo el C18:1 trans y el C18:1 fueron significativamente diferentes respecto de la raza ($p < 0.001$ y $p < 0.01$,

respectivamente). En los novillos Bradford 3/8 fue mayor la cantidad de C18:1, en tanto, el C18:1 trans fue mayor en animales Hereford. Por último, los ácidos grasos C14:1 y C17:1 no presentaron diferencias significativas respecto de la raza. Los ácidos grasos poliinsaturados C18:2 n-6 y C18:3 n-3 no presentaron efectos estadísticamente significativos pero las concentraciones de CLA también fueron afectadas por el genotipo. El mayor porcentaje correspondió a la grasa subcutánea de los novillos Bradford ¼, mientras el menor se presentó en Bradford 3/8.

Diferencias entre genotipos probablemente se deban a diferencias en las actividades de las enzimas que influyen en la expresión de genes y/o función de la enzima (Dance et al. 2009). Laborde et al. (2011) encontraron que la actividad de la Delta 9 desaturasa que convierte C16:0 a C16:1 es mayor en Simmental que en Red Angus. Variaciones genéticas fueron encontradas en las concentraciones de C14:0, C14:1c9, C16:0, C16:1c9, C18:0 y C18:1 c9 en grasa subcutánea de diversas razas por Kelly et al. (2012). Dichos autores asociaron esas variaciones al nivel de grasa subcutánea al encontrar que disminuciones de C18:1 correspondían a aumentos de C14:0, C16:0 y C18:0.

3.3. Efecto de la dieta y el genotipo en algunos indicadores de interés nutricional

Diversos parámetros relacionados con el valor nutricional de los lípidos dietarios se presentan en la Tabla 3.

La relación entre el C18:2 n-6 y el C18:3 n-3 es importante en la salud humana. Dicha relación fue menor cuando los animales consumen pasturas. Se observa una gran diferencia con la alimentación “feedlot”, en la que la proporción de C18:2 n-6 es mucho mayor que la de C18:3 n-3. Este resultado coincide con estudios previos, realizados sobre calidad de carne. El grupo genético también influyó significativamente, y los valores más altos se presentaron en animales H y B1/4. La interacción entre la raza y la dieta fue muy significativa ($p < 0.001$).

Otro indicador de interés es la proporción de MUFA presente. En este caso, el mayor porcentaje correspondió a la alimentación con grano y a los animales de raza B3/8. La interacción entre la raza y la dieta fue poco significativa ($p < 0.05$).

La proporción de ácidos grasos saturados, SFA, también se utiliza para evaluar la calidad nutricional de la grasa. Aquí se presentó el efecto provocado por la dieta de manera muy significativa ($p < 0.001$), mientras el del grupo genético resultó menor ($p < 0.05$). Notablemente más alto fue el porcentaje encontrado en animales cuya alimentación fue pastoril. A medida que aumenta la proporción de grano en el régimen alimenticio, el porcentaje de SFA en la grasa subcutánea va disminuyendo. Este resultado concuerda con aquel encontrado por García et al. (2008), en lípidos intramusculares de la carne. Respecto del genotipo, el menor valor se presentó en animales B1/4 y el mayor en H.

La relación entre MUFA y SFA fue también afectada por la dieta, el genotipo y la interacción entre ambos. En concordancia con lo anteriormente descrito, la dieta pastoril generó grasas subcutáneas con menores valores de la relación MUFA/SFA que la dieta “feedlot”. A su vez, los animales del genotipo H son los que presentaron el menor valor de esta relación.

La cantidad de colesterol en la grasa subcutánea se vio afectada sólo por la raza, pero de manera poco significativa ($p < 0.05$). El genotipo con mayor porcentaje de colesterol fue H, mientras la de menor fue B1/4. Sin embargo, en estudios previos se comprobó que el contenido de colesterol en la carne fue afectado por la dieta, siendo la pastoril aquella que provocó el menor porcentaje (García et al., 2008).

3.4. Aplicación del análisis discriminante a la composición en ácidos grasos

El análisis discriminante aplicado en las mediciones de los ácidos grasos en la capa subcutánea permitió agrupar las muestras de grasa subcutánea de novillos según las respectivas dietas aplicadas. Al estudiar los ácidos grasos, se observaron 2 funciones discriminantes (FD), las cuales fueron significativas ($p < 0,05$), y cada una de ellas explicó el 93,1 y 6,9% de la varianza total, lo que permitió clasificar correctamente el 95,8% de los casos agrupados originales y 93,1 % de los casos agrupados mediante la validación cruzada. Las variables

seleccionadas estandarizadas como las más importantes en la clasificación fueron: C14:0, A, C18:1, B, C18:2 n-6, CLA, MUFA y SFA. También se aplicó el análisis discriminante para ver una posible clasificación de los genotipos, el cual clasificó correctamente el 66,7% de los casos agrupados originales y el 55,6% de los casos agrupados validados mediante validación cruzada. El gráfico no se muestra debido a que se considera que estas variables reflejan más la clasificación por dieta.

4. Conclusiones

La dieta totalmente pastoril presentó niveles más altos de ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido linoléico (C18:3 n-3) y CLA y menores de los ácidos oleico (C18:1) y linoleico (C18:2 n-6) que la dieta de pasturas con 0.7% de suplemento y la de feedlot. El genotipo afectó los niveles de ácidos mirístico (C14:0), pentadecanoico (C15:0), margárico (C17:0), oleico trans (C18:1t), oleico (C18:1) y CLA. Los niveles más altos de CLA se presentaron en los novillos B1/4 y los menores en los de raza B3/8. La relación C18:2 n-6/C18:3 n-3 fue significativamente menor (<0.001) cuando la dieta fue exclusivamente pastoril. Los valores más altos se presentaron en las razas H y B1/4. La proporción de MUFA fue mayor en la grasa de los animales bajo el régimen “feedlot” y en aquellos del genotipo B3/8. La proporción de SFA se vio afectada por la dieta con un mayor grado de significación que por el genotipo ($p<0.001$ y $p<0.05$, respectivamente). Fue notablemente mayor el porcentaje encontrado en animales con dieta pastoril. El genotipo H presentó el mayor porcentaje de SFA. La dieta pastoril y el genotipo H presentaron los menores valores para la relación MUFA/SFA. Ni el genotipo ni la dieta afectaron significativamente los niveles de colesterol. H fue el genotipo con mayor concentración, pero con un bajo nivel de significación ($p<0.05$).

El análisis discriminante determinó grandes diferencias entre las dietas, pero no así entre los grupos genéticos.

Tabla 1: Genotipo, dieta y efecto de interacción en composición en ácidos grasos de grasa subcutánea de novillos, a partir de cuatro tipos genéticos, alimentados con tres dietas diferentes (% en peso sobre el total de ácidos grasos).

Acido graso	Dieta			Genotipo				RSME	Dieta	Genotipo	DxG
	Pastura	Pastura + 0.7%	Feedlot (80%)	H	B1/2	B1/4	B3/8				
C14:0	4.01	3.96	3.89	3.97 b	4.34 a	4.05 b	3.46 b	0.7281	NS	**	*
A	0.54 a	0.50 a	0.20 b	0.38	0.45	0.43	0.39	0.1146	***	NS	NS
C14:1	0.50 a	0.42 b	0.26 c	0.37	0.45	0.38	0.36	0.3370	***	NS	NS
C15:0	1.89	1.97	1.83	1.73 b	2.19 a	1.84 b	1.83 b	0.3399	NS	***	NS
C16:0	27.04 a	26.30 ab	25.13 b	26.84	26.38	25.66	25.74	1.7627	**	NS	NS
C16:1	4.85	5.25	4.94	4.36	5.11	5.48	5.11	0.9731	NS	NS	NS
C17:0	1.69 a	1.30 b	1.48 b	1.62 a	1.38 b	1.44 ab	1.53 ab	0.2616	***	*	NS
C17:1	1.07	1.00	1.13	1.03	1.09	1.13	1.02	0.2028	NS	NS	NS
C18:0	15.42 a	12.95 b	12.33 b	15.16a	12.11 b	12.96 ab	14.04 ab	2.6105	***	**	NS
C18:1t	3.27 b	2.80 b	4.20 a	4.08 a	3.43 ab	3.63 ab	2.53 b	1.1166	***	***	*
C18:1	32.35 b	37.13 a	38.47 a	33.76 b	36.11 ab	36.03 ab	38.03 a	3.5297	***	**	*
B	0.88 a	0.83 a	0.60 b	0.74	0.80	0.76	0.78	0.1371	***	NS	NS
C	0.38 ab	0.46 a	0.36 b	0.30 b	0.52 a	0.40 ab	0.39 ab	0.1469	*	***	***
C18:2 n-6	1.40 b	1.57 b	3.17 a	2.02	2.31	1.99	1.87	0.6612	***	NS	**
C18:3 n-3	1.06 a	0.89 a	0.33 b	0.72	0.87	0.74	0.71	0.2421	***	NS	NS
CLA	0.67 b	0.79 a	0.41 c	0.64 a	0.63 ab	0.74 a	0.48 b	0.1702	***	***	NS

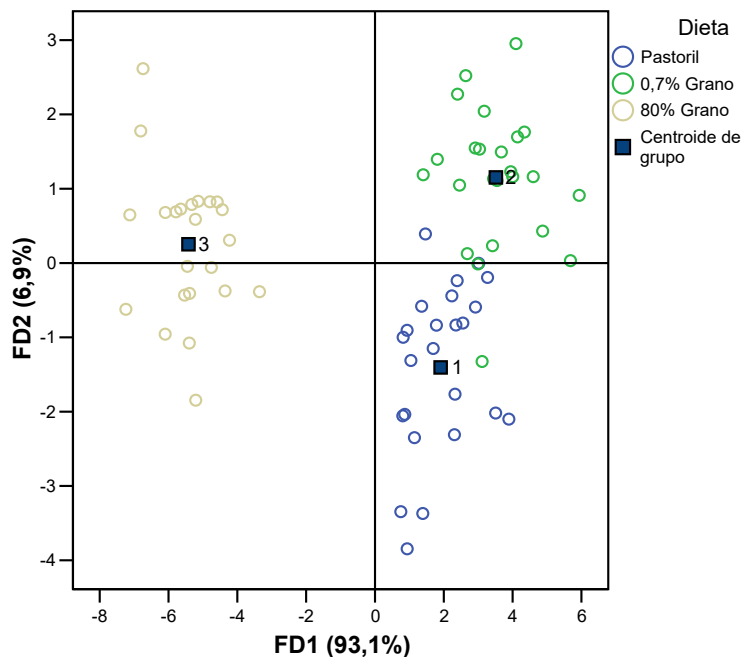
Las letras diferentes (abc), en las filas, tienen valores de medias estadísticamente diferentes. NS: no significativo ($p>0.05$). *: $p<0.05$, **: $p<0.01$ y ***: $p<0.001$. RSME: raíz cuadrada del cuadrado medio del error. A, B y C: componentes no identificados.

Tabla 2: Efecto de la dieta y el genotipo en algunos indicadores de interés nutricional.

Indicador	Dieta			Genotipo				RMSE	Dieta	Geno tipo	DxG
	Pastura	Pastura + 0.7%	Feedlot (80%)	H	B1/2	B1/4	B3/8				
C18:2 n-6/C18:3 n-3	1.41 b	1.90 b	11.72 a	6.50 a	3.25 ab	5.75 a	4.54 b	2.5720	***	**	***
MUFA	37.20 b	42.38 a	43.41 a	38.11 b	41.22 ab	41.51 ab	43.14 a	3.8765	***	**	*
SFA	46.48 a	43.21 b	37.65 c	44.72 a	41.48 b	41.21 b	42.37 ab	3.4297	***	*	NS
MUFA/SFA	0.81 b	0.99 ab	1.16 a	0.86 b	1.02 a	1.03 a	1.06 a	0.1629	***	**	*
Colesterol	129.06	119.60	131.02	137.42 a	123.84 ab	111.87 b	133.11 ab	26.4356	NS	*	NS

Las letras diferentes (abc), en las filas tienen valores de medias estadísticamente diferentes. NS no significativo ($p > 0.05$), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$. RMSE raíz cuadrada del cuadrado medio del error.

Gráfico 1: Análisis discriminante aplicado a ácidos grasos en grasa subcutánea de novillos para diferenciar los efectos de las dietas.



BIBLIOGRAFÍA

Brewer MS. (2012). *Reducing the fat content in ground beef without sacrificing quality: A review. Meat Science* 91:385-395.

Costa ASH, Rico-Pires VM, Mendez-Godinho C, Mestre-Prates JA. (2013) *Expression of genes controlling fat deposition in two genetically diverse beef cattle breeds fed high or low silage diets. BMC Veterinary Research* 9: 118-134.

Cruz-Hernandez C, Kramer JKG, Kennelly JJ, Glimn DR, et al (2007) *Evaluating the conjugated linoleic acid and trans 18:1 isomers in milk fat of dairy cows fed increasing amounts of sunflower oil and a constant level of fish oil. Journal Dairy Science* 90:3786-3801.

Dance LJE, Matthews KR, Doran O. (2009). *Effect of breed on fatty acid composition and stearoyl-CoA desaturase protein expression in the Semimembranosus muscle and subcutaneous adipose tissue of cattle. Livestock Science* 125: 291-297.

Fiorentini G, Lage JF, Carvalho IPC et al. (2015) *Lipid sources with different fatty acid profile and quality of beef from confined Nellore steers. Asian Australas. Journal Animal Science* 28 (7): 976-986.

French, P., Stanton, C., Lawless, F., O'Riordan, E. G., Monahan, F. J. and Caffey, P. J. et al. (2000). *Fatty acid composition, including conjugated linoleic acid of intramuscular fat from steers offered grazed grass, grass silage or concentrate-based diets, Journal of Animal Science* 78: 2855–2949.

Fritsche J, Steinhardt H. (1998). *Amounts of conjugated linoleic acid (CLA) in German foods and evaluation of daily intake. Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und -Forschung A – Food Research and Technology* 206: 77–82.

Hesley CE, Siegl KJ, Sabate J, et al. (2016) *Adipose tissue alpha-linolenic acid is inversely associated with insulin resistance in adults. Am. J. Clin. Nutr.* 103(4):1105-1110.

Garcia PT, Pensel N A, Sancho A M, Latimori N J, Kloster A M, Amigote M A, Casal J J. (2008). *Nutritional aspects of beef lipids according to breed and diet in Argentina. Meat Science* 79: 500-508.

Garcia PT (2011) *Metabolism of α -linolenic acid (ALA) in meat animals. En Soybean and Nutrition. Editor Hany A El Shemy. ISBN 978 -953-307-536-5. www. Interchopen.com/download /pdf/19989.*

Garcia PT, Casal JJ. (2012). *Linoleic and alpha linolenic acids content in pork, beef and lamb lipids. Garcia, P.T. y Casal, J.J. Chapter 1 in Linoleic acid , biochemical properties and health effects. Nova publishers ISBN 978-1-62257-399-8 (2012).*

Garcia PT, Pordomingo A, Perez CD, Rios MD, Sancho AM, et al. (2015) *Influence of cultivar and cutting date on the fatty acid composition of forage crops for grazing beef production in Argentina. Grass Forage Science* Doi:10.1111/GFS.12167.

Garcia PT, Latimori N, Sancho AM, Casal JJ. (2017) *Diet and genotype effects on polyunsaturated fatty acids of beef lipids. Research in Agriculture* 1:7-14 <http://dx.doi.org/10.22158/ra>.

Jiang T, Mueller CJ, Busboom JR, Nelson ML et al. (2013) *Fatty acid composition of adipose tissue and muscle from Jersey steers was affected by finishing diet and tissue location. Meat Science* 93 :153-161.

Johnson GH, Fritsche K (2012) *Effect of dietary linoleic acid on markers of inflammation in healthy persons: A systematic review of randomized controlled trials. J. Acad. Nutr. Diet* 112: 1029-1041.e1015.

Kelly MJ, Tume RK, Newman S, Thompson JM. (2012). *Genetic variation in fatty acid composition of subcutaneous fat in cattle. Animal Production Science* 53 (2):129-133.

aborde FL, Mandell IB, Tosh JJ et al. (2011) *Breed effects on growth performance, carcass characteristics, fatty acid composition, and palatability attributes in finishing steers. Journal of Animal Science* 79(2): 355-365.

McAfee AJ, McSorley EM, Cuskally GJ et al. (2011). *Red meat from animals offered a grass diet increased plasma and platelet n-3 PUFA in healthy consumers. British Journal of Nutrition* 105(1):80-86.

Mapiye C, Turner TD, Rolland DC, Baron VS et al. (2013) *Adipose tissue and muscle fatty acid profiles of steers*

fed red clover silage with and without flaxseed. Livest. Sci 151 :11-20.

Mapiye C, Aalhus JL, Turner TD, Rolland DC et. al. (2014) Types of oilseed and adipose tissue influence the composition and relationships of fatty acid biohydrogenation intermediate product hay diet. *Lipids* 49:275-286.

Mapiye C, Vahamani P, Aalhus JL, Rolland DS, et al. (2015) Fatty acid composition of beef steers as affected by diet and fat depot. *South African Journal of Animal Science* 45 (4):

Marmer W N, Maxwell R J, Williams J E. (1984). Effects of dietary regimen and tissue site on bovine fatty acid profiles. *Journal of Animal Science*; 59: 121-129.

Mir Z, Rushfeldt MI, Mir PS, Paterson LJ, Weslake RJ (2000). Effects of dietary supplementation with CLA or linoleic acid rich oil in the lamb content of lamb tissues, *Small Ruminant Research* 36: 25-31.

Nakamura MT, Nara TI. (2004). Structure, function, and dietary regulation of $\Delta 6$, $\Delta 5$ and $\Delta 9$ desaturases. *Ann. Rev. Nutr.*24:345-376.

Nantapo CWT, Muchenje V, Nkukwana TT, Hugo A, et al (2015) Socio-economic dynamics and innovative technologies affecting health-related lipid content in diets: Implications on global food and nutrition security. *Food Research International* 76:896-905.

Ntsomboh NG, Likeng-Li NGue C, Bell JM, et al. (2016) Effects of dietary fatty acids on human health. *Food and Public Health* 6 (3):75-85.

Oliveira DM, Sampaio AAM, Henrique W. et al. (2012). Quality traits and lipid composition of meat from Nellore Young bulls fed with different oils either protected or unprotected from rumen degradation. *Meat Science* 90:28-35.

Pariza MW, Park, Yeonhwa C, Mark E. Review. (2001). The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Progress in Lipid Research* 40: 283-298.

Raes K, De Smet S, Demeyer D. (2014). Effect of dietary fatty acids on incorporation of long chain polyunsaturated fatty acids and conjugated linoleic acid in lamb, beef and pork meat: A review *Animal Feed Science Technology* 113:199-221.

Ritzenthaler KL, McGuire MK, Falen R. (2001) Estimation of conjugated linoleic acid intake by written dietary assessment methodologies underestimation actual intake evaluated by food duplicate methodology. *Journal of Nutrition* 131:1548-1554.

Shingfield KJ, Bonnet M, Scollan ND. (2013). Recent development in altering the fatty acid composition of ruminant-derived foods. *Animal* 7(Suppl.1):132-162. *Soybean and Nutrition*. Editor: Hany A.-El-Shemy. ISBN 978-953-307-536-5. www.intechopen.com/download/pdf/19989.

Tsuboyama-Kasaoka N, Takahashi M, Tanemura K, Kim H.J, Tange T., Okuyama H, et al. (2000). Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. *Diabetes* 49: 1534-1542.

Vahmani P, Mapiye C, Prieto N, Rolland DC, et al (2015) The scope for manipulating the polyunsaturated fatty acid content of beef: A review *Journal Animal Science Biotechnology* 6:29 doi: 10.1186 /s40104-015-0026-z.

EFICACIA ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA OLEAGINOSA EN ACEITE DE CHÍA Y EN MODELO DE EMULSIÓN O/W

ANTIOXIDANT EFFICACY OF EXTRACTS FROM OIL INDUSTRY BY-PRODUCTS IN CHIA OIL AND IN O / W EMULSION MODEL

Jalil Ramallo, M.V.1; Bertolino, C.L.1; Martinez, M.L.12; Maestri, D.M12; Bodoira, R.M.3*

¹ Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTA). Facultad de Ciencias Exactas. Físicas y Naturales (FCEfyN). Universidad Nacional de Córdoba (UNC).

² Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV - CONICET). Universidad Nacional de Córdoba.

³ Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos Córdoba (ICYTAC - CONICET). Universidad Nacional de Córdoba (UNC).

*Correspondencia: rominabodoira@hotmail.com

Resumen

Se estudiaron extractos secos (ES) ricos en compuestos fenólicos de tegumento de maní (ETM) y de harina de sésamo (EHS), obtenidos mediante agua-etanol subcríticos. Los mismos fueron evaluados como agentes antioxidantes en aceite de chía (Rancimat -100 °C) y en emulsión ácida O/W (40 °C-15 días), comparando su accionar con TBHQ. Previamente se caracterizaron mediante el contenido de fenoles totales (ETM: 520 y EHS: 120 mg AG/g ES); DPPH (EC50 ETM 4.97 y EHS 82.83 µg ES/mL); FRAP (EC50 ETM 0.36 y EHS 3.64 µg ES/mL) y β-caroteno-linoleico (%AA ETM 40.76 % y EHS 22 %). En presencia de ETM, la estabilidad del aceite de chía aumentó significativamente (75-85 %) y la respuesta fue dependiente de la concentración. En el ensayo de almacenamiento de las emulsiones O / W, el control sin ningún antioxidante alcanzó un índice de peróxidos (IP) de 86 meq O₂ / kg de aceite a los 15 días, mientras que las emulsiones con ETM apenas superaron 15 meq O₂ / kg. Utilizando 6000 ppm de ETM se disminuyó la velocidad de reacción más de un 50 %. En el caso de EHS, aumentó la estabilidad del aceite de chía, en menor proporción que el ETM (52-59 %), sin embargo en emulsiones O/W demostró un comportamiento prooxidante. Los diferentes resultados en ambas matrices pueden justificarse por el efecto del pH y la composición característica de cada extracto. La extracción con agua-etanol subcríticos del tegumento de maní puede proporcionar extractos ricos en compuestos fenólicos con uso potencial como antioxidante natural de aceite de chía libre y emulsionado en solución ácida.

Palabras claves: Subproductos industria oleaginosa, valor agregado, tegumento de maní, expeler de sésamo, extracción subcrítica, antioxidantes naturales, aceite de chía, emulsión O/W.

Abstract

Dry extracts (DE) rich in phenolic compounds of peanut skin (PSE) and sesame cake (SCE), obtained by subcritical water-ethanol were studied. They were evaluated as antioxidant agents in chia oil (Rancimat -100 °C) and in O / W acid emulsion (40 °C-15 days), comparing their action with TBHQ. Previously they were characterized by the total phenols content (PSE: 520 and SCE: 120 mg GA / g DE); DPPH (IC50 PSE 4.97 and SCE 82.83 µg DE / mL); FRAP (IC50 PSE 0.36 and SCE 3.64 µg DE / mL) and β-carotene-linoleic (PSE 40.76% and SCE 22%). In the presence of PSE, chia oil stability increased significantly (75-85%) and the response was concentration dependent. In the storage test of O / W emulsions, the control without any antioxidant reached and peroxide index of 86 meq O₂ / kg oil at 15 days, while the emulsions with PSE barely exceeded 15 meq O₂ / kg. Using 6000 ppm PSE the reaction rate was decreased more than 50%. In the case of SCE, the stability of chia oil increased, in a lower proportion than PSE (52-59%), however, in O / W emulsions it showed a pro-oxidant behaviour. These different results in both matrices can be justified by the pH effects and the extracts composition. Extraction with subcritical water-ethanol from peanut skin can provide extracts rich in phenolic compounds with potential use as a natural antioxidant of free chia oil and emulsified in acidic solution.

Keywords: Oil industry by-products, add value, peanut skin, sesame cake, subcritical extraction, natural antioxidants, chia oil, O/W emulsions.

Introducción

En la actualidad algunos procesos industriales son altamente ineficientes considerando el volumen de residuos, principalmente de naturaleza orgánica que generan. En este contexto, para limitar la producción y acumulación de corrientes de desecho de alimentos, una opción es utilizarlos tanto como sea posible y darles un valor agregado. Por ejemplo, a través de la recuperación de moléculas biológicamente activas que pueden ser aprovechadas en diferentes áreas de aplicación (salud, agricultura, alimentos, cosmética, etc) (Nazzaro et al., 2018).

Dentro de los compuestos bioactivos, los fenólicos ocupan un lugar importante ya que representan una alternativa a los antioxidantes (AOs) sintéticos (BHA, el BHT y TBHQ), que están siendo reevaluados considerando sus efectos en el sistema endócrino (Pop et al., 2013) y una posible acción carcinogénica (Gharavi et al., 2007; Eskandani et al., 2014). El uso de AOs es el método más efectivo, conveniente y económico (Shahidi & Zhang, 2015) entre los diversos empleados para evitar los procesos de oxidación en alimentos que contienen lípidos.

Los procesos de oxidación, que son más rápidos en matrices más insaturadas como el aceite de chía (un 60 % de α -linolénico - Ayerza & Coates, 2009), disminuyen la calidad nutricional por pérdida de ácidos grasos esenciales y de actividad vitamínica, alteran las propiedades organolépticas y generan productos potencialmente tóxicos (Dobarganes & Márquez-Ruiz, 2003). A su vez, los lípidos de la dieta, se consumen con frecuencia como emulsiones lo que aumenta su susceptibilidad a la oxidación debido a la gran área interfacial entre la fase lipídica y la fase acuosa. Además, en comparación con un aceite libre, en una emulsión existen múltiples factores que afectan el proceso, como ser; el pH, el tamaño de gota, la viscosidad, el tipo y cantidad de emulsionante, el proceso de homogenización, los prooxidantes como los metales de transición presentes en la fase acuosa, entre otros (Jacobsen, 2016).

Existe entonces un gran interés en AOs de fuentes naturales (Wu et al., 2019), así como desde un punto de vista sustentable, de los que se obtienen a partir de residuos de la industria tales como los expellers de extracción de aceite (Bolling et al., 2010; Terpinc et al., 2012; Zhao et al., 2012), cáscaras y pieles de diferentes frutos (Baino et al., 2014; Barba et al., 2016; Banerjee et al., 2017; Caporaso et al., 2017; Lai et al., 2017). Se ha demostrado además que la extracción mediante flúidos subcríticos utilizando solventes GRAS (Generally Recognized As Safe), es una tecnología más limpia, rápida y segura que los métodos de extracción convencionales como Soxhlet y maceración con solventes orgánicos (Abdelmoez et al., 2014; Todd & Baroutian, 2017; Bodoira et al., 2017ab; Ko et al., 2014).

En Argentina, la industria manisera es de gran importancia, principalmente en la economía regional de la provincia de Córdoba. Como consecuencia de la operación de blanchado se genera una corriente residual de tegumento de maní (TM) que corresponde al 3 % del peso inicial (Lorenzo et al., 2018). Las semillas de sésamo por su parte, en el territorio argentino son producidas en menor cantidad, pero la producción de este aceite a gran escala ocupa el octavo lugar en el mercado mundial de aceites debido a su alto contenido lipídico (Bodoira et al., 2017a). La misma se realiza mediante tecnología de prensado (Martínez et al., 2013) resultando la masa sólida en un expeller o torta que, cuando se deslipidiza totalmente y se muele, se denomina harina de sésamo (HS).

Múltiples estudios han demostrado que tanto en el TM (Nepote et al., 2005; Wang et al., 2007; Ballard et al., 2010; Larrauri et al., 2016; Bodoira et al., 2017b), como en la HS (Suja et al., 2005; Terpinc et al., 2012; Kenari et al., 2014; Bodoira et al., 2017a), se encuentran cantidades considerables de compuestos fenólicos con capacidad antioxidante.

Existen incluso investigaciones previas que han probado extractos de TM (ETM) para mantener la calidad y detener o retrasar los procesos de oxidación de lípidos en diferentes matrices alimenticias (Nepote et al., 2002; 2004; O'Keefe & Wang 2006; Yu et al., 2010; De Camargo et al., 2012; 2017; Larrauri et al., 2012; Sichiatti Munekata et al., 2015; 2016), principalmente en productos cárnicos (Lorenzo et al., 2018). Además, algunos autores informaron ciertos efectos antimicrobianos de los ETM (Sarnoski, et al., 2012; Pizzolitto et al., 2013; Peng et al., 2015; De Camargo et al., 2017; Bodoira et al., 2019) que se suman a los efectos AOs y generan ventajas obvias a un aditivo alimentario. Incluso un trabajo reciente con el mismo ETM usado en este trabajo demuestra, mediante estudios in vivo, que no posee toxicidad alguna (Rossi et al., 2020).

En cuanto a extractos de HS (EHS) aplicados en sistemas alimenticios, si bien existe menor evidencia que para ETM, se reportó que pueden estabilizar los aceites de soja, girasol y cártamo (Bahmaei & Peyman, 2012; Mohdaly, et al., 2011; Suja et al. 2004) así como la mantequilla de oleína (Nadeem et al., 2014) de manera más eficiente que el BHT.

Por lo tanto, no hay antecedentes del efecto de estos extractos sobre la estabilidad de un aceite muy insatura-

do como el de chía, ni sobre el efecto en un sistema de tipo emulsión. Este último representa un sistema estratégico para incluir nutrientes relevantes en diversas matrices dietéticas. El objetivo de este trabajo fue evaluar la efectividad de extractos secos de estos subproductos, obtenidos mediante fluidos subcríticos, sobre la estabilidad oxidativa de aceite de chía libre y en un modelo de emulsión ácida de tipo O/W.

2. Materiales y métodos

2.1 Acondicionamiento de las matrices y extracción con fluidos subcríticos

El TM se obtuvo de maní tipo Runner como subproducto del proceso de blanqueo industrial típico (90 °C, 10 min). Las semillas de sésamo se obtuvieron de plantaciones comerciales ubicadas en la provincia de Salta. Se llevó a cabo inicialmente una limpieza manual al TM y luego con un tamiz automático (EJR 2000 Zonytest, Argentina) se eliminaron harinas indeseadas. Las semillas de sésamo, primeramente se desgrasaron en forma parcial utilizando una prensa de tornillo a escala piloto (Komet, modelo CA 59 G, Alemania) siguiendo las condiciones de Martínez et al. (2017). Posteriormente en ambas matrices, se eliminó posibles grasas remanentes mediante Soxhlet, (n-hexano-6 h), se molieron y tamizaron a fin de obtener un tamaño de partícula uniforme (0.5 mm).

Para la extracción se utilizó el método de fluidos subcríticos con agua-etanol y un equipo semicontinuo con condiciones ya optimizadas en trabajos previos (Bodoira et al., 2017ab). Los extractos obtenidos fueron centrifugados (20 min- 9000 rpm), su solvente removido con un evaporador rotatorio a 40 °C y el remanente en liofilizador (Pfeiffer, Mod: DUO 5 M, Germany). Finalmente los extractos secos (ES) fueron almacenados a -20 °C en envases de vidrio color ámbar y en atmósfera de nitrógeno hasta el momento de su análisis.

2.2 Caracterización de los extractos secos de Tegumento de Maní y Harina de Sésamo

Para caracterizar a los ES, los mismos se re-suspendieron en metanol en concentraciones adecuadas para realizar las siguientes técnicas analíticas.

* Contenido de fenoles totales (CFT) según Singleton et al (1999), expresando los resultados en mg ácido gálico (AG)/mg ES.

* Capacidad de eliminación de radicales libres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) según Apak et al. (2013), expresando los resultados como EC50 (concentración requerida en µg ES/mL para reducir a la mitad la concentración inicial del radical DPPH) y como equivalentes de Trolox en mmol Tx eq/g ES.

* Poder Reductor (FRAP) según Benzie & Strain (1996). Los resultados se expresaron como mmol Tx eq/g ES y como EC50 (concentración en µg ES/mL que causa un aumento del 50% de la absorbancia inicial).

* β-Caroteno-Linoleico: técnica basada en la capacidad de minimizar la pérdida de coloración del β-caroteno por oxidación en una emulsión con ácido linoleico. La determinación se realiza mediante mediciones espectrofotométricas en el tiempo (Marco, 1968) y la actividad antioxidante (%AA) del extracto se calcula según:

$$\%AA = [1 - ((AmT0 - AmT1) / (AcT0 - AcT1))] * 100$$

donde AmT0 es la absorbancia inicial de la muestra, AmT1 la absorbancia a los 120 min, y AcT0 y AcT1 las absorbancias del control. Finalmente los resultados se expresan como EC50 (concentración en µg ES/mL a la cual %AA es 50%) y como mmol Tx eq/g ES.

* Determinación del Coeficiente de partición (Log P): considerando la importancia de la solubilidad de un antioxidante en la fase continua o dispersa de una emulsión, se puede estimar el comportamiento lipofílico/hidrofílico de los extractos a través del cálculo de Log P, según Farhoosh et al. (2016). Cuando los valores de Log P son menores a cero, demuestran tendencia hacia un comportamiento hidrofílico debido a que la concentración de soluto predomina en la fase acuosa. De lo contrario, los resultados mayores a cero se corresponden con una mayor abundancia de soluto en la fase oleosa, y mientras mayor sea el valor numérico más fuerte es el carácter lipofílico.

2.3 Ensayo de estabilidad oxidativa en aceite de chía

Para probar la actividad antioxidante de ETM y EHS, se evaluó la estabilidad oxidativa del aceite de chía mediante el método de Rancimat (AOCS-2009 Cd 12b-92 e ISO 6886). Se utilizaron 3 g de aceite a 100 °C con un flujo de aire de 20 L/h. Los ES fueron añadidos con 150 µL de metanol en concentraciones seleccionadas

según ensayos previos (2000, 3000, 4000, 6000, 8000, 10000 ppm de ETM y 8000, 10000, 12000 y 14000 ppm de EHS). También se realizó un control negativo sin antioxidante (sólo con 150 µL de metanol) y un control positivo con 200 ppm de TBHQ (concentración máxima permitida por Código Alimentario Argentino). La estabilidad del aceite se determinó en términos de tiempo de inducción (TI) (h) y la efectividad de los extractos se expresó como factor de protección (FP):

$$FP = \frac{\text{(tiempo de inducción del aceite con antioxidante (horas))}}{\text{(tiempo de inducción del aceite sin antioxidante (horas))}}$$

2.4 Ensayo de estabilidad oxidativa en emulsión O/W de aceite de chía

Las emulsiones fueron realizadas siguiendo la metodología de Ospina et al. (2019), con algunas modificaciones. Se seleccionó un pH ácido de 3.5 para representar el típico de productos alimenticios ácidos, tales como mayonesa y algunas salsas. Los ES se solubilizaron en etanol/agua (3:2 v/v) y se homogeneizaron con 5 g de aceite de chía, 1 g de Tween 80 y 50 mL de buffer acetato de sodio 20 mM (pH 3.5) con un homogeneizador Ultraturrax (IKA T18, Alemania) operado a 18000 rpm durante dos minutos. La emulsión (en baño de hielo) se sometió a una segunda etapa de homogeneización con sonda ultrasónica (Modelo 150 V / T, Biologist, INC, EE. UU) operada a 40% de potencia. Las concentraciones finales fueron entre 4000 y 6000 ppm para ETM y entre 8000 y 12000 ppm para EHS, TBHQ a 200 ppm y un control negativo sin ningún antioxidante. Cada emulsión (por triplicado) en un frasco de vidrio ámbar (10 mL) cubierto con film, se incubaron en estufa a 40 ° C durante quince días.

Se tomaron muestras cada tres días y se midió el contenido de sus productos de oxidación extrayendo el aceite de chía con 30 mL de iso octano : 2-propanol (2:1 v/v). Luego se determinó la cantidad de peróxidos lipídicos (productos de oxidación primarios) según AOCS (2009) expresando los resultados como meq O₂/kg aceite. También se midió la cantidad de productos secundarios de oxidación, según el cálculo del índice de p-anisidina (Norma NMX-F-051-SCFI-2008).

La oxidación de los aceites vegetales sigue principalmente la cinética de medio orden y determinar la velocidad de formación de hidroperóxidos, es una medida de la velocidad de oxidación (Labuza, 1971) del aceite que puede usarse para comparar lo que sucede con este parámetro cuando añadimos AOs.

$$dY/dt = K_M * Y^{(1/2)} * [RH]$$

donde Y es la concentración de hidroperóxidos, t el tiempo de oxidación, KM la constante de velocidad mixta (integrada por la constante de velocidad de iniciación, de propagación y de finalización) y [RH] es la concentración del sustrato lipídico. A partir de las ecuaciones de las curvas de velocidad de reacción para los distintos tratamientos (calculadas a partir de los valores de IP) se obtuvieron los valores de la pendiente de cada curva (KM[RH₀]/2). Un punto importante es la consideración de que [RH₀] (concentración de aceite al tiempo 0) es constante en el tiempo de oxidación e igual para todos los tratamientos. De esta forma, se puede realizar directamente la relación entre las pendientes de cada tratamiento (KM[RH₀]/2) y la del control negativo (KMC[RH₀]/2), que multiplicada por 100 da el parámetro cinético KM/KMC% (donde KM es la constante de velocidad mixta de la emulsión que contiene extracto y KMC es la constante de velocidad mixta de la emulsión control sin antioxidante).

2.5 Análisis estadísticos

Los resultados fueron analizados por análisis de varianza (ANAVA). La normalidad de los datos se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Las comparaciones entre tratamientos se determinaron mediante la prueba de Fisher. Todos los análisis se realizaron con INFOSSTAT / Professional 2014 (FCA-UNC, Argentina). Los tratamientos se realizaron por triplicado y se consideraron significativamente diferentes a valores de p < 0.05.

Resultados y discusión

Caracterización de los extractos secos de Tegumento de Maní y Harina de Sésamo

En la Tabla 1 se muestran los resultados sobre capacidad antioxidante y contenido de fenoles totales (CFT) para ambos extractos. Al comparar el accionar antioxidante entre ellos, en todas las mediciones realizadas el

ETM es significativamente más eficiente que el EHS. El CFT es aproximadamente cuatro veces más en el ETM que en EHS. También lo fue, y en mayor medida, la eficacia para interrumpir la secuencia de reacciones de oxidación. Comparando los valores de EC50 se observa que se requiere 16 veces mayor cantidad de EHS que de ETM para reducir la concentración del radical DPPH a la mitad; y 10 veces mayor proporción para lograr el mismo poder reductor según la técnica FRAP. En cuanto a los valores de β -caroteno-linoleico, se requiere aproximadamente seis veces más de EHS que de ETM para conseguir el 50 % de actividad contra la oxidación por parte de peróxidos lipídicos en emulsión.

Las técnicas utilizadas miden capacidades diferentes: atrapamiento de radicales libres (β -caroteno-linoléico y DPPH) o poder reductor (FRAP). Tanto en DPPH como FRAP el mecanismo de transferencia de electrones (TE) es el dominante, mientras que en β -caroteno-linoleico lo es el mecanismo de transferencia de hidrógenos (TH). Observando los resultados en equivalentes de trolox (tabla 1) ya que las EC50 no son comparables entre técnicas, se evidencia que existe mayor eficacia antioxidante en esta última técnica, demostrando que el mecanismo TH es dominante para ambos extractos y dejando en evidencia que en emulsión ambos se muestran efectivos, aunque el ETM mucho más. A su vez si comparamos técnicas con el mismo mecanismo químico de transferencia (TE) como DPPH y FRAP, el poder reductor parece ser la capacidad dominante cuando de este mecanismo se trata. Esto último se da en ambos extractos, siendo los milimoles de trolox equivalentes para FRAP un 28% más alto que para DPPH en ETM y un 44% más alto en EHS.

Si comparamos con patrones y AOs sintéticos de referencia, Ospina et al. (2019) con la técnica DPPH informaron valores de 3.49 mmol Tx eq/g para TBHQ y de 1.63 mmol Tx eq/g para α -tocoferol. Podemos evidenciar que los valores obtenidos para ETM en este trabajo (2.57 mmol Tx eq/g ES) fueron superiores a los del α -tocoferol, no así respecto al AO sintético TBHQ, el secuestrador de radicales libres por excelencia. El caso de EHS muestra una capacidad muy inferior (0.29 mmol Tx eq/g ES) a los AOs sintéticos usados por estos autores.

En cuanto al CFT del ETM (520 mg AG/g ES), es un resultado intermedio comparado con los obtenidos en trabajos previos con este tegumento. Braga et al., (2016) produjeron un extracto liofilizado (mediante UAE con etanol al 80 % y posterior concentrado) con un CFT de 404.4 mg AG/g, mientras que Constanza et al. (2012) lograron un extracto secado por atomización que alcanzó un CFT de 712 mg AG/g. En cuanto al ensayo de DPPH para ETM resultaron necesarios sólo 4.96 μ g ES/mL para reducir la concentración inicial del radical un 50 %, mientras que Larrauri et al. (2016) mostraron un valor inferior (2.01 μ g ES/mL), aunque con extractos purificados. Braga et al., (2016) por su parte, informan un valor considerablemente mayor de concentración necesaria (20 μ g ES/mL). El ensayo de FRAP fue menos estudiado en trabajos previos con ETM. En este estudio resultó en un valor de 3.58 mmol eq Tx/g ES, el cual supera ampliamente al reportado por De Camargo y colaboradores (2017) (0.45 mmol eq Tx/g ES), utilizando maceración con acetona como solvente de extracción.

En cuanto a EHS, el valor de CFT (120 mg AG/g ES) fue el doble al informado por Peschel et al. (2007) (65 mg AG/g ES) utilizando maceración con agua a 60 °C. Por otra parte Kenari et al. (2014), utilizando UAE y etanol como solvente de extracción, obtuvieron también un valor inferior (83 mg AG/g ES), así como Suja et al. (2005) y Mohdaly et al. (2013). Estos últimos autores, evaluaron también la capacidad antioxidante por DPPH de EHS obtenidos a partir de maceración, alcanzando un %inh = 46 % para 200 μ g ES/mL, valor casi duplicado por los EHS del presente trabajo (85 % inh).

Finalizando la caracterización de los ES y en cuanto a su solubilidad, en la Tabla 1 se muestran los resultados del coeficiente de partición a pH 3.5 y 5.5. Los valores negativos indican que ambos ES poseen características hidrófilas. A pH 5.5, no hay diferencias entre ambos, sin embargo cuando el pH disminuye a 3.5 la hidrofiliidad del EHS también lo hace, diferenciándose del Log P del ETM, el cual no se ve afectado. Si bien mantienen su lipofobicidad, se observa una tendencia tanto en AOs sintéticos (Ospina et al., 2019) como en EHS a aumentar su hidrofiliidad a medida que se incrementa el pH.

Estabilidad oxidativa en aceite de chía

En la Figura 1 se expresan los resultados del ensayo en Rancimat como Factor de Protección (FP) a las distintas concentraciones (ppm) de ambos extractos en aceite de chía. El aceite de chía sin ningún agregado

antioxidante posee un tiempo de inducción (TI) de 3.26 h, al cual se le atribuye un FP = 1. Este TI fue incrementado en todos los ensayos con aceite aditivado. En particular con ETM el FP aumenta con la concentración, mostrando un incremento máximo de 85.5% respecto del control para la concentración de 8000 ppm (FP = 6.89); luego de este valor no se encuentran diferencias significativas con la concentración máxima probada (10000 ppm).

Respecto al control positivo (200 ppm TBHQ) resultó en un incremento de 79.37%, equivalente a utilizar 3000 ppm de ETM. En contraste, Nepote et al (2002) no logró igualar ni superar al AO sintético BHT en un ensayo de oxidación a 60°C con aceite de girasol aditivado con ETM. Así como De Camargo et al., (2012) en Aceite de soja con Rancimat, obtuvieron un TI de 17.34 h con TBHQ (200 ppm), 6.47 h con BHT (100 ppm) y de 7.3 con ETM (400 ppm) demostrando este último un efecto ligeramente superior al BHT pero muy inferior al TBHQ.

Comparando con bibliografía previa en aceite de chía, se evidencia que el desempeño del ETM fue superior al de otros AOs de origen natural, como el palmitato de ascorbilo (PA) con un FP de 4.5 a 5000 ppm (Ixtaina et al. 2012) y de 3.64 utilizando 200 ppm de este AO en combinación con 8000 ppm de extracto de romero (Bodoira et al., 2017c).

Por su parte, los tratamientos con EHS no lograron un FP tan elevado, 8000 ppm apenas duplicaron el TI del control. Además, a diferencia del ETM, no se muestra una variación con significancia estadística del FP con respecto a la concentración de extracto. Los resultados coinciden con Bahmaei & Peyman (2012) que mediante Rancimat obtuvieron un TI de aceite de soja sin aditivar de 7.93 h y de 9.53 y 8.85 con 2000 ppm de EHS etanólico y metanólico respectivamente. Por otra parte, todas las concentraciones probadas de EHS demostraron una efectividad significativamente inferior al antioxidante sintético TBHQ (Figura 1). Estos resultados concuerdan con otros estudios con diferentes aceites y tipos de ensayos de oxidación en estufa (Suja et al., 2004; Mohdaly et al., 2011) en los cuales tampoco el EHS, obtenido con Soxhlet utilizando metanol, pudo equiparar el efecto del TBHQ aunque sí el del BHT.

La capacidad antioxidante está muy relacionada con la estructura química de un compuesto (Olsowy et al., 2019) y cuando de un extracto se trata, se relaciona desde ya con su composición química. Respecto a la composición relativa de ETM y EHS utilizados en este trabajo, se detalló en trabajos previos (Bodoira et al., 2017b; 2019). En particular en el ETM son abundantes los taninos condensados también llamados proantocianidinas, un tipo de polifenoles que poseen reconocidas propiedades farmacológicas y antioxidantes (Rauf et al., 2019). En particular están presentes proantocianidinas del tipo dímeros derivados de la catequina y epicatequina (procianidinas). Estas moléculas oligoméricas demostraron ser más efectivos AOs que sus equivalentes monómeros de catequina, así como también superiores a la Vitamina C (Spranger et al., 2008). Dentro de los dímeros de procianidinas hay dos tipos (A y B) de acuerdo al tipo de unión interflavan, siendo el Tipo-A el predominante en el ETM (Oldoni et al., 2016; Bodoira et al., 2017b). Dong et al., (2013) demostraron que ambos tipos tienen alta capacidad antioxidante y dependiente de la concentración, sin embargo las Tipo-B son más efectivas en medio acuoso, mientras que las Tipo-A lo son en sistemas oleosos y en tejidos.

También se destaca en el ETM la presencia de ciertos flavonoides, entre ellos; flavanoles como la catequina y epicatequina, flavonoles como la quercetina y el isorhamnetin, flavonas como luteolina y flavanonas como naringenina (Bodoira et al., 2017b). Todos estos flavonoides comparten ciertas características en su estructura química que los hace donadores de H por excelencia (Olsowy et al., 2019). Además también se puede relacionar la estructura con la capacidad de quelar metales, esta es favorecida por la proximidad de grupos hidroxilo con grupos carbonilo del mismo o distinto anillo (Olsowy et al., 2019), lo que sucede por ejemplo en naringenina, luteolina, isorhamnetin, quercetina y rutina, este último un flavonol glicosidado también presente en el ETM (Bodoira et al., 2017b).

En el EHS en cambio, se encuentran mayormente lignanos (sesaminol, sesamolol, diasesamina, sesamolina) (Dar et al., 2013; Bodoira et al., 2019) a los cuales se les atribuye también propiedades nutricionales y AOs (Gouveia et al., 2016). También con cierta abundancia se reportan ácidos hidroxicinámicos como el ferúlico, diferúlico y dicafeico (Bodoira et al., 2019), reconocidos AOs también (Olsowy et al., 2019). Sin embargo, en el EHS los compuestos con mayor abundancia son del tipo glicosidados; como diglucósido y monoglucósido

de sesaminol y epicatequina 3-O galato. La glicosidación reduce considerablemente la capacidad antioxidante (Olsowy et al., 2019) y salvo por el ácido dicafeico no se evidencia la presencia de compuestos con capacidad quelante. Por otra parte también está presente una procianidina dimérica del Tipo-B (Bodoira et al., 2019), que como mencionamos previamente son más efectivas en medio acuoso que en oleoso (Dong et al., 2013).

Estas características en cuanto a la composición de ambos extractos podrían explicar en parte no sólo las diferencias demostradas por las técnicas *in vitro*, sino también la efectividad superior en aceite de chía del ETM, incluso a más bajas concentraciones que el EHS. Es importante resaltar también que las concentraciones probadas son altas respecto a AOs sintéticos porque se trata de extractos complejos en donde la concentración real de bioactivos expresada como mg AG/ kg aceite (datos no mostrados) es aproximadamente 50% más baja en ETM y 85% más baja en EHS (8000 ppm representan 4000 mg AG/kg aceite en ETM y 1000 mg AG/kg aceite en EHS).

Estabilidad oxidativa de aceite de chía en emulsión O/W

En cuanto al índice de peróxidos (IP) (Figura 2), el nivel no detectado al T0 demuestra que los procesos, tanto de homogenización en la preparación de la emulsión como la extracción del aceite de chía, no afectan a este último en cuanto a su estado de oxidación. Se evidencia que los tratamientos con ETM se mantuvieron en valores bajos de oxidación: con las tres concentraciones probadas se logró mantener un IP por debajo de 15 meq O₂/kg de aceite (límite establecido por el Código Alimentario Argentino) hasta el día 15, sin diferencias significativas entre dichas concentraciones (Tabla 2). A diferencia de lo sucedido en aceite (Figura 1) el efecto antioxidante del ETM no mostró dosis dependencia en emulsión. En cambio el control sin ningún AO superó los 15 meq O₂/kg luego del tercer día y el control positivo (TBHQ) lo hizo en el noveno día de almacenamiento.

Como mencionamos la composición del ETM tiene varios componentes, tanto dentro del grupo de los flavonoides como de las procianidinas, que la bibliografía reporta como excelentes dadores de H y quelantes de metales. De hecho dentro de las procianidinas, las de tipo-A fueron las más eficaces en sistemas oleosos (Dong et al., 2013). Además respecto al pH, Wood et al (2002) no encontraron diferencias significativas en la actividad antioxidante de extractos de piel de uva, ricos en las mismas procianidinas que ETM, a diferentes pH. Es decir estos compuestos parecen no verse afectados por las condiciones ácidas de la emulsión ensayada. Por el contrario el EHS mostró un efecto claramente prooxidante a la más baja concentración probada (6000 ppm) (Figura 2). Desde el sexto día de ensayo, este tratamiento mostró significativamente mayor oxidación que el control negativo, mientras que 8000 y 10000 ppm no se diferenciaron de este significativamente hasta el final del ensayo, es decir no mostraron efecto alguno (Tabla 2). No han sido reportados este tipo de efectos del EHS en trabajos previos, Nadeem et al. (2014) en cambio, obtuvieron resultados positivos pero en una emulsión del tipo W/O.

Respecto a comportamientos prooxidantes de compuestos fenólicos, varios estudios han demostrado que bajo ciertas condiciones tales como: altas concentraciones, cambios en el pH y la presencia de metales de transición; los polifenoles pueden exhibir este comportamiento (Olszowy et al., 2019). También su estructura química tiene influencia en su potencial actividad prooxidante (Yordi et al., 2012). En particular, Zhen et al (2008) informaron efecto prooxidante de ácidos hidroxicinámicos, como el ferúlico y el caféico, y Zhou et al (2013) de la epicatequina 3-Galato en emulsiones alimenticias, estos compuestos poseen alta abundancia relativa en el EHS usado en este trabajo (Bodoira et al., 2019). Zhou et al (2013) demostraron que en emulsiones O/W de aceite de lino con bajo pH (2-4), la epicatequina 3-Galato tuvo un efecto prooxidante a bajas concentraciones (5-100 µM), mientras que a 500 µM no presentó ninguna diferencia respecto al control, es decir un resultado muy similar a lo obtenido con EHS en este trabajo.

El comportamiento prooxidante observado, también podría ser explicado por un efecto del emulsionante sobre los compuestos del EHS. Huang y Frankel (1997) han reportado que el Tween 20 indujo a las catequinas del té, al ácido gálico y al propil galato a actuar como prooxidantes. Lo que sucede es que el emulsionante es capaz de atrapar aire y los compuestos fenólicos se oxidan, ya sea por la presencia de oxígeno o de trazas de metales provenientes del aceite.

Respecto a los productos de oxidación secundarios (Tabla 2), recién aparecen en todos los casos a partir del tercer día de almacenamiento, excepto para ETM a 6000 ppm que mantuvo un nivel no detectado hasta el sexto día de almacenamiento. Mientras que el EHS a la misma concentración mostró la mayor generación de productos de oxidación secundarios, superando incluso al control negativo desde el tercer día.

La efectividad del ETM en mantener la calidad oxidativa de una aceite altamente insaturado y emulsionado puede compararse con la reportada previamente por este extracto en otras matrices alimenticias complejas. Por ejemplo, Yu et al (2010) demostraron que el ETM es tan efectivo como 200 ppm de BHT o BHA en carne molida, Larrauri et al. (2012) elaboraron salame aplicando un ETM purificado y con un alto CFT (967.54 mg AG/g) que consiguió disminuir la formación de hidroperóxidos prácticamente un 80%. Sichetti Munekata et al (2015) por su parte, ensayaron ETM en empanadas de pollo consiguiendo retrasar la oxidación un 95%, y en empanadas de oveja (Sichetti Munekata et al., 2016) logrando igualar el accionar del BHT. Por su parte, De Camargo et al. (2017), en un sistema modelo de pescado, informaron que el ETM resultó más efectivo que el BHT.

Finalmente, a partir de las ecuaciones de las curvas de velocidad de reacción para los distintos tratamientos (calculadas a partir de IP y todas con R² superior a 0.9), se obtuvieron los valores de la pendiente de cada curva (KM/[RH₀]/2) con los que se determinó KM/KMC% (Tabla 3). Los parámetros cinéticos superiores al 100% que se observan para las emulsiones con distintas concentraciones de EHS, demuestran que todas tienen un efecto prooxidante en cuanto a la velocidad de reacción, pero este efecto es significativamente mayor cuando el extracto está a la menor concentración utilizada. Se evidencia también que el TBHQ, si bien logra disminuir el parámetro cinético obteniendo un valor de 74.45 %, no llega a ser una diferencia significativa respecto al control. En cambio, con ETM el valor del parámetro disminuye más de la mitad respecto al del control, sin mostrar diferencias significativas entre las distintas concentraciones (Tabla 3).

Conclusiones

Se abordó el poder antioxidante de dos extractos obtenidos de corrientes residuales de la industria oleaginosa: el tegumento de maní (TM) y la harina de sésamo (HS). La realización de este trabajo resulta ser un antecedente valioso para la potencial implementación de alternativas antioxidantes (AOs) naturales con notables ventajas tanto desde el punto de vista nutricional, de seguridad alimentaria y ambiental. Así, no solo se colabora con la reducción de subproductos, se le da un valor agregado a los mismos y se ofrece una alternativa a los AOs de origen sintético, tan cuestionados actualmente tanto por la literatura científica como por los mismos consumidores.

Los extractos (E) obtenidos por flúidos subcríticos demostraron, mediante variadas técnicas analíticas in vitro, tener buena capacidad antioxidante. Sin embargo, existió una marcada superioridad en la eficacia del ETM frente al EHS, siendo posiblemente su composición química dominada por dímeros de catequina (pro-cianidinas) la razón de dicha diferencia. Respecto a la eficacia en matrices alimenticias, se concluyó que ETM resultó muy efectivo en el retraso de los procesos de oxidación en la concentración más baja probada tanto en aceite de chía a granel como en emulsión ácida del tipo O/W. Incluso mostró en ambos sistemas eficacia superior al TBHQ.

En el caso del EHS ciertos compuestos presentes en su composición, no solo son menos efectivos AOs si no también más susceptibles a volverse prooxidantes en condiciones ácidas, así como posiblemente exista una influencia del emulsionante con algunos compuestos de la matriz. Todo ello puede explicar su comportamiento ligeramente antioxidante en aceite a granel y prooxidante en emulsión ácida de tipo O/W.

Aunque en este trabajo se utilizó una emulsión modelo, puede servir para predecir lo que sucedería en una emulsión ácida real, como mayonesas o salsas. Sin embargo, debería profundizarse en estudios relacionados ya que son muchos los factores que intervienen en el proceso oxidativo en este tipo de sistemas complejos. Por otra parte es importante resaltar que el aceite utilizado en este trabajo, al ser altamente insaturado, demuestra la potencialidad del ETM para estabilizar este tipo de ácidos grasos tan susceptibles y así generar alternativas para incorporarlos en la dieta con los beneficios a la salud que implicaría tal adición.

Agradecimientos

Al instituto de ciencia y tecnología de los alimentos (ICTA) de la Universidad Nacional de Córdoba y al instituto de ciencia y tecnología de los alimentos Córdoba (ICYTAC-CONICET).

Tabla 1: Actividad antioxidante, contenido de fenoles totales (CFT) y coeficiente de partición (Log P) del extracto de tegumento de maní (ETM) y de harina de sésamo (EHS).

	Extracto	
	ETM	EHS
CFT (mg AG/g ES)	520 ^a ± 40,01	120 ^b ± 10,00
<i>Actividad Antioxidante</i>		
DPPH		
EC50 ^a (μg ES/mL)	4,96 ^a ± 0,06	82,83 ^b ± 0,01
mmol Tx eq/g ES	2,57 ^a ± 0,19	0,29 ^b ± 0,06
FRAP		
EC50 ^b (μg ES/mL)	0,36 ^a ± 0,02	3,64 ^b ± 0,28
mmol Tx eq/g ES	3,59 ^a ± 0,55	0,51 ^b ± 0,07
β-Caroteno-Linoleico		
EC50 ^c (μg ES/mL)	82,83 ^a ± 8,64	471,67 ^b ± 16,97
mmol Tx eq/g ES	14,49 ^a ± 2,29	1,85 ^a ± 0,72
Coefficiente de partición (Log P)		
pH 3.5	-1,19 ^a ± 0,001	-1,07 ^a ± 0,003
pH 5.5	-1,21 ^a ± 0,001	-1,25 ^b ± 0,004

Valores con letra diferente son significativamente diferentes (p>0,05). AG: Ácido Gálico; EC50a: concentración a la cual el radical DPPH se reduce un 50%; EC50b: concentración a la cual la absorbancia inicial aumenta un 50%; EC50c: concentración a la cual la AA% es 50%; ES: Extracto seco; Tx Eq: Trolox equivalentes.

Tabla 2: Índice de peróxidos y p- Anisidina en ensayo de almacenamiento (40°-15 días) de emulsión O/W de aceite de chía con distintas concentraciones (ppm) de extracto tegumento de maní (ETM), de harina de sésamo (EHS) y TBHQ.

Tratamiento	T ₀	1 DÍA	3 DÍAS	6 DÍAS	9 DÍAS	12 DÍAS	15 DÍAS
[ppm]		Índice de Peróxidos (meq O ₂ /kg aceite)					
Control	ND	7,33 ^f ±0,27	12,17 ^d ±0,00	18,03 ^c ±1,81	32,51 ^c ±5,86	61,33 ^c ±0,59	112,63 ^{bc} ±36,65
ETM							
[4000]	ND	1,05 ^b ±0,28	2,32 ^{ab} ±1,57	7,27 ^{ab} ±2,94	7,01 ^a ±2,89	12,33 ^a ±3,82	23,13 ^a ±0,00
[6000]	ND	0,68 ^{ab} ±0,04	0,79 ^a ±0,19	3,33 ^a ±0,93	3,25 ^a ±0,00	10,19 ^a ±0,65	15,09 ^a ±2,04
[8000]	ND	0,03 ^a ±0,00	1,19 ^a ±0,13	3,40 ^a ±0,02	10,41 ^a ±0,97	10,30 ^a ±0,45	16,35 ^a ±2,04
EHS							
[6000]	ND	3,76 ^d ±0,00	16,58 ^d ±3,92	58,96 ^d ±8,23	78,07 ^e ±4,01	112,81 ^d ±12,55	242,59 ^d ±24,22
[8000]	ND	4,84 ^c ±0,41	6,59 ^c ±1,41	16,88 ^c ±1,80	43,69 ^d ±0,00	64,54 ^c ±0,00	119,22 ^{bc} ±0,00
[10000]	ND	2,47 ^c ±0,18	6,31 ^b ±0,05	18,16 ^c ±3,96	33,34 ^c ±0,82	73,77 ^c ±9,56	132,33 ^c ±0,00
TBHQ [200]	ND	4,57 ^c ±0,19	6,84 ^c ±0,37	11,79 ^{bc} ±2,20	22,40 ^b ±1,51	36,93 ^b ±0,80	56,47 ^{ab} ±14,21
		Índice de p-Anisidina (%)					
Control	ND	ND	0,24 ^a ± 0,02	10,4 ^{ab} ± 2,21	8,14 ^{ab} ± 0,31	11,43 ^{ab} ± 1,27	30,02 ^{ab} ± 0,00
ETM							
[4000]	ND	ND	0,21 ^a ± 0,30	8,14 ^{ab} ± 1,71	3,29 ^a ± 0,93	10,91 ^{ab} ± 2,52	13,44 ^a ± 0,00
[6000]	ND	ND	ND	8,11 ^{ab} ± 0,11	6,99 ^{ab} ± 0,55	10,22 ^a ± 3,00	10,74 ^a ± 1,85
[8000]	ND	ND	0,40 ^a ± 0,32	3,29 ^a ± 2,29	10,1 ^{ab} ± 5,43	10,15 ^a ± 1,91	7,64 ^a ± 0,00
EHS							
[6000]	ND	ND	9,4 ^b ± 4,05	15,10 ^b ± 1,09	18,62 ^b ± 4,29	23,8 ^c ± 2,97	49,6 ^b ± 0,00
[8000]	ND	ND	2,48 ^a ± 1,08	8,17 ^{ab} ± 4,04	10,31 ^{ab} ± 0,0	12,65 ^{abc} ± 0,0	22,25 ^{ab} ± 0,00
[10000]	ND	ND	3,2 ^{ab} ± 1,84	10,2 ^{ab} ± 0,19	7,05 ^{ab} ± 1,00	21,95 ^{bc} ± 2,91	26,53 ^{ab} ± 0,00
TBHQ [200]	ND	ND	0,53 ^a ± 0,14	4,97 ^a ± 0,22	4,85 ^a ± 0,17	11,60 ^{ab} ± 3,21	13,52 ^a ± 3,06

1

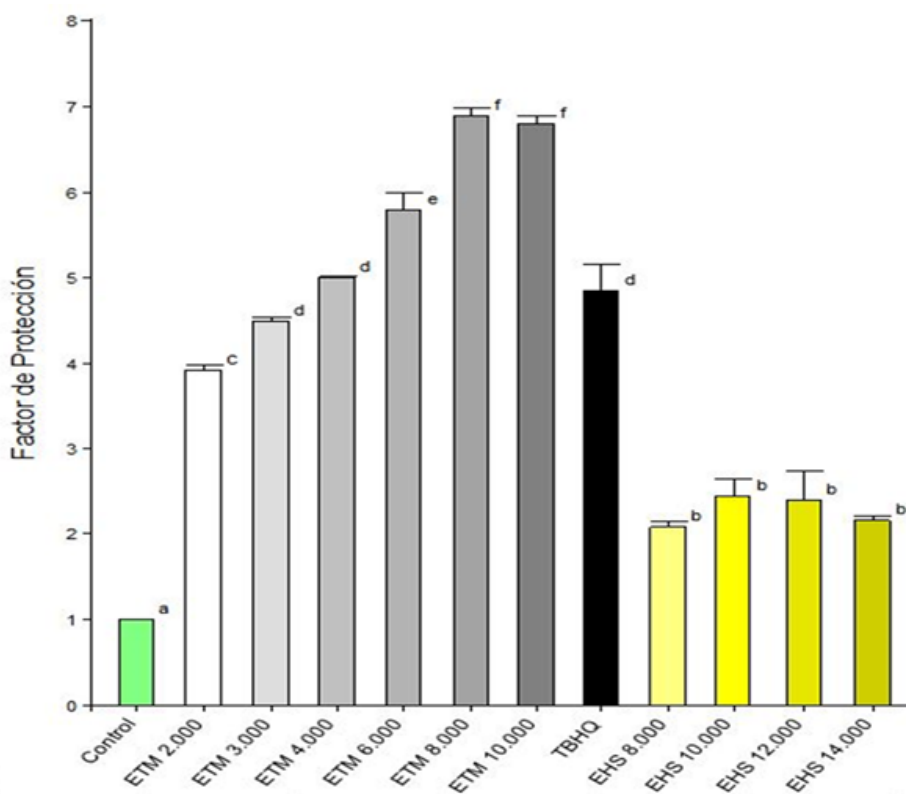
Valores con letra diferente son significativamente diferentes (p>0,05). ND: No detectado

Tabla 3: Velocidad de reacción (KM. [RHo]/2) expresada como pendiente de la recta y parámetro cinético (KM/KMC%) para el índice de peróxidos en ensayo de almacenamiento de emulsión O/W de aceite de chía con distintas concentraciones (ppm) de extracto tegumento de maní (ETM), de extracto de harina de sésamo (EHS) y TBHQ.

Tratamiento [ppm]	(K . [R H]) 2	K TK %
Control	0,025 ^c ± 0,003	100 ^{cd}
ETM		
[4000]	0,011 ^a ± 0,001	46,43 ^{ab} ± 3,79
[6000]	0,010 ^a ± 0,000	40,01 ^a ± 7,19
[8000]	0,012 ^a ± 0,000	46,73 ^{ab} ± 5,25
EHS		
[6000]	0,039 ^c ± 0,000	157,99 ^c ± 19,63
[8000]	0,028 ^{cd} ± 0,000	112,01 ^d ± 16,4
[10000]	0,030 ^{fd} ± 0,001	120,46 ^d ± 19,05
TBHQ [200]	0,018 ^b ± 0,002	74,45 ^{bc} ± 18,46

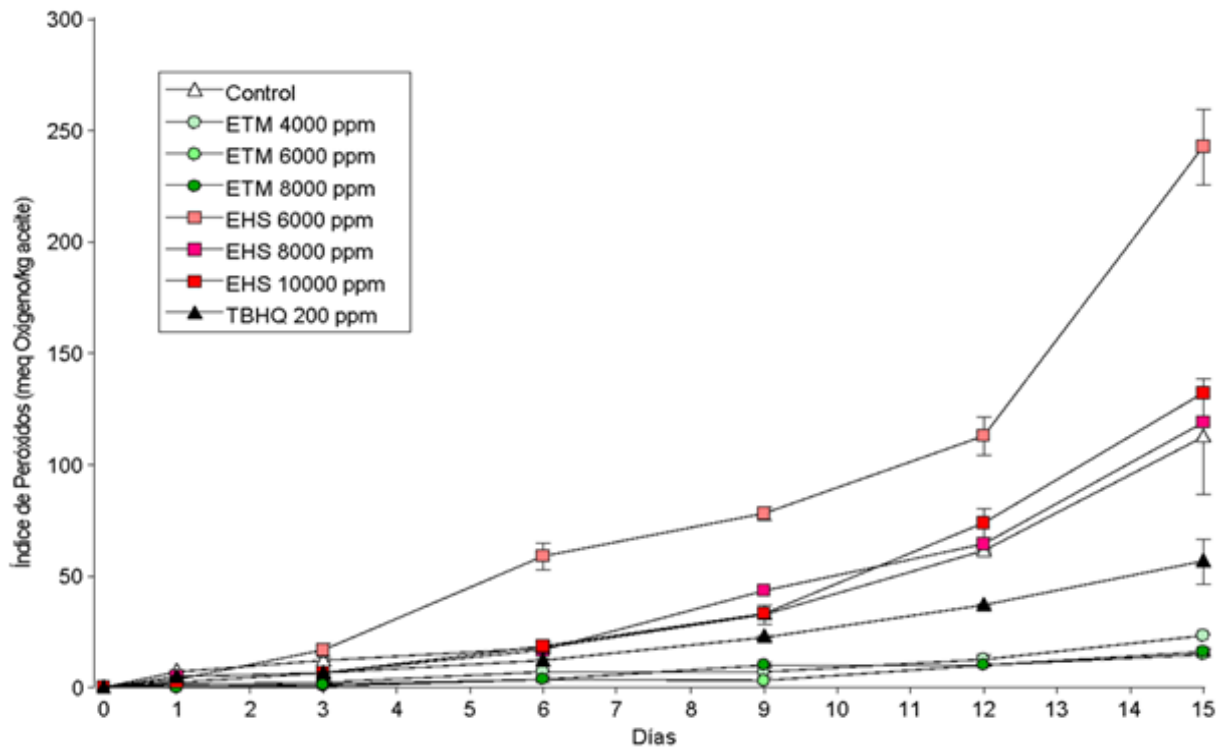
Valores con letra diferente son significativamente diferentes (p>0,05).

Figura 1: Factor de protección (FP) obtenido mediante Rancimat (100°C-20 L/h) en aceite de chía para distintas concentraciones (ppm) de extracto de tegumento de maní (ETM), de extracto de harina de sésamo (EHS) y TBHQ.



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

Figura 2: Evolución del Índice de peróxidos en ensayo de almacenamiento (40°C-15 días) de emulsión O/W de aceite de chía con distintas concentraciones (ppm) de extracto tegumento de maní (ETM), de extracto de harina de sésamo (EHS) y TBHQ.



Valores con una letra diferente son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

BIBLIOGRAFÍA

- AOCS. (2009). *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society* (5th ed.). Champaign, IL, USA: AOCS Press.
- Abdelmoez, W, Nage, SM, Bastawess, A, Ihab, A, Yoshida, H. (2014). Subcritical water technology for wheat straw hydrolysis to produce value added products. *J. Clean. Prod.* 70: 68-77.
- Apak, R, Gorinstein, S, Böhm, V, Schaich, KM, Özyürek, M, Güçlü, K. (2013). Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity. *Pure Appl. Chem.* 85:957-998.
- Ayerza, R, Coates, W. (2009). Influence of environment on growing period and yield, protein, oil and α -linolenic content of three chia (*Salvia hispanica* L.) selection. *Ind. Crop. Prod.* 30(2): 321-324.
- Bahmaei, M, Peyman, H. (2012). Antioxidant activity of sesame lignan compounds on soybean oil. *Ital. J. Food Sci.* 24:55-66.
- Baiano, A, Bevilacqua, L, Terracone, C, Conto, F, Del Nobile MA. (2014). Single and interactive effects of process variables on microwave-assisted and conventional extractions of antioxidants from vegetable solid wastes. *J. Food Eng.* 120:135-145.
- Ballard, TS, Mallikarjunan, P, Zhou, K, O'Keefe, S. (2010). Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. *Food Chem.* 120:1185-1192.
- Banerjee, J, Singh, R, Vijayaraghavan, R, MacFarlane, D, Patti, AF, Arora, A. (2017). Bioactives from fruit processing wastes: Green approaches to valuable chemicals. *Food Chem.* 225:10-22.
- Barba, FJ, Zhu, Z, Koubaa, M, Sant'Ana, AS, Orlie V. (2016). Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 49:96-109.
- Benzie, IFF, Strain, JJ. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant

Power”: *The FRAP Assay. Anal. Biochem.* 239(1):70-76.

Bodoira, R, Velez, A, Andreatta, AE, Martínez, M, Maestri, D. (2017a). Extraction of bioactive compounds from sesame (*Sesamum indicum* L.) defatted seeds using water and ethanol under sub-critical conditions. *Food Chem.* 237:114-120.

Bodoira, RM, Rossi, Y, Montenegro, M, Maestri, D, Velez, A. (2017b). Extraction of antioxidant polyphenolic compounds from peanut skin using water-ethanol at high pressure and temperature conditions. *J. Supercrit. Fluids* 128:57-65.

Bodoira, RM, Penci, MC, Ribotta, PD, Martínez ML. (2017c). Chia (*Salvia hispanica* L.) oil stability: Study of the effect of natural antioxidants. *Food Sci. Technol.* 75:107-113.

Bodoira, R, Vélez, A, Maestri, D, Herrera, J. (2019). Bioactive Compounds Obtained from Oilseed By-Products with Subcritical Fluids: Effects on *Fusarium verticillioides* Growth. *Waste Biom. Valorizat.* <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00839-y>

Bolling, BW, McKay, DL, Blumberg, JB. (2010). The phytochemical composition and antioxidant actions of tree nuts. *Asia Pac J Clin Nutr.* 19:117-123.

Braga, GC, Melo, PS, Bergamaschi, KB, Tiveron, AP, Massarioli, AP, Alencar, SMD (2016). Extraction yield, antioxidant activity and phenolics from grape, mango and peanut agro-industrial by-products. *Cienc. Rural.* 46(8):1498-1504.

Caporaso, N, Formisano, D, Genovese, A. (2017). Use of phenolic compounds from olive mill wastewater as valuable ingredients for functional foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1-13.

Código Alimentario Argentino. Capítulo VII: Alimentos grasos y aceites comestibles. 388 Artículo 523bis - (Res 2012, 19.10.84).

Constanza, KE, White, BL, Davis, JP, Sanders, TH, Dean, LL. (2012). Value-added processing of peanut skins: antioxidant capacity, total phenolics, and procyanidin content of spray-dried extracts. *J. Agric. Food Chem.* 60(43):10776-10783.

Dar, AA, Arumugam, N. (2013). Lignans of sesame: Purification methods, biological activities and biosynthesis-a review. *Bioorg. Chem.* 50: 1-10.

De Camargo, AC, Vieira, TMFS, Regitano-D'Arce, MAB, Calori-Domingues, MA, Canniatti-Brazaca, SG. (2012). Gamma radiation effects on peanut skin antioxidants. *Int. J. Mol. Sci.* 13:3073-3084.

De Camargo, AC, Regitano-d'Arce, MAB, Rasera, GB, Canniatti-Brazaca, SG, do Prado Silva, L, Alvarenga, VO, et al. (2017). Phenolic acids and flavonoids of peanut by-products: Antioxidant capacity and antimicrobial effects. *Food Chem.* 237:538-544.

Dobarganes, MC, Márquez-Ruiz, G. (2003). Oxidized fats in foods. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 6(2):157-63.

Dong, X, Zou, B, Zhang, Y, Ge, Z, Du, J, Li, C. (2013). Preparation of A-type proanthocyanidin dimers from peanut skins and persimmon pulp and comparison of the antioxidant activity of A-type and B-type dimers. *Fito-terapia* 91:128-139.

Eghbaliferiz, S, Iranshahi, M. (2016). Prooxidant activity of polyphenols, flavonoids, anthocyanins and carotenoids: updated review of mechanism and catalyzing metals. *Phytother. Res.* 30:1379-1391.

Eskandani, M, Hamishehkar, H, Dolatabadi, JEN. (2014). Cytotoxicity and DNA damage properties of tert-butylhydroquinone (TBHQ) food additive. *Food Chem.* 153:315-320.

Farhoosh, R, Johnny, S, Asnaashari, M, Molaahmadibahraseman, N, Sharif, A. (2016). Structure-antioxidant activity relationships of o-hydroxyl, o-methoxy, and alkyl ester derivatives of p-hydroxybenzoic acid. *Food Chem.* 194:128-134.

Gharavi, N, Haggarty, S, El-Kadi, AO. (2007). Chemoprotective and carcinogenic effects of tert-butylhydroquinone and its metabolites. *Curr. Drug Metab.* 8(1): 1-7.

Gouveia, LA, Cardoso, CA, de Oliveira, GM, Rosa, G, Moreira, AS. (2016). Effects of the intake of sesame seeds

- (*Sesamum indicum* L.) and derivatives on oxidative stress: A systematic review. *J. Med. Food*. 19: 337-345.
- Huang, S, Frankel, EN. (1997). Antioxidant activity of tea catechins in different lipid systems. *J. Agric. Food Chem*. 45:3033-3038.
- Ixtaina, VY, Nolasco, SM, Tomás, MC. (2012). Oxidative stability of chia (*Salvia hispanica* L.) Seed Oil: Effect of Antioxidants and Storage conditions. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 89:1077-1090.
- Jacobsen, C. Oxidative Stability and Shelf Life of Food Emulsions. En *Oxidative Stability and Shelf Life of Foods Containing Oils and Fats*. Editores: Hu, M., Jacobsen, C. AOCS Press. Published by Elsevier Inc. (2016). 287-312.
- Kenari, RE, Mohsenzadeh, F, Amiri ZR. (2014). Antioxidant activity and total phenolic compounds of Dezful sesame cake extracts obtained by classical and ultrasound-assisted extraction methods. *Food Sci. Nutr*. 2(4):426-435.
- Ko, M, Cheigh, C, Chung, M. (2014). Relationship analysis between flavonoids structure and subcritical water extraction (SWE). *Food Chem*. 143:147-155.
- Labuza, TP, Dugan Jr, LR. (1971). Kinetics of lipid oxidation in foods. *C R C Crit. Rev. Food Tech*. 2(3): 355-405.
- Larrauri, M, Barrionuevo, MG, Riveros, C, Mestrallet, MG, Zunino, MP, Zygodlo, JA, Grosso, NR, Nepote, V. (2012) Effect of peanut skin extract on chemical stability and sensory properties of salami during storage, *J. Sci. Food Agric*. 93:1751-1757.
- Larrauri, M, Zunino, MP, Zygodlo, JA, Grosso, NR, Nepote, V. (2016). Chemical characterization and antioxidant properties of fractions separated from extract of peanut skin derived from different industrial processes, *Ind. Crops Prod*. 94:964-971.
- Lorenzo, JM, Munekata, PES, Sant'Ana, AS, Carvalho, RB, Barba, FJ, Toldrá, F, Mora, L, Trindade, MA. (2018). Main characteristics of peanut skin and its role for the preservation of meat products. *Food Sci. Technol*. 77:1-10.
- Marco, GJ. (1968). A rapid method for evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 45(9): 594-598.
- Martínez, ML, Bordón, MG, Lallana, RL, Ribotta, PD, Maestri, DM. (2017). Optimization of Sesame Oil Extraction by Screw-Pressing at Low Temperature. *Food Bioprocess Technol*. 10(6): 1113-1121.
- Martínez, ML, Penci, MC, Ixtaina, V, Ribotta, PD, Maestri, DM. (2013). Effect of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of walnut oil under different storage conditions. *Food Sci. Technol*. 51: 44-50.
- McClements, DJ, Decker, EA. (2000). Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Impact of Molecular Environment on Chemical Reactions in Heterogeneous Food Systems. *J. Food Sci*. 65(8):1270-1282.
- Mohdaly, AA, Ramadan-Hassanien, MF, Mahmoud, A, Sarhan, MA, Smetanska, I. (2013). Phenolics extracted from potato, sugar beet, and sesame processing by-products. *Int. J. Food Prop*. 16: 1148-1168.
- Mohdaly, AA, Smetanska, I, Ramadan, MF, Sarhan, MA, Mahmoud, A. (2011). Antioxidant potential of sesame (*Sesamum indicum*) cake extract in stabilization of sunflower and soybean oils. *Ind. Crop. Prod*. 34: 952-959.
- Nadeem, M, Situ, C, Mahmud, A, Khaliq, A, Imran, M, Rahman, F, Khan, S. (2014). Antioxidant activity of sesame (*Sesamum indicum* L.) cake extract for the stabilization of olein based butter. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 91: 967-977.
- Nazzaro, F, Fratianni, F, Ombra, MN, D'Acerno, A, Coppola, R. (2018). Recovery of biomolecules of high benefit from food waste. *Current Op. Food Sc*. 22: 43-54.
- Nepote, V, Grosso, NR, Guzman CA. (2002). Extraction of antioxidant components from peanut skins. *Grasas & Aceites*. 53(4): 391-395.
- Nepote, V, Grosso, NR, Guzmán, CA. (2005). Optimization of extraction of phenolic antioxidants from peanut skins. *J. Sci. Food Agric*. 85(1): 33-38.
- O'Keefe, SF, Wang, H. (2006). Effects of peanut skin extract on quality and storage stability of beef products. *Meat Sci*. 73(2): 278-286.

- Oldoni, TLC, Melo, PS, Massarioli, AP, Moreno, IAM, Bezerra, RMN, Rosalen, PL, et al. (2016). Bioassay-guided isolation of proanthocyanidins with antioxidant activity from peanut (*Arachis hypogaea*) skin by combination of chromatography techniques. *Food Chem.* 192: 306-312.
- Olszowy, M. (2019). What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants? *Plant Physiol. Biochem.* 144: 135-143.
- Ospina, M, Montaña-Oviedo, K, Díaz-Duque, Á, Toloza-Daza, H, Narváez-Cuenca, CE. (2019). Utilization of fruit pomace, overripe fruit, and bush pruning residues from Andes berry (*Rubus glaucus* Benth) as antioxidants in an oil in water emulsion. *Food Chem.* 281: 114-123.
- Peng, M, Bitsko, E, Biswas, D. (2015). Functional properties of peanut fractions on the growth of probiotics and foodborne bacterial pathogens. *J. Food Sci.* 80 (3): 635-641.
- Peschel, W, Dieckmann, W, Sonnenschein, M, Plescher, A. (2007) High antioxidant potential of pressing residues from evening primrose in comparison to other oilseed cakes and plant antioxidants. *Ind. Crop. Prod.* 25: 44-54.
- Pizzolitto, RP, Dambolena, JS, Zunino, MP, Larrauri, M, Grosso, NR, Nepote, V, et al. (2013). Activity of natural compounds from peanut skins on *Fusarium verticillioides* growth and fumonisin B1 production. *Ind. Crop. Prod.* 47: 286-290.
- Rauf, A, Imran, M, Abu-Izneid, T, Patel, S, Pan, X, Naz, S, et al. (2019). Proanthocyanidins: A comprehensive review. *Biomed. Pharmacother.* 116: 1089-1099.
- Rossi, YE, Bohl, LP, Vanden Braber, NL, Ballatore, MB, Escobar, FM, Bodoira, R, et al. (2020). Polyphenols of peanut (*Arachis hypogaea* L.) skin as bioprotectors of normal cells. Studies of cytotoxicity, cytoprotection and interaction with ROS. *J. Funct. Food.* 67: 1038-1062.
- Sarnoski, PJ, Boyer, RR, O'Keefe, SF. (2012). Application of proanthocyanidins from peanut skins as a natural yeast inhibitory agent. *J. Food Sci.* 77(4): 242-249.
- Sichetti Munekata, PE, Calomeni, AV, Rodrigues, CEC, Fávaro-Trindade, CS, Alencar, SM, Trindade, MA. (2015). Peanut skin extract reduces lipid oxidation in cooked chicken patties. *Poult. Sci.* 94(3): 442-446.
- Sichetti Munekata, PE, Paseto Fernandes, R de P, Pires de Melo, M, Trindade, MA, Lorenzo, JM. (2016). Influence of peanut skin extract on shelf-life of sheep patties. *Asian Pac J. Trop. Biomed.* 6(7): 586-596.
- Singleton, VL, Orthofer, R, Lamuela-Raventós, RM. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299: 152-178.
- Spranger, I, Sun, B, Mateus, AM, Freitas, V, Ricardo-da-Silva, JM. (2008). Chemical characterization and antioxidant activities of oligomeric and polymeric procyanidin fractions from grape seeds. *Food Chem.* 108(2): 519-532.
- Suja, KP, Abraham, JT, Thamizh, SN, Jayalekshmy, A, Arumughan, C. (2004). Antioxidant efficacy of sesame cake extract in vegetable oil protection. *Food Chem.* 84(3): 393-400.
- Suja, KP, Jayalekshmy, A, Arumughan, C. (2005). Antioxidant activity of sesame cake extract. *Food Chem.* 91(2): 213-219.
- Terpinc, P, Ceh, B, Ulrich, NP, Abramovic, H. (2012). Studies of the correlation between antioxidant properties and the total phenolic content of different oil cake extracts. *Ind. Crop. Prod.* 39: 210-217.
- Lai, WT, Khong, NMH, Lim, SS, Hee, YY, Sim, BI, Lau, KY, et al. (2017). A review: Modified agricultural by-products for the development and fortification of food products and nutraceuticals. *Trends Food Sci. Technol.* 59: 148-160.
- Todd, R, Baroutian, S. (2017). A Techno-Economic Comparison of Subcritical Water, Supercritical CO2 and Organic Solvent Extraction of Bioactives from Grape Marc. *J. Clean Prod.* 158: 349-358.
- Wang, J, Yuan, X, Jin, Z, Tian, Y, Song, H. (2007). Free radical and reactive oxygen species scavenging activities of peanut skins extract. *Food Chem.* 104(1): 242-250.
- Wood, JE, Senthilmohan, ST, Peskin, AV. (2002). Antioxidant activity of procyanidin containing plant extracts at

different pHs. Food Chem. 77(2): 155-161.

Wu, G, Chang, C, Hong, C, Zhang, H., Huang, J, Jin, Q, et al. (2019). Phenolic compounds as stabilizers of oils and antioxidative mechanisms under frying conditions: A comprehensive review. Trends Food Sci. Technol. 92: 33-45.

Yordi, EG, Pérezi, EM, Matos, MJ, Villares, EU. Nutrition, Well-Being and Health. En Antioxidant and pro-oxidant effects of polyphenolic compounds and structure-activity relationship evidence. Editores: Bouayed, J, Bohn, T. IntechOpen. (2012).

Yu, J, Ahmedna, M, Goktepe, I. (2010). Potential of peanut skin phenolic extract as antioxidative and antibacterial agent in cooked and raw ground beef. Int. J. N Food Sci. Technol. 45(7): 1337-1344.

Zhao, X, Chen, J, Du, F. (2012). Potential use of peanut by-products in food processing: a review. J. Food Sci. Technol. 49: 521-529.

Zheng, L-F, Dai, F, Zhou, B, Yang, L, Liu, Z-L. (2008). Prooxidant activity of hydroxycinnamic acids on DNA damage in the presence of Cu(II) ions: Mechanism and structure-activity relationship. Food Chem. Toxicol. 46(1): 149-156.

EFFECTO DE LA FERMENTACIÓN Y LA DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL SIMULADA EN LA GENERACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIOXIDANTES A PARTIR DE HARINA DE ARVEJA AMARILLA (*PISUM SATIVUM*)

EFFECT OF FERMENTATION AND SIMULATED GASTROINTESTINAL DIGESTION ON THE GENERATION OF ANTIOXIDANT PEPTIDES FROM YELLOW PEA FLOUR (*PISUM SATIVUM*)

Cipollone, M A¹, Tironi, V A^{1*}.

¹ Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA)-(CCT La Plata-CONICET, CICPBA, UNLP) - 47 y 116(1900) La Plata - Argentina maguscipollone@hotmail.com; vtironi@quimica.unlp.edu.ar

*Correspondencia: vtironi@quimica.unlp.edu.ar

Resumen

Las arvejas (*Pisum sativum*) son legumbres de amplio consumo a nivel mundial. Sin embargo, la bioactividad de sus péptidos no ha sido lo suficientemente estudiada hasta el momento. En el presente trabajo se analizó harina de arvejas amarillas luego de ser sometida a dos procesos: simulación de la digestión gastrointestinal y fermentación. Se midió el grado de proteólisis, se analizó su composición peptídica mediante electroforesis (SDS-PAGE y Tricina SDS-PAGE) y cromatografía FPLC de filtración en gel, y se ensayaron dos métodos para evaluar la actividad antioxidante (métodos ORAC y HORAC). Luego de la digestión gastrointestinal, el grado de proteólisis obtenido fue 29 ± 2 % y se pudo observar disminución de moléculas con masas moleculares mayores a 10 kDa con la consecuente aparición de moléculas de menores masas. Se evidenció un aumento significativo ($p < 0,05$) de la actividad por el método de ORAC, sin encontrar diferencias en el caso de la actividad HORAC. En cuanto a la fermentación de la harina, la misma fue realizada por su propia microflora en dos condiciones de tiempo (24–48 h)/temperatura (30–37 °C). Los valores de grado de hidrólisis obtenidos (13-17 %) fueron menores a los obtenidos para la harina digerida. En cuanto a la composición polipeptídica, no se detectaron diferencias dadas por la fermentación excepto la posible formación de agregados. La actividad antioxidante (método de ORAC) presentó valores de IC50 para las condiciones 24h/30°C y 48h/37°C comparables con el obtenido para la harina digerida.

Palabras claves: arvejas amarillas, harina, simulación digestión gastrointestinal, harina fermentada, actividad antioxidante

Abstract

Peas (*Pisum sativum*) are legumes widely consumed worldwide. However, the bioactivity of its peptides has not been sufficiently studied so far. In this work, yellow pea flour was analyzed when subjected to two processes: simulation of gastrointestinal digestion and fermentation. Proteolysis degree, peptide/polypeptide composition (electrophoresis SDS-PAGE and Tricine SDS-PAGE, gel filtration chromatography), and two antioxidant activity assays (ORAC and HORAC methods) were performed. After gastrointestinal digestion, the degree of proteolysis was 29 ± 2 % and a decrease in molecules with molecular weight greater than 10 kDa could be observed with the consequent appearance of smaller molecules. A significant increase in activity was evidenced by the ORAC method, without significant differences in HORAC activity. Regarding the fermentation of pea flour, it was carried out by its autochthonous microflora in two conditions of time (24–48 h)/temperature (30–37°C). The proteolysis degree values (13-17 %) were lower than those obtained for digested flour. Regarding the composition, no differences were detected due to fermentation except the possible formation of aggregates. The antioxidant activity (ORAC method) presented IC50 values for the 24 h/30°C and 48 h/37°C conditions comparable with those obtained for the digested flour.

Keywords: yellow peas, flour, gastrointestinal digestion, fermented flour, antioxidants properties

Introducción

Las legumbres -entre ellas las arvejas (*Pisum sativum*)- son de consumo habitual en la mayor parte del mundo, de forma directa o como ingredientes. La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) propuso al año 2016 como el Año Internacional de las Legumbres Secas (<http://www.fao.org/pulses-2016/en/>) con el fin de potenciar estos cultivos por su rol en materia de seguridad alimentaria y nutricional y en la adaptación al cambio climático, la preservación de los suelos y la salud humana.

Las arvejas son una fuente importante de nutrientes y compuestos saludables (20-26% p/p de proteína, 1-3%

p/p lípidos, 46-50% p/p de carbohidratos y 14-18% p/p de fibra) aportando aproximadamente 317 kcal/100 g de grano (Zulet y Martínez, 2001). Estas semillas permiten la preparación de ingredientes diversos tales como harinas, aislados o concentrados proteicos, almidones y fibra, que son de importancia creciente en el diseño de alimentos saludables y para dietas especiales (Agboola, Mofolasayo, Watts y Aluko, 2010). Como aspecto negativo, las arvejas presentan componentes antinutricionales como α -galactósidos, inhibidores de tripsina y fitatos, cuya concentración depende de la variedad y su eliminación es fundamental para mejorar la calidad nutricional.

Una de las opciones más adecuadas para incrementar el consumo de legumbres en la dieta diaria es utilizar sus harinas en las fórmulas de elaboración de productos horneados y mejorar sus características sensoriales y funcionales mediante la fermentación de masa madre (Gobbetti et al., 2019). Varios experimentos han demostrado que la fermentación de las legumbres mejora su valor nutritivo, reduce algunos compuestos endógenos antinutricionales como el ácido fítico y ejerce efectos beneficiosos sobre la digestibilidad de las proteínas y el valor biológico de las legumbres (Granito et al., 2002).

Diversos procesos, entre ellos las fermentaciones y la digestión gastrointestinal, pueden producir la liberación de péptidos con actividades biológicas. Existen algunos antecedentes de estudios de actividad antioxidante de péptidos de arvejas. Se ha informado que las fracciones más hidrofóbicas separadas a partir de un hidrolizado de arveja presentaron las mayores actividades de secuestro de radicales y de quelación de metales, aunque el carácter hidrofóbico no contribuyó al poder reductor (capacidad de donar electrones). También, se demostró que la propiedad catiónica de los aminoácidos afecta negativamente la actividad antioxidante de las fracciones peptídicas (Pownall, Udenigwe y Aluko, 2010).

En Argentina, el cultivo de arveja se está consolidando debido a la creciente demanda para la exportación y porque es considerada cada vez más como una alternativa viable para incluir en la rotación, tanto por su rentabilidad como por los beneficios como antecesor de los cultivos de verano. En la última década, la producción de esta leguminosa se duplicó y la exportación aumentó casi 10 veces, siendo los principales destinos Brasil, España e India (http://www.agroindustria.gov.ar/new/00/programas/dma/productos_no_tradicionales/Produccion%20Argentina%20de%20Legumbres%20-%202016.pdf). Sin embargo, a pesar de este aumento en la demanda, las variedades nacionales han sido muy poco estudiadas.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la potencialidad de harina de arvejas amarillas cultivadas en la provincia de Buenos Aires como fuente de péptidos antioxidantes generados mediante un proceso de fermentación autóctona y mediante un proceso de digestión gastrointestinal simulado.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Preparación y análisis de composición de la harina: Se utilizaron arvejas amarillas (*Pisum sativum* var. Yams) cultivadas en el año 2016 en el sur de la provincia de Buenos Aires. Para obtener la harina (H) se molieron las arvejas en molino Udy (malla 1mm). Se evaluó el contenido de humedad, cenizas y lípidos según los métodos de la AOAC (1990), carbohidratos mediante una hidrólisis ácida completa seguida del método colorimétrico de antrona (Southgate, 1976) y proteína por método de microKjeldhal seguido de la colorimetría modificada de Berthelot (Tabbaco, Meiattini, Moda y Tarli, 1979), $f = 5.6$ g proteína/g N (Gueguen y Barbot, 1988).
2. Fermentación autóctona: Se prepararon harinas fermentadas (HF) por su propia flora a partir de dispersiones (36,4% p/p) de harina en agua destilada incubando a diferentes temperaturas (30°C o 37°C) por 24 y 48 h.
3. Simulación de la digestión gastrointestinal: Se obtuvo el digerido gastrointestinal simulado de la harina (HD) según el protocolo de Minekus et al. (2014) incluyendo las fases oral, gástrica e intestinal. Las muestras fueron mezcladas con fluido salival simulado (SSF, compuesto por KCl 0,5 M, KH₂PO₄ 0,5 M, NaHCO₃ 1 M, MgCl₂ 0,15 M, y NH₄HCO₃ 0,61 M; pH = 7), α -amilasa (Sigma 100-70 57,4 U/mg, 26 mg/ml en SSF, CaCl₂ 0,3 M) y se incubaron con agitación durante 2 min a 37°C. Luego, se agregó fluido gástrico simulado (SGF, compuesto por KCl 0,5 M, KH₂PO₄ 0,5 M, NaHCO₃ 1 M, NaCl 2 M, MgCl₂ 0,15 M, y NH₄HCO₃ 0,61

M; pH = 3), pepsina (Sigma P7125 \geq 400 U/mg, 62,5 mg/ml en SGF) y CaCl₂ (0,3 M) y se incubó con agitación durante 2 h a 37°C. Por último, se agregó fluido intestinal simulado (SIF, compuesto por KCl 0,5 M, KH₂PO₄ 0,5 M, NaHCO₃ 1 M, NaCl 2 M y MgCl₂ 0,15 M; pH = 7), pancreatina (MP Biomedicals inc.4X USP Grade, 15,3 mg/ml en SIF), bilis (150 mg/ml Bilis Fluka B3883), CaCl₂ (0,3 M) y se incubó con agitación durante 2 h a 37°C. Finalmente, se inactivaron las enzimas calentando 10 min a 85 °C y se liofilizó.

4. Grado de hidrólisis proteica (GH): fue determinado en las muestras de H, HF y HD mediante el método del TNBS (ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico) (Adler-Nissen, 1979; Orsini Delgado, Tironi, & Añón, 2011).

5. Preparación de fracciones de polipéptidos/péptidos solubles: Muestras de H, HF y HD fueron solubilizadas en buffer fosfato salino (PBS, pH = 7,4, 500 rpm, 37°C, 1 h). La proteína soluble fue determinada en el sobrenadante mediante el método de Lowry (Lowry, Rosebrough, Farr y Randall, 1951).

6. Composición molecular: las muestra fueron analizadas mediante dos tipos de electroforesis, a- SDS-PAGE; las muestras se dispersaron (3 mg proteína/ml) en buffer muestra 1X (Tris 0,0625 M, SDS 2 %, glicerol 10 %v/v). Se utilizaron geles separadores de 12 % de poli(acrilamida) y geles de apilamiento con 4 % de poli(acrilamida), sembrando 30 µg de proteína, que fueron corridos a corriente constante (30 mA por placa, voltaje máximo 200 V). b- Tricina-SDS-PAGE (Schägger, 2006), las muestras se dispersaron (3 mg proteína/ml) en buffer muestra 1X (Tris-HCl 37,5 mM (pH = 7), glicerol 7,5 % p/v (Anedra), SDS 3 % p/v, Coomassie blue G 250 (Serva) 0,0125 % p/v). Se empleó un sistema de tres geles de diferente concentración: un gel de apilamiento, un gel espaciador y un gel separador (con urea 6 M) conteniendo 4, 10 y 16 % de acrilamida, respectivamente. Se sembraron 30 µg de proteína. La corrida se realizó a voltaje constante, empezando con 30 mA durante el pasaje a través del gel stacking y aumentando a 100 mA hasta concluir. Finalizada la corrida, se procedió a tratar con solución fijadora (metanol 50 %, ácido acético 10 %, acetato de amonio 100 mM) durante 45 min. Para ambos tipos de electroforesis, se realizó la coloración con solución de Coomassie Brilliant Blue R-250 manteniendo en agitación durante 2 h y una decoloración con solución decolorante (etanol 30 %, ácido acético 10 %) aplicado sucesivas veces Finalmente, se realizó una tinción con plata para aumentar la sensibilidad cuando fue necesario (Blum, Beier y Gross, 1987). Las electroforesis se realizaron en un equipo Mini Protean II (BIO-RAD).

También se realizaron corridas de cromatografía líquida rápida para proteínas (FPLC) de filtración en gel de las fracciones solubles en buffer PBS utilizando un equipo ÄKTA purifier (GE Healthcare) y dos columnas de exclusión molecular diferentes. La columna Superdex 75 10/300 GL (límite de exclusión: 102 kDa; rango de separación 3-70 kDa) (GE Healthcare) fue calibrada con azul dextrano (volumen de exclusión, $V_0 = 7,3$ ml), albúmina (67 kDa), ovoalbúmina (9,2 kDa), quimotripsina (25 kDa), ribonucleasa (19 kDa) y aprotinina (6,5 kDa) obteniéndose la siguiente ecuación para la curva de calibración: $\log MM = 1,96 - 2,30 K_{av}$, donde: MM: masa molecular, $K_{av} = (V_e - V_0)/(V_t - V_0)$, V_e es el volumen de elución en mililitros del pico de interés; V_0 es el volumen de exclusión y V_t es el volumen total de la columna ($V_t = 24$ ml). Las muestras se filtraron con filtros de nylon de 0,45 µm de poro. Se eluyeron 200 µl de cada muestra con un flujo de 0,4 ml/min. Los polipéptidos y péptidos fueron detectados por absorbancia a 210 nm. La columna Superdex Peptide 10/300 GL (GE Healthcare) (límite de exclusión = 10000 Da; rango de separación = 100-7000 Da para proteínas globulares) fue calibrada con azul dextrano (volumen muerto, $V_0 = 7,60$ ml), aprotinina (6500 Da), vitamina B12 (1855 Da) y ácido hipúrico (179,14 Da), obteniéndose la siguiente ecuación para la curva de calibración: $\log MM = 4,84 - 3,30 K_{av}$, $V_t = 24$ ml. Las muestras fueron filtradas con filtros de nylon de 0,45 µm de poro. Las condiciones de corrida fueron: flujo 0,5 ml/min, volumen de muestra = 200 µl, la detección fue realizada a 210 nm.

7. Determinación de la actividad antioxidante. La actividad antioxidante de las muestras solubles fue evaluada por dos métodos. El ensayo ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) consistió en mezclar 150 µl de fluoresceína (53,3 nM) con 25 µl de muestra, buffer (control negativo CN), o distintas diluciones del Trolox (6-hidroxy-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico) (6,25 a 75 µM) utilizado como referencia. Por último, se agregaron 250 µl del AAPH (2,20-Azo-bis-(2-metilpropionamida) dihidrocloride) 160 mM y se realizaron lecturas de fluorescencia (λ_{exc} : 485 nm, λ_{em} : 535 nm) en un lector de microplacas (SYNERGY HT-SIAFRT, Biotek Instruments) cada 1 min hasta los 45 min, incubando a 37°C, con agitación continua. Para el ensayo HORAC (Hydroxyl Radical Averting Capacity) se preparó una solución de fluoresceína 0,0603

μM en buffer PBS ($\text{pH} = 7,4$); una solución de H_2O_2 0,75 M en agua MilliQ y una solución de cobalto (10 mg de ácido picolínico, 11 mg de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 50 ml de agua MilliQ). Las mezclas de reacción fueron preparadas añadiendo 190 μl de la solución de fluoresceína; 20 μl de muestra o buffer PBS (control negativo); 15 μl de H_2O_2 y 75 μl de solución de cobalto. Se realizaron lecturas de fluorescencia (λ_{exc} : 485 nm, λ_{em} : 535 nm) en un lector de microplacas (SYNERGY HT-SIAFRT) cada 1 min hasta las 3 h, incubando a 37°C con agitación continua (Orsini Delgado, Galleano, Añón, y Tironi, 2015). Para ambos métodos, se graficó el % de inhibición de los radicales frente a la concentración de proteína de las muestras; cada punto de concentración se midió por duplicado. Las curvas se ajustaron mediante regresión lineal o regresión no lineal utilizando GraphPad Prism versión 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). La regresión no lineal se realizó de acuerdo a la ecuación dosis-respuesta sigmoidea (pendiente variable): $Y = \text{bottom} + (\text{top} - \text{bottom}) / (1 + 10^{-(\text{Log IC}_{50} - X) \cdot \text{hillslope}})$, donde $X = \log(\text{concentración})$, $Y = \%$ de inhibición de radicales. Para normalizar las curvas, “bottom” se restringió a un valor constante de 0 y “top” fue restringido a un valor constante de 100. Finalmente se obtuvo la concentración que inhibe el 50 % de los radicales (IC_{50}).

8. Análisis estadístico. Se analizaron diferencias entre las muestras a través de un Análisis de varianza (ANAVA). Las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores medios fueron evaluadas por el test de Tukey (GraphPad Prism 5.0, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La harina de arveja amarilla presentó un contenido de $2,7 \pm 0,5 \%$ de cenizas y $2,2 \pm 0,2 \%$ de grasa, valores comparables con los informados previamente para arvejas de origen canadiense (2,42 % de cenizas y 2,01 % de lípidos, Boye, Zare y Pletch, 2010). El valor obtenido para humedad fue $10,4 \pm 0,1 \%$. El valor nutritivo de las leguminosas se debe en parte a su aporte en carbohidratos, siendo el almidón el polisacárido mayoritario (Salunkhe y Kadam, 1989). En este caso, el valor obtenido (67,9 %) fue superior a los informados en bibliografía (46 % según USDA National Nutrient DataBa). Una posible explicación para este resultado podría ser que la hidrólisis ácida extensiva realizada podría haber atacado también componentes de la fibra, dado que la suma de carbohidratos más fibra informada en otros trabajos es comparable al valor total obtenido en el presente. Sin duda, el elevado contenido proteico en la mayoría de las especies de leguminosas convierte a esta familia en la principal fuente de proteína vegetal para el hombre (Cubero y Moreno, 1983). El contenido en las arvejas se sitúa entre el 20-26 % en base húmeda (b.h.). Los datos obtenidos en este trabajo mostraron un valor de $18 \pm 1 \%$ en b.h. (20 % base seca (b.s.)). Boye, Zare y Pletch (2010) informaron un valor de 21 % de proteínas (24,6 % en base seca (b.s.)) en arvejas amarillas de Canadá.

La evaluación de propiedades bioactivas de componentes alimentarios requiere poder simular la liberación de dichos componentes durante la digestión gastrointestinal. En este sentido, se realizó una simulación in vitro de la digestión gastrointestinal de la harina. Se utilizó un ensayo estático basado en un protocolo generado en el marco de la Acción INFOGEST de la Unión Europea, el cual cuenta con consenso internacional (Minekus et al., 2014). Este método está basado en las condiciones fisiológicas e incluye una fase oral, una gástrica y una intestinal, cada una de ellas contiene soluciones de electrolitos completas cuya composición se detalla en la sección Materiales y Métodos. En primer instancia se midió el grado de hidrólisis (GH) que es uno de los indicadores más utilizados como un parámetro de monitoreo de la proteólisis (Adler-Nissen, 1979). El valor obtenido se muestra en la Tabla 1, el cual resultó ser un poco mayor al publicado por Barbana y Boye (2011) quienes trabajaron con suspensiones de concentrados de proteínas de lentejas (5 % p/p) y obtuvieron un GH (método de TNBS) de 29 % luego de la digestión gastrointestinal. Se determinó el contenido de proteína en los digeridos gastrointestinales liofilizados a través del método de microKjeldahl, obteniéndose los resultados que se muestran en la Tabla 1. Se evaluó la concentración de proteína soluble (por el método de Lowry) obtenida a partir de la dispersión de H o HD (10 mg de muestra/ml en buffer PBS). En la Tabla 1 se presentan estos resultados junto con los correspondientes % de solubilidad proteica (respecto a la proteína total). Puede observarse que no se registraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en el % de solubilidad luego de la digestión. Estos resultados sugieren que la hidrólisis se produjo fundamentalmente sobre moléculas proteicas que eran solubles en las muestras de partida.

Por otra parte, se realizaron procesos de fermentación de la harina por su propia flora a dos temperaturas (30°C y 37°C) y durante dos tiempos (24 y 48 h). En la Tabla 2 se presentan los valores de pH alcanzados en las distintas condiciones. Se registró un descenso significativo ($p < 0,05$) de pH a ambos tiempos de fermentación. No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) dados por la temperatura de fermentación. Estos datos fueron comparables con los publicados por Torino et al. (2013) para lentejas fermentadas naturalmente donde los valores obtenidos para el tiempo inicial y las 48 h a 37°C fueron 6,63 y 3,67 respectivamente. También se estudió el nivel de proteólisis por el método de TNBS para el cual se obtuvieron, en todas las condiciones, valores entre 13 y 17 %, y se evidenció que la proteólisis no avanzó luego de las 24 h de fermentación. Estos valores son notablemente menores que el obtenido luego de la digestión gastrointestinal simulada (Tabla 1). La solubilidad proteica (proteína soluble en buffer PBS (método de Lowry)/100 g proteína total (método de microKjeldahl)) de todos los fermentos presentó valores similares (54 ± 2 %), mientras que para la muestra antes de la fermentación la solubilidad proteica fue de 68 ± 4 % (Tabla 1). En este caso, se evidencia una disminución de la solubilidad en las HFs con respecto a HF0, lo cual podría estar relacionado con formación de agregados durante la incubación correspondiente al proceso de fermentación.

Se realizaron ensayos de electroforesis a fin de analizar la composición molecular de las diferentes muestras. La harina presentó una gran diversidad de polipéptidos en las corridas de SDS-PAGE. La mayoría de las bandas se pueden atribuir a subunidades componentes de legumina y vicilina. Según lo descrito por Shevkani y Singh (2015), las bandas 2, 3 y/o 4 podrían atribuirse a vicilina, una proteína oligomérica que consiste en tres subunidades polipeptídicas de entre 43 y 53 kDa. La banda 1 podría corresponder a las subunidades del hexámero legumina que tienen una MM de alrededor de 60 kDa. Las bandas 5 a 14 pueden ser atribuidas a diversas albúminas. Lu, Quillien y Popineau (2000) mostraron que el perfil SDS-PAGE de la fracción albúmina de arvejas contenía esencialmente dos grupos de proteínas, una banda principal con masas alrededor de 30 kDa y varias bandas alrededor de 14 kDa y menores. Las glutelinas, en condiciones no reductoras, presentan bandas que se encuentran entre 50-67, 30-38 y 20-28 kDa (Gorinstein, Moshe, Greene y Arruda, 1991; Martínez y Añón, 1996). Finalmente, no podemos descartar la presencia de subunidades ácidas y básicas de legumina (37 y 25 kDa, respectivamente) como segmentos libres en las harinas. En el caso de HD, fue necesario realizar una tinción con plata de los geles ya que en la tinción con Coomassie Blue no se detectaban bandas. De esta manera, pudo registrarse que las bandas presentes en la harina desaparecieron (Figura 1A). Pudieron detectarse dos nuevas bandas (15 y 16) con MM 67 y 63 kDa, respectivamente, que podrían ser atribuidas a productos de hidrólisis de otros polipéptidos mayores que no ingresaban a los geles. La ausencia de otras bandas indica que la gran mayoría de los productos de digestión corresponderían a moléculas de baja MM que escapan de este gel. Cuando se analizaron las harinas fermentadas, se encontró que todos los perfiles electroforéticos fueron prácticamente iguales entre fermentos y respecto a la muestra sin fermentar (Figura 1C). Para detectar péptidos de menores masas moleculares, se realizaron electroforesis Tricina-SDS-PAGE donde se pudo observar que la harina contiene una gran variedad de péptidos con MM menores a 30 kDa. En el caso de HD se observó que las bandas que aparecían en la porción superior del gel (> 6 kDa) disminuyen su intensidad indicando que fueron atacadas por las enzimas digestivas (Figuras 1B). En cuanto a HF se repitió el comportamiento analizado en las corridas SDS-PAGE; todos los fermentos y su muestra sin fermentar presentaron perfiles similares, observándose solo una disminución de la intensidad de una banda correspondiente a 26 kDa para la condición de fermentación 48 h/37°C (Figura 1D).

Las fracciones solubles fueron analizadas mediante cromatografía de filtración en gel para estudiar su composición molecular. En el caso del análisis de H mediante la columna Superdex 75 (límite de exclusión: 100 kDa), el pico más intenso apareció al volumen de exclusión correspondiendo a masas moleculares mayores a 100 kDa, es decir los oligómeros de globulinas intactos. Este pico se encuentra solapado, y tendría presencia de unidades constituyentes de las leguminas (globulinas 11S, tres dímeros constituidos por polipéptidos de 60 kDa que se mantienen unidos por enlaces no covalentes formados por subunidades ácidas y básicas asociadas por puentes disulfuro), ya que como puede observarse el máximo de este pico corresponde a moléculas con masas de 60 kDa; y a las vicilinas (globulinas 7S, trímeros formados por unidades de aproximadamente 50 kDa estabilizados por interacciones hidrofóbicas, enlaces electrostáticos y de hidrógeno). También pudo apreciarse presencia relevante de moléculas con masas entre 25 y 43 kDa, 11 y 16 kDa, 4 y 7 kDa y 2,7

a 4 kDa. Estos picos corresponderían fundamentalmente a albúminas y algunos péptidos menores. Luego de la digestión gastrointestinal simulada, se observó que hubo una disminución de los picos correspondientes a masas moleculares mayores a 10 kDa con la consecuente aparición de nuevos picos correspondientes a moléculas con masas menores a 10 kDa. Estas variaciones evidencian el ataque proteolítico producido durante la digestión gastrointestinal (Figura 2A).

En el caso de las HFs, se observó que todos los fermentos presentaron cromatogramas similares, la diferencia principal con la muestra HF0 fue un aumento del pico correspondiente al volumen de exclusión, lo que infiere la formación de agregados como se mencionó anteriormente (Figura 2C).

Con el fin de mejorar el análisis de las moléculas de baja masa molecular, se realizaron cromatografías con la columna Superdex 30 (rango de separación < 10 kDa). En el cromatograma correspondiente a H, se observó un pico correspondiente al volumen de exclusión de la columna (> 10 kDa) además apareció un pico correspondiente a moléculas con masas mayores a 6,5 kDa y pequeños picos que involucran moléculas entre 2 y 0,1 kDa. Luego de la digestión gastrointestinal, se observó una disminución de los picos con masas moleculares > 10 kDa indicando que parte de esas moléculas fueron atacadas por las enzimas. Además, se observó la aparición de un nuevo pico involucrando un amplio rango de moléculas menores a 4,3 kDa, pero con un máximo alrededor de 1,3 kDa, dos picos solapados (0,1-0,5 kDa, correspondientes a aminoácidos libres hasta péptidos de 4 aminoácidos), y otros dos pequeños picos de menores masas que sugieren la liberación de algún otro tipo de componente (no proteico) durante la digestión gastrointestinal (Figura 2B).

Por último, cuando analizamos las harinas fermentadas se observó un comportamiento similar en todas las muestras incluida la muestra sin fermentar donde la mayor proporción de moléculas aparecen con el volumen de elución (Figura 2D).

Finalmente, se llevó a cabo una primera aproximación a la evaluación de la actividad antioxidante de H, HFs y HD a través del análisis de sus fracciones solubles utilizando dos metodologías: método ORAC y método HORAC. Mediante el método ORAC es posible medir la capacidad “secuestrante” de radicales peroxilos (generados a partir de AAPH a 37°C) determinándose experimentalmente la degradación oxidativa de la fluoresceína utilizada como sonda fluorescente. Por lo tanto, la pérdida de fluorescencia es un indicativo del daño que está sufriendo la fluoresceína por su reacción con los radicales peroxilo. Aquellos compuestos con capacidad antioxidante protegerán a dicha molécula de la degradación oxidativa, inhibiendo o disminuyendo la pérdida de fluorescencia (Ou, Hampsch-Woodil, y Prior, 2001). En cuanto a HORAC, en este ensayo se determina la degradación oxidativa de la fluoresceína, que se descompone al reaccionar con los radicales hidroxilo generados in situ a partir de un metal divalente (Co⁺²) y H₂O₂, con la consiguiente pérdida de fluorescencia. En el presente trabajo, se ensayaron las fracciones solubles de cada muestra en diferentes concentraciones a fin de obtener curvas dosis-respuesta. A partir de estas curvas (graficando % de inhibición de radicales en función de la concentración de proteína en la muestra), se obtuvieron los valores de IC₅₀ (concentración que inhibe el 50 % de los radicales) de cada muestra. El digerido gastrointestinal exhibió un valor de IC₅₀ en el ensayo ORAC 3 veces menor ($p < 0,05$) que H. En el caso del ensayo HORAC, los valores de IC₅₀ para H y HD no mostraron diferencia significativa ($p > 0,05$) entre ellos (Tabla 3). Es importante remarcar, que aunque en los dos ensayos se utiliza la misma sonda fluorescente, las concentraciones que se evalúan son muy diferentes; el ensayo ORAC permite evaluar concentraciones mucho más bajas de las moléculas antioxidantes. En trabajos previos, Ou, Hampsch-Woodil, y Prior (2001) demostraron que el ensayo HORAC reflejaría principalmente la capacidad de los antioxidantes de quelar metales, inhibiendo de esta manera la formación de radicales OH•; mientras que, como ya se mencionó anteriormente, el ensayo ORAC mide la capacidad de secuestro de radicales peroxilo por interrupción de la cadena radicalaria, fundamentalmente a través de un mecanismo de donación de átomos de hidrógeno. Estas diferencias en la sensibilidad y en los mecanismos de acción de los compuestos activos entre ambos métodos utilizados en este trabajo podrían explicar diferencias de comportamientos luego de la digestión gastrointestinal entre ambos métodos. Todos los fermentos registraron un aumento de actividad antioxidante respecto de la dispersión inicial presentando valores de IC₅₀ entre 1,3 y 2 veces menores; los fermentos obtenidos a 37°C por 48 h y a 30°C por 24 h presentaron la mayor capacidad antioxidante sin diferencias significativas entre ellos ($p < 0,05$).

Dichos valores son comparables con los obtenidos luego de someter a la harina a un proceso de simulación de la digestión gastrointestinal. Por lo tanto, de acuerdo con estos primeros ensayos se puede inferir que el proceso de fermentación generaría una proteólisis parcial que liberaría péptidos con actividad potencialmente antioxidante. Torino et al. (2013) informaron que la fermentación nativa de lentejas produjo un aumento de los grupos amino libres (medidos por el método de TNBS, de 0,6 mmol Leu/g a 1,5 mmol Leu/g) durante las primeras 48 h y no se observaron cambios posteriores. En consecuencia, observaron también un aumento significativo de la actividad antioxidante medida por el método de ORAC.

En este trabajo, se pudo verificar que tanto la digestión gastrointestinal simulada como la fermentación generaron un aumento de la actividad antioxidante, generando productos de similar capacidad antioxidante de acuerdo con el ensayo ORAC a pesar que el grado de proteólisis fue significativamente menor en las HFs y que la composición molecular fue diferente. Una posible explicación para estos hechos es que péptidos/polipéptidos de diferentes tamaños estarían ejerciendo actividades comparables. Tampoco puede descartarse que el aumento de actividad registrado luego de la fermentación corresponda no sólo a la presencia de péptidos, sino que podría estar relacionada con otros compuestos no proteicos que fueron liberados o modificados por el proceso de fermentación.

CONCLUSIONES

La literatura sobre la actividad antioxidante de péptidos de arvejas es muy escasa y hasta donde conocemos, el estudio de dichos péptidos liberados a partir de un proceso de simulación de la digestión gastrointestinal no había sido estudiado hasta ahora. Los resultados obtenidos en ese sentido han sido muy alentadores posicionando a la harina de arveja como un ingrediente potencialmente antioxidante. También se realizaron los primeros avances en el estudio del proceso de fermentación autóctona de la harina y la posibilidad de utilizar la misma como otro ingrediente con características antioxidantes. Este es un tema que está en crecimiento y del cual tampoco se ha estudiado mucho. En el presente trabajo, se realizó los primeros ensayos de fermentación con la intención de seleccionar las condiciones del proceso. Los resultados obtenidos mostraron que este tipo de fermentaciones puede ser una herramienta interesante para mejorar las propiedades antioxidantes de las harinas de arvejas; estos estudios serán profundizados a futuro en nuestro laboratorio.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por un proyecto del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, PUE16-22920160100033CO) y por un proyecto

Tabla 1: Se muestra los valores de GH (TNBS), PT (microKjeldahl), PS (Lowry) y solubilidad en buffer PBS (pH: 7,4) de todas las muestras

Muestra	Grado de hidrólisis (GH)(%)	Proteína total (PT) (%p/p)	Proteína soluble (PS) (mg/mL)	Solubilidad (g PS/100g PT)
H	-	18 ± 1*	1.3 ± 0.1*	70 ± 3 ^b
HD	29 ± 2	16 ± 2*	1.2 ± 0.1*	77 ± 10 ^b
HF ₀	-	6,3 ± 0,3 ^a	0,08 ± 0,03 ^a	68 ± 4 ^b
HF _{24,30}	16,8 ± 0,07 ^a	6,6 ± 0,3 ^a	0,61 ± 0,04 ^b	52 ± 5 ^a
HF _{48,30}	17 ± 2 ^a	7,3 ± 0,4 ^a	0,63 ± 0,04 ^b	54 ± 4 ^a
HF _{24,37}	13 ± 2 ^a	6,4 ± 0,3 ^a	0,63 ± 0,03 ^b	54 ± 3 ^a
HF _{48,37}	13 ± 2 ^a	7,0 ± 0,6 ^a	0,65 ± 0,05 ^b	57 ± 8 ^a

H: harina de arveja; HD: harina de arveja digerida; HF: harina de arveja fermentada (cada subíndice corresponde a las condiciones de fermentación). Los resultados se expresan como el promedio ± SD de dos determinaciones. Superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Tabla 2: Variación de pH durante la fermentación

Temperatura (°C)	tiempo (h)	pH
30	0	6,25 ± 0,01 ^c
	24	5,1 ± 0,1 ^b
	48	3,94 ± 0,06 ^a
37	0	6,23 ± 0,04 ^c
	24	4,7 ± 0,2 ^b
	48	3,9 ± 0,1 ^a

Los resultados se expresan como el promedio ± SD de dos determinaciones. Superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Tabla 3: Valores de IC₅₀ obtenidos por el método de ORAC para todas las muestras y por el método de HORAC para H y HD.

Muestra	IC ₅₀ (mg/ml)	IC ₅₀ HORAC (mg/ml)
H	0.24 ± 0.08 ^d	5 ± 1 ^a
HD	0.08 ± 0.01 ^a	3 ± 1 ^a
HF ₀	0,128 ± 0,004 ^c	-
HF _{24,30}	0,071 ± 0,003 ^a	-
HF _{48,30}	0,093 ± 0,004 ^b	-
HF _{24,37}	0,087 ± 0,005 ^b	-
HF _{48,37}	0,066 ± 0,002 ^a	-

H: harina de arveja; HD: harina de arveja digerida; HF: harina de arveja fermentada (cada subíndice corresponde a las condiciones de fermentación). Los resultados se expresan como el promedio ± SD de dos determinaciones. Superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

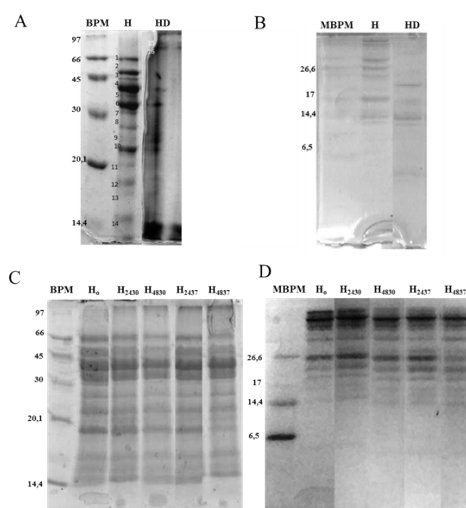


Figura 1: Electroforesis SDS-PAGE (A y C); Tricina-SDS-PAGE (B y D). BPM: patrón de bajo peso molecular. H: harina de arveja; HD: harina de arveja digerida; HF: harina de arveja fermentada (cada subíndice corresponde a las condiciones de fermentación). MBPM: patrón de muy bajo peso molecular

BIBLIOGRAFÍA

- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzene-sulfonic acid. *J Agr Food Chem*, 27(6): 1256–1262.
- Agboola, S, Mofolasayo, O, Watts, B, Aluko, R. (2010). Functional properties of yellow field pea (*Pisum sativum* L.) seed flours and the *in vitro* bioactive properties of their polyphenols. *Food Res Int*, 43: 582–588.
- AOAC (1990). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists* (W. Horwitz, Ed.), 15th edn, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, U.S.A.
- Barbana, C, Boye, J I. (2011). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of lentil protein hydrolysates: Determination of the kinetics of inhibition. *Food Chem* 127: 94–101.
- Blum, H, Beier, H, Gross, H. J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99.
- Boye, J I, Zare, F, Pletch, A. (2010). Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Res Int*, 43: 414–431
- Cipollone MA, Tironi VA. (2020). Yellow pea flour and protein isolate as sources of antioxidant peptides after simulated gastrointestinal digestion. *Legume Science*. e59. <https://doi.org/10.1002/leg3.59>
- Cubero, J I, Moreno, M T. (1983). *Leguminosas de grano*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España, pp 31-47.
- Gobbetti, M, De Angelis, M, Di Cagno, R, Calasso, M, Archetti, G, Rizzello, C G. (2019). Novel insights on the functional/nutritional features of the sourdough fermentation. *Int J Food Microbiol*, 302: 103-113.
- Gorinstein, S, Moshe, R, Greene, L J, Arruda, P. (1991). Evaluation of four amaranthus species through protein electrophoretic patterns and their amino acid composition. *J Agric. Food Chem*, 39: 851-854
- Granito, M, Frias, J, Doblado, R, Guerra, M, Champ, M, Vidal-Valverde, C. (2002) Nutritional improvement of beans (*Phaseolus vulgaris*) by natural fermentation. *Eur Food Res Technol*, 214: 226–231
- Gueguen, J, Barbot, J. (1988). Quantitative and qualitative variability of pea (*Pisum sativum* L.) protein composition. *J Sci Food Agr*, 42: 209–224
- Horubala, A., (1999). Antioxidant capacity and their changes in fruit and vegetables processing. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.* 3: 30-31.
- Lowry, O H, Rosebrough, N J, Farr, A L, Randall, R J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1): 265-75
- Lu, B-Y, Quillien, L, Popineau, Y. (2000). Foaming and emulsifying properties of pea albumin fractions and partial characterisation of surface-active components. *J Sci. Food Agric.* 80: 1964-1972.
- Martínez, E N, Añón, M C. (1996). Composition and Structural Characterization of Amaranth Protein Isolates. An Electrophoretic and Calorimetric Study. *J Agric. Food Chem*, 44: 2523-2530
- Minekus, M, Alminger, M, Alvito, P, Balance, S, Bohn, T, Bourlieu, C, Carrière, F, Boutrou, R, Corredig, M, Dupont, D, Dufour, C, Egger, L, Golding, M, Karakaya, S, Kirkhus, B, Le Feunteun, S, Lesmes, U, Macierzanka, A, Mackie, A, Marze, S, McClements, D J, Ménard, O, Recio, I, Santos, C N, Singh, R P, Vegarud, G E, Wickham, M S, Weitschies, W, Brodkorb, A. (2014) A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food - an international consensus. *J. Funct. Foo1*, 5(6):1113-24
- Orsini Delgado, M, Galleano, M, Añón, M, Tironi, V. (2015). Amaranth peptides from gastrointestinal digestion: Antioxidant activity against physiological reactive species. *Plant Foods Hum Nutr*, 70:27–34.
- Orsini Delgado, M, Tironi, V, & Añón, M. (2011). Antioxidant activity of amaranth proteins or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. *LWT-Food Sci Technol*, 44: 1752–1760.
- Ou, B, Hampsch-Woodil, M, Prior, R. (2001). Development and validation of an improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agr Food Chem*, 49: 4619-4626
- Pownall, T L, Udenigwe, C C, Aluko, R E. (2010). Amino Acid Composition and Antioxidant Properties of Pea Seed (*Pisum sativum* L.) Enzymatic Protein Hydrolysate Fractions. *J Agr Food Chem.*, 58: 4712–4718

Salunkhe, D K, Sathe, S K, Reddy, N R. (1989). *Lipids*. En: D.K. Salunkhe and S.S. Kadam (eds), *Handbook of World Food Legumes: Nutritional Chemistry, Processing Technology and Utilization*, Boca Raton, FL, CRC Press, 99–116

Schägger, H. (2006) *Tricine-SDS-PAGE*. *Nature Protocols volume 1*: 16–22.

Shevkani, K, Singh, N. (2015) *Relationship between protein characteristics and film-forming properties of kidney bean, field pea and amaranth protein isolates*. *Int. J Food Sci Technol*, 50: 1033–1043

Southgate, D A T. (1976). *Determination of food carbohydrates*. London: Applied Science Publishers, Book.

Tabbaco, A, Meiattini, F, Moda, E, Tarli, P. (1979). *Simplified enzymic colorimetric serum urea nitrogen determination*. *Clin. Chem*, 25: 336-337

Torino, M I, Limón R I, Martínez-Villaluenga, C, Mäkinen, S, Pihlanto, A, Vidal-Valverde, C, Frias, J. (2013) *Antioxidant and antihypertensive properties of liquid and solid state fermented lentils*. *Food Chem*, 136: 1030–1037.

Zulet, M A, Martínez, J A. (2001). *Mediterranean diet: Legumes and cholesterolemia*. *Rev Chil Nutr*, 28: 312–320.

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL POLISACÁRIDO DE KEFIR (KEFIRAN) EN EL CONTEXTO INTESTINAL Y SU EFECTO EN LA SALUD DEL CONSUMIDOR

BIOLOGICAL ACTIVITY OF KEFIR POLYSACCHARIDE (KEFIRAN) IN THE INTESTINAL CONTEXT AND ITS EFFECT ON CONSUMER HEALTH

Medrano Micaela^a, Gangoiti María Virginia^b, Simonelli Nicolás^a, Abraham Analía Graciela^{a,c}

^a Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA); Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata - CONICET CCT La Plata – CIC. 47 y 116, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

^b Laboratorio de Investigación en Osteopatías y Metabolismo Mineral (LIOMM) - Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. 50 y 116, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

^c Área Bioquímica y Control de Alimentos - Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. 47 y 115, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

*Correspondencia: Micaela Medrano: mmedrano@biol.unlp.edu.ar / María Virginia Gangoiti: mvgangoiti@biol.unlp.edu.ar/

Nicolás Simonelli: nicosimonelli94@gmail.com/ Analía Graciela Abraham: aga@biol.unlp.edu.ar

Resumen

El interés por el consumo de alimentos saludables y poco procesados ha crecido en los últimos años. Al mismo tiempo, también se ha incrementado la evidencia científica que afirma que una población bacteriana intestinal saludable es responsable de la buena salud. Dentro de los alimentos que favorecen el desarrollo de un microbiota intestinal saludable están los polisacáridos no digeribles y dentro de estos, los exopolisacáridos bacterianos.

En este artículo de revisión se aborda el estudio del polisacárido kefiran, presente en la leche fermentada artesanal denominada kéfir. El mecanismo de acción de este polisacárido y su acción benéfica para la salud podrían explicarse a través de tres mecanismos que actuarían solos o de manera sinérgica: i) interacción directa del polímero con las células intestinales; ii) estimulación de poblaciones bacterianas benéficas y producción de metabolitos con actividad biológica; y/o iii) modulación del sistema inmune y respuesta sistémica. Se desarrollan los tres mecanismos haciendo un recorrido por la evidencia científica que los sustenta.

Teniendo en cuenta la gran cantidad de efectos biológicos demostrados, así como la versatilidad que tiene este biopolímero para mejorar las características funcionales de los alimentos, se concluye que el kefiran tiene gran potencialidad para ser utilizado como aditivo alimentario. Por otro lado, el consumo de la leche fermentada kefir producida artesanalmente en los hogares es una fuente natural de este polisacárido.

Palabras claves: kefir - kefiran - exopolisacáridos - actividad biológica

Abstract

Interest in healthy and under processed foods has grown in recent years; and so did scientific evidence showing that a healthy gut microbiota is responsible for good health. Among the foods that promote the development of a healthy gut microbiota are non-digestible polysaccharides and within them, bacterial exopolysaccharides.

This review article discusses the health benefits of kefiran, the bacterial exopolysaccharide present in artisanal fermented milk called kefir. The mechanism of action of this polysaccharide and its beneficial action for health could be explained through three mechanisms that would act alone or synergistically: (i) direct interaction of the biopolymer with intestinal cells; (ii) stimulation of beneficial bacterial populations and production of metabolites with biological activity; and/or (iii) modulation of the immune system and systemic response. All three mechanisms are developed by taking a tour of the scientific evidence that underpins them.

Considering the large number of proven biological effects, as well as the versatility that this biopolymer has to improve the functional characteristics of food, it can be concluded that kefiran has great potential to be used as a food additive. On the other hand, the consumption of kefir-fermented milk produced in households is a natural source of this biopolymer at appropriate doses.

Keywords: kefir - kefiran - exopolysaccharide - biological activity

Introducción

En los últimos años, la investigación sobre aditivos alimentarios naturales y compuestos bioactivos capaces de aportar un beneficio en la salud del consumidor ha crecido de manera exponencial. En este sentido, los polisacáridos obtenidos de fuentes naturales (vegetales, hongos, algas y bacterias) han recibido especial atención. En particular, los exopolisacáridos (EPS) producidos por bacterias ácido lácticas (BAL) han demostrado encajar en la categoría de ingredientes funcionales dados sus demostrados efectos beneficiosos para la salud (Lynch et al., 2018).

Concomitantemente, la relevancia que presenta la microbiota intestinal en patologías intestinales, así como en otros tipos de afecciones, la ha convertido en un tema de investigación de sumo interés e importancia. (Cani & Delzenne, 2009, Zmora et al., 2019). Ciertas patologías intestinales como la enfermedad inflamatoria intestinal y el cáncer colorrectal están relacionadas con el desequilibrio microbiano (Fernandez et al., 2016; Gao et al., 2015), y en particular, con la disminución de ciertas bacterias productoras de butirato pertenecientes principalmente a los géneros *Roseburia*, *Faecalibacterium* y otros (Candela et al., 2014; Lopez-Siles et al., 2015).

La fibra dietaria puede inducir cambios en la microbiota intestinal. Dentro de este grupo, algunos polisacáridos no digeribles son capaces de estimular específicamente ciertos microorganismos beneficiosos en el colon, como bifidobacterias y lactobacilos. Ya que el incremento de estos microorganismos es generalmente acompañado por un efecto benéfico sobre la salud, tales polisacáridos se consideran "prebióticos".

Los EPS sintetizados por BAL también son candidatos para ser utilizados como ingredientes prebióticos ya que son producidos por microorganismos de status GRAS (generalmente reconocidos como seguros), por lo que podrían ser fácilmente incluidos como aditivo en alimentos funcionales (Salazar et al., 2016; Zannini et al., 2016).

Muchos EPS producidos por BAL no son hidrolizados por enzimas digestivas humanas y pueden llegar al intestino grueso e interactuar con las células del consumidor por contacto directo con el epitelio intestinal y/o modulando la microbiota intestinal y la posterior producción de metabolitos con actividad biológica. Esta modulación de la microbiota intestinal y/o su metabolismo, cuando es censado por las células del epitelio intestinal, podría desencadenar una respuesta biológica (Medrano et al., 2009).

El kefiran es un polisacárido natural que se encuentra en la leche fermentada artesanal llamada "kefir", y también está presente en los "gránulos de kefir" que son el cultivo starter o iniciador con el cual se produce la leche fermentada en los hogares. El kefir tiene una larga trayectoria de consumo y está asociado a numerosos efectos beneficiosos para la salud de los consumidores (Abraham et al., 2010; 2020). El kefiran le otorga viscosidad al producto fermentado que se consume y se encuentra presente en una concentración aproximada de 300 mg/L, dependiendo de factores como el tiempo de incubación de los gránulos, la proporción gránulos/leche y la temperatura, entre otros (Rimada y Abraham, 2003).

Químicamente, el kefiran es un glucogalactano de alto peso molecular (superior a 106 Da), constituido por unidades de D-glucosa y D-galactosa que forman una cadena lineal $\alpha 1-4$ con ramificaciones $\alpha 1-6$ (La Rivière et al., 1967; Abraham et al., 2010). El kefiran podría utilizarse como aditivo alimentario ya que tiene propiedades tecnológicas interesantes tales como mejorar las propiedades viscoelásticas de geles (Rimada & Abraham, 2006), presentar capacidad de gelificante (Piermaria et al., 2008) y formar películas comestibles (Piermaria et al., 2009), entre otras (Abraham et al., 2020).

La actividad biológica de los EPS en general y del kefiran en particular, en el contexto intestinal, podría desencadenarse por -al menos- tres mecanismos:

- i) interacción directa del polímero con las células intestinales;
- ii) estimulación de poblaciones bacterianas benéficas y producción de metabolitos con actividad biológica); y/o
- iii) modulación del sistema inmune y respuesta sistémica.

Además, estos mecanismos podrían presentar una actividad sinérgica.

A continuación, se desarrollará una Revisión de los principales resultados científicos sobre el kefiran referentes a los mecanismos mencionados.

- i) interacción directa del polímero con las células intestinales

Siendo que el kefiran es un polisacárido no digerible que puede llegar al intestino grueso donde puede ejercer cierta actividad biológica in situ, la capacidad de asociarse a las células de epitelio intestinal es una característica relevante. La misma ha sido demostrada in vitro en células intestinales de la línea Caco-2 (Medrano et

al., 2009). Esta unión podría darse a través de interacciones químicas estrechas entre este polisacárido hidrofílico y receptores de superficie que se encuentran en las microvellosidades de las células intestinales adaptados a la interacción estrecha con el mucus.

Como consecuencia de esta asociación -que de algún modo enmascara al enterocito-, el kefiran podría proteger al epitelio intestinal frente a la acción de patógenos. En este sentido, se demostró que este polisacárido puede antagonizar *in vitro* la virulencia de un patógeno alimentario intestinal como *Bacillus cereus*, ya sea evitando que los diversos factores extracelulares (toxinas) dañen a las células (Medrano et al., 2008) así como también disminuyendo el daño generado por la misma bacteria (Medrano et al., 2009).

Otra consecuencia de esta íntima asociación del kefiran con el epitelio intestinal podría estar relacionada con cierta actividad antitumoral. Algunos resultados preliminares *in vitro* indican que el kefiran tendría un efecto antiproliferativo en células de colon tumorales altamente invasivas de la línea HT-29 (Medrano et al., 2015) y esto podría explicar -en parte- la actividad antitumoral asociada tradicionalmente al consumo de kefir. Esta actividad antiproliferativa está en concordancia con resultados obtenidos *in vitro* para otras líneas tumorales no intestinales, como las de cáncer de cuello de útero (HeLa), cáncer hepático (HepG2) (Elsayed et al., 2017) y células de cáncer de mama (MCF-7) (Jenab et al., 2020).

ii) estimulación de poblaciones bacterianas benéficas y producción de metabolitos con actividad biológica

Al ser el kefiran un EPS capaz de llegar al colon, puede ser utilizado como sustrato fermentable por bacterias residentes. Esto ha sido demostrado en estudios *in vitro* e *in vivo*, ya sea para grupos específicos de bacterias como para poblaciones totales y producción de metabolitos.

Se demostró que el kefiran favorece el crecimiento de Bifidobacterias. Se estudió *in vitro* la capacidad de una cepa de *Bifidobacterium bifidum* para crecer en un medio de cultivo con kefiran (Serafini et al., 2014). *Bifidobacterium* representa, junto con *Lactobacillus*, una de las poblaciones de bacterias benéficas para la salud más estudiadas (Arbolea et al., 2016; O'Callaghan y van Sinderen, 2016). También se ha demostrado *in vivo* que el kefiran incrementa el número de bifidobacterias intestinales en ratones después de 2 y 7 días de consumo de kefiran en el agua de bebida, comparado con el grupo control (Hamet et al., 2016), lo cual representa un hallazgo importante en lo que respecta al efecto prebiótico del kefiran.

Recientemente se ha publicado el primer trabajo científico que demuestra que este EPS es capaz de ser fermentado por bacterias intestinales humanas presentes en barros fecales de niños sanos con dieta omnívora, y que sus productos de fermentación consisten en ácidos orgánicos de cadena corta (ácidos láctico, acético, propiónico y butírico). Además, se demostró *in vitro* que estos ácidos tienen un efecto antiproliferativo en células tumorales de cáncer de colon de la línea HT-29; esto permite aportar evidencia para la comprensión de las propiedades antitumorales que se le atribuyen tradicionalmente al kefir (Medrano et al., 2020).

Los ácidos orgánicos de cadena corta producidos por las poblaciones bacterianas intestinales, así como otros metabolitos, pueden alcanzar el torrente sanguíneo y tener diversos efectos a nivel sistémico (Peredo-Lovillo et al., 2020).

iii) modulación del sistema inmune y otras respuestas sistémicas asociadas.

Finalmente, de manera directa o bien a través de la estimulación de poblaciones bacterianas, este polisacárido puede generar una respuesta sistémica mediada por el sistema inmune, teniendo en cuenta que esta correlación ha sido demostrada (Arbolea et al., 2016).

El consumo de kefiran en concentraciones equivalentes a las que se encuentran en la leche fermentada demostró inducir cambios en el balance de células inmunes *in vivo* (Medrano et al., 2011). En el contexto intestinal, se encontró un incremento de células productoras de anticuerpos IgA, lo cual podría representar una contribución a la defensa del epitelio. Al mismo tiempo, se encontró un aumento de células presentadoras de antígenos (macrófagos y células dendríticas). Cabe destacar que este incremento de células inmunes no estuvo acompañado por anomalías morfológicas ni histológicas en los intestinos de los animales, lo cual indicaría

que este EPS es capaz de modular el sistema inmune sin desencadenar una respuesta inflamatoria. Al mismo tiempo, se encontró un aumento de las células productoras de mucus en los animales que consumieron el kefiran, lo que indica una estimulación de producción de mucina y la consecuente estimulación de poblaciones de Bifidobacterias (Pokusaeva et al., 2011) y posible efecto en la disminución de la constipación (Maeda et al., 2004). El incremento de la producción de algunos mediadores de la respuesta inmune (citoquinas y anticuerpos) luego del consumo de kefiran fue demostrado *in vivo* (Vinderola et al., 2006). En general, se observó que el kefiran indujo una respuesta inmune en la mucosa intestinal, y también tuvo efecto en la inmunidad sistémica a través de las citoquinas liberadas a la sangre circulante. En línea con estos resultados, Jenab et al., (2020) demostraron *in vitro* que el kefiran incrementa la producción de citoquinas (IL-6) de células mononucleares de sangre periférica.

La respuesta inmune está íntimamente relacionada con la respuesta inflamatoria. En este sentido, Furuno y Nakanishi (2012) estudiaron el efecto antiinflamatorio de kefiran en mastocitos derivados de la médula ósea de ratones. Descubrieron que el kefiran tiene un efecto supresor sobre la función inflamatoria de los mastocitos, al inhibir la desgranulación y la producción de citoquinas. En línea con esto, Kwon et al., (2008) obtuvieron resultados similares con relación al efecto antiinflamatorio del kefiran en una de las condiciones alérgicas e inflamatorias más conocidas, el asma.

Otro de los aspectos relacionados con la inmunomodulación y los procesos inflamatorios, corresponde a los procesos tumorales. La actividad antitumoral del kefiran ha sido tal vez una de las primeras en ser abordadas, sin embargo, aún no hay mecanismos propuestos para su modo de acción. Shiomi et al., (1982) estudiaron la inhibición del crecimiento de tumores sólidos inducidos en ratones. Encontraron que el crecimiento de los tumores fue inhibido por la administración oral e intraperitoneal de kefiran; estos autores concluyeron que el efecto antitumoral del kefiran estaría mediado por una respuesta del hospedador, aunque no se profundizó en estas observaciones ni se propusieron mecanismos de acción. Otro acercamiento a la actividad antitumoral del kefiran fue abordado por Murofushi et al., (1983) quienes estudiaron la respuesta de hipersensibilidad y la inhibición del crecimiento de tumores inducidos en ratones, luego de ser tratados con kefiran. Se observó una correlación entre la respuesta de hipersensibilidad y la actividad antitumoral en los ratones; sin embargo, el mecanismo de acción del kefiran no fue dilucidado.

Durante muchos años la actividad antitumoral de kefiran no fue nuevamente abordada hasta los últimos años, en los que algunos estudios *in vitro* recuperaron el interés por este efecto usando líneas tumorales no intestinales, tal como se mencionó en el ítem i).

Otros efectos beneficiosos para la salud a nivel sistémico y relacionados de alguna manera con el contexto intestinal se estudiaron en diferentes modelos *in vivo*. El efecto del kefiran sobre la hipertensión, el contenido de lípidos y glucosa en la sangre (modelos de colesterol y diabetes) y el estreñimiento (Maeda et al., 2004); aterosclerosis, propiedades antiinflamatorias (Uchida et al., 2010) y actividad antioxidante (Radhouani et al., 2018).

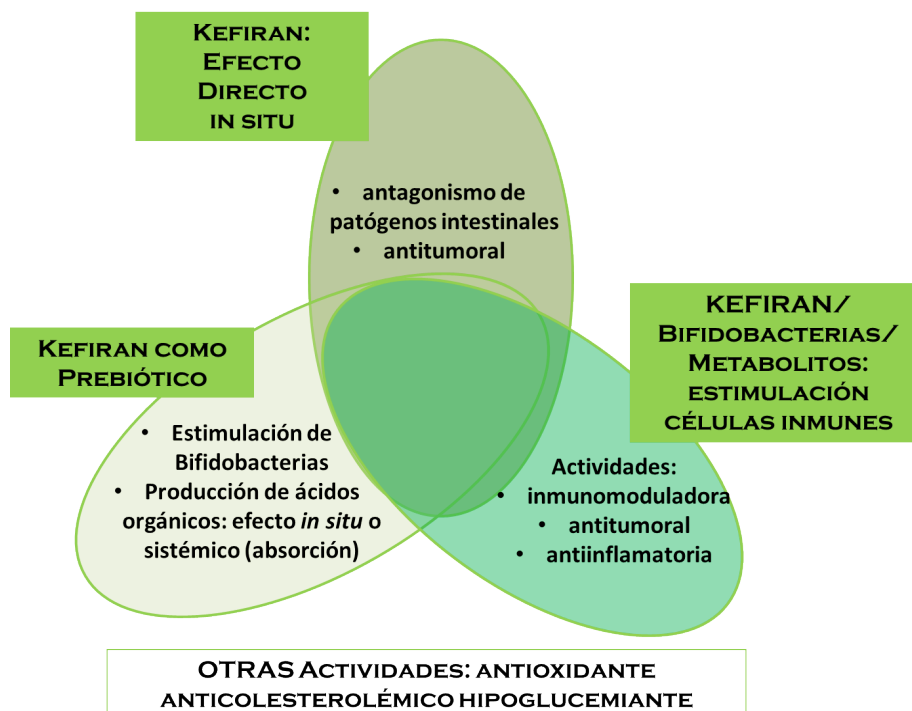
Cabe mencionar que no se ha reportado ninguna actividad adversa en relación con el consumo de este polisacárido (excepto en el caso de células tumorales, donde parece sí tener efecto), al menos en las dosis en las que se encuentra en el producto fermentado.

CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta la gran cantidad de evidencia científica que se ha presentado, sumado a los efectos benéficos para la salud que están sustentados empíricamente por años de consumo de la bebida fermentada que contiene kefiran, no es ambicioso postular que este biopolímero tiene gran potencialidad para ser utilizado como aditivo alimentario debido a su versatilidad y a la gran cantidad de efectos biológicos demostrados. Probablemente la mayoría de ellos se inicien en el contexto intestinal a través del efecto directo del polisacárido (i), o de la estimulación de poblaciones bacterianas y de sus metabolitos (ii), así como del efecto sistémico mediado por el sistema inmune (iii), no descartando que estos mecanismos puedan actuar de manera sinérgica (FIGURA 1). El consumo de la leche fermentada kefir producida artesanalmente en los hogares es una

fuente natural de este polisacárido en dosis adecuadas.

Figura 1: ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL KEFIRAN EN EL CONTEXTO INTESTINAL



: se representan los tres ejes principales a través de los cuales el kefiran podría ejercer su actividad biológica en el contexto intestinal. Cada uno de los ejes podría ejercer su efecto de manera individual o sinérgica.

BIBLIOGRAFÍA

Abraham, A, Medrano, M, Piermaria, JA, Mozzi, F. Novel applications of polysaccharides from lactic acid bacteria: A focus on kefiran (Review article). En *Food Hydrocolloids: Characteristics, Properties and Structures*. Ed: Clarence S. Hollingworth. New York, EEUU. Nova Publishers, Inc (2010) 253-271

Abraham, A, Simonelli, N, Gagliarini, N, Medrano, M, Piermaria, J. Kefiran (Review article). En: *Polysaccharides of Microbial Origin. Biomedical Applications*. Editores: Joaquim Miguel Oliveira, Hajer Radhouani y Rui L. Reis. Switzerland Editorial Springer (2020). En prensa.

Arbolea, S, Stanton, C, Ryan, CA, Dempsey, E, Ross, PR. (2016) *Bosom Buddies: the symbiotic relationship between infants and Bifidobacterium longum ssp. longum and ssp. infantis*. Genetic and probiotic features. *Annu Rev Food Sci Technol* 7:1-21.

Candela, M, Turrone, S, Biagi, E, Carbonero, F, Rampelli, S, Fiorentini, C, et al. (2014) *Inflammation and colorectal cancer when microbiota-host mutualism breaks*. *World J Gastroenterol* 20(4):908-922.

Cani, PD, Delzenne, NM. (2009) *The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease*. *Curr Pharm Des* 15(13):1546-1558.

Elsayed, EA, Farooq, M, Dailin, D, El-Enshasy, HA, Othman, NZ, Malek, R, et al. (2017) *In vitro and in vivo biological screening of kefiran polysaccharide produced by Lactobacillus kefiranofaciens*. *Biomed Res* 28(2):594-600.

Fernández, J, Redondo-Blanco, S, Gutiérrez-del-Río, I, Miguélez, EM, Villar, CJ, Lombó, F. (2016) *Colon microbiota fermentation of dietary prebiotics towards short-chain fatty acids and their roles as anti-inflammatory and antitumour agents: A review*. *J Funct Foods* 25:511-522.

Furuno, T, Nakanishi, M. (2012) *Kefiran suppresses antigen-induced mast cell activation*. *Biol Pharm Bull* 35:178-183.

Gao, Z, Guo, B, Gao, R, Zhu, Q, Qin, H. (2015) *Microbiota dysbiosis is associated with colorectal cancer*. *Front*

Microbiol 6:20.

Hamet, MF, Medrano, M, Perez, PF, Abraham, AG. (2016) Oral administration of kefiran exerts a bifidogenic effect on Balb/c mice intestinal microbiota. *Benef Microbes* 7:237-246.

Hasheminya, SM, Dehghannya, J. (2020) Novel ultrasound-assisted extraction of kefiran biomaterial, a prebiotic exopolysaccharide, and investigation of its physicochemical, antioxidant and antimicrobial properties. *Mater Chem Phys.* 243:122645.

Jenab, A, Roghanian, R, Ghorbani, N, Ghaedi, K, Emtiazi, G. (2020) The Efficacy of Electrospun PAN/Kefiran Nanofiber and Kefir in Mammalian Cell Culture: Promotion of PC12 Cell Growth, Anti-MCF7 Breast Cancer Cells Activities, and Cytokine Production of PBMC. *Int J Nanomedicine* 15:717-728.

Kwon, OK, Ahn, KS, Lee, MY, Kim, SY, Park, BY, Kim, MK, Lee, IY, OH, SR, Lee HK. (2008) Inhibitory effect of kefiran on ovalbumin-induced lung inflammation in a murine model of asthma. *Arch Pharm Res* 31(12):1590-1596.

La Rivière, JW, Kooiman, P, Schmidt, K. (1967) Kefiran, a novel polysaccharide produced in the kefir grain by *Lactobacillus brevis*. *Arch Microbiol* 59:269-278.

Lopez-Siles, M, Martinez-Medina, M, Abellà, C, Busquets, D, Sabat-Mir, M, Duncan, SH, et al. (2015) Mucosa-associated *Faecalibacterium prausnitzii* phylotype richness is reduced in patients with inflammatory bowel disease. *Appl Environ Microbiol* 81(21):7582-7592.

Lynch, KM, Zannini, E, Coffey, A, Arendt EK. (2018) Lactic acid bacteria exopolysaccharides in foods and beverages: isolation, properties, characterization, and health benefits. *Annu Rev Food Sci Technol* 9:155-176.

Maeda, H, Zhu, X, Omura, K, Suzuki, S, Kitamura, S. (2004). Effects of an exopolysaccharide (kefiran) on lipids, blood pressure, blood glucose, and constipation. *Biofactors* 22:197-200.

Medrano, M, Gangoiti, MV, Pastor, DA; Abraham, AG. (2015) Actividad antitumoral in vitro del kefiran y sus productos de fermentación. XV Congreso CYTAL 2015 AATA-. Trabajo publicado en el libro de actas in extenso del congreso. Trabajo premiado FANUS (Ed. 2016).

Medrano, M, Gangoiti, MV, Simonelli, N, Abraham, AG. (2020) Kefiran fermentation by human faecal microbiota: Organic acids production and in vitro biological activity. *Bioact Carbohydr Diet Fibre* 24:100229.

Medrano, M, Pérez PF, Abraham, AG. (2008) Kefiran antagonizes cytopathic effects of *Bacillus cereus* extracellular factors. *Int J Food Microbiol* 122(1-2):1-7.

Medrano, M, Hamet, MF, Abraham, AG, Pérez, PF. (2009) Kefiran protects Caco-2 cells from cytopathic effects induced by *Bacillus cereus* infection. *Antonie Van Leeuwenhoek* 96(4), 505.

Medrano, M, Racedo, S, Rolny, I, Abraham, AG, Pérez, PF. (2011) Oral administration of kefiran modulates the immune cell balance of lymphoid tissues associated to intestinal mucosa. *J Agri Food Che* 59:5299-5304.

Murofushi, M, Shiomi, M, Aibara, K. (1983) Effect of orally administered polysaccharide from kefir on delayed-type hypersensitivity and tumor growth in mice. *Jpn J Med Sci Biol* 36:49-53.

O'Callaghan, A, van Sinderen, D. (2016) Bifidobacteria and their role as members of the human gut microbiota. *Front Microbiol* 7:925.

Peredo-Lovillo, A, Romero-Luna, HE, Jiménez-Fernández, M. (2020) Health promoting microbial metabolites produced by gut microbiota after prebiotics metabolism. *Food Res Int:* 109473.

Piermaria, JA, La Canal, M, Abraham, AG. (2008) Gelling properties of kefiran, a food-grade polysaccharide obtained from kefir grain. *Food Hydrocoll* 22(8):520-1527.

Piermaria, JA., Pinotti, A, Garcia, MA, Abraham, AG. (2009) Films based on kefiran, an exopolysaccharide obtained from kefir grain: Development and characterization. *Food Hydrocoll* 23(3):684-690.

Pokusaeva, K, Fitzgerald, GF, van Sinderen, D. (2011) Carbohydrate metabolism in bifidobacteria. *Genes Nutr* 6:285-306.

- Radhouani, H, Gonçalves, C, Maia, FR, Oliveira, JM, Reis, RL. (2018) *Biological performance of a promising Kefiran-biopolymer with potential in regenerative medicine applications: a comparative study with hyaluronic acid.* *J Mater Sci Mater Med* 29(8):124.
- Rimada, PS, Abraham, AG. (2003) *Comparative study of different methodologies to determine the exopolysaccharide produced by kefir grains in milk and whey.* *Le Lait*, 83(1):79-87.
- Rimada, PS, Abraham, AG. (2006) *Kefiran improves rheological properties of glucono- δ -lactone induced skim milk gels.* *Int Dairy J* 16(1):33-39.
- Salazar, N, Gueimonde, M, de los Reyes-Gavilan, CG, Ruas-Madiedo, P. (2016) *Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria and bifidobacteria as fermentable substrates by the intestinal microbiota.* *Crit Rev Food Sci Nutr* 56(9):1440-1453.
- Serafini, F, Turrone, F, Ruas-Madiedo, P, Lugli, GA, Milani, C, Duranti, S, et al. (2014) *Kefir fermented milk and kefiran promote growth of Bifidobacterium bifidum PRL2010 and modulate its gene expression.* *Int J Food Microbiol* 178:50-59.
- Shiomi, M, Sasaki, K, Murofushi, M, Aibara, K. (1982) *Antitumor activity in mice of orally administered polysaccharide from Kefir grain.* *Jpn J Med Sci Biol* 35:75-80.
- Uchida, M, Ishii, I, Inoue, C, Akisato, Y, Watanabe, K, Hosoyama, et al. (2010) *Kefiran reduces atherosclerosis in rabbits fed a high cholesterol diet.* *J Atheroscler Thromb* 17(9):980-988.
- Vinderola, G, Perdigon, G, Duarte, J, Farnworth, E, Matar, C. (2006) *Effects of the oral administration of the products derived from milk fermentation by kefir microflora on immune stimulation.* *J Dairy Res* 73(4):472-479.
- Zannini, E, Waters, DM, Coffey, A, Arendt, EK. (2016) *Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides.* *Appl Microbiol Biotechnol* 100(3):1121-1135.
- Zamora, N, Suez, J, Elinav, E. (2019) *You are what you eat: diet, health and the gut microbiota.* *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 16(1):35-56.