



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



TESIS DE DOCTORADO

**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS
BIOACTIVOS DE SALVADO DE ARROZ:
APLICACIONES EN ALIMENTACIÓN Y SALUD**

M.Sc. (Ing. Agr.) Sonia Cozzano Ferreira

Programa de Posgrado en Química
Facultad de Química
Universidad de la República

Montevideo - Uruguay
Julio de 2017



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



PEDECIBA



Obtención y caracterización de extractos bioactivos de salvado de arroz
Aplicaciones en alimentación y salud

M.Sc. (Ing. Agr.) Sonia Cozzano Ferreira

Tesis de Doctorado presentada al Programa de Postgrado en Química y
Programa de Ciencias Básicas (PEDECIBA-Química) de la Facultad de Química
como parte de los requisitos necesarios para la obtención del título de Doctora
en Química

Director de tesis:

Dra. Alejandra Medrano

Codirectora:

Dra. María Dolores Del Castillo

Director Académico:

Dr. Patrick Moyna

Montevideo – Uruguay

Julio de 2017

INTEGRANTES DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

Dr. Eduardo Dellacassa

Dr. Tomás López

Dr. Adolfo Martínez-Rodríguez

Montevideo – Uruguay
Julio de 2017

A mis amores, Valentina y Luisina

Agradecimientos

Quisiera agradecer a PEDECIBA Química por el apoyo económico para el desarrollo del presente trabajo de tesis doctoral.

A SAMAN S.A y en especial al Ing. Agr. Raúl Uruga por la buena disposición para el suministro de materia prima.

A la Universidad Católica del Uruguay por el apoyo para la realización del trabajo y al Programa de apoyo a la especialización docente por la Beca para la estancia en el CIAL-UAM-MADRID.

Al CIAL (Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación), en especial a Loli y su equipo por toda la colaboración a lo largo de la investigación.

Al laboratorio de “Fisicoquímica Biológica” (Instituto Química Biológica, Facultad de Ciencias, UdelaR) por préstamo de equipos y el recibarnos en las largas jornadas de ORAC.

A la Facultad de Química, UdelaR, por sus puertas abiertas y su espíritu de colaboración, especialmente a Ignacio Míguez (Nachito) de Farmacognosia, a Bruno Irigaray del equipo de Grasas y Aceites y a todos aquellos que me han brindado su ayuda para sacar el trabajo adelante.

A mis tutoras, Alejandra (Ale) y María Dolores (Loli) por la confianza y el “dejarme hacer” cotidiano.

A todos los amigos cosechados en el CYTAL, por el afecto y por todos los buenos momentos compartidos.

A mis compañeros de trabajo y amigos, Ana Curutchet y Leonardo Sallé por estar siempre de manera incondicional cubriendo lo que hiciera falta para que pudiera “ganarle al tiempo” y llegar a la meta.

A Marcela Roche y su sonrisa constante durante tantas frías tardes en el UHPLC.

A Nahir Urruzola por el amparo cotidiano y su contagioso espíritu de superación.

A Adriana Fernández, mi compinche, con quien he compartido las de “cal y las de arena” en el trabajo diario de laboratorio durante todos estos años de construcción.

A toda mi familia y en especial a mis suegros Ana y Washo, por estar siempre apuntalando a la familia y alentándonos a superarnos !!

A Gabriel, Valentina y Lusina los grandes motores de todas mis quimeras!

A todos los que me han acompañado de alguna u otra forma en este capítulo de mi vida... muchas gracias!!

RESUMEN

El arroz (*Oryza sativa*) es el cereal cultivado más importante a nivel mundial (672×10^6 toneladas /año). Su destino prioritario es la alimentación humana como arroz blanco. El Uruguay es un exportador neto de arroz blanco, generando anualmente 130 mil toneladas de salvado de arroz como residuo. Aunque el 10% de este salvado tiene como destino la producción de aceite y una parte se utiliza para la alimentación animal, es de gran interés estudiar su uso potencial en la alimentación humana.

Las enfermedades no transmisibles son responsables de la muerte de 40 millones de personas en el mundo cada año. Uno de los factores de riesgo más relevante son el sobrepeso y la obesidad. Estos están directamente relacionados un mayor riesgo de padecer diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, entre otras. Dados los actuales hábitos alimenticios, de alto consumo de azúcares libres se prevé un incremento de la incidencia global de estas patologías en los próximos años.

La presente tesis doctoral se enfoca en la posibilidad de aprovechar una materia prima sub-valorada como el salvado de arroz, con el objetivo de desarrollar nuevos ingredientes alimentarios para el consumo humano que contribuyan a la reducción del riesgo de padecer estas patologías crónicas no trasmisibles.

Para ello, se desarrolló un extracto rico en antioxidantes polifenólicos cuyas condiciones de producción fueron optimizadas a través de un diseño experimental central compuesto (CCD) $2k = 23 = 16$ tratamientos, con 3 variables independientes (% de etanol, tiempo y temperatura) a 3 niveles (-1, 0 y +1) y utilizando tecnologías simples y fácilmente escalables. El residuo insoluble generado tras la obtención de dicho extracto fue caracterizado por análisis de su composición nutricional y capacidad antioxidante demostrando ser una fracción rica en fibra dietética antioxidante.

Las condiciones de extracción optimizadas (maceración simple con 35% de etanol en la solución extractora, a 20°C por 105 minutos) permitió obtener un extracto de salvado de arroz principalmente rico en proteínas (12,74 g/100g de MS) y en carbohidratos (77,0 g/100g MS). Bajo dichas condiciones, se recuperó el total de fibra dietética soluble (2,23 ±0,10 g/100g MS) que compone el salvado de arroz; así como, un contenido de lípidos totales de 3,38 ±0,07 g/100g MS y de cenizas de 4,82±0,06 g/100g MS.

El extracto antioxidante resultó ser rico en polifenoles (71,42±1,60 mg de GAE/ g de extracto) y presentó elevada capacidad antioxidante (451±14 µmol de TE/g muestra frente a radical ABTS.+ y 912±31 µmol de TE/g muestra frente a radicales peroxilos). El análisis cromatográfico por UHPLC indicó que los componentes fenólicos mayoritarios presentes en extracto son ácido clorogénico (44, 84 ± 2, 25 mg / 100 g de materia seca) y ácido ferúlico (12,44 ± 0,60 mg / 100 g de materia seca). El extracto presentó valores IC₅₀ de 0,14 ± 0,01 y 4,50 ± 0,08 mg/mL contra radicales peroxilos y ABTS⁺, respectivamente. Para su mejor caracterización el extracto seleccionado se fraccionó mediante ultrafiltración empleando una membrana con tamaño de poro uniforme de 3 kDa. Aplicando este procedimiento se encontró que el extracto está constituido por un 68% de compuestos con tamaño molecular mayor a 3 kDa (FAPM) y 32% de compuestos con tamaño menor a este valor (FBPM). El análisis cromatográfico de ambas fracciones indica que la FAPM contiene principalmente ácido ferúlico mientras que el compuesto fenólico mayoritario que compone a la FBPM es ácido clorogénico.

El estudio de bioaccesibilidad de los componentes bioactivos que forman el extracto antioxidante de salvado de arroz llevado a cabo por simulación gastrointestinal *in vitro* indicó una pérdida significativa ($p < 0,05$) de la capacidad antioxidante del extracto durante el proceso fisiológico del orden de de 21 y 29%, contra el radical peroxilo y ABTS⁺, respectivamente. Los resultados sugirieron una degradación de los compuestos fenólicos ácidos ferúlico y clorogénico que componen el extracto que puede tener lugar como consecuencia de los cambios de pH que transcurren durante el proceso de digestión oral gastrointestinal simulando las condiciones fisiológicas humanas. El cromatograma obtenido por UHPLC del digerido permitió cuantificar la presencia de 11, 60 ± 0,63 mg de ácido

clorogénico cada 100 g de digerido y $4,94 \pm 0,44$ mg de ácido ferúlico cada 100 g de digerido. Estos resultados sugieren que tras el proceso de digestión del extracto, podrían encontrarse en el lumen intestinal cantidades de ácidos ferúlico y clorogénico fisiológicamente relevantes bioaccesibles. En consecuencia, estos componentes podrían bien ejercer su acción antioxidante a nivel de la pared intestinal o ser potencialmente absorbidos en el TGI y ejercer sus efectos en el organismo.

El análisis nutricional del residuo insoluble generado tras la obtención del extracto seleccionado mostró ser rico en fibra dietética total ($28,90 \pm 0,70$ g/100 g MS) y en lípidos totales ($17,93 \pm 0,30$ g/100g MS). Además presentó proteínas ($1,60 \pm 0,03$ g/100 g MS), cenizas ($8,30 \pm 0,32$ g/100 g MS) y un menor contenido en carbohidratos totales ($43,40 \pm 0,03$ g/100g MS) que el encontrado en el extracto antioxidante. La capacidad antioxidante contra el radical ABTS^{•+} de la fracción insoluble evaluada por el método de QUENCHER fue de 236 ± 10 μ moles de TE/g de muestra. Estos resultados sugieren que la fracción insoluble además de ser una fuente de fibra alimentaria importante, principalmente insoluble, es también fuente de antioxidantes por lo que podría considerarse como un nuevo ingrediente alimentario fuente de fibra dietética antioxidante.

La validación de estos dos nuevos ingredientes alimentarios se llevó a cabo a través de la elaboración de galletas funcionales sin azúcares añadidos aptos para celíacos. El consumo de galletas en la región es masivo a nivel poblacional, por lo que vehicular dichos ingredientes benéficos para la salud resultarían en un gran aporte para reducir el riesgo de padecer enfermedades crónicas no transmisibles como la diabetes. Las galletas fueron elaboradas utilizando como base a la harina de arroz, que fue sustituida por un 10 % de extracto antioxidante y 54 % de fracción rica en fibra dietética antioxidante para obtener una galleta que resultó ser fuente de fibra dietética (3g /porción de 30 g) de acuerdo a la reglamentación vigente en el MERCOSUR y alta en fibra dietética para la CE (>6 g/100g de galleta). Se utilizó stevia como edulcorante no nutritivo resultando ser un alimento que no contiene azúcar añadido y; por lo tanto, presenta potencial para reducir el riesgo de diabetes. El alimento presentó una capacidad antioxidante de 3653 ± 150 μ mol TE/ porción considerando los compuestos

extraíbles e hidrolizables presentes y de 1125 ± 73 μmol de TE/porción de galleta (30g) por el método de ABTS-QUENCHER. El % de bioaccesibilidad de los polifenoles presentes en las galletas fue de 17% respecto a los polifenoles totales presentes en una porción de 30g de alimento ($33,07 \pm 1,59$ mgGAE/porción). El promedio de aceptabilidad general de las nuevas galletas libres de gluten, fuente de fibra dietética y antioxidantes fue de 51% (88 evaluaciones). La formulación debe considerarse un prototipo inicial sobre el cual debe trabajarse para obtener un alimento de óptima calidad sensorial.

En conclusión, se puede afirmar con un 95% de confianza que es posible obtener 2 nuevos ingredientes alimentarios de calidad nutricional y funcional a partir de salvado de arroz: extracto antioxidante (fracción soluble) y la fracción insoluble rico en fibra dietética antioxidante. El proceso de extracción propuesto es de gran simplicidad y bajo costo de inversión por lo que se alinean al concepto de “extracción verde” destacándose el hecho de no generar nuevos residuos de producción siendo innovadora, eco-sostenible y de promisoría implementación en la industria uruguaya. Las galletas elaboradas permiten afirmar que se ha logrado un alimento tradicional de gran consumo regional que reúne varias de las condiciones recomendadas sobre una dieta saludable por la OMS (2014 y 2015) para la reducción del riesgo de padecer enfermedades crónicas no transmisibles en un solo alimento. Las galletas no contienen gluten, ni azúcar añadido (endulzado con stevia como edulcorante no nutritivo), son fuente de fibra alimentaria antioxidante (3 g /porción) y presentan capacidad antioxidante siendo un primer prototipo de alimento funcional que valida la recuperación del salvado de arroz.

Palabras clave: Salvado de Arroz, Antioxidantes fenólicos, Fibra antioxidante, Bioaccesibilidad, Alimentos funcionales, Sostenibilidad

Lista de siglas

AAPH	Fuente de radicales libres, 2,2'- azobis (2 – amidinopropane) dihydrochloride.
ABTS	Radical libre (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
AC	Ácido clorogénico
AF	Ácido ferúlico
AG	Ácido gálico
CA	Capacidad antioxidante
CA-ABTS	Capacidad antioxidante contra el radical ABTS.+
CA-ORAC-FL	Capacidad antioxidante contra el radical peroxilo
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura por sus siglas en inglés: Food and Agricultural Organization
FAPM	Fracción de alto peso molecular
FBPM	Fracción de bajo peso molecular
FDA	Food and Drug Administration
FI-EAE	Fracción Insoluble de la Extracción Asistida por Enzimas
GAE	Ácido gálico equivalente de su sigla en inglés: gallic acid equivalent
MGAP	Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca
OPYPA	Oficina de Programación y Políticas Agropecuarias
ORAC	Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (del inglés: oxygen radical absorbance capacity)
SA	Salvado de arroz
SA-EAE	Salvado de Arroz con extracción asistida por enzima
TE	Trolox equivalente
TGI	Tracto Gastro Intestinal
TROLOX	Patrón antioxidante: Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
UdelaR	Universidad de la República

Tabla de contenidos

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS.....	i
BIOACTIVOS DE SALVADO DE ARROZ: APLICACIONES EN ALIMENTACIÓN Y SALUD.....	i
Agradecimientos	6
RESUMEN	9
Lista de siglas	1
Tabla de contenidos	2
Introducción general.....	5
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO	10
Hipotesis.....	10
Objetivos de la tesis	10
Objetivo general	10
Objetivos específicos	10
I - OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE INGREDIENTES ALIMENTARIOS SOSTENIBLES A PARTIR DE SALVADO DE ARROZ.....	11
1-Introducción	11
1.1-El salvado de arroz como nutriente	11
1.2- El salvado de arroz como fuente de antioxidantes	14
1.2.1-Compuestos polifenólicos presentes en el salvado de arroz	15
1.2.2- Efecto de las condiciones de extracción y métodos de evaluación sobre composición y capacidad antioxidante de los extractos polifenólicos.	19
1.3- Compuestos fenólicos no extraíbles asociados a la fibra dietética del salvado de arroz	26
1.3.1- Bioaccesibilidad de los compuestos antioxidantes presentes en la fibra dietética del salvado de arroz	28
1.3.2- Digestión absorción y metabolismo de los polifenoles	30
2-Objetivos específicos del capítulo 1	33
3-Materiales y métodos	34
3.1- Caracterización de la materia prima	34
3.1.1 Determinación de humedad.....	34
3.1.2 Determinación de cenizas totales	35
3.1.3 Determinación de proteínas.....	35
3.1.4 Determinación de lípidos totales.....	35

3.1.5 Determinación del contenido fibra dietética	35
3.2- Obtención de los extractos antioxidantes de salvado de arroz	36
3.3- Caracterización de los extractos antioxidantes	39
3.3.1 Contenido de proteínas solubles	39
3.3.2 Contenido de polifenoles totales	39
3.3.3. Capacidad antioxidante	40
3.4 Selección de extractos de salvado de arroz para su uso como ingrediente natural antioxidante e identificación de compuestos fenólicos.....	43
3.4.1- Composición nutricional del extracto	43
3.4.2 Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos del extracto seleccionado y sus fracciones.....	44
3.5- Validación del residuo generado durante el proceso de extracción como ingrediente alimentario	46
3.5.1 Composición nutricional y contenido de cenizas de la fracción insoluble	47
3.5.2 Evaluación de la capacidad antioxidante de la fracción insoluble	47
3.6- Estudio in vitro de la bioaccesibilidad de los compuestos antioxidantes	49
4 -Resultados y discusión.....	51
4.1- Composición del nutricional de las materias primas	51
4.2- Efecto de las variables del proceso de extracción sobre la composición y propiedades de los extractos.....	53
4.2.1- Influencia de la materia prima de origen en la composición y capacidad antioxidante de los extractos.....	54
4.2.2 -Análisis de correlación entre contenido polifenoles totales y capacidad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de salvado de arroz.....	59
4.3- Validación y optimización del proceso de extracción a partir del salvado de arroz	60
4.3.1- Análisis del modelo	60
4.3.2- Análisis de las gáficas de contorno y superficies de respuesta	67
4.3.3- Condiciones óptimas para la extracción de antioxidantes del salvado de arroz.....	72
4.4- Caracterización nutricional de extracto seleccionado	73
4.5- Caracterización de la fracción de compuestos fenólicos del extracto antioxidante del salvado de arroz	74
4.5.1- Composición de la fracciones de alto y bajo peso molecular del extracto de salvado de arroz	74
4.5.2- Caracterización de la fracción de compuestos fenólicos del extracto de salvado de arroz	76
4.5.3- Efectos de la digestión oral gastrointestinal en la bioaccesibilidad de los antioxidantes del extracto.....	77
4.6- Caracterización del residuo insoluble recuperado durante el proceso de obtención del extracto antioxidante de salvado de arroz	81
4.6.1- Validación del valor nutricional del nuevo ingrediente.....	81
4-Conclusiones del capítulo	85
5- Referencias.....	87

II- FORMULACIÓN DE UNA GALLETA FUNCIONAL A BASE DE INGREDIENTES EXTRAÍDOS DE SALVADO DE ARROZ.....	98
1- Introducción	98
1.1- Alimentos funcionales	98
1.1.1- <i>Evolución y concepto general sobre alimento funcional</i>	99
1.1.2 - <i>Marco legal de los alimentos funcionales</i>	100
1.2- Las Galletas como vehículo de compuestos funcionales.....	101
1.2.1- <i>Fundamento del uso de edulcorantes en sustitución de la sacarosa para la formulación de las galletas funcionales</i>	102
1.2.2- <i>Fundamento de la elección del tipo de harina para la elaboración de las galletas funcionales</i>	107
2- Objetivos específicos del capítulo	115
3 - Materiales y métodos	116
3.1- Ingredientes funcionales sostenibles aislados del salvado de arroz	116
3.2 -Formulación de la galleta.....	117
3.3 -Análisis nutricional de las galletas	119
3.4 -Análisis de las propiedades antioxidantes de las galletas.....	119
3.5- Caracterización del color superficial de las galletas	125
3.6-Análisis de aceptabilidad de la galleta funcional	125
4-Resultados y discusión.....	128
4.1- Validación nutricional de las galletas funcionales	128
4.2- Evaluación del potencial como nuevo alimento funcional de las galletas.	131
4.3- Análisis del color superficial de las galletas funcionales	140
4.4- Estudio de la aceptabilidad del nuevo alimento	141
5- Conclusiones del capítulo	145
5-Referencias.....	147

Introducción general

El arroz (*Oryza sativa L.*) es el cereal cultivado más importante del mundo y es el alimento básico para las dos terceras partes de la población mundial (Arendt & Zannini, 2013, Rice Almanac, 2013). Al igual que otros granos de cereales, el arroz es rico en carbohidratos, proteínas, ciertos ácidos grasos, y micronutrientes (vitaminas y oligoelementos). La producción total de arroz mundial alcanza las 672×10^6 toneladas (Arendt & Zannini, 2013) y es cultivado actualmente en más de 100 países, habiendo más de 1 billón de personas que dependen en él para su sustento (Rice Almanac, 2013). En la mayoría de las zonas tropicales de América y del Caribe, es el grano más consumido, suministrando más calorías per cápita inclusive que el trigo, el maíz, la yuca, o la papa (Rice Almanac, 2013). Se estima que este cereal, aporta el 21% de la energía y el 15 % de las proteínas globales de la dieta humana per cápita (Arendt & Zannini, 2013).

El cultivo de arroz en Uruguay se produce en el litoral norte, en el este y en el centro del país (*Figura 1*). La zona norte está comprendida por los departamentos de Artigas y Salto, la zona centro integra a los departamentos de Rivera, Tacuarembó, Durazno y Río Negro y la zona este, incluye a los departamentos de Rocha, Treinta y Tres, Lavalleja y Cerro Largo (OPYPA-DIEA-MGAP, 2016). La superficie sembrada total en la zafra 2015/16 fue estimada en más de 161 mil hectáreas con una producción aproximada de 1,3 millones de toneladas de arroz cáscara seco (OPYPA-DIEA-MGAP, 2016).

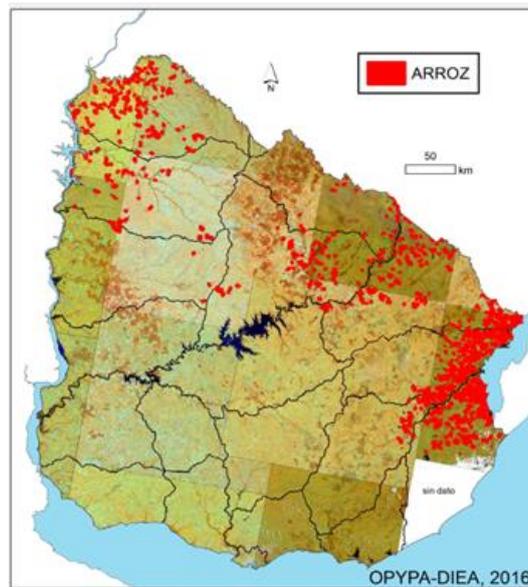


Figura 1- Distribución de la producción de arroz, Imágenes de los satélites LANDSAT-8 y RESOURCESAT, (enero y febrero 2016). Tomado de MGAP (OPYPA-DIEA, 2016).

El arroz (*Oryza sativa*) es una especie perteneciente a la familia de las gramíneas, de ciclo anual (*poácea*) que se cultiva en régimen semi-acuático, y cultivable en un amplio rango de condiciones climáticas (Arendt & Zannini, 2013). El arroz cultivado pertenece a las especies *O. sativa* y/o *O. glaberrima*. Siendo la primera la especie predominante, *O. glaberrima* se cultiva en una escala limitada y sólo en África.

El fruto indehisciente o cariósipide de esta planta encierra al arroz integral. El arroz como tal se recolecta con la cáscara adherida llamándose “arroz vestido o con cáscara” (*Figura 2*). La cáscara constituye un 20% del peso bruto del arroz y está formada por la lema y pálea que son los rudimentos florales.

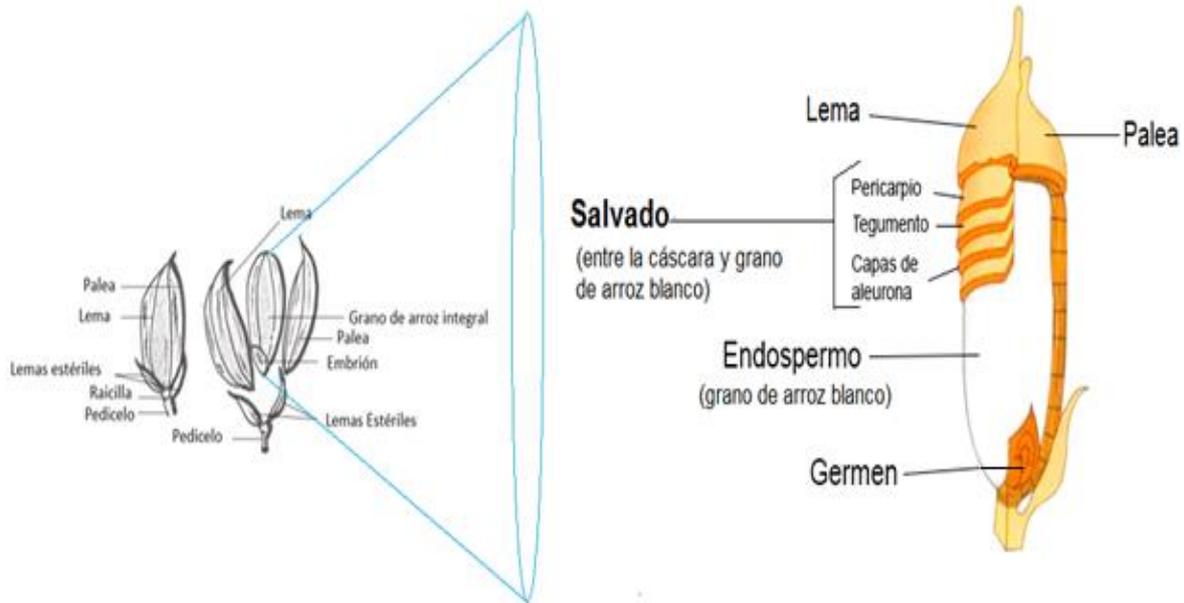


Figura 2- Esquema de la estructura del grano de arroz basado en los propuestos por Arendt & Zannini, (2013) y <http://www.officialteamLift.com/wp-content/uploads/2017/03/33896-3.png>.

El salvado de arroz (SA) es la porción del grano que comprende al tegumento, pericarpio y capa de aleurona (*Figura 2*) que se ubica entre las cáscaras y el endospermo que se elimina tras el pulido del arroz integral para obtener el “arroz blanco” (Gul *et al.*, 2015, Friedman, 2013, Arendt & Zannini, 2013). Durante el procesamiento industrial del arroz, el primer paso es “descascarillar” (quitar las cáscaras) obteniendo el “arroz integral”/ “completo” o “arroz cargo” (*Figura 3*). El arroz integral es de color marrón porque aún conserva al salvado. El arroz integral está compuesto por pericarpio (2%), cubierta de la semilla (testa), aleurona (5%), el germen (2-3%) y el endospermo (89-94%) (Delcour and Hosenev, 2010 citados por Arendt & Zannini, 2013). El arroz se consume mayoritariamente “blanco” es decir sin SA.

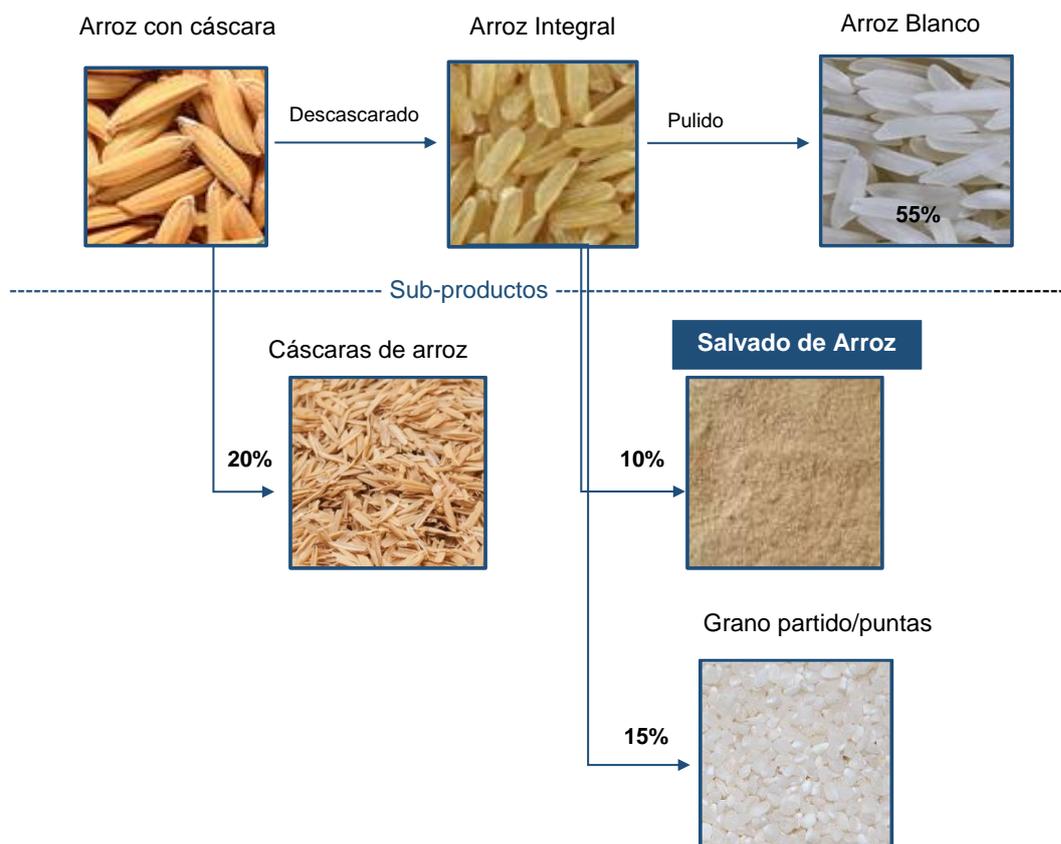


Figura 3- Procesamiento industrial del arroz en molino: subproductos y rendimiento.

El arroz integral sufre un proceso que es conocido como “blanqueamiento”, el cual consiste en una serie de “pulidos” hasta llegar a un pulido más fino que ofrece brillo a la superficie de la porción blanca comestible del grano (Arendt & Zannini, 2013). De este proceso de pulido del arroz integral para obtener “arroz blanco” es de donde surge el salvado del arroz. Las cantidades de salvado resultantes del proceso de pulido varían ampliamente según el procedimiento seguido. Es así que la composición es variable de acuerdo a la severidad del molino y muchas veces el salvado de arroz puede llegar a ser una mezcla de salvado (capa marrón) y de germen que se produce como un subproducto durante el proceso de molienda en la producción de arroz blanco a partir del grano integral (Gul *et al.*, 2015). Si bien, desde el punto de vista estrictamente botánico, el salvado de arroz se compone de tegumento, pericarpio y capa de aleurona (Figura 2), en la industria (Figura 3), al material que se desprende del proceso de pulido del arroz integral hasta llegar al arroz blanco es lo que se conoce como “salvado de arroz” y por tanto en la práctica, está compuesto por el pericarpio, la aleurona, parte del germen pulverizado y parte del endospermo (más fragmentos

de arroz blanco) (Gul *et al.*, 2015). La severidad del pulido afecta significativamente la composición química, nutricional y las propiedades fisicoquímicas del salvado de arroz resultante (Yılmaz, 2016, Lerma- García *et al.*, 2009; Rosniyana *et al.*, 2007). El grado de pulido es definido por cada molino en función de la calidad de producto que se desea vender, rendimientos y costos.

La *Figura 3*, muestra los porcentajes de las distintas fracciones que surgen del procesamiento del arroz cosechado: aproximadamente el 30 % son residuos (20 % es cáscara, y 10 % es salvado), el resto (70%), está formado por granos de arroz blanco o pulido, entero y partido o quebrado (Shih, 2003). El objetivo de la molienda es el de quitar la cáscara de arroz, el salvado y el germen, tratando de que la ruptura del endospermo sea mínima para obtener el mayor rendimiento posible en granos enteros (Arendt & Zannini, 2013). Se estima que en el mundo anualmente se producen 76 millones de toneladas de salvado de arroz (Friedman, 2013) y en particular en Uruguay, podemos estimar una producción cercana a las 130.000 toneladas al año (*Figura 3*).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

Hipotesis

A partir del reciclaje del salvado de arroz, es posible obtener nuevos ingrediente alimentarios de alto valor añadido, fibra dietética y extractos de compuestos antioxidantes que pueden utilizarse en la formulación de alimentos funcionales que contribuyan a la reducción del riesgo de padecer enfermedades crónicas no transmisibles de la población y aptos para grupos poblaciones con requerimientos nutricionales particulares tales como celíacos.

Objetivos de la tesis

Objetivo general

Obtener y caracterizar extractos bioactivos de salvado de arroz y evaluar su potencial como ingredientes en la formulación de nuevos alimentos funcionales y alimentos para grupos poblaciones con requerimientos nutricionales particulares.

Objetivos específicos

1-Extraer, identificar, cuantificar y caracterizar los compuestos bioactivos presentes en el salvado de arroz cultivado en Uruguay.

2-Evaluar el potencial de los extractos de salvado de arroz como inhibidores de los procesos de oxidación (antioxidantes).

3-Incorporar el extracto bioactivo con mayor actividad antioxidante en galletas de harina de arroz y evaluar la estabilidad de dichos compuestos y su actividad durante el proceso de elaboración.

4-Realizar el estudio *in vitro* de las bioaccesibilidad y bioactividad del alimento suplementado y/o suplementos nutricionales de salvado de arroz obtenidos.

I- OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE INGREDIENTES ALIMENTARIOS SOSTENIBLES A PARTIR DE SALVADO DE ARROZ

1-Introducción

El salvado de arroz es una excelente fuente de nutrientes conteniendo alrededor de 15-20% de aceite, 12-16% de proteínas, 23 a 28% de fibra dietética y 7 a 10% de cenizas de acuerdo a lo reportado por distintos autores (*Tabla 1*). La composición proximal del salvado de arroz depende de la variedad y las condiciones ambientales durante el cultivo así como también del procesamiento que se dé al grano para la obtención del arroz blanco (Yilmaz, 2016).

1.1-El salvado de arroz como nutriente

El contenido de proteínas del SA varía entre 10 y 17 g/100 g de acuerdo a la bibliografía revisada (*Tabla 1*). Las cuatro fracciones proteicas del arroz son la albúmina (soluble en agua), la globulina (soluble en sal), la glutelina (alcalina / soluble en ácido) y Prolamina (soluble en alcohol) (Shih, 2003). Basándose en las diferencias de solubilidad de las proteínas, Wattanasiritham *et al.* (2016), separaron a la fracción proteica del salvado de arroz en: 12,5 % de albúmina, 13,9%, globulina, 70,8 % de glutelinas y 2,9% de prolamina. Las proteínas del salvado de arroz han ganado interés en la industria de alimentos debido a su alta calidad nutricional e hipoalergenicidad que las hacen muy interesantes para ser utilizadas como ingredientes en la formulación de alimentos (Chanput *et al.* 2009). Las proteínas del salvado de arroz presentan elevado contenido de treonina, valina, lisina, histidina y triptofano mostrando una calidad nutricional superior a otras proteínas vegetales (Han *et al.*, 2015). Recientemente, aumenta el interés en las propiedades funcionales de las proteínas del salvado de arroz dado que contienen en su estructura péptidos bioactivos encriptados que poseen actividades antioxidantes e inhibidoras de la

enzima convertidora de la angiotensina I (ACE); y por tanto se le atribuyen propiedades antihipertensivas (Wang *et al.*, 2017).

Los polisacáridos de salvado de arroz son compuestos valiosos con actividades biológicas de gran interés. En el trabajo de Liu *et al.* (2017), se obtuvieron extractos acuosos de SA desgrasado sometidos a fermentación fúngica. Seguidamente el producto de la fermentación se aisló (por precipitación con etanol) y se desproteinizó. El análisis por cromatografía gaseosa del producto indicó que el salvado de arroz está compuesto por glucosa, arabinosa, galactosa, manosa y xilosa en una relación molar de 9:5:8:2:5 respectivamente. La precipitación de xilanos ha sido descrita también por Palaniappan *et al.* (2017), estos autores realizaron extracciones a temperatura ambiente ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$). La hidrólisis y derivatización de extractos acuosos extraídos de salvado de arroz revelaron el predominio de xilosa seguido por arabinosa y glucosa, con relaciones molares de ara: xilo de 0,55 y 0,68, respectivamente.

El SA tiene de 17 a 29 g/100g de lípidos (*Tabla 1*). De acuerdo a Yoshida *et al.* (2011), los lípidos del SA comprenden principalmente triacilgliceroles (84,9-86,0% en peso), ácidos grasos libres (4,2-4,6% en peso) y fosfolípidos (6,5-6,7% en peso). En particular, se destaca en esta fracción la presencia de orizanoles y tocoferoles que le confieren gran capacidad antioxidante (Butsat & Siriamornpun, 2010). La concentración de estos antioxidantes lipídicos estimada por Chotimarkorn, *et al.* (2008), indica contenidos de 0.56–1.08 mg/g SA de orizanol, 0.35–0.77 mg/g SA de tocofenoles y 0.22–0.46 mg/g SA en tocotrienoles. Todos ellos contienen muy alto potencial para ser utilizados como antioxidante naturales en la industria de alimentos.

El contenido de fibra dietética total del SA oscila entre 6 y 29 g/100g de SA (*Tabla1*). La fracción de fibra dietética del salvado de arroz se compone principalmente de celulosa, lignina y hemicelulosa, siendo mayoritariamente rica en compuestos insolubles (Chinma *et al.*, 2015; Elleuch *et al.*, 2011). El contenido de fibra dietética soluble del salvado de arroz varía de 1,02 y 2,25 g/100g (Huang & Lai, 2016). La fibra dietética del salvado de arroz es uno de los componentes de interés en la presente investigación, y por ello se desarrollará en mayor detalle en el apartado 1.3 de este documento.

Tabla 1-Composición proximal del salvado de arroz.(los valores se reportan tal y como se presentan en las respectivas referencias)

Humedad (g/100g)	MS (g/100g)	Proteínas totales (g/100g)	Lípidos totales (g/100)	Cenizas (g/100g)	Fibra dietética total (g/100g)	Carbohidratos digeribles (g/100g)	Carbohidratos totales (g/100g)	Referencias
11,19±0,03		14,6±0,21	16,62±0,05	7,41±0,01	27,04±0,30	26,16*		Abdul-Hamid &Luan, 2000
12,12±0,25	–	12,32±0,24	20,30±0,92	8,73±0,08	28,60±0,32	17,92±0,26	–	Choi et al., 2011
8,41±0,20	–	16,61±0,20	17,87±0,30	8,13±0,04	24,15	–	–	Faria et al., 2012
–	85,8±0,78	10,53±0,55	16,8±1,6	10,76±1,05	6,3±0,5	–	–	Singh et al., 2013
11,23±0,22	–	14,63±0,22	21,60±0,34	11,84±0,05	–	–	40,70±0,20	Gopinger et al., 2015
12,12±0,25	–	12,32±0,24	20,31±0,92	8,73±0,08	28,60±0,32	–	17,92±0,26	Gul et al., 2015
8,58±0,69	–	12,45±0,86	26,59±1,38	8,57±0,57	–	–	43,73±0,80	Wang et al., 2015
12,8± 0,40	–	17,40±0,92	21,42± 1,91	6,77±0,30	26,68± 0,58	14,92±3,09	–	Mahua 2015

- *Los autores estiman los carbohidratos digeribles por diferencia

El contenido de minerales en el salvado de arroz varía entre 7 y 12 g/100g SA (*Tabla 1*). Las cenizas se concentran en las porciones exteriores del cariopside, con una distribución del 61% en salvado, 23,7% en el endospermo externo, 3,7% en el endosperma medio y 11,6% en el endosperma central (Lamberts *et al.*, 2007, citados por Amagliani *et al.*, 2017). Esto hace al salvado de arroz una fuente de minerales importante para la nutrición humana. Amagliani *et al.* (2017), reportan la composición en minerales y elementos traza en SA (mg/100g peso fresco) como sigue: Ca (43.3±0.30), Cl (82.0 ±1.00), K (1500 ±10.0), Mg (768 ±16.0), Na (12.4±0.05), P (1590±10.0), Cu (0.96±0.01), Fe (7.63±0.04), Mn (21.1±0.15) y Zn (6.25±0.04).

El análisis de la composición proximal del SA, permite afirmar que este residuo industrial se destaca principalmente por su alto contenido en carbohidratos que junto al gran aporte de fibra dietética, a los lípidos y los minerales, justifican la búsqueda de estrategias innovadoras que permitan su revalorización para la alimentación humana sin que se generen nuevos residuos en el proceso.

1.2- El salvado de arroz como fuente de antioxidantes

Los “antioxidantes”, son sustancias que neutralizan las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, producidas por las células en condiciones de estrés oxidativo (Prior, 2014). El “estrés oxidativo” resulta del desbalance existente entre la formación de radicales libres y la capacidad de neutralizarlos por nuestro organismo (Arab, *et al.*, 2011). Los “radicales libres”son definidos como moléculas que no están equilibradas en electrones por lo que son altamente inestables y reactivos. Algunos ejemplos de radicales libres derivados del oxígeno incluyen: superóxido (O_2^-), hidroxilo (OH^-), hidroxiperoxilo (HOO^-), peróxido (ROO^-) y alcóxido (RO^-). Bajo la situación de estrés oxidativo o glicoxidación, las especies reactivas del oxígeno (EROs) y los radicales libres, permanecen activos atacando lípidos de membranas, proteínas nucleares, membranas celulares, enzimas y material genético (ADN y ARN) (Prior, 2014). Como consecuencia de esta descontrolada capacidad de las EROs se desencadenan enfermedades crónicas tales como cáncer, enfermedades coronarias y enfermedades degenerativas (Havsteen, 2002).

A la defensa antioxidante natural del organismo humano (sistema enzimático y no enzimático) se le suma el aporte dietario de antioxidantes naturales tales como: el ácido ascórbico, los polifenoles, los tocoferoles y los carotenoides. Por ésta razón es de gran interés la búsqueda de compuestos antioxidantes de fuentes naturales que permitan aumentar el sistema natural de defensa, contribuyendo a la prevención de ocurrencia de enfermedades crónicas no transmisibles. En este contexto el salvado de arroz ha sido reconocido como una fuente importante de antioxidantes tales como: gamma orizanol, tocoferoles y trienoles (Arab, *et al.* 2011; Lai, *et al.* 2009; Chotimarkorn, *et al.* 2008; Renuka & Arumughan, 2007, Iqbal *et al.*, 2005; Xu *et al.* 2001) compuestos fenólicos y ácidos fenólicos (Butsat & Siriamornpun, 2010).

El presente trabajo de tesis se centra en los compuestos polifenólicos libres y ligados a la fibra dietética por el carácter innovador. El salvado de arroz, ya es reconocido como una de las principales fuentes de antioxidantes liposolubles asociados a la fracción lipídica (Gul *et. al.*, 2015; Lerma-García *et al.* 2009).

La concentración en polifenoles en el salvado de arroz, así como también, la capacidad antioxidante depende de las condiciones ambientales de crecimiento del cultivo (Chotimarkorn *et al.*, 2008; Butsat & Siriamornpun, 2010) e identificación genética (Lema-García *et al.*, 2009). Iqbal *et al.* 2005, indican que la irrigación del cultivo como uno de los factores que afecta significativamente el potencial antioxidante del salvado de arroz.

Hasta la fecha no se ha reportado la caracterización, ni cuantificación de los compuestos fenólicos del SA uruguayo y su potencial capacidad antioxidante. Se espera que el presente trabajo de tesis contribuya al conocimiento de la calidad antioxidante de uno nuestros principales residuos agroindustriales.

1.2.1-Compuestos polifenólicos presentes en el salvado de arroz

Los polifenoles son un grupo muy grande de metabolitos secundarios de las plantas que poseen una estructura típica con anillos aromáticos y dobles enlaces conjugados que le permiten actuar como antioxidantes (Brewer, 2011). Los granos enteros son

una de las fuentes más importantes de polifenoles, los que son reconocidos como antioxidantes naturales (Manach, 2004, Adom & Liu, 2002) En el grano de arroz, las concentraciones más altas en compuestos fenólicos se han reportado en la capa de aleurona, aunque también se encuentran en el embrión y cubierta de la semilla (Shao *et al.*, 2014; Butsat & Siriamornpun, 2010).

Los flavonoides se caracterizan por presentar un bajo peso molecular y compartir un esqueleto común de definilpiranos (C₆-C₃-C₆), compuesto por dos anillos aromáticos unidos a través de una cadena central de 3 carbonos y 4 grupos carbonilos. Poseen varios grupos hidroxilo unidos a su estructura de anillos los que le confieren la capacidad de neutralizar radicales libres al donar átomos de hidrógeno activo (Du, *et al.*, 2016). Los trabajos de Shao *et al.*, (2014) no detectaron flavonoides en salvado de arroz blanco sugiriendo que la presencia de flavonoides en el salvado, está asociada al color del grano del cual proviene. Los salvados provenientes de granos de arroz coloreados contienen mucho más compuestos bioactivos que el salvado proveniente de salvado de grano blanco (Friedman, 2013). Muntana & Prasong (2010), encontraron que los extractos de salvado de arroz de grano blanco, contienen menos polifenoles totales y capacidad antioxidante que los salvados de arroz negro y rojo, sin embargo, no se descarta su potencial como fuente de antioxidantes del SA blanco.

En trabajos con salvado de arroz de grano blanco, se ha identificado kaemferol (Wanyo, *et al.*, 2014; Reza *et al.*, 2015), rutina (Reza *et al.*, 2015), quercetina (Liu *et al.*, 2017; Ghasemzadeh *et al.* 2015; Reza *et al.*, 2015), epicatequina (Liu *et al.*, 2017, Reza *et al.*, 2015) y apigenina (Ghasemzadeh *et al.* 2015).

Los ácidos fenólicos se clasifican en 2 grupos: los derivados del ácido benzoico y los derivados del ácido cinámico (*Figura 1*).

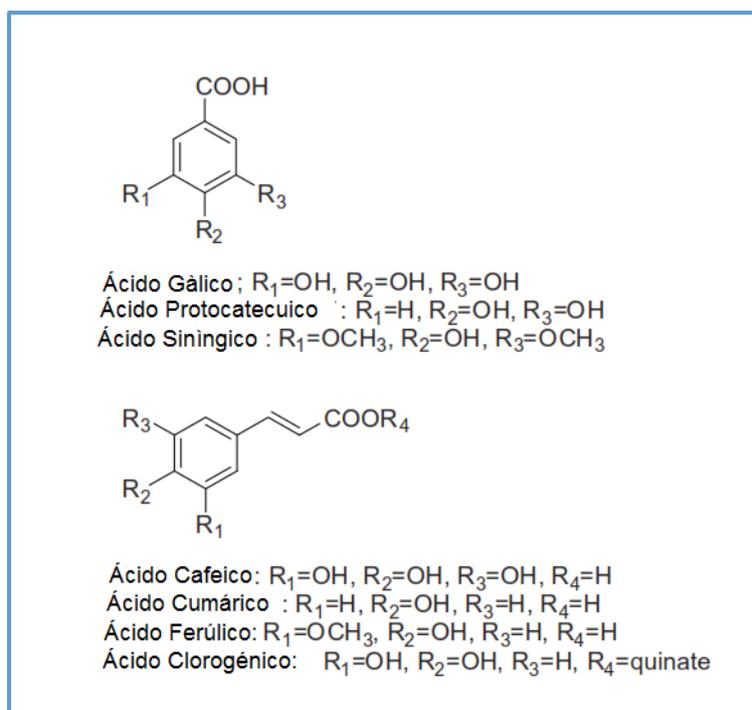


Figura 1- Estructuras químicas de compuestos fenólicos que componen el salvado de arroz (Adaptado de Ti *et al.* 2014).

Los ácidos hidroxicinámicos son más comunes que los ácidos hidroxibenzoicos y consisten básicamente en p-cumárico, cafeíco, ferúlico, y ácidos sinápico (Manach, 2004). En grano de arroz integro, éstos ácidos están presentes en dos formas: i) forma soluble, que incluye las formas libre en el citoplasma celular y las formas conjugadas, las cuales pueden ser extraídas con diferentes solventes tales como, agua, metanol, etanol y acetona y ii) en forma insoluble o “ácidos fenólicos ligados”, los cuales se encuentran covalentemente unidos a la pared celular de la planta (Shao & Bao, 2015. Ti *et al.*, 2014; Adom & Lui, 2002).

Ti *et al.* (2014), analizaron el contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en SA proveniente de 5 cultivares de arroz de la variedad índica del sur de China. Ellos encontraron que ácido cafeíco, protocatecuico y clorogénico se encuentran en forma libre en el SA, mientras que el ácido gálico, ferúlico, cumárico y siringico se encuentran en ambas formas libre y ligada a la pared celular. Estos autores reportan un contenido de ácido clorogénico del orden 7,4 a 9,3 $\mu\text{g/g}$ en forma libre. Para el ácido ferúlico en cambio, encontraron que la mayor concentración se

encuentra ligada (1243,0 µg/g) a la pared celular del SA mientras que solamente 71,1 µg/g se encuentra en forma libre.

Estudios realizados por Wang *et al.* (2015), sugieren que la capacidad antioxidante del salvado de arroz se deriva de la combinación de fitoquímicos presentes y no de un solo compuesto. Sin embargo, la mayoría de los estudios identifican al ácido ferúlico (AF) como principal compuesto del salvado de arroz, encontrándose principalmente, esterificado con arabinosilanos y hemicelulosas en la capa de aleurona y el pericarpio (Wang, 2015, Ti *et al.* 2014, Kumar & Pruthi, 2014, Butsat & Siriamornpun, 2010, Manach *et al.*, 2004, Adom, *et al.* 2002). El AF se caracteriza por ser, insoluble en agua a temperatura ambiente pero es soluble en agua caliente, acetato de etilo, etanol y éter etílico y se ha encontrado que el uso de etanol (60%) es adecuado para la exitosa extracción de dicho ácido (Guo *et al.*, 2003 citado por Kumar & Pruthi, 2014). Al AF además se le atribuyen múltiples beneficios para la salud entre como antioxidante, actividad hipolipemiente, antiinflamatorio, antidiabético, entre otros y aplicaciones industriales como conservante alimentario (Kumar & Pruthi, 2014). Ghasemzadeh *et al.* (2015), encontraron que en extractos etanólicos de SA (50:50 v/v) además de AF (12.28 mg/100 g peso seco), contienen similares aportes de ácido gálico (AG) (11.56 mg/100 g peso seco) y ácido clorogénico (AC) (11.12 mg/100 g de peso seco).

A partir de las referencias expuestas en este apartado, se espera obtener extractos de SA enriquecidos principalmente en ácidos fenólicos como ferúlico, clorogénico y gálico que se encuentran en forma libre y son potencialmente extraíbles con solventes orgánicos. En una segunda etapa de este mismo capítulo, se buscará una alternativa de uso al residuo resultante de la generación de extractos antioxidantes innovando en una alternativa para el reciclaje completo del salvado de arroz.

Para poder escoger las condiciones necesarias para la obtención de extractos antioxidantes que mejor se ajusten a la producción industrial, a continuación se revisan brevemente los factores de procesamiento que influyen en la composición de los extractos obtenidos.

1.2.2- Efecto de las condiciones de extracción y métodos de evaluación sobre composición y capacidad antioxidante de los extractos polifenólicos.

La capacidad antioxidante de los diferentes extractos de salvado de arroz reportados en la bibliografía además de ser influenciados por factores genéticos y ambientales como ya fuera mencionado, también depende del tipo de solvente utilizado (Ghasemzadeh et. al, 2015; Serpen et al. 2012; Lai, et al. 2009), el tiempo de extracción, la temperatura, el pH entre otros factores así como también de las características físicas de la muestra (Arab et al., 2011, Garcia- Salas et al., 2010, Lai, et al. 2009, Naczk & Shahidi, 2006).

1.2.2.1- Elección del método de extracción

De acuerdo a Chemat et al. (2012), la “extracción verde se basa en el descubrimiento y diseño de procesos de extracción que reducen el consumo de energía, permiten el uso de disolventes alternativos y productos naturales renovables, que aseguren un extracto y producto de alta calidad y seguridad”. Estos autores han identificado tres soluciones principales para diseñar y demostrar la extracción verde a escala de laboratorio e industrial: (1) mejora y optimización de los procesos existentes; (2) usar equipo no sofisticados; y (3) la innovación en procesos y procedimientos, pero también en el descubrimiento de disolventes alternativos.

Actualmente, la tendencia es hacia la búsqueda de técnicas con mayor poder extractivo como lo son microondas, fluidos supercríticos, ultrasonido, entre otras, que permitan optimizar los rendimientos, acortar los tiempos de extracción. Estos procedimientos permiten disminuir el consumo de disolventes que perjudican el medio ambiente (Chemat et al., 2012, Wang & Weller, 2006). Sin embargo, en general implican altos costos de inversión inicial. Por tal motivo, dichas técnicas no siempre pueden ser asumidos por las industrias y/o laboratorios, es por ello que los métodos tradicionales continúan dominando, debido a la simplicidad y bajo costo de instalación (Lui et al., 2017; Dent et al., 2013). Además, el proceso tradicional de extracción puede ser ampliamente mejorado por la selección de disolventes adecuados, temperatura óptima y tiempos de extracción (Dent, et al., 2013).

Los compuestos fenólicos en general se encuentran en estrecha interacción con otros componentes vegetales tales como carbohidratos y proteínas formando complejos insolubles (Garcia-Salas, *et al.* 2010). Los métodos de extracción para compuestos fenólicos simples (ácidos benzoicos, aldehídos benzoicos, ácidos cinámicos y catequinas) a partir de materiales sólidos o semisólidos como lo es el caso del salvado de arroz, se han centrado en la maceración y utilizando disolventes orgánicos (Garcia-Salas, *et al.* 2010). Básicamente, la materia prima pre-tratada se expone a diferentes disolventes, los cuales absorben compuestos de interés (Starmans & Nijhuis, 1996). Por lo general, luego de la maceración las muestras se centrifugan y se filtran para eliminar los residuos sólidos, y el extracto puede utilizarse como aditivo, suplemento alimenticio o estar destinado a la preparación de alimentos funcionales dependiendo de la naturaleza del solvente utilizado (Starmans & Nijhuis, 1996). Como ya fue mencionado, en el SA los compuestos fenólicos, se encuentran fuertemente ligados a arabinoxilanos en la pared celular de la capa de aleurona y por lo tanto, cuando se realizan extractos por maceración simple, la extracción no es completa (Butsat & Siriamornpun, 2010).

Un enfoque alternativo a los métodos tradicionales para la obtención de fenoles a partir de salvado de arroz es la extracción asistida por enzimas (EAE). Este método es de bajo costo, es respetuoso con el medio ambiente (Liu *et al.*, 2017), y es principalmente dependiente de la capacidad de las enzimas para hidrolizar los componentes de la pared celular e interrumpir la complejidad estructural y facilitando la liberación de compuesto de interés en la solución (Marathe *et al.*, 2017). Las enzimas más utilizadas para la extracción de compuestos bioactivos son celulasas, hemicelulasas y pectinasas. Las principales fuentes de enzimas son bacterias y hongos aunque también pueden ser de origen animal o vegetal (Marathe *et al.*, 2017). Los estudios de Wanyo *et al.* (2014), usando celulasas como único tratamiento del SA lograron aumentar la cantidad de ácidos fenólicos libres, tales como ácido protocateicuico y ácido vanílico. Sin embargo, el tratamiento es poco eficiente dado que aumentan los ácidos fenólicos libres pero no el contenido total de compuestos fenólicos. Lim & Kim, (2016) trabajando sobre salvado de arroz evaluando distintas carbohidrolasas comerciales (entre las que se encuentra la enzima Celluclast ® utilizada en el presente trabajo de tesis) observaron aumentos significativos, del orden de 1,5 a 3 veces, en el contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante

medida por los métodos DPPH y FRAP, respectivamente tras el tratamiento enzimático. Los estudios más recientes (Liu *et al.*, 2017), realizaron la hidrólisis de salvado de arroz utilizando una mezcla de enzimas compuesta por 0,5% de glucoamilasa, 1,5% de proteasa y 1,5% de celulasa, el tratamiento con este complejo de enzimas, provoca la hidrólisis del almidón, proteínas y fibra dietética del salvado de arroz interrumpiendo las interacciones entre los compuestos fenólicos y los componentes de la pared celular y; en consecuencia, favoreciendo la liberación tanto de los compuestos libres como conjugados.

1.2.2.2- Efecto del tipo de solvente utilizado en la extracción

La solubilidad de los compuestos fenólicos se ve afectada por la polaridad del (los) disolvente (s) utilizado (s). Por lo tanto, es muy difícil desarrollar un procedimiento único de extracción adecuado que a un mismo tiempo logre la extracción de todos los compuestos fenólicos presentes (Garcia-Salas, *et al.* 2010). Algunos de los disolventes más utilizados en los procedimientos de extracción son hexano, éter, cloroformo, acetonitrilo, benceno y etanol. Estos disolventes comúnmente se mezclan en diferentes proporciones con agua (Gil-Chavez *et al.*, 2013). Sin embargo, varios disolventes deben ser usados con cuidado ya que son tóxicos para los seres humanos y peligrosos para el medio ambiente (Gil-Chavez *et al.*, 2013). En general el rendimiento de extracción de polifenoles a partir de salvado de arroz sigue el siguiente orden decreciente: EtOAc > MeOH > hexano (Arab *et al.*, 2011; Lai *et al.* 2009). Si bien, utilizando etanol no se obtienen los mejores rendimientos y se trata de un solvente inflamable y potencialmente explosivo, se utiliza en gran escala en la industria, porque es fácilmente disponible en alta pureza, tiene un precio bajo y es completamente biodegradable (Chemat *et al.*, 2012). Por otra parte, el etanol tiene la ventaja de ser reutilizable, no es tóxico y los extractos pueden ser utilizados como ingredientes en la industria de alimentos (Chew *et al.* 2011, citados por Ororian & Escriche, 2015) y por tanto, es uno de los solventes reconocidos dentro de la "extracción verde" (Chemat *et al.*, 2012). A su vez, la naturaleza polar del agua también hace posible su uso como disolvente de extracción en el campo de los productos naturales solubles en agua tales como proteínas, azúcares, ácidos orgánicos y sustancias inorgánicas. Así, a temperatura y presión ambiente, el agua tiene una constante dieléctrica de 80, lo que lo convierte en un disolvente

extremadamente polar (Chemat *et al.*, 2012). Si bien, la solubilidad de los compuestos fenólicos aumenta con el aumento de la polaridad del disolvente utilizado (Naczek & Shahidi, 2006), el rendimiento en la recuperación de polifenoles es generalmente más alta en disolventes orgánicos polares que en agua (Hwang & Thi, 2014, Lapornik *et al.*, 2005).

Los sistemas binarios de solventes (por ej, agua: alcohol) son más eficientes en la extracción de compuestos polifenólicos que los sistemas mono-solvente, debido a las diferentes polaridades de los compuestos bioactivos (Dent, *et al.*, 2013). Los estudios de Ghasemzadeh *et al.* (2015), encontraron que la maceración de SA en una mezcla etanol: agua (50:50) es más eficiente en la extracción de polifenoles y los extractos obtenidos presentan mayor capacidad antioxidante que los que se producen por maceración con etanol. Esto se explica en base a sus características físico-químicas, los polifenoles son solubles en compuestos polares siendo la mezcla agua: etanol, más polar que la maceración única en etanol. Además la mezcla de estos solventes presenta menos viscosidad debido a la presencia de agua, lo que podría favorecer una mejor transferencia de masa (Ghasemzadeh *et al.* 2015). En un estudio similar a la presente tesis, donde se optimizó por metodología de superficie de respuesta, la capacidad antioxidante y contenido de polifenoles totales en salvado de arroz con extracción asistida por ultrasonido, teniendo como variables independientes el contenido en etanol, temperatura (°C) y tiempo de extracción (min), se encontró que el porcentaje de etanol fue la variable más significativa para todas las respuestas (Tabaraki & Nateghi, 2011). El contenido de polifenoles totales reportados para salvado de arroz obtenidos por maceración con diferentes combinaciones de solventes (metanol, etanol, acetato de etilo puros o en mezclas con agua) varió de 2,2 a 12,4 mgGAE/g (Chen *et al.* 2016, Arab, *et. al.*, 2011, Rao *et al.* 2010, Zhang, *et al.* 2010, Sirithon & Siriamornpun, 2010, Lai, *et. al.*, 2009, Chotimarkorn *et al.*, 2008).

1.2.2.3-Efecto de la temperatura de extracción

De acuerdo a los estudios de Tabaraki & Nateghi (2011), el contenido de compuestos polifenólicos totales extraídos empleando una mezcla (etanol: agua) a partir de salvado de arroz se incrementó rápidamente con el aumento de temperatura hasta los 54 °C y seguidamente ocurrió una ligera disminución. El calentamiento moderado

del salvado de arroz puede debilitar la estructura del tejido vegetal y afectar la integridad de la pared celular facilitando la liberación de polifenoles.

1.2.2.4-Efecto del tiempo de extracción

Los tiempos de extracción más largos y utilizando agua como solución extractora aumentan las posibilidades de oxidación de los compuestos fenólicos, lo que se explica por la mayor actividad de la polifenoloxidasas, mientras que si se utiliza metanol o etanol la enzima se inactiva preservándose la actividad de los polifenoles (Lapornik *et al.*, 2005). De acuerdo a Wang *et al.*, (2008) optimizando la extracción por ultrasonido de compuestos fenólicos en salvado de trigo, reportan al factor tiempo como el parámetro más significativo para el proceso de extracción obteniendo los valores máximos en 25 min (con 64% de etanol y 60°C).

El tiempo de extracción reportado para la extracción de salvado de arroz fue de 3 a 16 horas (Chen *et al.* 2016, Arab, *et. al.*, 2011, Rao *et al.* 2010, Zhang, *et al.* 2010, Sirithon & Siriamornpun, 2010, Lai, *et. al.*, 2009, Chotimarkorn *et al.*, 2008).

1.2.2.5- Método de determinación de la capacidad antioxidante

Los antioxidantes pueden desactivar radicales libres básicamente por medio de dos mecanismos de acción: 1- neutralización de radicales libres por transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y 2-por transferencia simple de electrones (SET o ET) para reducir compuestos tales como metales, carbonilos y radicales (Prior *et al.*, 2014). Estos mecanismos pueden tener lugar simultáneamente y el mecanismo dominante en un sistema dado, estará determinado por la estructura y propiedades del antioxidante, solubilidad, coeficiente de partición y el sistema solvente. La energía de disociación del enlace (BDE) y el potencial de ionización (IP) son los factores más importantes para determinar los mecanismos y la eficacia de los antioxidantes (Wright *et al.*, citados por Prior *et al.*, 2005). Existen varios ensayos para determinar la capacidad antioxidante, basados en los métodos anteriores (*Tabla 2*). La mayoría de los métodos basados en HAT aplican un esquema de reacción competitiva, en el cual un antioxidante y un sustrato compiten por radicales (Prior, 2014, Huang *et al.*, 2005). Los ensayos basados en SET (*Tabla 2*) miden la capacidad de un antioxidante en la reducción de un oxidante, el cual cambia de color cuando se reduce. El grado de

cambio de color es relacionado con la concentración del antioxidante en la muestra. (Prior, 2014).

Tabla 2-Métodos para determinar la capacidad antioxidante *in vitro* (adaptado de Prior, 2014).

Ensayos involucrando transferencia de átomos de hidrógeno (HAT)	Ensayos involucrando transferencia de electrones (SET)
ORAC	TEAC
TRAP	FRAP
Ensayo "crocin bleaching" (CBA)	DPPH
IOU(absorción de oxígeno inhibida)	CUPRAC
Inhibición de la oxidación de ácido linolénico	Fenoles totales Folin-Ciocalteu
Inhibición de la oxidación inducida de LDL	ABTS

En el presente trabajo de tesis, la capacidad antioxidante de los extractos será evaluada por los métodos ORAC (HAT) y ABTS^{•+} (SET). La capacidad de absorción de radicales de oxígeno o popularmente conocido como método "ORAC" del inglés "Oxygen Radical Absorbance Capacity", tiene como principal ventaja para su elección que los radicales peroxilo utilizados predominan en la oxidación de lípidos en alimentos y sistemas biológicos bajo condiciones fisiológicas (Shahidia & Zhong, 2015). Por lo tanto, los valores ORAC se consideran de relevancia biológica como referencia para la eficacia antioxidante *in vivo* (Schaich *et al.*, 2015; Shahidia & Zhong, 2015, Prior, 2014). El método es sensible al pH, temperatura, pO₂ y lleva mucho tiempo la cuantificación de resultados (Schaich & Xie, 2015, Prior, 2014).

El método de ABTS [2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)] es un método SET, que se basa en la captura del radical catiónico ABTS^{•+} por parte de los antioxidantes presentes en la muestra. Este radical es de color verde con máximos de absorbancia a 645, 734 y 815 nm (Re *et al.*, 1999). El método mide la decoloración de la solución conteniendo el radical libre y la muestra, debido a la captura del radical. Los antioxidantes pueden neutralizar el catión radical ABTS^{•+} ya sea por reducción directa vía donación de electrones o por radicales Quenching mediante donación de átomos de hidrógeno, y el equilibrio de estos dos mecanismos se determina generalmente por la estructura antioxidante y el pH del medio (Prior *et al.* 2005). Por

lo tanto, aunque el ensayo de ABTS, suele clasificarse como un método basado en un mecanismo SET el mecanismo HAT también se aplica (Shahidia & Zhong, 2015).

Es un método muy sencillo, de bajo costo, la reacción es rápida, no requiere equipos sofisticados y es estable frente a los cambios de pH (Shahidia & Zhong, 2015). Las principales desventajas de este método son: requiere un paso extra generar el radical libre de la sal de ABTS (14 horas) (Schaich & Xie, 2015; Shahidia & Zhong, 2015); el radical generado no es estable por largos períodos de tiempo y es difícil determinar el punto final de la reacción (Shahidia & Zhong, 2015); no es un método estandarizado.

Además de lo anteriormente expuesto, se ha demostrado que existe un efecto de interferencia del disolvente utilizado para la extracción de los antioxidantes de los alimentos. En particular, los extractos orgánicos acuosos que suelen utilizarse para extraer los antioxidantes de los alimentos, no sólo contienen antioxidantes sino que también “arrastran” otros componentes que se solubilizan e interfieren en los ensayos. De acuerdo a los estudios de Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2006, el ranking de sensibilidad a la interferencia del efecto del solvente y componentes del alimentos es el siguiente: ORAC > ABTS > DPPH > FRAP. Ciertos constituyentes de alimentos no antioxidantes como algunos aminoácidos y los ácidos urónicos, pueden producir un resultado positivo en los ensayos de capacidad antioxidante. Estos componentes pueden interferir con los polifenoles presentes en la matriz alimenticia produciendo un valor de capacidad antioxidante diferente que el que se produciría con los polifenoles solos. En general la principal limitante de los ensayos de capacidad antioxidante *in vitro* es que, aunque fueron diseñados para identificar los antioxidantes se espera que proporcione mayores efectos protectores contra radicales libres *in vivo*, el radical en “los tubos de ensayo” probablemente no ocurre *in vivo* (Schaich & Xie, 2015). Es por esto que recientemente el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (U.S. Department of Agriculture citado por Schaich & Xie, 2015) retiró las *Tablas* de valores de ORAC de muchos alimentos de su página web.

Por otra parte, Serpen *et al.* (2007), demostraron que los antioxidantes unidos a la pared celular tienen una alta capacidad antioxidante pero son difíciles de extraer y de evaluar por los métodos tradicionales. Esto es porque con los métodos tradicionales

antes mencionados no se considera a los antioxidantes presentes en la fracción insoluble del producto alimenticio. Para superar este problema, Gökmen *et al.* (2009) elaboró un método directo llamado QUENCHER (sigla en inglés para Quick, Easy, New, Cheap and Reproducible) para evaluar la capacidad antioxidante de los alimentos evitando el procedimiento de extracción previa. Esto permite investigar la capacidad antioxidante de todo material antioxidante.

A pesar de las limitaciones que presentan los métodos de evaluación *in vitro* de la capacidad antioxidante, estos siguen siendo la primera herramienta a nivel de laboratorio para el escrutinio de los bioactivos enriquecidos en fitoquímicos. Los efectos *in vitro* deben complementarse utilizando líneas celulares y modelos de experimentación animal e intervención en humanos, para complementar las evidencias descriptivas que justifiquen su bioactividad.

A partir de estos antecedentes bibliográficos se decidió obtener extractos antioxidantes de salvado de arroz por maceración simple ya que es un método sencillo, económico y fácil de escalar a nivel de la industria en Uruguay. Se ensayará la obtención de extractos por extracción asistida por enzima (EAE) y el uso de solventes “verdes” (agua, etanol y su combinación). Dado la influencia de la temperatura y el tiempo de extracción sobre el contenido y capacidad antioxidantes se evaluó la influencia de los parámetros en las características de los extractos de salvado de arroz. Se ensayaron temperaturas en un rango de 0 a 50°C y tiempos de extracción compatibles a un proceso industrial de entre 30 a 180 min.

1.3- Compuestos fenólicos no extraíbles asociados a la fibra dietética del salvado de arroz

El término fibra dietética es aceptado como una mezcla compleja de polisacáridos no digeribles (celulosa, hemicelulosa, oligosacáridos, pectinas, gomas), ceras y lignina, encontrados en la paredes de las plantas (Tosha & Yada, 2010; Elleuch, *et al.* 2011).

Formalmente, la Asociación Americana de Químicos de Cereales (AACC, 2001), define a la fibra dietética como sigue: la fibra dietética incluye las partes comestibles de las plantas o carbohidratos análogos que son resistentes a la digestión y absorción en el intestino delgado humano con fermentación completa o parcial en el intestino grueso. La AACC (2001) divide a sus constituyentes en 3 categorías como sigue: i- Polisacáridos no amiláceos y oligosacáridos no digeribles: celulosa, hemicelulosa, pectinas, beta-glucanos, gomas, mucílagos, fructanos, inulina y oligofruktosas/fructooligosacáridos; ii-Carbohidratos análogos: almidón resistente, fructooligosacáridos, galactooligosacáridos, dextrinas no digeribles, componentes de carbohidratos modificados o sintéticos, celulosas modificadas (metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa) y polidextrosa; iii- Lignina y otras sustancias asociadas: lignina, ceras, fitato, cutina y tanino. Según la AACC, las fibras dietéticas promueven beneficios fisiológicos incluyendo laxación, atenuación del colesterol en sangre y atenuación de la glucosa en sangre. Esta definición es la primera que incluye a las sustancias que están “asociadas a la fibra dietética validando la relación existente entre la fibra dietética y los compuestos fenólicos como un todo”. La lignina no es un polisacárido, sino que se trata de un polímero tridimensional de fenoles de base denominados monolignoles. Estos monolignoles son derivados de los ácidos p-cumárico, ferúlico y sinápico y pueden establecer diferentes tipos de enlaces entre sí, además de ligar otro tipo de moléculas, complejizando la estructura (Sarni-Manchado & Cheynier, 2006).

Los componentes antioxidantes que son insolubles en agua; así como, en otros disolventes son considerados como "componente polimérico insoluble" y contribuyen de manera significativa a la capacidad antioxidante total de muchos alimentos, que a menudo se subestimaba dada su pobre extractibilidad (Gökmen *et al.*, 2009). “La fibra dietética antioxidante se define como el complejo entre los compuestos fenólicos y los polisacáridos de la pared celular” (Saura-Calixto, 1998).

Los granos de cereales son reconocidos como una de las principales fuentes de fibra para la nutrición humana. La fibra de salvado de arroz se compone en gran parte de polisacáridos no celulósicos (24%), celulosa (10,3%) y lignina (10,7%) (Chinma, 2015; Elleuch *et al.*, 2011). La *Oryza sativa*, por ser una gramínea monocotiledónea posee una pared celular del Tipo II que a diferencia de la Tipo I, son pobres en pectina y

proteínas estructurales, contienen mezclas de β -D-glucanos con puentes de ácidos ferúlicos que entrecruzan las cadenas de xilano, (hidroxicinamatos) (Carpita, 1996), lo que la hace un interesante vehículo de estos compuestos de interés (Daou y Zhang, 2011).

1.3.1- Bioaccesibilidad de los compuestos antioxidantes presentes en la fibra dietética del salvado de arroz

Como ya fue mencionado en apartado 1.1, gran parte de los compuestos fenólicos presentes en el salvado de arroz se extraen generalmente empleando distintos solventes. Los polifenoles solubles en disolventes son comúnmente reconocidos como polifenoles extraíbles y los polifenoles insolubles como no extraíbles e hidrolizables (Vitali *et al.* 2009). Sin embargo, la cantidad cuantificada por estos métodos difiere de las cantidades que normalmente son absorbidos bajo condiciones fisiológicas cuando son ingeridos y pasados a través del tracto digestivo (Lamperi *et al.* citafo por González-Aguilar, *et al.*, 2017).

El término “bioaccesibilidad” se define como la cantidad de un constituyente alimenticio que está presente en el intestino, como consecuencia de la liberación desde de la matriz de un alimento (Saura-Calixto *et. al* 2007). La biodisponibilidad puede definirse como la fracción de dicho nutriente (antioxidante) que se digiere, absorbe y utiliza en el metabolismo normal del organismo (Hedren *et al.*, 2002 citado por Palafox *et al.*, 2011). El término biodisponibilidad es estrictamente dependiente de la bioaccesibilidad (Palafox *et al.*, 2011). La mayoría de los estudios sobre la biodisponibilidad de antioxidantes se centran en alimentos y bebidas de los cuales estos se encuentran pncipalmente en forma libre. Hay evidencias que indican que la microestructura de los alimentos afecta la bioaccesibilidad y la biodisponibilidad de varios nutrientes, refiriéndose principalmente a los antioxidantes (Parada & Aguilera, 2007). De acuerdo a Gökmen *et al.*, (2009), el estado estado físico y químico en el que se encuentran los antioxidantes en los alimentos se pueden clasificar en las siguientes categorías (*Figura 5*): i- Compuestos de bajo peso molecular, que están libres de Interacción química o física con otras macromoléculas y que pueden ser fácilmente extraíbles con agua o mezclas hidroalcohólicas (en esta categoría se

incluyen los ácidos fenólicos del SA ya discutidos en 2.1) ii-los compuestos, que están atrapados físicamente en estructura celular iii- Compuestos de bajo peso molecular, que son químicamente ligados a otras macromoléculas. Vi- material antioxidante insoluble (generalmente de alto peso molecular). Los cambios microestructurales impartidos a la matriz natural por el procesamiento de los alimentos así como también durante la ingestión de los mismos son relevantes en determinar la biodisponibilidad de los nutrientes seleccionados (Parada & Aguilera, 2007).

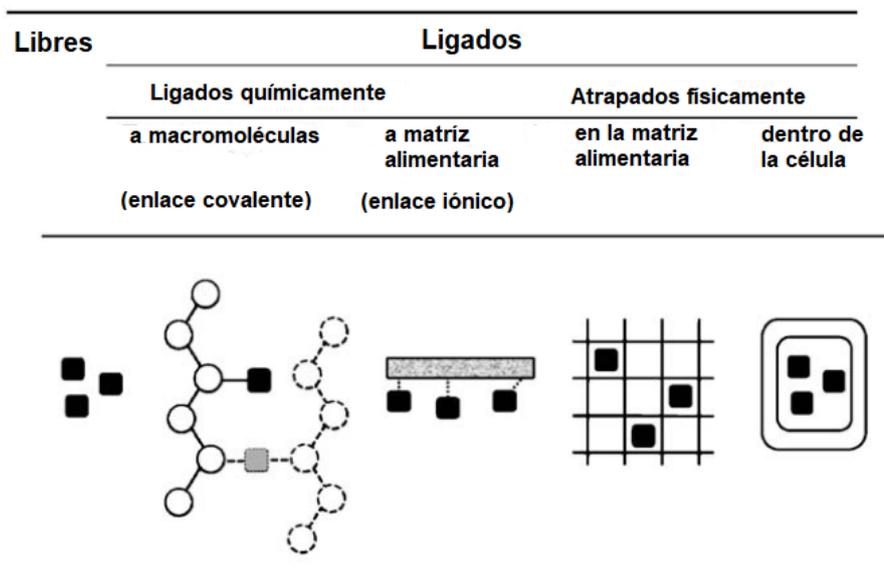


Figura 2- Distribución de los antioxidantes en la microestructura alimentaria. Adaptado de Gökmen *et al.*, 2009).

La fibra dietética funciona como un vehículo natural de compuestos bioactivos a través del tracto gastrointestinal y la producción de metabolitos generados durante su fermentación en el colón pueden explicar los beneficios fisiológicos generados por el consumo de fibra dietética (Macagnan *et. al* 2016). En este contexto, la investigación sobre fibra dietética antioxidante es actualmente de gran interés (Macagnan *et. al* 2016).

Bajo estas puntualizaciones podemos afirmar que solamente los polifenoles que sean liberados de la matriz alimenticia por la acción de las enzimas digestivas presentes en el tracto gastrointestinal (estómago e intestino delgado) y la microflora bacteriana (intestino grueso) estarán bioaccesibles y por lo tanto potencialmente biodisponibles (Saura-Calixto, 2011; Saura-Calixto *et al.* 2007). Se estima que un 48% de los

polifenoles provenientes de la dieta son bioaccesibles en el intestino delgado y un 42% se convierten en bioaccesibles en el intestino grueso (Saura-Calixto *et al.* 2007).

La condición de la fibra dietética como vehículo de antioxidantes, sumado al hecho reportado de que en el SA la mayor proporción de compuestos fenólicos se encuentran ligados a la fibra antioxidante, y al sentido lógico de no pretender revalorizar un residuo industrial generando nuevos residuos, justifican la necesidad de revalorizar los residuos insolubles generados tras la obtención de extractos antioxidantes.

1.3.2- Digestión absorción y metabolismo de los polifenoles

Los dos principales ácidos fenólicos reportados para el salvado de arroz, ácido ferúlico y ácido clorogénico son absorbidos mayoritariamente en órganos distintos del tracto gastrointestinal, mientras el primero es absorbido en el estómago y metabolizado en el hígado (Zhao *et al.*, 2004) el segundo se absorbe tras su hidrólisis enzimática en el colon por la microbiota a cafeico (Manach *et al.*, 2004). La *Figura 3* se muestra las rutas metabólicas de los polifenoles tras la ingesta de alimentos que lo contienen.

Los polifenoles se liberan luego de la ingesta por la masticación (acción mecánica) y seguidamente pueden ser solubilizados directamente (a 37°C, pH 1-7,5) o por acción de las enzimas digestivas que hidrolizan los enlaces no covalentes entre los grupos hidroxilo de los compuesto fenólicos y los grupos polares de las moléculas polisacáridas (Palafox-Carlos *et al.*, 2011). La asimilación comienza en el estómago, lo que resulta en la aparición de los compuestos en la sangre inmediatamente después de la ingestión (He & Giusti, 2010).

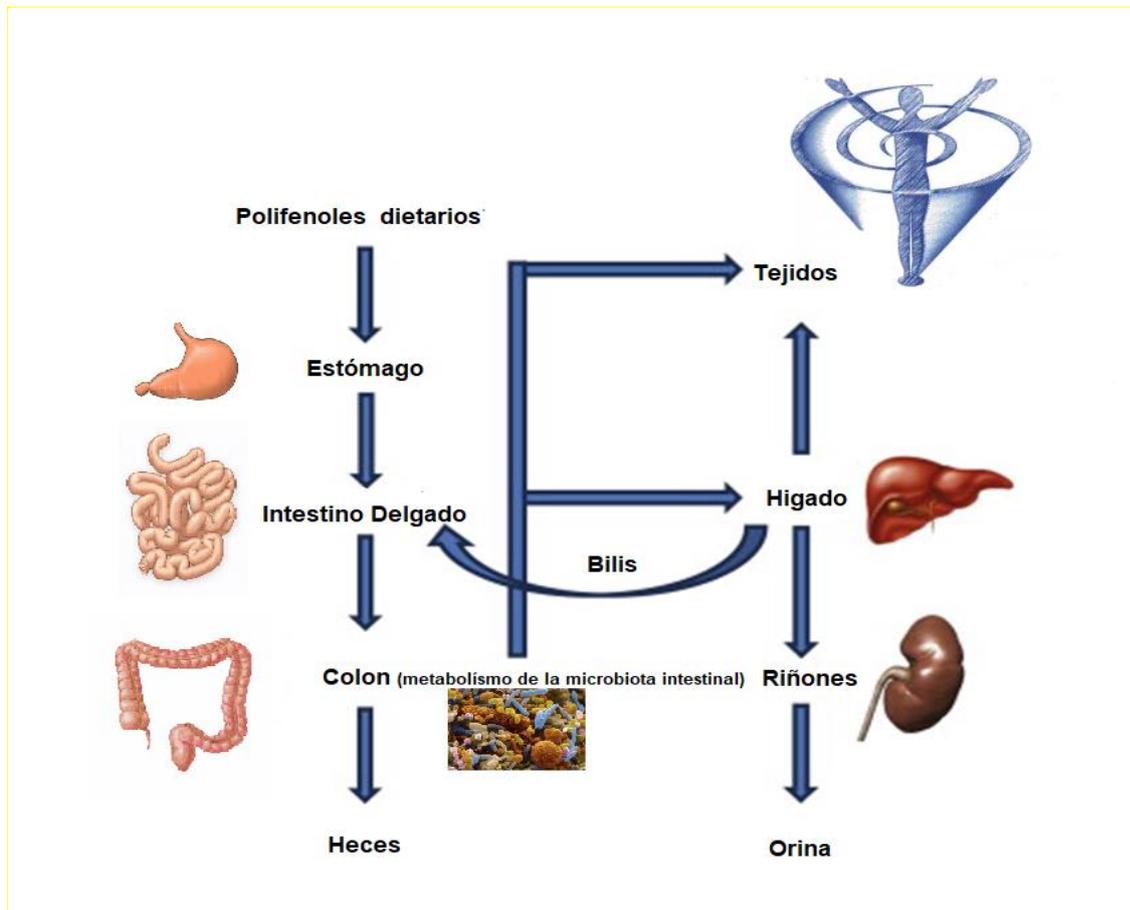


Figura 3- Metabolismo de los polifenoles dietarios (basada en Koutsos & Lovegrove, 2015).

Los compuestos fenólicos pueden difundir a través de la pared intestinal luego de ser liberados de la matriz (Palafox-Carlos *et al.*, 2011). Según Gessner *et al.* (2016), solamente una pequeña parte (5-10%) de polifenoles ingeridos de las plantas, que existen principalmente como ésteres, glicósidos o polímeros, se absorben en el intestino delgado penetrando la barrera epitelial de forma pasiva (previa hidrólisis enzimática). Los glicósidos también se absorben en el intestino, pero por difusión pasiva ineficiente o por transportadores dependientes de sodio (He & Giusti, 2010). La mayor proporción de polifenoles pasan a través del intestino delgado sin ser absorbidos (aproximadamente 90% a 95% de los polifenoles) estando asociados a la fibra dietética (Gessner *et al.*, 2016) Una vez que la fibra dietética arriba al colon, se convierte en sustrato fermentable de la microflora intestinal generándose nuevos metabolitos de polifenoles potencialmente biodisponibles (Gessner *et al.*, 2016; Cardona *et al.*, 2013, He & Giusti, 2010). Estos nuevos metabolitos también sirven

como sustratos promotores del crecimiento (efecto prebiótico) o sustancias antimicrobianas beneficiando a la microbiota colónica (Gessner *et al.*, 2016).

Aquellos que no son absorbibles y no son fermentados por la microbiota, pueden permanecer en el lumen intestinal, creando un ambiente saludable antioxidante al secuestrar los radicales libres y contrarrestar los efectos de los pro-oxidantes de la dieta (Palafox *et al.*, 2011) o ser excretados a través de las heces (Gessner *et al.*, 2016).

A partir de las referencias expuestas en este apartado, se espera obtener una fracción rica en fibra antioxidante. Los compuestos de esta fracción estarán covalentemente ligados a los polisacáridos insolubles de la pared celular del salvado de arroz, siendo su contribución principal en la mejora del ambiente colónico y generación de nuevos metabolitos por fermentación colónica (no analizada en este trabajo).

2-Objetivos específicos del capítulo 1

2.1 - Extraer, identificar, cuantificar y caracterizar los compuestos bioactivos presentes en el salvado de arroz cultivado en Uruguay.

2.2 - El evaluar el potencial de los extractos de salvado de arroz como inhibidores de los procesos de oxidación (antioxidantes).

2.3 - Realizar el estudio *in vitro* de la bioaccesibilidad y bioactividad del extracto antioxidante obtenido a partir del salvado de arroz.

3-Materiales y métodos

3.1- Caracterización de la materia prima

Se trabajó con salvado de arroz en estado íntegro, es decir sin desgrasar. El salvado de arroz, fue suministrado por un molino nacional (SAMAN S.A) en bolsas de 20 kg constituidas por una mezcla (“pool”) de diferentes variedades de arroz (*Oryza Sativa*) cultivadas en el país (principalmente “El Paso 144”). Una vez en el Laboratorio el salvado de arroz fue fraccionado en bolsas ziploc de 1 Kg y congelado a -18°C para preservarlo a lo largo del desarrollo de la tesis. Al salvado de arroz sin desgrasar se caracterizó por análisis de las propiedades fisicoquímicas y se considera como composición promedio del salvado de arroz de Uruguay. A continuación se detallan los métodos analíticos utilizados para caracterizar la materia prima (salvado de arroz) y sus productos derivados (FI-EAE, Extracto antioxidante, fracción insoluble rica en antioxidantes). En todos los casos los ensayos fueron realizados por triplicado y expresados como promedio \pm desvío estándar.

3.1.1 Determinación de humedad

La humedad de la muestra se determinó por el método gravimétrico AOAC-13004, secando 1 gramo de muestra por triplicado por 1 hora 30 min a 130 °C y estimando el agua evaporada por diferencia entre las muestras antes y luego del proceso de secado. Los resultados se expresan como % de humedad o gramos /100 g de muestra.

$$\% \text{ Humedad} = [PCM - PCMS / PCM - PC] \times 100$$

$$PC = \text{Peso cápsula vacía}$$

$$PCM = \text{Peso de cápsula} + \text{muestra}$$

$$PCMS = \text{Peso de cápsula} + \text{muestra seca}$$

3.1.2 Determinación de cenizas totales

La cuantificación del contenido de cenizas totales del SA se realizó por triplicado y utilizando el método ISO 5984-2002940.26. El método consistió en la cuantificación de residuo inorgánico resultante de la incineración de la muestra a 550°C por 8 horas. Los resultados se expresaron como % de ceniza en la muestra.

3.1.3 Determinación de proteínas

El contenido de proteínas se cuantificó por triplicado por determinación del contenido de nitrógeno por el método de Kjeldahl de la AOAC 920.152, (1999), utilizando como factor de conversión 5,7. El equipo empleado para este análisis fue un Digestor Foss Tecator 1007/1002 Kjltec auto-distillation.

$$\% \text{ Proteína} = \text{Contenido de nitrógeno orgánico} \times 5,7$$

3.1.4 Determinación de lípidos totales

La cuantificación del contenido de grasa se realizó por se realizó por triplicado, Por extracción semicontinua con éter de petróleo por el método de Soxhlet de acuerdo a la norma ISO-6492-1999.

3.1.5 Determinación del contenido fibra dietética

La cuantificación del contenido de fibra dietética total se realizó por el método enzimático 985.29 de la AOAC (1999). Se realiza en tres etapas utilizando el Kit Sigma Chemical Co. No TDF-100 con: Alfa amilasa; Proteasa; Amiloglucosidasa. Se determina fibra total dietética (FTD) (fibra soluble + fibra insoluble de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\%FDT = \frac{\left[g \text{ residuo} - \left(\frac{\% \text{ proteína residuo} + \% \text{ cenizas residuo}}{100} \right) \times g \text{ residuo} - g \text{ blanco} \right]}{g \text{ muestra}} \times 100$$

3.1.6 Determinación de carbohidratos

La estimación del contenido total de carbohidratos del SA se hizo por diferencia, a partir del contenido de humedad, cenizas, proteínas grasa, y fibra dietética total con la siguiente ecuación:

$$CHOs\ Tot = 100 - (\% \text{ humedad} + \% \text{ proteínas} + \% \text{ de grasa} + \% \text{ cenizas} + \% FDT).$$

3.2- Obtención de los extractos antioxidantes de salvado de arroz

Se utilizó un diseño experimental central compuesto (CCD) $2^k = 2^3 = 16$ tratamientos, de cara frontal con 2 puntos centrales. Las tres variables independientes (factores) y sus tres niveles (-1, 0 y +1) fueron: % de Etanol en solución extractora (70, 35, 0), Temperatura de extracción (20, 35 y 50°C) y Tiempo de extracción (30, 105 y 180 minutos). Las variables de respuesta seleccionadas fueron la capacidad antioxidante determinada por los métodos de ORAC-FL y ABTS y el contenido de polifenoles totales evaluados por el método de Folin Ciocalteu. La *Tabla 3*, la matriz del diseño experimental y los niveles evaluados para cada factor.

La optimización de la capacidad antioxidante de los extractos (ABTS y ORAC-FL) y contenido de polifenoles se estimaron mediante el diseño de experimentos (DOE) utilizando el programa Software Statgraphics (Centurion XVI Version 16.1.03, Virginia, USA) que permite la creación y el análisis de diseños experimentales. Para confeccionar las gráficas de superficie de respuesta se utilizó el software Statistica (www.statsoft.com).

El modelo del polinomio cuadrático propuesto para la respuesta Capacidad antioxidante y/o Contenido de polifenoles totales (Y) fue:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2$$

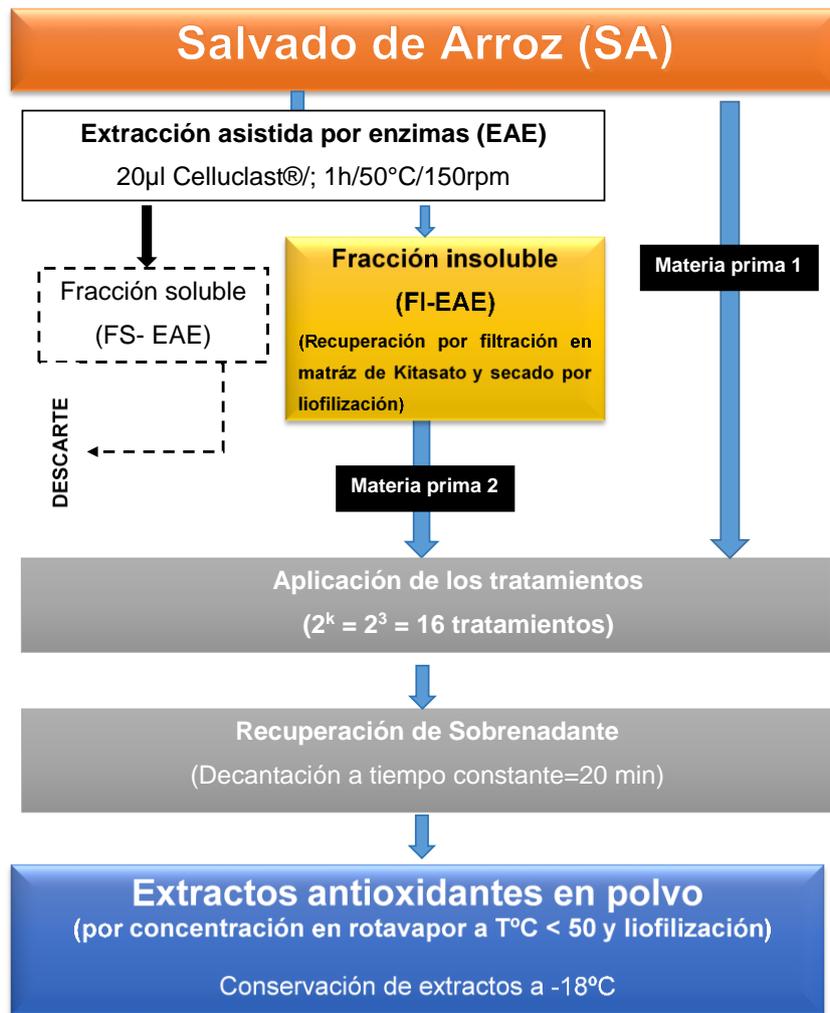
Donde, Y es la capacidad antioxidante y/o polifenoles totales Xi, representa a las variables independientes 1-% de etanol de la solución extractora, 2-temperatura de extracción, y 3-tiempo de extracción) y los b, los coeficientes de regresión.

Tabla 3-Matriz de experimentos del diseño central compuesto.

Sistemas	X1	X2	X3	Factores y niveles	X1	X2	X3
	(Solv:agua)	(T°C)	(t min)		(Solv:agua)	(T°C)	(t min)
1	1	1	1		70	20	30
2	1	-1	1		70	50	30
3	-1	-1	-1		0	50	180
4	0	-1	0		35	50	105
5	0	0	0		35	35	105
6	-1	1	1		0	20	30
7	1	-1	-1		70	50	180
8	0	0	-1		35	35	180
9	0	0	1		35	35	30
10	-1	1	-1		0	20	180
11	-1	0	0		0	35	105
12	1	1	-1		70	20	180
13	1	0	0		70	35	105
14	-1	-1	1		0	50	30
15	0	0	0		35	35	105
16	0	1	0		35	20	105

X₁= relación solvente: agua; X₂=temperatura de extracción (°C) y X₃=tiempo de extracción (minutos).

La *Figura 4*, resume el procedimiento de trabajo utilizado para la obtención de los extractos antioxidantes con las condiciones presentadas en la *Tabla 3*. Se destaca que se ha partido de 2 materias primas diferentes: materia prima 1, definida como el salvado de arroz y materia prima 2, definida como la fracción insoluble (FI-EAE) resultante de la extracción asistida por enzima. Sobre cada una de ellas, se le aplicó el diseño experimental antes mencionado (*Tabla 3*). Se realizaron 2 lotes, de 16 extractos cada uno para cada materia prima ensayada.



*Figura 4-*Procedimiento de trabajo para la obtención de los extractos de salvado de arroz.

Para obtener la FI-EAE (materia prima 2) el salvado de arroz, se trató con 20µl de enzima Celluclast® /g de muestra (con actividad celulolítica), a 50°C durante 1 hora y en agitación constante (150 rpm). El precipitado obtenido se recuperó por filtración utilizando un matríz kitasato e inmediatamente fue llevado a congelación (-20°C) para liofilizar.

Cada uno de los sistemas de extracción (*Tabla 3*), se simuló en botellas Schott de 1 L manteniendo una relación solución extractora: materia prima de 350 mL:100g. Las botellas fueron colocadas en un baño termostatzado (ajustando la temperatura según

cada sistema) manteniendo la agitación constante en 150 rpm. Una vez transcurrido el tiempo correspondiente a cada experimento (*Tabla 3*), las botellas fueron retiradas del baño y mantenidas por 20 minutos en reposo hasta que decantara el precipitado. Se recuperó el sobrenadante simplemente por vertido cuidadoso en un recipiente limpio. Para la obtención de extractos antioxidantes secos, los vertidos acuosos fueron directamente liofilizados mientras que los que contenían etanol, previamente se recuperó el solvente por rotavapor a 40°C. Todos los extractos una vez que estuvieron liofilizados fueron conservados a -18°C para sus sucesivos análisis.

3.3- *Caracterización de los extractos antioxidantes*

En los 32 extractos obtenidos (16 partiendo de SA y 16 partiendo de FI-EAE), se analizó el contenido de polifenoles totales, contenido de proteínas y la capacidad antioxidante

3.3.1 *Contenido de proteínas solubles*

Se determinó el contenido proteico por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) en cada extracto obtenido. Los extractos en polvo se disolvieron a una concentración de 1 mg/mL en buffer fosfato 10 mM pH=7,4. Se construyó una curva patrón utilizando albúmina (BSA) como proteína patrón en un rango de 0,1 a 0,4 mg/mL. Se tomaron La medida de absorbancia se realiza a 750 nm y los resultados se expresan en % de proteína.

3.3.2 *Contenido de polifenoles totales*

El total de compuestos fenólicos de los extractos de SA se analizó de acuerdo al método de Folin Ciocalteu propuesto por Slinkard & Singleton (1965) modificando las cantidades de los reactivos para su uso en lector de placa.

El análisis se llevó a cabo utilizando microplacas de fondo plano de 96 pocillos. La reacción se inició mezclando 10µl de muestra con 50µl de la solución de Folin-Ciocalteu (en disolución previa con agua a razón de 1: 5 reactivo de Folin: agua respectivamente), en cada pocillo. Se mantuvo 3 minutos a temperatura (°C) ambiente, y a continuación se adicionaron 200µl de solución de bicarbonato de sodio.

Se mantuvo 30 minutos más a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 750nm en un lector de placas Multiskan FC (Thermo Scientific). Como blanco se utilizaron 10µl agua destilada en lugar de muestra. Todos los extractos fueron pesados por duplicado y las mediciones se realizaron por triplicado. La curva patrón de ácido gálico se construyó en un rango de 0,05 a 0,5 mg/mL.

3.3.3. Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de los extractos en polvo se evaluó empleando dos métodos distintos que se describen en los siguientes subapartados

3.3.1.1 Capacidad de absorción de radicales libres de oxígeno (ORAC)

Con este método de análisis se buscó verificar la capacidad que poseen los antioxidantes presentes en los extractos para absorber los radicales libres de oxígeno presentes en el medio, mediante espectrofotometría de fluorescencia. Para ello se utilizó el método descrito por Ou *et al.* (2001), conocido como método ORAC, del inglés “Oxygen Radical Absorbance Capacity” adaptado por Dávalos *et al.* (2005). Los resultados fueron expresados como µmol Trolox Equivalente /g de muestra.

Las medidas de fluorescencia se realizaron a una λ de excitación a 485 nm y λ de emisión de 520 nm. La reacción fue llevada a cabo en un volumen final de 200 µL a 37°C, midiendo la fluorescencia a cada minuto por 104 minutos en un espectrofluorímetro (Varioskan® Flash). Se utilizó buffer fosfato 75 mM pH 7,4 y la sonda fluorescente como sustrato oxidable fluoresceína (120 µL, concentración final 70 nM). También, se le agrega un generador de radicales oxígeno, AAPH (60 µL, concentración final 12 mM), y el antioxidante (20 µL), ya sea Trolox (concentración final 1-8 µM) o muestra (a diferentes concentraciones). El blanco consistía de buffer fosfato en lugar de antioxidante. La solución de fluoresceína (1,17 mM) se solubilizó en buffer fosfato 75 mM pH 7,4 y se conservó a 4 °C en oscuridad. El AAPH y las soluciones de Trolox fueron preparadas en el mismo buffer diariamente. Todas las muestras a analizar fueron preparadas por duplicado y cada uno de los preparados fue analizado por triplicado. Todas las medidas de fluorescencia fueron normalizadas con el blanco y se calculó el área bajo la curva del decaimiento de la fluoresceína (AUC):

$$AUC = 1 + \sum_{i=1}^{i=104} f_i / f_0$$

f_0 sería la fluorescencia a los 10 minutos de incubación a 37 °C y f_i la fluorescencia medida a cada minuto. El área bajo la curva (AUC) final de las diluciones del patrón y las muestras fueron calculadas restando el AUC del blanco. Se realizó la curva de calibración con las distintas diluciones de Trolox y se calcularon los valores para cada una de las muestras en equivalentes de Trolox. Los valores de ORAC-FL fueron expresados en μmol de Trolox/g de extracto.

Además de las medidas puntuales de las muestras, se realizaron las curvas de dosis-respuesta del extracto que presentó mayor capacidad antioxidante por el método de ORAC-FL, para calcular el valor de IC50.

3.3.2.2 Método de decoloración del radical catiónico ABTS^{•+}

La determinación se llevó a cabo siguiendo el procedimiento de decoloración del radical ABTS^{•+} descrito por Re *et al.* (1999). El método mide el grado de atrapamiento de los radicales monocatiónicos ABTS^{•+} decolorándose por la presencia de antioxidantes en la muestra. La decoloración de la mezcla de reacción es proporcional al poder antioxidantes de la misma que absorben a 734 nm. Se preparó una solución madre del radical ABTS^{•+} por oxidación química del ABTS (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) 7mM en presencia de persulfato potásico 140mM a temperatura ambiente y se dejó incubar de 14 a 16 horas en oscuridad para la formación del radical ABTS^{•+} (color verde-azulado). La solución de trabajo del radical ABTS^{•+}, se preparó por dilución de la solución madre 1:80 (v/v) en tampón fosfato sódico (PBS) 5mM pH 7,4 para obtener un valor de absorbancia de $0,7 \pm 0,02$ a 734nm. A continuación se tomaron 30 μl de las muestras diluidas o estándares y se adicionaron 3 mL de la solución de trabajo del radical ABTS^{•+}. La absorbancia se midió a los 10 minutos de iniciada la reacción. Para la curva de calibrado se utilizó como sustancia Trolox 2,5 mM en PBS. Los patrones y las muestras también (1 mg/mL) fueron preparados en buffer fosfato 5 mM pH 7,4. E

Los valores de equivalentes de Trolox (TE) se expresaron como μmoles de TE/g. Para el cálculo de los valores se contruyó una recta de calibración empleando

concentraciones de este compuesto en un rango de 0,25 a 2,0 mM frente al % de inhibición de la absorbancia a los 10 minutos de reacción. El % de inhibición se calculó según la siguiente ecuación:

$$\%Inhibición = \frac{A_{control} - A_{muestra}}{A_{control}} * 100$$

Siendo: $A_{control}$ la absorbancia de 3 mL del reactivo ABTS en el buffer con 30 μ L del buffer y $A_{muestra}$ la absorbancia de 3 mL del reactivo ABTS en el buffer con 30 μ L del patrón (Trolox) o la muestra. Interpolando el valor de % de inhibición de cada una de las muestras en la curva de calibrado obtenida para el Trolox se obtuvo el valor de TE para la muestra.

El % de inhibición representa la habilidad de los antioxidantes presentes en la muestra de atrapar los radicales ABTS \cdot + (color verde-azulado) y transformarlos en ABTS $^{2-}$ (incoloro).

Además de las medidas puntuales de las muestras, se realizaron las curvas de dosis-respuesta del extracto que presentó mayor capacidad antioxidante por el método de ABTS para calcular el valor de IC50.

Con los resultados obtenidos de contenido de proteínas, contenidos de polifenoles totales y capacidad antioxidante se construyeron *Tablas* comparativas evaluando diferencias significativas entre los valores medios obtenidos en cada extracto mediante un ANOVA evaluando las diferencias entre valores medios por el test de Tukey. Para ello los datos fueron procesados utilizando el software libre infostat/L versión 400 (Universidad Nacional de Córdoba). Este análisis se realizó para comparar entre extractos según cada condición ensayada.

3.4 Selección de extractos de salvado de arroz para su uso como ingrediente natural antioxidante e identificación de compuestos fenólicos

Se seleccionaron las condiciones de extracción para la producción del “mejor extracto” enriquecido en compuestos antioxidantes para su uso como ingrediente natural en la formulación de alimentos. La selección se realizó por la metodología de optimización por superficie de respuesta, detallada en el apartado 2.2, utilizando el programa Software Statgraphics (Centurion XVI Version 16.1.03, Virginia, USA).

Una vez identificado el extracto se profundizó en su caracterización y conocimiento a través de los siguientes análisis cuyas metodologías se describen a continuación:

- Composición nutricional del extracto.
- Fraccionamiento del extracto antioxidante en alto (FAPM) y bajo (FBPM) peso molecular respectivamente.
- Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos (UHPLC-DAD) en extracto y fracciones (FAPM y FBPM).

3.4.1- Composición nutricional del extracto

Se caracterizó el extracto obtenido desde el punto de vista fisicoquímico (contenido de humedad, cenizas, proteínas totales, grasa, fibra dietética total y carbohidratos totales) utilizando los mismos métodos mencionados para la caracterización del salvado de arroz en el apartado 3.1 de este documento.

3.4.2- Aislamiento y caracterización de los componentes de las de las fracciones de alto y bajo peso molecular

El extracto antioxidante seleccionado se fraccionó por peso molecular mediante una membrana de ultrafiltración empleando una membrana con un tamaño de corte 3 kDa (dispositivo Amicon Ultracentrifugación, Merck Millipore, Tullagreen Carrigtwohill Co. Cork, Ireland). Se prepararon soluciones de extracto conteniendo 10mg/mL en PBS (10 mM, pH=7,5). Primero se recuperó la fracción soluble del extracto centrifugando

por 20 minutos a 9500 rpm y 5°C. Seguidamente dicho sobrenadante se ultrafiltró (3KDa) a 4000 rpm, 5°C por 45 minutos obteniendo 2 fracciones: bajo peso molecular (BPM) que es la que atraviesa la membrana y la de alto peso molecular (APM) retenida por la membrana. Ambas fracciones fueron recuperadas, liofilizadas y mantenidas en congelación (-18°C) para su posterior análisis de capacidad antioxidante e identificación de compuestos fenólicos mediante UHPLC-UV.

3.4.2 Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos del extracto seleccionado y sus fracciones

Para evaluar la composición en compuestos fenólicos del extracto seleccionado, de sus fracciones de APM y BPM y el producto de su digestión, se usó un equipo de cromatografía de líquidos de ultra-alta resolución (UHPLC) marca Ultimate 3000-THERMO FISHER SCIENTIFIC. Los compuestos fenólicos fueron separados utilizando una columna Kromasil 100 C8 3,5µm 15x 0,4 (Scharlac Science N40347 070-B2Y 709). La adquisición de los datos así como también la calibración e integración de picos fueron realizadas con el software Dionex Chromeleon 7.1 SR2.

La fase móvil y las condiciones que se utilizaron fueron basadas en Reza *et al.* (2015). La fase móvil fue: Acetonitrilo como solvente A, Metanol como solvente B y Ac. Fosfórico (pH= 2,81), como solvente C. Las corridas fueron realizadas siguiendo el gradiente de elución que se muestra en la *Tabla 4*. Se dejó que el programa corriera durante 5 minutos previos con 5% de A; 0% de B y 95% de C (condiciones iniciales) para equilibrar la columna. El flujo y la temperatura se mantuvieron constantes a lo largo del análisis en un 1 mL/min y 30°C respectivamente con un volumen de inyección de 20 µL. Para la detección UV de compuestos fenólicos se utilizaron dos longitudes de onda: 290 y 358 nm (Díaz & Heinzen, 2006)

Tabla 3-Gradiente de elución de la fase móvil utilizada para la caracterización por UHPLC

Fase Móvil \ Tiempo (min)	Tiempo (min)				
	0-10	10 -20	20-40	40-50	50-55
A-ACN (%)	5	10	20	100	5
B-MeOH (%)	0	10	20	0	0
C-H ₃ PO ₄ (%)	95	80	60	0	95

Se prepararon soluciones de ácido ferúlico, ácido gálico, quercetina y rutina de grado analítico y pureza conocida que se emplearon como patrones de referencia para la identificación de los compuestos fenólicos del extracto de salvado de arroz. Se partió de soluciones madre de 5mg/mL preparadas con metanol, para la construcción de las curvas de calibración en el rango de 0,05 a 1mg/mL con 5 puntos. En todos los casos se obtuvieron rectas de calibrado con R² superior al 0,995. Todas las muestras fueron preparadas en una concentración de 10mg/mL para su inyección. Las muestras de extracto y sus fracciones se disolvieron en una mezcla 35% etanol 65% agua (solución de origen), mientras que el producto de la digestión se diluyó en agua. Las muestras y los patrones fueron filtrados previo a la inyección utilizando una jeringa Hamilton (Avanti Polar Lipids), filtros de 45 µm para HPLC (Merk Millipore).

Los compuestos se identificaron comparando los picos con los estándares. Para cada compuesto se utilizó el tiempo de retención y el perfil del espectro de absorbancia. La cuantificación se basó en la extrapolación de las rectas de calibración de estándares antes mencionada (área pico vs concentración). Los datos fueron expresados como promedio ± desviaciones estándar.

3.5- Validación del residuo generado durante el proceso de extracción como ingrediente alimentario

Una vez seleccionado el extracto de salvado de arroz con mayor contenido en antioxidantes se recuperó el residuo “fracción insoluble” obtenido durante su proceso de extracción (Figura 5). De acuerdo a la revisión bibliográfica presentada en el apartado 1.3 de este documento se asumió que esta fracción podría estar enriquecida en fibra dietética antioxidante. Bajo este supuesto y alineados a los conceptos de reciclaje total del residuo industrial del procesado del arroz se trabajó en la validación de éste como nuevo ingrediente alimentario. La Figura 5 resume los análisis llevados a cabo para la caracterización de los 2 nuevos ingredientes obtenidos a partir de salvado arroz. La metodología empleada para el análisis del extracto antioxidante de salvado de arroz se describe en el apartado 3.3 de este documento. A continuación describen los materiales y los métodos empleados para la caracterización y de la fracción insoluble.

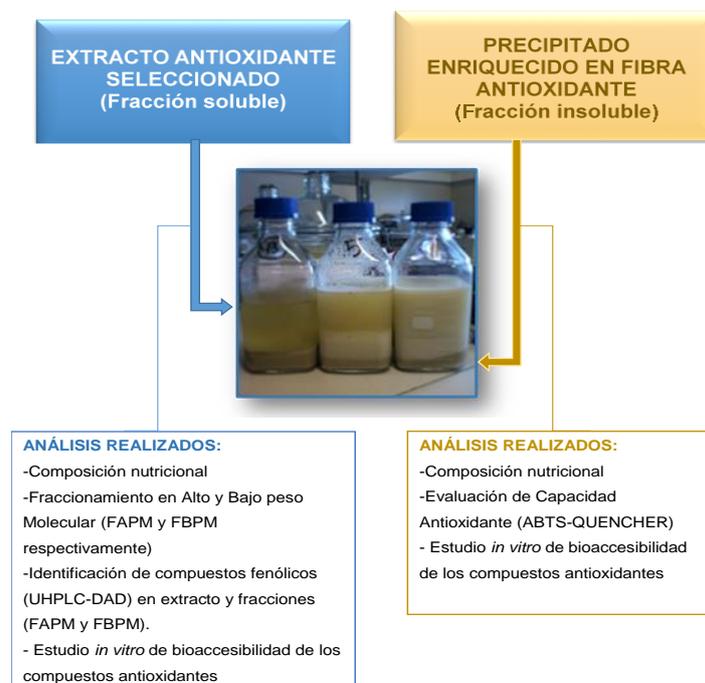


Figura 5-Ingredientes obtenidos del SA y esquema de análisis para su caracterización.

Previo a su caracterización el residuo del proceso de extracción, también denominada fracción insoluble, se secó en estufa con recirculación de aire a una temperatura de 50°C hasta lograr un peso constante. El producto seco se almacenó en recipientes herméticos a -18°C hasta su posterior caracterización mediante análisis fisicoquímico y evaluación de su capacidad antioxidante.

3.5.1 Composición nutricional y contenido de cenizas de la fracción insoluble

La composición nutricional y ceniza de la fracción insoluble (proteínas totales, grasa, fibra dietética y carbohidratos totales) se realizó utilizando los mismos métodos mencionados para la caracterización de la materia prima de partida (salvado de arroz) en el apartado 3.1 de este documento.

3.5.2 Evaluación de la capacidad antioxidante de la fracción insoluble

Para evaluar la capacidad antioxidante de la fracción insoluble se utilizó el método de ABTS- directo o QUENCHER (sigla en inglés para Quick, Easy, New, Cheap and Reproducible) descrito por Serpen *et al.* (2007) y Gökmen *et al.* (2009) (*Figura 6*). Este método está especialmente indicado para cereales y en este caso en particular se ha utilizado por tratarse de una fracción insoluble que imposibilitaba usar el método tradicional propuesto por Re *et al.* 1999. Previo al análisis, el tamaño de partícula de la muestra se redujo con la ayuda de un molinillo Ufesa de uso habitual para moler café se pasó por un tamíz molecular de 0.20 μm con el fin de favorecer el contacto con el radical ABTS^{•+}. La solución madre de radical ABTS^{•+} se disolvió en una mezcla 50:50 agua: etanol. El resto de las condiciones de análisis fueron las indicadas en el apartado 3.3.2.2 de la presente tesis doctoral.

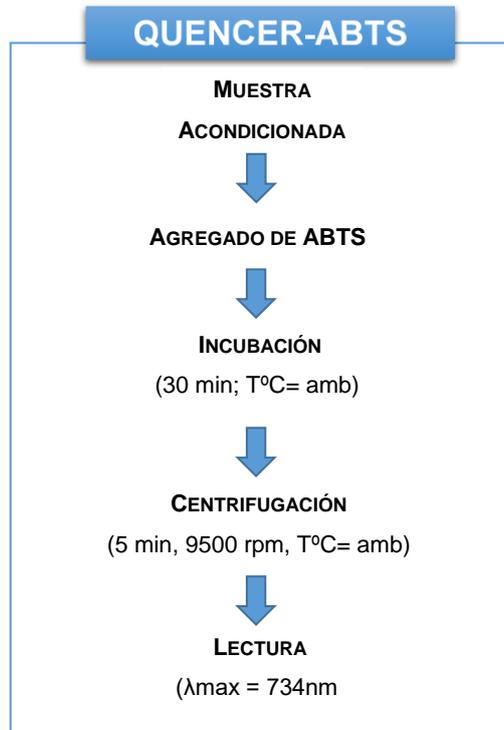


Figura 6-Procedimiento experimental del método denominado QUENCHER por sus siglas en inglés.

Se pesaron 10 mg de muestra por triplicado y se hicieron reaccionar con 10 mL de la solución de ABTS previamente preparada. Se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y se realizó la lectura a 734 nm utilizando una placa multipocillo transparente (*Figura 6*). Una vez alcanzado los 30 minutos a temperatura ambiente se centrifugó cada tubo conteniendo la muestra la solución de ABTS a 9500 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 734 nm sobre el sobrenadante en un lector de placas Multiskan FC (Thermo Scientific). Para ello, se agregan 10 μ L de muestra en cada pocillo (triplicado) de la placa de 96 pocillos, se le agregan 190 μ L de solución de trabajo de ABTS, se midió en el lector de placas a 734 nm. Seguidamente se interpolaron los valores de Absorbancia a 734 nm para obtener los valores de μ moles de Trolox respecto a la recta de calibrado. La capacidad antioxidante se expresa en μ mol de Trolox equivalente (TE)/g de muestra.

3.6- Estudio *in vitro* de la bioaccesibilidad de los compuestos antioxidantes

Para medir bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos se siguió el protocolo de digestión *in vitro* propuesto por Hollebeeck *et al.* (2013), que consiste en tres etapas consecutivas (Figura 7): la salivar (oral) la gástrica y la intestinal, para imitar la digestión fisiológica en condiciones normales. Todo el proceso se simuló en Erlenmeyer cerrados de 50 mL en baño de agua a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ y 200 rpm de agitación. Este procedimiento se realizó para el SA y los 2 nuevos ingredientes obtenidos durante el desarrollo de la tesis (extracto antioxidante y fracción enriquecida en fibra antioxidante). Las muestras fueron analizadas tal como fueron obtenidas sin procesamiento previo.

Preparación de los digeridos:

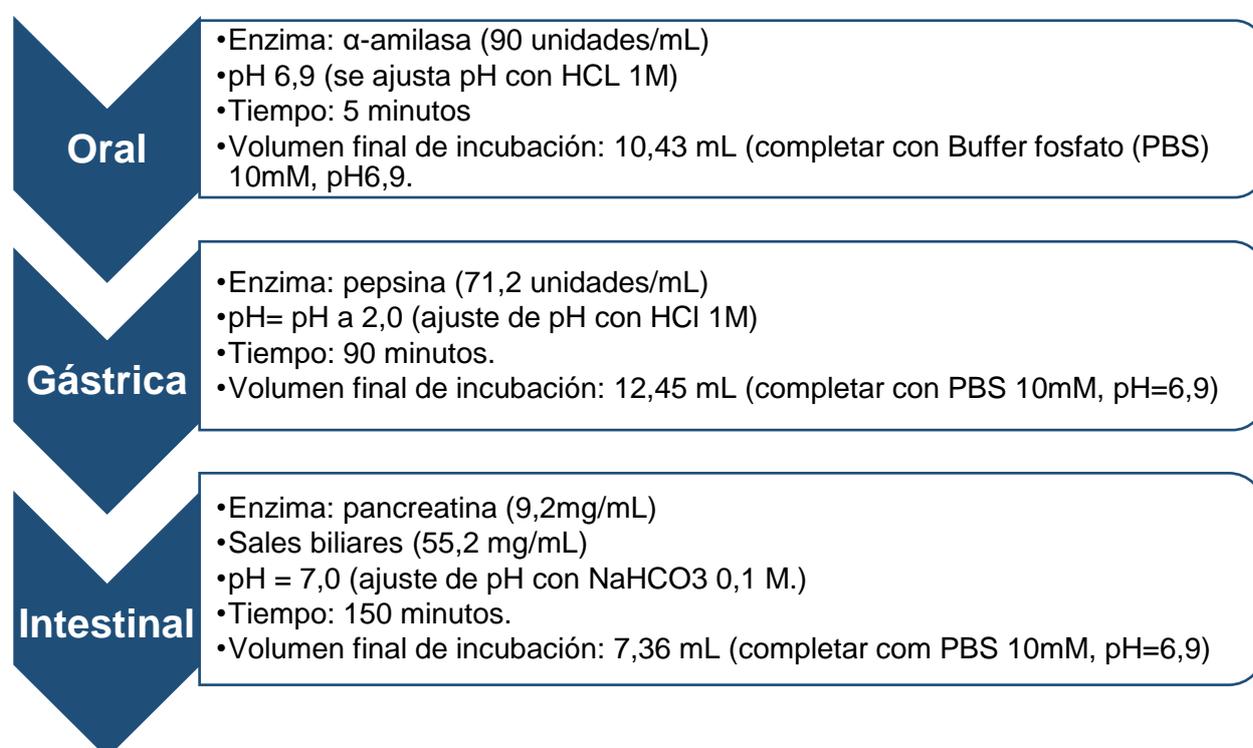


Figura 7-Simulación de la digestión *in vitro*: etapas y condiciones.

Terminado el tiempo de incubación de la etapa intestinal, se inactivaron las enzimas en baño de agua a 90 °C por 10 minutos. Seguidamente, los digeridos fueron centrifugados a 10000 rpm por 10 minutos separando el sobrenadante del precipitado.

Las muestras fueron liofilizadas y conservadas en congelación a -18°C. El sobrenadante representa lo que potencialmente puede ser absorbido por el organismo hasta el intestino (porción bioaccesible), mientras que los precipitados representan la fracción que pasará al intestino grueso para ser sometida potencialmente a fermentación colónica y sus productos resultantes ser parcialmente absorbidos.

4 -Resultados y discusión

4.1- Composición del nutricional de las materias primas

La *Tabla 4*, muestra la composición nutricional del salvado de arroz (materia prima 1) y el residuo obtenido durante el proceso de extracción asistido con enzimas (FI-EAE) (materia prima 2) que se emplearon para la obtención de los nuevos ingredientes alimentarios objeto de estudio en la presente investigación.

Tabla 4-Composición nutricional del salvado de arroz y de la fracción insoluble (FI-EAE). Los resultados se expresan como g/100g de materia seca (MS) y representan el valor medio \pm desviación estándar de las determinaciones realizadas por triplicado. Letras diferentes dentro de una misma fila indican diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las muestras encontradas mediante prueba t.

	Salvado de arroz (g)	FI-EAE (g)
Proteínas totales	12,46 \pm 0,10 a	11,92 \pm 0,06 b
Lípidos totales	24,04 \pm 0,32 a	21,50 \pm 0,50 b
Fibra dietética	21,59 \pm 0,60 b	32,05 \pm 2,49 a
Cenizas	7,56 \pm 0,20 b	8,76 \pm 0,25 a
Carbohidratos totales*	34,36 \pm 0,80 a	26,00 \pm 1,72 b

SA: Salvado de arroz

FI-EAE: Fracción insoluble resultante de la extracción asistida por enzimas (EAE).

*Carbohidratos disponibles obtenidos por diferencia (MS- Σ Lípidos totales, proteínas totales, cenizas, fibra dietética total para base seca).

A pesar de que la composición de la matriz alimentaria depende de múltiples factores tales como el grado de pulido (Gul, *et al.*, 2015) y la variedad de grano (Yılmaz, 2016), los resultados obtenidos indican el gran potencial del salvado de arroz como fuente natural de ingredientes alimentarios de gran interés nutricional. El salvado de arroz producido en Uruguay se destaca por su alto contenido en carbohidratos totales (34,36 g/100 g de MS), fibra dietética (21,60 g/100g de MS), lípidos (24,04 g/100g de MS), proteínas (12, 46 g/100g de MS) y cenizas (7,6 g/100g de MS). La composición proximal de SA empleado como materia prima en la presente investigación, es

comparable a la descrita por otros autores como puede observarse resumida en la *Tabla 1* del apartado 1.1 de este documento.

La fracción recuperada para su empleo en la obtención de nuevos ingredientes alimentarios (FI-EAE) presentó un contenido de fibra dietética y de cenizas, significativamente ($p < 0,05$) superior a la encontrada en la materia prima original (salvado de arroz), lo que se explica por la migración de compuestos solubles principalmente carbohidratos al sobrenadante obtenido por tratamiento enzimático del salvado de arroz. El contenido de carbohidratos totales en la muestra fue significativamente ($p > 0,05$) menor que el encontrado en salvado de arroz lo que básicamente demuestra la pérdida de carbohidratos digeribles por actividad de la enzima. También se verifica la pérdida significativa ($p > 0,05$) de lípidos (2,5 g) y de proteínas (0,5 g) hacia el sobrenadante durante el tratamiento enzimático del salvado de arroz como consecuencia del debilitamiento de los tejidos por hidrólisis enzimática de la celulosa y las condiciones de temperatura (50°C) utilizadas. Si bien, todas las diferencias enumeradas son significativas ($p > 0,05$), en términos absolutos, las diferencias más sustanciales entre las materias primas utilizadas para la obtención de extractos antioxidantes radica en el contenido de fibra dietética (10,44 g) y carbohidratos digeridos por la enzima (8,4 g). Esto era de esperar dado que se utilizó solamente una enzima con actividad celulasa. La FI-EAE ofrece ventajas desde el punto de vista nutricional dado que su mayor contenido de fibra dietética y menor contenido de carbohidratos, se ajusta a los lineamientos propuestos en 2015 por la OMS de cara a reducir el riesgo de enfermedades crónicas no transmisibles tales como diabetes tipo 2 y la obesidad.

Los resultados obtenidos indican las diferencias en composición entre las materias primas utilizadas para la obtención de extractos antioxidantes sugiriendo que ambas presentan potencial para ser valorizadas en ingredientes alimentarios funcionales.

4.2- Efecto de las variables del proceso de extracción sobre la composición y propiedades de los extractos

La *Tabla 5* se presenta la capacidad antioxidante contra el radical peroxilo (ORAC), del sobrenadante (FS-EAE) y la fracción insoluble (FI-EAE) obtenido tras la extracción asistida por enzimas (EAE) del salvado de arroz (*Figura 4*).

Tabla 5- Capacidad antioxidante medida por el método ORAC (μ moles de TE/g muestra) del sobrenadante (FS-EAE) y el residuo insoluble (FI-EAE) resultantes de la extracción asistida por enzimas (EAE) del salvado de arroz. Los resultados se expresan como medias \pm desviación estándar de las determinaciones realizados por sextuplicado. Letras diferentes denotan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los valores de las muestras analizadas por test Tukey.

	ORAC (μ mol TE/g de muestra)
FS-EAE	460 \pm 12 b
FI-EAE	621 \pm 20 a

FS-EAE: Sobrenadante resultante del tratamiento enzimático del SA

FI-EAE: Fracción insoluble resultante del tratamiento enzimático

En la *Tabla 5* se observa una mayor y significativa ($p < 0,05$) capacidad antioxidante contra el radical peroxilo (ORAC_FL) de la FI-EAE respecto a la FS-EAE resultante del tratamiento con la enzima celulolítica sobre el salvado de arroz (*Figura 4*). Las ventajas de la EAE favoreciendo la exposición de antioxidantes que queden más expuestos y puedan ser más fácilmente extraíbles, es reconocida y ha sido ampliamente reportada (Marathe *et al.*, 2017). Recientemente han sido reportadas ventajas y desventajas del uso de distintas enzimas para la extracción en salvado de arroz, como por ejemplo los trabajos de Kim & Lim (2016) con carbohidrasas comerciales; Wanyo *et al.* (2014), utilizando celulasas y Liu *et al.*, (2017) utilizando una mezcla de glucoamilasas, proteasas y celulasas. Sin embargo, en los productos provenientes de cereales la mayor riqueza antioxidante se encuentra asociada a la fibra dietética insoluble (Shao & Bao, 2015. Ti *et al.*, 2014). Hasta la fecha, en los trabajos donde se utiliza EAE se descarta la fracción insoluble resultante del tratamiento y los extractos se elaboran a partir del sobrenadante resultante que se encuentra enriquecido con los antioxidantes extraídos.

Con los resultados expuestos en la *Tabla 5*, se concluye que la FI-EAE, es más interesante para ser tomada como materia prima alternativa al salvado de arroz para la elaboración de extractos antioxidantes. Esta decisión se refuerza con las características nutricionales expuestas en el apartado anterior de este documento principalmente basado en su significativamente menor ($p < 0,05$) contenido de carbohidraos.

4.2.1- Influencia de la materia prima de origen en la composición y capacidad antioxidante de los extractos

Las *Tablas 6 y 7* muestran el contenido de proteínas totales (Lowry), polifenoles totales y capacidad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de dos materias primas objeto de estudio, salvado de arroz y FI-EAE, siguiendo el esquema de trabajo presentado en la *Figura 4*.

Tabla 6- Contenido en proteínas totales (%); polifenoles totales (mg GAE/g extracto); capacidad antioxidante medida por los métodos ORAC y ABTS (μ moles de TE/g extracto) de los 16 extractos obtenidos a partir de salvado de arroz. Los resultados se expresan como g/g de extracto y representan el valor, medio \pm desviación estándar de las determinaciones realizadas por sextuplicado. Letras diferentes dentro de una misma columnan indican diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las muestras obtenidas bajo diferentes condiciones experimentales encontradas mediante test Tukey.

Extracto	Condiciones de extracción			Proteínas totales (Lowry)	Polifenoles totales	Capacidad antioxidante (μ moles TE/g de extracto)	
	% Etanol	T (°C)	t (min)	% Proteína \pm DS	mg GAE/g extracto \pm DS	ORAC	ABTS
1	70	20	30	14,35 \pm 0,40 g	74,70 \pm 1,74 a	527 \pm 17 h	333 \pm 20 e
2	70	50	30	6,12 \pm 0,50 h	58,82 \pm 1,85 c	417 \pm 11 i	224 \pm 9,0 g
3	0	50	180	23,00 \pm 0,70 ab	62,83 \pm 2,70 c	608 \pm 15 de	274 \pm 7,0 f
4	35	50	105	21,18 \pm 0,60 cd	73,94 \pm 2,30 a	661 \pm 24 cd	447 \pm 23 ab
5	35	35	105	23,40 \pm 0,90 ab	66,80 \pm 1,50 b	626 \pm 28 cd	400 \pm 28 cd
6	0	20	30	13,31 \pm 0,43 g	61,90 \pm 0,61 c	552 \pm 26 fg	168 \pm 11 h
7	70	50	180	13,21 \pm 0,30 g	59,15 \pm 2,13 c	532 \pm 27 h	290 \pm 10 f
8	35	35	180	22,00 \pm 0,23 bcd	71,00 \pm 1,40 ab	600 \pm 18 de	394 \pm 26 cd
9	35	35	30	21,00 \pm 0,90 d	72,60 \pm 1,14 a	777 \pm 31 b	415 \pm 22 bc
10	0	20	180	17,00 \pm 0,25 f	49,23 \pm 2,05 e	542 \pm 13 gh	156 \pm 7,0 h
11	0	35	105	23,0 \pm 0,54 abc	61,00 \pm 2,03 c	640 \pm 30 cd	290 \pm 11 d
12	70	20	180	19,00 \pm 0,40 e	65,00 \pm 1,84 a	686 \pm 27 c	374 \pm 13 d
13	70	35	105	13,42 \pm 0,52 g	48,60 \pm 2,20 de	578 \pm 33 ef	251 \pm 11 fg
14	0	50	30	19,00 \pm 0,52 e	54,00 \pm 2,30 d	639 \pm 28 cd	223 \pm 17 g
15	35	35	105	23,29 \pm 0,60 ab	67,00 \pm 1,92 b	628 \pm 37 cd	389 \pm 16 cd
16	35	20	105	24,08\pm0,63 a	71,42\pm1,60 a	912\pm31 a	451\pm14 a

Tabla 7-Contenido en proteínas totales (%); polifenoles totales (mg GAE/g extracto); capacidad antioxidante medida por los métodos ORACy ABTS (μ moles de TE/g extracto) de los 16 extractos obtenidos a partir de FI-EAE de salvado de arroz. Los resultados se expresan como g/g de extracto y representan el valor, medio \pm desviación estándar de las determinaciones realizadas por sextuplicado. Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las muestras obtenidas bajo diferentes condiciones experimentales encontradas mediante test Tukey.

Extracto	Condiciones de extracción			Proteínas totales (Lowry) % Proteína \pm DS	Polifenoles totales mgGAE/g extracto \pm DS	Capacida antioxidante (μ moles de TE/g extracto \pm DS)	
	% Etanol	T ($^{\circ}$ C)	t (min)			ORAC	ABTS
1	70	20	30	8,04 \pm 0,21 i	60,30 \pm 0,50 d	660 \pm 21 bc	235 \pm 11 c
2	70	50	30	8,25 \pm 0,22 d	57,36 \pm 0,90 def	632 \pm 18 c	215 \pm 4,0 cd
3	0	50	180	18,46 \pm 0,80 d	50,60 \pm 1,34 efg	523 \pm 18 d	227 \pm 10 c
4	35	50	105	17,48\pm0,17 e	83,33\pm2,00 a	825\pm12 a	351\pm11 a
5	35	35	105	19,47 \pm 0,52 c	70,60 \pm 1,80 b	550 \pm 14 d	356 \pm 13 a
6	0	20	30	13,43 \pm 0,13 gh	57,60 \pm 1,72 d	418 \pm 14 e	145 \pm 11 f
7	70	50	180	12,91 \pm 0,40 gh	52,83 \pm 2,09 fg	559 \pm 0,02 d	263 \pm 15 b
8	35	35	180	21,78 \pm 0,90 ab	65,50 \pm 2,09 bc	654 \pm 31 bc	356 \pm 14 a
9	35	35	30	20,87 \pm 0,30 b	69,30 \pm 1,81 b	677 \pm 18 bc	339 \pm 17 a
10	0	20	180	14,41 \pm 0,30 f	44,00 \pm 1,50 h	716 \pm 26 b	183 \pm 14 e
11	0	35	105	18,10 \pm 0,14 de	65,50 \pm 1,7 bc	500 \pm 0,12 d	212 \pm 11 cd
12	70	20	180	13,65 \pm 0,40 fg	50,80 \pm 1,80 g	311 \pm 6 f	222 \pm 11 c
13	70	35	105	12,63 \pm 0,40 h	61,00 \pm 1,60 cd	653 \pm 16 bc	192 \pm 13 de
14	0	50	30	22,09 \pm 0,70 a	58,71 \pm 2,80 de	413 \pm 25 e	189 \pm 6,0 de
15	35	35	105	19,40 \pm 0,33 c	70,70 \pm 2,80 b	547 \pm 6,0 d	346 \pm 13 a
16	35	20	105	21,07 \pm 0,40 b	61,00 \pm 2,52 cd	623 \pm 40 c	263 \pm 12 b

Todos los extractos obtenidos presentan capacidad antioxidante independientemente de la materia prima original de la que fueron extraídos. Bajo las condiciones ensayadas, el extracto que resultó ser significativamente ($p < 0,05$) mayor en capacidad antioxidante contra el radical ABTS⁺ (451 ± 14 μmol de TE/g muestra) y radicales peroxilos ORAC-FL (912 ± 31 a μmol de TE/g muestra) se obtuvo partiendo directamente de salvado de arroz (*Tabla 6*). El mejor extracto se obtuvo bajo las siguientes condiciones de extracción: 35% de etanol en la solución extractora, temperatura ambiente (20°C) y tiempos de 105 minutos de agitación (150 rpm). Este extracto a su vez, fue el que presentó mayor contenido de polifenoles totales ($71,42 \pm 1,60$ mg de GAE/ g de extracto) y de proteínas ($24,08 \pm 0,63\%$), probablemente globulinas que son solubles en etanol: agua, de entre todas las muestras analizadas. Ambas fracciones podrían estar explicando la capacidad antioxidante resultante (Chanput, 2009).

En la *Tabla 7*, se observa que las condiciones de extracción que permiten obtener el extracto con mejores propiedades antioxidante partiendo de FI-EAE (351 ± 11 y 825 ± 12 μmol de TE/g muestra contra el radical ABTS⁺ y radicales peroxilos, respectivamente) se corresponden con las descritas anteriormente para salvado de arroz consistentes en una solución extractora que contiene un 35% de etanol y 105 minutos de tratamiento con agitación constante con la excepción de que no es necesario utilizar calentamiento a 50°C (*Tabla 7*). Estos resultados permiten afirmar que, bajo nuestras condiciones de ensayo, los mejores extractos antioxidantes a partir de este residuo agroindustrial, se logran utilizando una solución binaria 35: 65 etanol: agua (v/v) y un tiempo de maceración de 105 minutos independientemente de cual sea la materia prima de origen (salvado de arroz o FI-EAE). Los resultados pueden explicarse en función de la mayor solubilidad de los compuestos polifenólicos en la mezcla etanol: agua y la menor viscosidad de dicha solución que permite una mayor transferencia de masa (Dent *et al.*, 2013 y Ghasemzadeh *et al.*, 2015). Como puede observarse en las *Tablas 6* y *7*, estos extractos fueron los que presentaron el mayor y significativo ($p < 0,05$) contenido de compuestos polifenólicos totales ($71,42 \pm 1,60$ y $83,33 \pm 2,00$ mg de GAE/ g de extracto para SA y FI-EAE, respectivamente) lo que da cuenta de las ventajas del uso de esa proporción de etanol: agua.

Comparando ambas materias primas sometidas al mismo tiempo de extracción y solución extractora con 35% de etanol, se observa que existe una diferencia en la temperatura necesaria para obtener la máxima extracción. Esto se explica por el estado fisicoquímico en el que se encuentran los antioxidantes (Gökmen *et al.*, 2009). Partiendo de salvado de arroz sin previo tratamiento enzimático, se extraen principalmente los antioxidantes libres que no interactúan química o físicamente con otras macromoléculas, no requiriendo tratamientos severos de temperatura para su extracción. Mientras que partiendo de FI-EAE se tiene mayormente antioxidantes que no se liberan tan fácilmente de la estructura. Esto es porque los polifenoles libres pasan al sobrenadante (FS-EAE) durante el tratamiento previo con enzimas celulolíticas (*Figura 4*). En esta situación, las mayores temperaturas del proceso (50°C) podrían contribuir a la ruptura del resto de la pared celular no afectada por el tratamiento enzimático permitiendo una mayor extracción de compuestos bioactivos (Ti *et al.*, 2015, Tabaraki & Neteghi, 2011).

A pesar de las evidencias expuestas en la *Tabla 5*, sobre las ventajas de utilizar la FI-EAE por su mayor capacidad antioxidante ORAC respecto al sobrenadante y composición nutricional, ninguno de los extractos obtenidos a partir de esta matriz superó significativamente al obtenido directamente a partir de salvado de arroz en las condiciones de extracción ya discutidas. Si comparamos la capacidad antioxidante contra el radical peróxido del sobrenadante de la EAE (*Tabla 5*) que fue descartado para su uso como materia prima en la presente investigación, observamos que es un 45% menor a la capacidad que presentó el mejor extracto a partir de FI-EAE (460±12 vs 825±12 µmol TE/g de muestra para FE-EAE y FI-EAE respectivamente). Sumado a lo anterior, el uso de enzimas, encarece el proceso de producción y como único tratamiento queda demostrado que no es suficiente. Los compuestos que quedan expuestos durante el proceso de hidrólisis requieren de un segundo proceso de extracción para ser recuperados. En consecuencia, concluimos que podría ser adecuado no extraerlos y utilizar el complejo fibra-compuesto fenólico como vehículo u encapsulante natural para incrementar la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los mismos y recuperar el sobrenadante como tradicionalmente se ha hecho. Los

estudios más recientes sobre EAE en salvado de arroz, recomiendan utilizar una mezcla de enzimas que permitan hidrolizar eficazmente la compleja estructura de la pared celular de esta matriz alimentaria y; así, facilitar la liberación de compuesto de interés en la solución sobrenadante incrementando el rendimiento de su extracción (Marathe *et al.*, 2017, Liu *et al.*, 2017). En el futuro podrían realizarse estudios comparativos empleando ambos procedimientos en paralelo para comparar su efectividad.

Dado que el procedimiento de extracción hidroalcohólica directamente aplicado sobre el salvado de arroz permite obtener un extracto con elevada capacidad antioxidante y que el procedimiento puede ser fácilmente transferible se decidió proceder a una mejor caracterización del mismo para validar su potencial como ingrediente funcional.

4.2.2 -Análisis de correlación entre contenido polifenoles totales y capacidad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de salvado de arroz

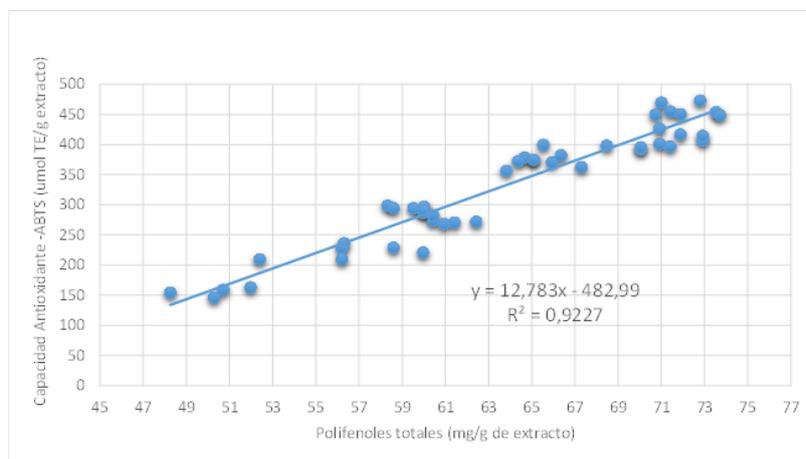


Figura 8-Correlación entre el contenido de polifenoles totales (mg GAE/g extracto) de los extractos y la capacidad antioxidante contra el radical ABTS⁺ (umol TE/g extracto).

Se encontró una alta correlación ($r^2 = 93\%$) entre el contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante contra el radical ABTS⁺ de los extractos partiendo de salvado de arroz (Figura 8). Los resultados sugieren que los

compuestos fenólicos que componen el extracto podrían ser los contribuyentes principales de la capacidad antioxidante frente a este radical de los extractos de salvado de arroz. Estos resultados coinciden con los reportados por Shen *et al.* (2009) para granos de arroz.

Por otra parte, no se encontró correlación entre contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante frente a los radicales peroxilos (ORAC-FL). Los extractos obtenidos contienen diferentes compuestos antioxidantes y en proporciones variables siendo los efectos de los antioxidantes no aditivos para un mismo mecanismo de acción (Prior *et al.*, 2005).

4.3- Validación y optimización del proceso de extracción a partir del salvado de arroz

Para el tratamiento de los resultados obtenidos del análisis de los extractos se utilizó el software estadístico Statgraphics (Centurion XVI Version 16.1.03, Virginia, USA), con el cual se obtuvo el análisis de varianza de los datos, los modelos de regresión ajustados y la optimización de las respuestas planteadas en el diseño central compuesto ya descrito en la metodología.

4.3.1- Análisis del modelo

Los resultados del análisis del modelo para la optimización de las condiciones para obtener un extracto con elevado contenido en polifenoles totales y capacidad antioxidante se muestran en las *Tablas 8 y 9*.

Tabla 8 Nivel de significancia de los factores y sus interacciones en el modelo resultantes del ANOVA.

Coeficiente	Polifenoles totales	ABTS	ORAC
	(mg GAE/g extracto)	(μ mol de TE/g de extracto)	
Valor - P			
A:Etanol (%)	0,0002	0,0001	ns
B:T(°C)	0,0009	ns**	0,0112
C:Tiempo (min)	0,0011	0,0121	ns**
AA	0,0000	0,0000	0,0002
AB	0,0001	0,0001	0,0038
AC	0,0290	0,0678**	0,0199
BB	0,0003	0,0091	0,0199
BC	0,0000	0,0135	ns
CC	0,0008	0,0058	0,0533**

ns= no significativo

$p \leq 0,05$, variables y términos estadísticamente significativas a un nivel de confianza del 95%.

(**) $p \geq 0,10$, variables y términos estadísticamente no significativas a nivel de confianza del 90%.

Valores de $p \leq 0,05$ y $p \leq 0,10$ indican diferencias con un grado de significación del 95 y el 90%, respectivamente.

Para la variable de respuesta capacidad antioxidante contra al radical ABTS (CA-ABTS), el término lineal que involucra a la temperatura y la interacción etanol*tiempo resultó con un valor de p entre 0,05 y 0,10 por lo cual es estadísticamente significativo con 90% de confianza, siendo el resto de los factores estadísticamente significativos con un nivel de confianza del 95%. Estos resultados son similares a los reportados por Tabaraki & Nateghi (2013), quienes en el análisis de la regresión, encontraron que el principal parámetro de extracción de compuestos de salvado de arroz con capacidad antioxidante (DDPPH y FRAP) fue la concentración de etanol de la solución extractora siendo los efectos de la temperatura y el tiempo no significativos. En nuestro caso si bien el tiempo resultó ser significativo, tienen un impacto menor en la variable capacidad antioxidante contra el radical ABTS^{•+} como se discute más adelante (Figura 9-a).

En la variable de respuesta capacidad antioxidante contra al radical peroxilo (CA-ORAC-FL) el término lineal que involucra el % de etanol de la solución extractora

y el tiempo de extracción resultaron no significativos a niveles de confianza del 90 % y de igual modo que la interacción de la temperatura y el tiempo.

Tabla 9-Coeficientes de regresión, valores de r^2 y prueba de falta de ajuste obtenidas para polifenoles totales y capacidad antioxidante medidas por los métodos ABTS⁺ y ORAC-FL, respectivamente.

Coeficiente	Polifenoles totales	ABTS	ORAC-FL
	mg GAE/g extracto	$\mu\text{mol de TE/g de extracto}$	
Constante	88,5800	234,5140	779,6000
A:Etanol (%)	1,0695	12,5042	9,3214
B:T(°C)	-1,4581	-5,5204	-15,7023
C:Tiempo (min)	-0,2374	0,6650	1,4981
AA	-0,0113	-0,1247	-0,1065
AB	-0,0055	-0,0858	-0,0971
AC	-0,0002	0,0030**	0,0146
BB	0,0172	0,1032	0,2365
BC	0,0033	0,0106	ns
CC	0,0005	-0,0047	-0,0096
R2	82,96	90,23	60,8370
RDS	1,06	15,93	76,6640
Falta de Ajuste (p-valor)	<0,05	>0,05	>0,05

En la *Tabla 9* se presentan los coeficientes de los modelos de regresión, los valores de r^2 y la prueba de falta de ajustes obtenidos para PT, CA-ABTS y CA-ORAC-FL. El % de etanol presentó el coeficiente de regresión lineal más alto y positivo tanto para PT como para capacidad antioxidante contra el radical ABTS⁺ y contra radicales peroxilos, respectivamente (*Tabla 9*). Mientras el coeficiente cuadrático presentó signo negativo y baja magnitud indicando que el comportamiento describe una parábola convexa, es decir con un punto máximo por encima del cual la respuesta disminuye (*Figura 9-a y 9-b*).

El coeficiente de regresión lineal para temperatura es de signo negativo para las tres variables de respuesta analizadas, lo que significa que tiene un comportamiento inverso con la respuesta. La magnitud de dicho coeficiente en términos absoluto es más bajo para polifenoles totales y CA-ABTS que para la CA-ORAC-FL. Esto significa que los cambios en dicha variable impactan más sobre la CA-ORAC-FL que sobre CA-ABTS y el contenido de polifenoles totales. La variable independiente temperatura es estadísticamente no significativo a un

nivel de confianza del 90% para la CA-ABTS (*Tabla 8*). Sin embargo, el término cuadrático para dicha variable es positivo para las 3 variables de respuesta evaluadas por lo tanto el comportamiento de esta variable sobre la respuesta también describe una parábola pero cóncava (*Figura 9-a y 9-b*).

El coeficiente de regresión lineal para la variable tiempo (min) resultó negativo para PT y positivo para la CA-ABTS y CA-ORAC-FL. La variable tiempo, es significativo solamente para PT y CA-ORAC-FL (*Tabla 8*). Los términos cuadráticos presentan signo positivo y negativo respectivamente para polifenoles totales y capacidad antioxidante describiendo una parábola convexa siendo más pronunciada para CA-ORAC-FL que para CA- ABTS (*Figura 9-a y 9-b*).

La prueba de falta de ajuste (lack of fit) está diseñada para determinar si el modelo seleccionado es adecuado para describir los datos observados ó si se debería ajustar a otro modelo. La prueba se realiza comparando la variabilidad de los residuos del modelo actual con la variabilidad entre observaciones obtenidas en condiciones repetidas de los factores. En la *Tabla 9*, se presenta el resultado de dicha prueba para cada modelo, si el valor-P para la falta de ajuste es menor que 0,05, existe una falta de ajuste estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95,0%. Esto significa que el modelo así ajustado no explica la variable de respuesta y se debería buscar otro modelo de mayor ajuste. Para polifenoles totales, todos los factores resultaron significativos ($p < 0,05$) y la regresión presenta un r^2 del 83%. Dado que el valor-P para la falta de ajuste en la *Tabla 9*, es menor que 0,05, existe una falta de ajuste estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95,0%. Esto significa que el modelo así ajustado no representa adecuadamente a los datos y que por lo tanto no debe utilizarse para decidir sobre los ensayos ni hacer recomendaciones. Para la capacidad antioxidante contra el radical peróxilo (ORAC-FL) el valor de r^2 es de 61% y la prueba de ajuste dio significativa (p -valor $> 0,05$) lo que confirma que el modelo de regresión hallado es aceptable en la predicción de la respuesta y explica el comportamiento en un 61% ($r^2 =$ variabilidad explicada por el modelo/variabilidad total). Esta relativa baja r^2 , puede deberse a alguna de las ventajas del método ORAC-FL por su sensibilidad principalmente a cambios de pH (Schaich & Xie, 2015, Prior, 2014).

La capacidad antioxidante contra radical ABTS, presentó un r^2 mayor (90%) que contra el radical peroxilo (ORAC-FL) y la prueba de ajuste dio significativa demostrando que el modelo es confiable y los resultados hallados se ajustan al modelo con un 95% de confianza. Además, dado su valor de r^2 , solamente un 10% de la varianza total no es atribuida a las variables independientes (tiempo de agitación, temperatura y %etanol en la solución extractora). El método ABTS resultó ser más estable (Shahidia & Zhong, 2015) que el de ORAC-FL explicando en mayor proporción la respuesta ante los cambios en las variables independientes.

Los moldelos cuadráticos ajustados para PT, CA-ABTS y CA-ORAC-FL se presentan en las ecuaciones 1, 2 y 3 respectivamente, los valores de las variables están especificados en sus unidades originales:

$$Y(PT) = 88,58 + 1,07 * E - 1,46 * T - 0,24 * t - 0,011 * (E)^2 - 0,005(E * T) + 0,017 * (T)^2 + 0,003 * (T * t) + 0,0005 * (t)^2$$

$$Y(CA - ABTS) = 234,51 + 12,50 * E - 5,52 * T + 0,66 * t - 0,12(E)^2 - 0,08(E * T) + 0,003(E * t) + 0,10(T)^2 + 0,01(T * t) - 0,005(t)^2$$

$$Y(CA - ORAC - FL) = 779,60 + 9,32 * E - 15,70 * T - 1,50 * t - 0,11(E)^2 - 0,10(E * T) + 0,01(E * t) + 0,23(T)^2 - 0,01(t)^2$$

Donde, Y (PT): Polifenoles totales en mg GAE/g muestra; Y (CA-ABTS): Capacidad antioxidante contra el radical ABTS ($\mu\text{mol TE /g muestra}$), Y (CA-ORAC-FL): Capacidad antioxidante contra el radical peroxilo ($\mu\text{mol TE /g muestra}$), E: %Etanol de la solución extractora; T: temperatura de extracción en $^{\circ}\text{C}$ y t: tiempo de extracción en minutos.

La *Tabla 10*, presenta los valores de capacidad antioxidante promedio, generados a partir de los modelos ajustados (ecuaciones 2 y 3) y los límites de confianza de 95%.

Tabla 10-Valores observados, valores ajustados por el modelo matemático y límites de confianza para la capacidad antioxidante del extracto seleccionado.

	Observados	Ajustados	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
ORAC ($\mu\text{mol TE /mg muestra}$)	925	793	770	817
ABTS ($\mu\text{mol TE /mg muestra}$)	457	440	422	459

A partir de los resultados expuestos en la *Tabla 10*, podemos afirmar con un 95% de confianza que utilizando los modelos ajustados y las condiciones del sistema seleccionado (35% de etanol/20°C y 105 min de agitación) se pueden obtener extractos con valores de capacidad antioxidante contra el radical ABTS de entre 422 y 459 $\mu\text{mol TE/g}$ de extracto y de 770 a 817 $\mu\text{mol TE/g}$ de extracto contra el radical peroxilo (ORAC-FL).

En las *Figuras 9-a* y *9-b*, de efectos principales se muestra como cada factor significativo del modelo afecta la capacidad antioxidante. Las curvas indican los cambios estimados en capacidad antioxidante (ABTS y ORAC-FL) cuando cada factor se mueve de su nivel bajo a su nivel alto, con todos los otros factores constantes en un valor a mitad de camino entre sus valores bajos y altos.

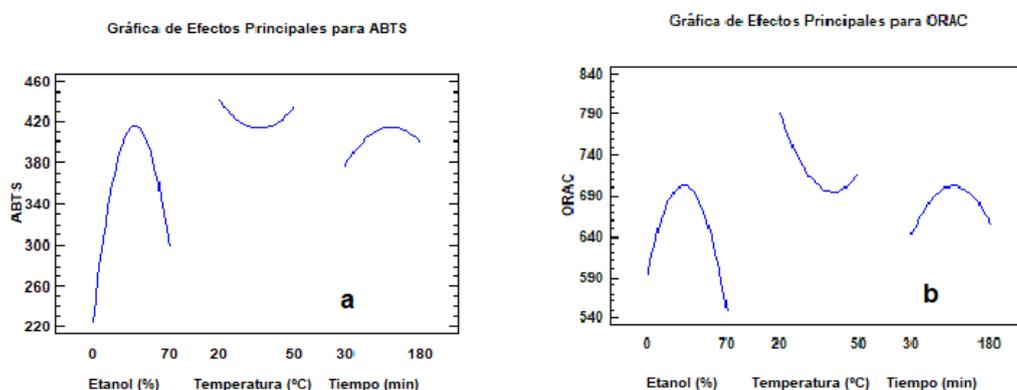


Figura 9-Efectos principales para la capacidad antioxidante de los extractos contra el radical ABTS (a) y radical peroxilo –ORAC-FL (b).

Para el caso de capacidad antioxidante contra el radical ABTS (9-a) se observa claramente como el % de etanol en la solución extractora tiene mayor impacto en la respuesta que el tiempo, a pesar de que ambos resultaron ser estadísticamente significativos con un nivel de confianza del 95%. Con 0% de etanol la capacidad antioxidante es cercana a 225 μmol de Trolox/g muestra mientras que en valores más altos de etanol en la solución extractora ofrece valores del orden de 298 μmol de TE/g muestra, esa diferencia cercana a los 73 μmol de Trolox/g muestra, es lo que se conoce “efecto principal” de % de etanol, es decir, a medida que la diferencia entre el nivel bajo y alto es más grande, el impacto de la variable sobre la variable de respuesta es mayor. El mismo comportamiento fue observado por Das *et al.* (2017), trabajando con extractos etanol: agua de salvado de arroz morado y negro donde a concentraciones mayores a 30% de etanol el contenido de polifenoles totales disminuye, debido a disminución de la solubilidad de compuestos fenólicos en la fase líquida por el cambio en la polaridad de la solución. La relación entre la capacidad antioxidante de los extractos de salvado de arroz y las variables independientes se muestra más adelante en la *Figura 13*. Si se observa la variable tiempo de extracción que también resultó estadísticamente significativa ($p < 0,05$) para el modelo de ajuste, los cambios de valores mínimos (30 minutos) a los valores máximos (180 min) tienen un impacto menor en la variable capacidad antioxidante contra el radical ABTS. De acuerdo a estos resultados se puede concluir que la variable que más influye en la capacidad antioxidante contra el radical ABTS es el % de etanol en la solución extractora. Estos resultados coinciden con los encontrados por Chandrika-Pathirana & Shahid (2005), trabajando con extractos de salvado de trigo.

Para la capacidad antioxidante contra el radical piróxilo (ORAC-FL), el efecto principal y estadísticamente significativo ($p < 0,05$) es la variable temperatura, a 20°C se alcanza un valor de 794 μmol de Trolox/g muestra y a 50°C los 717 μmol de Trolox/g muestra.

Al observar la *Figura 10*, que muestra los principales efectos de las interacciones: % de etanol-temperatura (AB), % etano-tiempo (AC** con 90% de confianza) y

temperatura-tiempo (BC) para capacidad antioxidante contra radical ABTS (a) se puede concluir que ambas son significativas es decir que el efecto de modificar uno de los factores (aumentar o disminuir) influye en el otro factor y viceversa. Esto mismo se verifica para las interacciones % de etanol-temperatura (AB) y etanol- tiempo (AC) para la capacidad antioxidante contra el radical peroxilo (ORAC-FL)

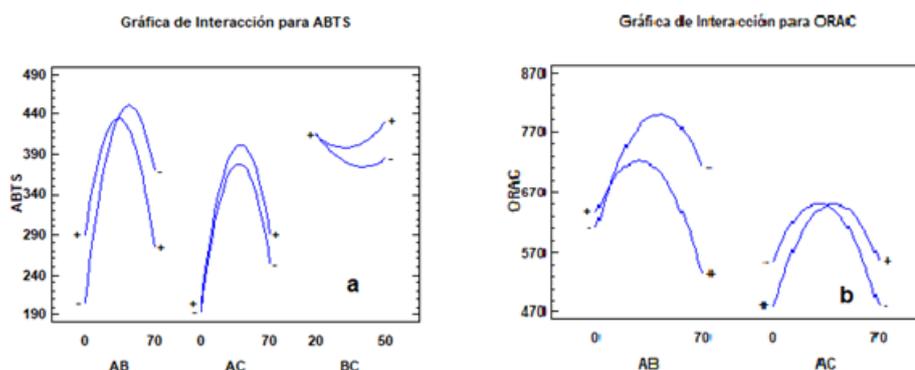


Figura 10-Efectos principales de las interacciones sobre la capacidad antioxidante de los extractos contra los radicales ABTS⁺ (a) y peroxilo (b)

4.3.2- Análisis de las gráficas de contorno y superficies de respuesta

Para encontrar las condiciones tecnológicas que permitan optimizar la capacidad antioxidante, y visualizar la influencia que sobre la misma tienen los distintos factores utilizados en el diseño experimental se realizaron *Figuras* de contornos y de superficie de respuesta. Estas gráficas de contorno (*Figura 11 y 12*), muestran los contornos para Y (capacidad antioxidante) en función del % de etanol y temperatura (°C) del sistema para un tiempo constante de agitación. Se puede ver que independientemente del método de evaluación de la capacidad antioxidante, los mejores resultados se obtienen para temperaturas cercanas a 20°C y contenido de etanol medio donde la curvatura del contorno se hace máxima.

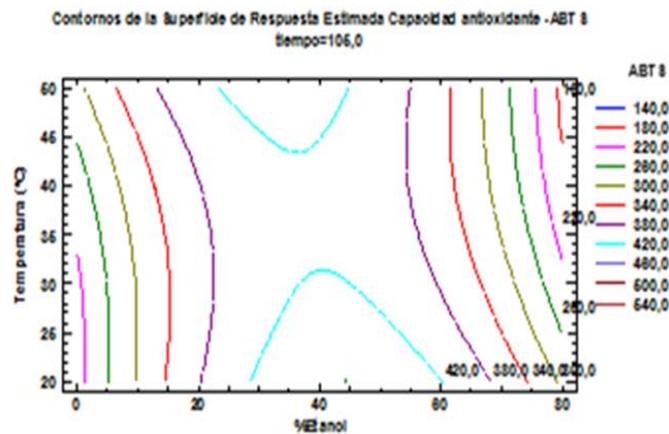


Figura 11-Gráficos de contornos de la superficie de respuesta estimada para capacidad antioxidante contra el radical ABTS⁺.

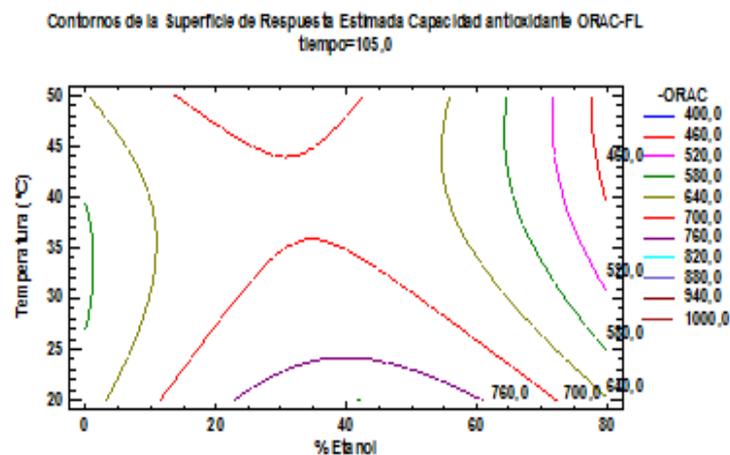


Figura 12-Gráfico de contornos de la superficie de respuesta estimada para capacidad antioxidante contra el radical peroxilo (ORAC-FL).

La mejor manera de expresar la relación entre las variables independientes (% etanol, temperatura y tiempo) y las variables dependientes (CA- ABTS y CA-ORAC-FL) es trazar las gráficas de superficie de respuesta generado por el modelo (Olawoye & Kadiri, 2016).

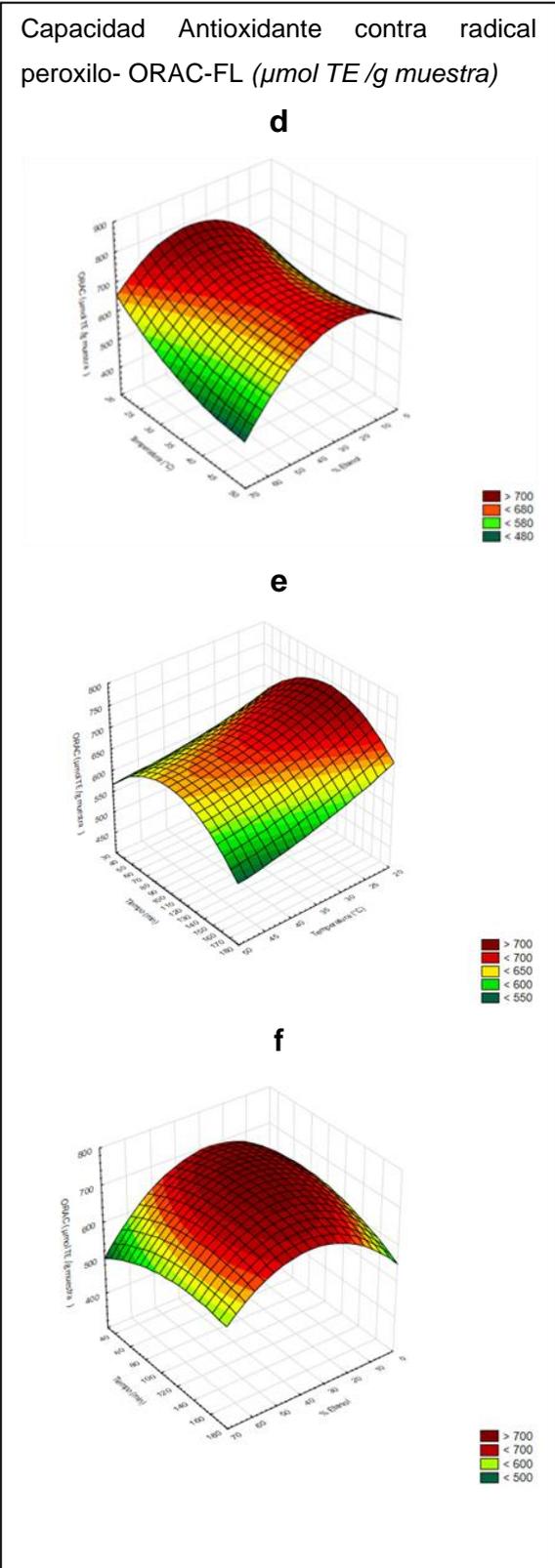
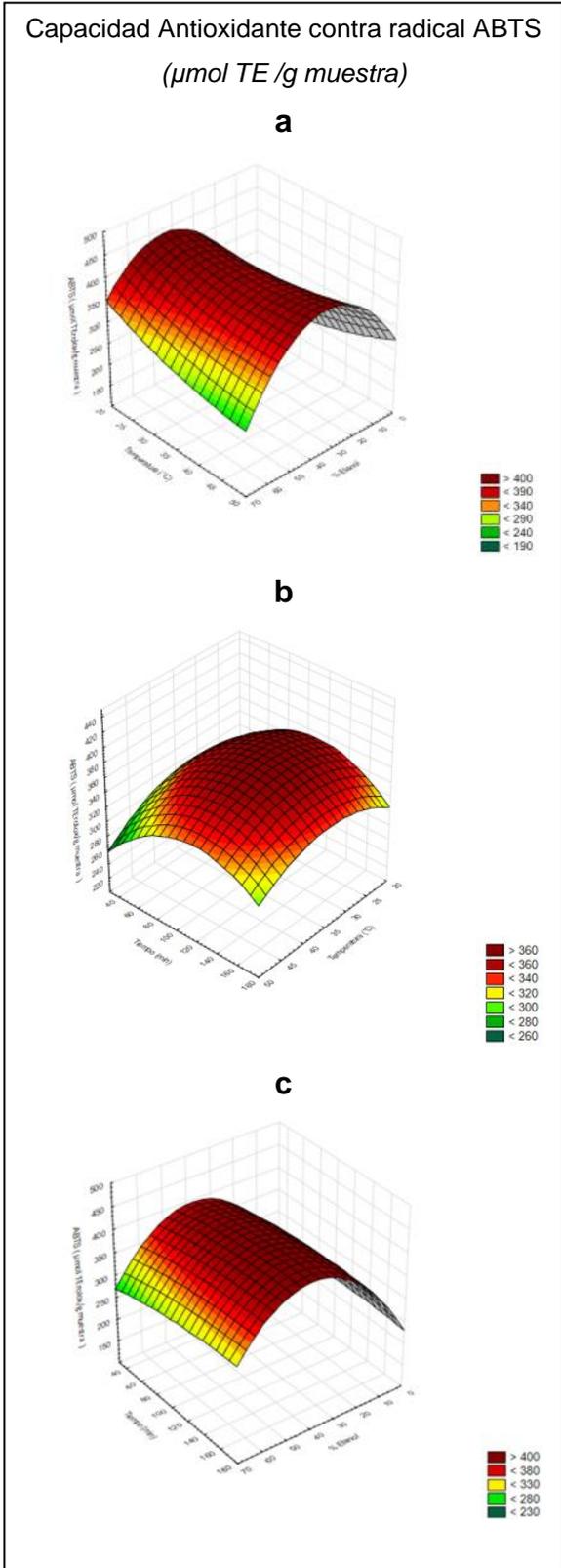


Figura 13-Efecto de las variables temperatura ($^{\circ}\text{C}$), tiempo (min) y contenido en etanol (%) sobre la capacidad antioxidante contra los radicales ABTS^+ ($\mu\text{mol TE/g muestra}$) (a, b, c) y peroxilo (d, e, f) de los extractos obtenidos a partir de salvado de arroz.

Hasta la fecha no se han encontrado trabajos de optimización por la metodología de superficie de respuesta con extractos antioxidantes de salvado de arroz íntegro por métodos simples de extracción como el de maceración utilizado en el presente trabajo.

La *Figura 13-a*, muestra la interacción entre concentración del solvente y la temperatura de extracción mientras se mantiene constante el tiempo de extracción en el punto central (0). La gráfica adquiere forma de “silla de montar”, mostrando que la máxima capacidad antioxidante contra el radical ABTS⁺ se logra con % de solvente medios entre 30 y 40% y independientemente de la temperatura de extracción. Esto se explica por la solubilidad de los compuestos polifenólicos (fuertemente correlacionados con la capacidad antioxidante contra el radical ABTS⁺, *Figura 8*), que es más alta en mezclas agua: etanol respecto a 100% agua o 100% etanol (Dent, *et al.*, 2013, Ghasemzadeh *et al.* 2015).

En la *Figura 13-d* para CA contra el radical peroxilo (ORAC-FL), la interacción entre % etanol y temperatura manteniendo el tiempo constante es mayor que para ABTS, es decir, al aumentar la temperatura y el %de etanol la capacidad antioxidante se ve marcadamente disminuída. En cambio, la temperatura cercana a la ambiente y % de etanol intermedios marcan una región de alta capacidad antioxidante contra los radicales peroxilos (ORAC-FL). Esta variable de respuesta a diferencia de la anterior, es afectado en mayor magnitud por el coeficiente de regresión lineal temperatura y la interacción de %etanol * temperatura (*Tabla 9*).

Tabaraki & Nateghi (2011), evaluaron la capacidad antioxidante de extractos de salvado de arroz obtenidos por extracción asistida por ultrasonido empleando los métodos DPPH y FRAP. Los autores encontraron que un aumento gradual de la capacidad antioxidante con el aumento del % de etanol (65 y 67% para DPPH y FRAP, respectivamente) y a la temperatura de 51°C se obtuvo óptima capacidad antioxidante; por encima de dichos valores se observó un decrecimiento de esta propiedad. Estos resultados difieren del comportamiento encontrado en maceración simple pudiendo explicarse por el método de extacción y las diferencias propias de los métodos antioxidantes.

En la *Figura 13-b* se muestra la interacción entre el tiempo de extracción y la temperatura sobre la capacidad antioxidante el radical ABTS⁺ manteniendo la concentración de etanol en el punto central (0). La temperatura presenta efectos lineales no significativos sobre la CA-ABTS, mientras que si son significativos los términos cuadráticos y la interacción entre tiempo y temperatura. Se observa que el incremento simultáneo de la temperatura y el tiempo de extracción disminuyeron la capacidad antioxidante. Este comportamiento coincide con el reportado por Olawoye & Kadiri, (2016) para extractos de amaranto. Bajo estas condiciones aumentan las posibilidades de oxidación de los compuestos fenólicos (Lapornik *et al.*, 2005). Los máximos valores de capacidad antioxidante encontrados para el radical ABTS⁺ se obtienen en tiempo de extracción intermedios y temperatura ambiente. Tabaraki & Nateghi, (2011) reportan que con tiempos de extracción moderados (45 min), se favorece la extracción de polifenoles del salvado de arroz y por tanto aumenta su capacidad antioxidante. En dicho trabajo el tiempo máximo de extracción fue de 45 minutos y temperaturas de 51 °C. Estas condiciones favorecieron el debilitamiento del tejido vegetal y consecuentemente una mayor liberación de compuestos con asistencia de ultrasonido. En la *Figura 13-b*, se observa que a temperatura ambiente la máxima capacidad antioxidante se obtiene con tiempos de extracción que rondan los 105 minutos pudiendo existir un efecto de compensación entre el tiempo y la temperatura respecto a los resultados de Tabaraki & Nateghi, (2011). El manejo de temperaturas cercanas a 20°C podría llegar a ser más ventajoso desde el punto de vista del consumo energético a nivel industrial. En el caso de la capacidad antioxidante contra el radical peroxilo (*Figura 13-e*), se observa claramente un impacto de la temperatura sobre la capacidad antioxidante independientemente del tiempo de extracción empleado. A medida que la temperatura de extracción aumentó la CA -ORAC-FL, disminuye encontrando los valores máximos a temperatura ambiente y tiempos intermedios de agitación en torno a los 105 minutos.

Por último, la interacción entre el tiempo y el % de etanol manteniendo constante la temperatura 13-c y 13-f muestra que independientemente del tiempo de extracción, altas concentraciones de etanol en la solución extractora afecta negativamente la CA de los extractos obtenidos. Esto se explica por la solubilidad

de los compuestos fenólicos en la solución que se hace máxima a concentraciones medias de etanol coincidiendo con lo señalado en la *Figura 13-a*. Por otra parte, los máximos valores de capacidad antioxidante contra el radical ABTS⁺ (13-c) se obtienen con un rango amplio de tiempos de extracción y % de etanol. En cambio, la mayor CA-ORAC-FL está concentrada en una zona central de interacción de tiempos y % de etanol (13 f).

4.3.3- Condiciones óptimas para la extracción de antioxidantes del salvado de arroz

En la *Tabla 11*, se muestra la combinación de los niveles de los factores que maximiza la capacidad antioxidante, medida por ambos métodos, ajustado sobre la región indicada. Del análisis estadístico y ajustes de los modelos obtenidos puede concluirse que el valor óptimo de capacidad antioxidante fue de 451 y 799 μmol de TE/g de extracto para ABTS y ORAC-FL, respectivamente. En las condiciones ensayadas se puede afirmar que con un 95% de confianza que estos resultados son reproducibles y que para alcanzarlos sería necesario aumentar el contenido de etanol en la solución extractora (entre 42 y 44%), mantener la temperatura en 20°C y lograr un tiempo de extracción entre los 106 y 110 minutos.

Tabla 11-Optimización de las condiciones de extracción para obtener una elevada capacidad antioxidante (ABTS y ORAC-FL).

Factor	Bajo	Alto	Óptimo -ABTS	Óptimo - ORAC-FL
Etanol (%)	0	70	44,38	42,22
Temperatura (°C)	20	50	20	20
Tiempo (min)	30	180	106,38	110,47
Valor óptimo (μmol de TE/g de extracto)			451,37	798,69

4.4-*Caracterización nutricional de extracto seleccionado*

En el *Tabla 12*, se presenta la caracterización nutricional del extracto seleccionado en el apartado anterior que se obtuvo empleando 35% de etanol como solución extractora, 20°C durante 105 min.

Tabla 12-Composición nutricional del extracto antioxidante seleccionado para su uso como ingrediente alimentario. Los datos se expresan como g/100g de materia seca. Los resultados representan el valor medio \pm SD de las determinaciones realizadas por triplicado

	Extracto antioxidante (Fracción soluble)
Proteínas totales	12,74 \pm 0,13
Lípidos totales	3,39 \pm 0,06
Fibra dietética	2,23 \pm 0,10
Cenizas	4,82 \pm 0,07
Carbohidratos totales*	77,00 \pm 0,02

*Carbohidratos disponibles obtenidos por diferencia (MS- Σ Lípidos totales, proteínas totales, cenizas, fibra dietética)..

Se ha logrado obtener un extracto de salvado de arroz principalmente rico en proteínas (12,74 g/100g de materia seca) y en carbohidratos (77,00 g/100g materia seca). Estos resultados son coherentes con la solución extractora utilizada mayoritariamente compuesta por agua (etanol: agua 35:65 v/v) que permite extraer la mayoría de los compuestos solubles presentes en el salvado de arroz principalmente los carbohidratos solubles y las proteínas. El contenido de proteínas presente en el extracto antioxidante es similar al contenido total que se ha reportado para el SA de entre 10 y 17 g/100 g (*Tabla 1*) en la bibliografía y en el cuantificado en la materia prima utilizada en esta investigación (12, 46 g/100g de MS, *Tabla 4*) pudiendo sugerir que bajo las condiciones ensayadas, la mayor parte de las proteínas presentes en el salvado de arroz se recuperan en el extracto antioxidante.

El contenido de fibra dietética total es similar al reportado por Faria *et al.* (2012) para fibra soluble en el salvado de arroz entero (1.48 ± 0.02). Por tanto, se puede sugerir que el total de fibra soluble es recuperada en el extracto antioxidante bajo las condiciones de extracción seleccionadas. El contenido de cenizas promedio del extracto de SA es inferior al reportado previamente en la literatura para el salvado de arroz (7 a 12 g/100g) dado que parte de las cenizas quedan retenidas en la fracción insoluble del extracto como se verá más adelante.

4.5- Caracterización de la fracción de compuestos fenólicos del extracto antioxidante del salvado de arroz.

4.5.1- Composición de la fracciones de alto y bajo peso molecular del extracto de salvado de arroz

A continuación, en la *Tabla 13*, se presenta el rendimiento (%) y la composición de las fracciones de alto (FAPM) y bajo peso molecular (FBPM) resultantes de la separación del extracto seleccionado por membranas de ultrafiltración.

Tabla 13- Contenido de ácidos fenólicos en las fracciones de alto (FAPM) y bajo (FBPM) obtenidas por ultrafiltración (3KDa) a partir del extracto de salvado de arroz seleccionado.

	Rendimiento	Acido Clorogénico	Ácido Ferúlico	Capacidad antioxidante (ORAC)
	(%)	(mg/100g de extracto)		(μ moles de TE/g extracto)
FAPM (PM>3KD)	68	15,12 \pm 1,20	45,64 \pm 0,82	776 \pm 17
FBPM (PM<3KDa)	32	34,18 \pm 1,27	14,33 \pm 0,58	1709 \pm 59

Como se observa en la *Tabla 13*, la separación del extracto seleccionado mediante membranas de ultrafiltración (cut-off 3 kDa) permitió confirmar que está constituido por un 68% de compuestos con tamaño mayor a 3 kDa y 32% de compuestos con menor peso molecular. A su vez, al analizar por UHPLC- UV dichas fracciones se pudo constatar que la FAPM se constituye principalmente por ácido ferúlico, mientras que la de FBPM de ácido clorogénico (*Figura 14*).

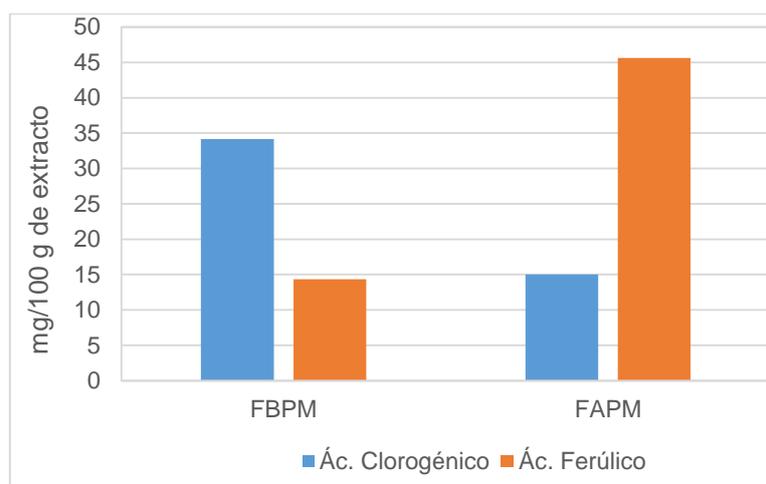


Figura 14- Contenido de ácidoclorogénico y ácido ferúlico (mg/100g de extracto) de las fracciones de bajo peso molecular (FBPM) y alto peso molecular (FAPM) analizadas por UHPLC-UV.

Del análisis de capacidad antioxidante de cada una de las fracciones contra el radical peroxilo (ORAC) se pudo constatar que la FBPM presenta mayor capacidad antioxidante (1709 ± 59 μ moles de TE/g extracto) que la FAPM (776 ± 17 μ moles de TE/g extracto) en su evaluación individual. Sin embargo, teniendo en cuenta la proporción constitucional de cada una de ellas en el extracto (68% FAPM y 32% FBPM, respectivamente) se puede inferir que es la FAPM rica en ácido ferúlico es la que mayormente contribuye la capacidad antioxidante del extracto seleccionado (912 ± 31 μ moles de TE/g extracto-*Tabla 5*).

Recientemente Wang *et al.* 2015, identificaron un nuevo glucósido del salvado de arroz, (p-hidroxibenzoato de metilo) como un nuevo compuesto que mostró una actividad antioxidante moderada contra el radical ABTS a partir de extractos obtenidos con acetato de etilo. Dado el alto contenido de carbohidratos del extracto seleccionado (*Tabla 12*), podría ser esperable que glucósidos y/o flavonoides glicosilados no evidenciados en el estudio cromatográfico puedan también estar aportando a la capacidad antioxidante.

4.5.2- Caracterización de la fracción de compuestos fenólicos del extracto de salvado de arroz

La *Figura 15*, muestra el cromatograma obtenido por UHPLC con detección UV correspondiente al perfil de compuestos fenólicos del extracto obtenido del SA. En tales condiciones se obtuvieron $71,42 \pm 1,60$ mg de GAE/g de extracto. En el perfil cromatográfico se identificaron los picos correspondientes a ácido gálico, ácido clorogénico, ácido ferúlico derivados del ácido ferúlico y flavonas. La cuantificación de compuestos fenólicos solo fue posible para ácido clorogénico y ácido ferúlico (*Tabla 14*).

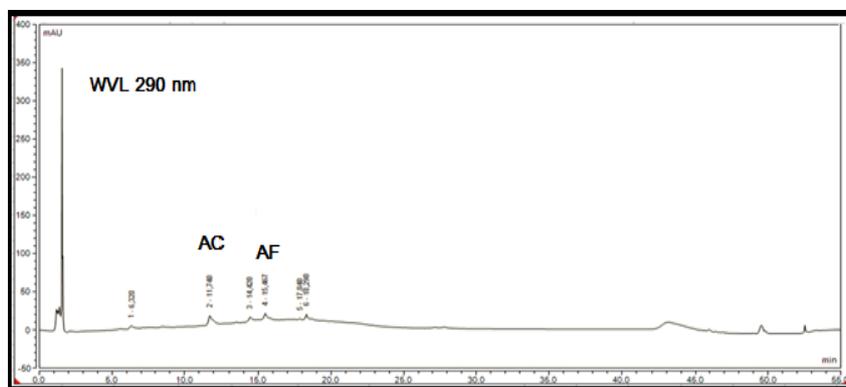


Figura 15-Cromatograma obtenido mediante cromatografía líquida de ultra alta presión (UHPLC) y detección UV a 290 nm del extracto soluble del salvado de arroz (*Oryza sativa*). Picos: 1- ácido gálico, 2- ácido clorogénico, 3- derivado del ácido ferúlico, 4- ácido ferúlico, 5 y 6 flavonoides.

El análisis cromatográfico de este extracto a 358 nm (no mostrado), no permitió corroborar la presencia de flavonoides tales como rutina y quercetina reportados en la bibliografía por otros autores (Reza *et al.*, 2015), solamente se identificaron en base al espectro UV-Vis flavonas que eluyeron a tiempos de retención de 17 y 18 minutos, respectivamente.

Tabla 14-Contenido de ácidos fenólicos (g/100g fracción soluble). Los análisis se realizaron por sextuplicado. Los picos cromatográficos se detectaron a 290 nm.

Compuesto fenólico	(mg/100g de extracto)
Ácido Clorogénico	44,84±2,25
Ácido Ferúlico	12,44±0,60

Ghasemzadeh, *et al.* (2015), encontraron contenidos similares de ácido ferúlico (12,28 mg / 100 g de materia seca), e inferior en ácido clorogénico (11,12 mg / 100 g de materia seca) para extractos obtenidos por ultrasonido con etanol-agua (50:50, v / v). Los autores concluyen que los ácidos clorogénico, ferúlico y gálico (11,56 mg / 100 g materia seca) fueron los compuestos fenólicos mayoritarios para los extractos obtenidos bajo sus condiciones experimentales.

Bajo nuestras condiciones experimentales el extracto seleccionado es rico principalmente en ácido clorogénico. Esto puede explicarse porque el ácido clorogénico se encuentra libre (Ti *et al.* 2014), por lo que es más fácil de extraer por maceración en solución binaria (etanol:agua) mientras que los ácidos ferúlico y gálico se podrían encontrar mayoritariamente ligados, esterificados con arabinosilanos y hemicelulosas en la capa de aleurona y el pericarpio, a la pared celular del salvado de arroz (Wang, 2015, Ti *et al.* 2014, Kumar & Pruthi, 2014, Butsat & Siriamornpun, 2010, Manach *et al.*, 2004, Adom, *et al.* 2002). Por tanto, podrían quedar principalmente retenidos en la fracción insoluble del extracto seleccionado que se analiza más adelante en el documento.

4.5.3- Efectos de la digestión oral gastrointestinal en la bioaccesibilidad de los antioxidantes del extracto.

El valor de IC₅₀ se define como la cantidad de extracto necesaria para inhibir el 50% de radicales libres presentes en el medio. Los valores más bajos de IC₅₀ indican una mayor actividad antioxidante. La Tabla 15 muestra los valores de IC₅₀ del extracto seleccionado y sus digeridos. El extracto presentó valores IC₅₀ de 0,14±0,01 y 4,50±0,08 mg/mL contra radicales peroxilos y ABTS^{•+}, respectivamente. Estos resultados indican que el extracto seleccionado es más

eficiente en inhibir al radical peroxilo que al radical ABTS requiriéndose una concentración de extracto 32 veces menor presente en el medio. Los radicales peroxilos son los que se encuentran presentes a nivel fisiológico (Shahidia & Zhong, 2015, Prior, 2014) siendo estos resultados promisorios en su potencial comportamiento *in vivo*. La gran mayoría de los artículos revisados reportan valores de IC₅₀ contra el radical DPPH en la fracción lipídica del salvado de arroz, no habiéndose encontrado referencias hasta la fecha para extractos hidroalcohólicos contra los radicales ABTS⁺ y peroxilo.

Tabla 15 - Efecto de la digestión sobre la capacidad antioxidante expresada como valores IC₅₀ medidos por los métodos ORAC-FL y ABTS, respectivamente. Los valores se presentan en mg/ml. Los resultados se expresan como valores medios ± desviación estándar determinada por sextuplicado. Letras diferentes en una misma columna, indican diferencias significativas (p<0,05) para la prueba t de diferencia entre medias.

	ORAC-FL mg/ml	ABTS mg/ml
Extracto de SA	0,14±0,01 b	4,50±0,08 b
Digerido del extracto de SA	0,17±0,01 a	5,83±0,23 a

Tras someter al extracto seleccionado a procesos de digestión oral gastrointestinal *in vitro* (Hollebeeck *et al.*, 2013) se observa una pérdida significativa (p<0,05) de capacidad antioxidante del orden del 21 y 29% contra el radical peroxilo y ABTS⁺, respectivamente (*Tabla 15*).

La disminución en la capacidad antioxidante observada tras la digestión, puede explicarse en base de la degradación de los ácidos ferúlico y clorogenico (principales compuestos identificados en el extracto seleccionado). Esto se sustenta en la naturaleza química de dichos ácidos donde predominan los grupos OH (*Figura 1*) y frente a los cambios de pH que transcurren en la simulación gástrica los mismos pueden ser disociados y por tanto contribuir a la pérdida de capacidad antioxidante. A pH neutro algunos fenólicos han mostrado actividades pro-oxidantes, mientras que a pH más ácidos muestran capacidad antioxidante (Moran *et al.* 1997 citado por Ydjedd *et al.* (2017). Resultados similares fueron

reportados por Fernández-Gómez *et al.* (2016), trabajando con extractos acuosos de café. Dichos autores reportan pérdidas de capacidad antioxidante evaluadas por el método de ABTS y ORAC debido a los cambios de pH sufridos durante el proceso de simulación gastrointestinal que degradan los compuestos fenólicos.

Los trabajos de Ydjedd *et al.* (2017), con extractos del fruto de algarrobo encontraron que bajo las condiciones intestinales, la disminución de la actividad antioxidante (ORAC, FRAP, y DPPH) en extractos no encapsulados puede atribuirse al hecho de que algunos compuestos fenólicos transforman su estructura generando otras propiedades químicas debido a su sensibilidad al pH neutro. Dichos autores demostraron que la encapsulación de extractos es una alternativa para preservar la CA a lo largo del TGI. Esta ruta deberá ser explorada en futuros trabajos con el extracto seleccionado de SA.

El producto de la digestión del extracto seleccionado, se analizó por UHPLC-DAD bajo las condiciones ya descritas. En la *Figura 16* se muestra el cromatograma correspondiente al producto de la digestión del extracto seleccionado. En esta muestra se pudo cuantificar cantidades de $11,60 \pm 0,63$ mg de ácido clorogénico/100 g de digerido y $4,94 \pm 0,44$ mg de ácido ferúlico/100 g de digerido (*Figura 16*). Esos resultados permiten afirmar que tanto el ácido ferúlico como el clorogénico presentes en el extracto son potencialmente absorbibles en el TGI.

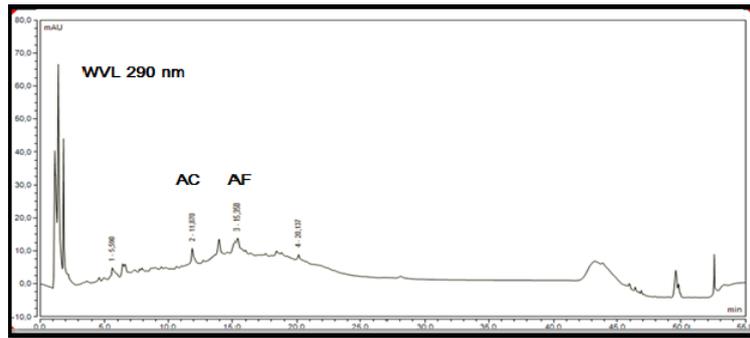
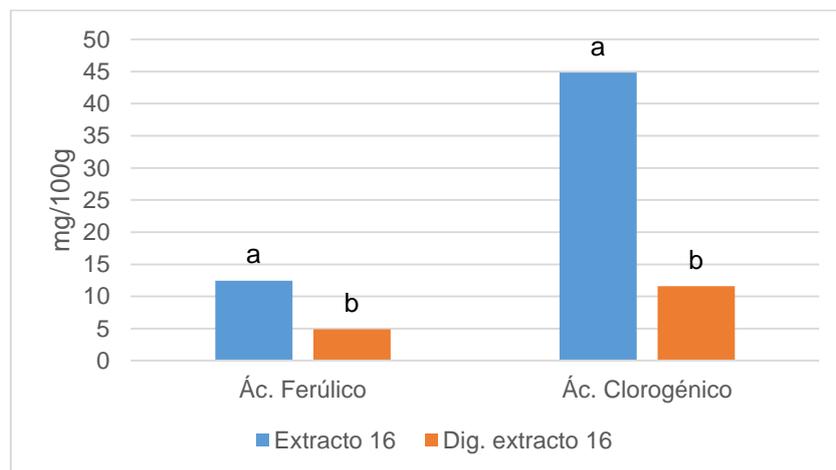


Figura 16-Cromatograma obtenido por cromatografía líquida de ultra alta presión (UHPLC) y detección 290 nm de los digeridos del extracto soluble del salvado de arroz (*Oryza Sativa*). Picos: 1- ácido gálico, 2-ácido clorogénico, 3- derivado del ácido ferúlico y 4- ácido ferúlico.

Si se compara la cantidad (mg/100g) de estos compuestos presentes en el extracto seleccionado en comparación a la cantidad encontrada en el digerido resultante de la simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro* (Figura 16) se observa que aproximadamente se recupera en el TGI un 40% del total del ácido ferúlico del extracto y un 25% del total de ácido clorogénico.



Letras diferentes entre barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$), según prueba t diferencia entre medias.

Figura 17-Contenido de ácido clorogénico y ácido ferúlico (mg/100g de extracto) presentes en el extracto seleccionado y su digerido determinado por UHPLC-DAD

Estos resultados permiten observar que si bien la concentración de ácido ferúlico libre en el extracto antioxidante es menor que la de clorogénico (*Tabla 14*), se recupera una mayor proporción del mismo en los digeridos indicando que podría llegar a tener una biodisponibilidad potencial mayor que el ácido clorogénico. Otra posible razón, que podría explicar el comportamiento observado es la transformación del ácido clorogénico a ácido cafeico tras someter el extracto a la hidrólisis enzimática simulada. Esto podría haber determinado un detrimento en la cuantificación por una menor detección de clorogénico bajo las condiciones de experimentales por UHPLC-DAD.

4.6- Caracterización del residuo insoluble recuperado durante el proceso de obtención del extracto antioxidante de salvado de arroz

El residuo resultante de la obtención del extracto antioxidante (*Figura 5*), fue caracterizado desde el punto de vista nutricional y como potencial ingrediente funcional fuente de fibra antioxidante para ser incorporado en alimentos.

4.6.1- Validación del valor nutricional del nuevo ingrediente

A continuación, en la *Tabla 16*, se presenta la composición nutricional del residuo resultante tras la obtención del extracto bioactivo de salvado de arroz (fracción insoluble). Como puede observarse la fracción es rica en fibra dietética.

Tabla 16- Composición nutricional del residuo insoluble obtenido durante el procedimiento de extracción empleando una solución hidroalcohólica al 35%, 20°C y 105 minutos. Los datos se expresan en g/g de materia seca y representan el valor medio \pm desvío estándar de las determinaciones realizadas por triplicado.

	Fracción rica en fibra antioxidante (Fracción insoluble)
Proteínas totales	1,60 \pm 0,03
Lípidos totales	17,93 \pm 0,30
Fibra dietética	28,91 \pm 0,70
Cenizas	8,30 \pm 0,32
Carbohidratos totales*	43,40 \pm 0,03

*Carbohidratos disponibles obtenidos por diferencia (MS- Σ lípidos totales, proteínas totales, cenizas, fibra dietética total para base seca)

Como se puede ver en la *Tabla 16* dicha fracción es principalmente rica en fibra dietética y lípidos a diferencia del extracto soluble que se caracterizó por ser fuente de proteínas y carbohidratos (*Tabla 12*). La comparación con la composición del extracto antioxidante permite indicar que esta fracción es rica en fibra dietética (*Figura 18*).

Los resultados indican que a partir de salvado de arroz, y siguiendo el esquema de trabajo instrumentado en la presente tesis doctoral se obtienen dos nuevos ingredientes utilizables para la elaboración de alimentos funcionales.

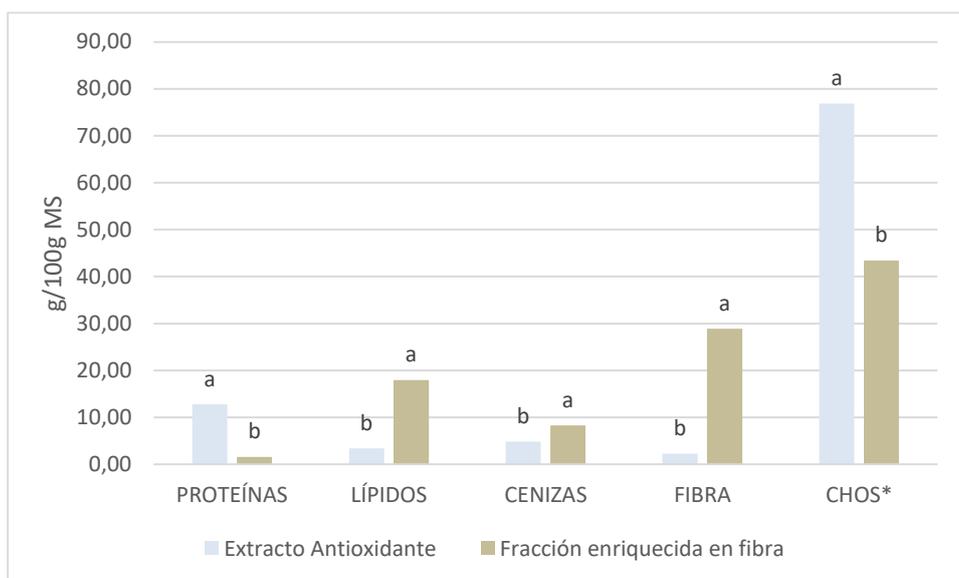


Figura 18 -Comparación nutricional de los ingredientes obtenidos empleando una solución hidroalcohólica con 35:65 etanol: agua (v/v), 20°C y un 105 minutos de extracción. que se seleccionaron como óptimas.

La capacidad antioxidante de la fracción insoluble contra el radical ABTS⁺ evaluada por el método de QUENCHER es de 236 ± 10 μ moles de TE/g de muestra. Estos resultados confirman que la fracción insoluble además de ser una fuente de fibra dietética importante, principalmente insoluble (Tabla 16) es también fuente de antioxidantes quedando definida como fracción enriquecida en fibra antioxidante.

En la fracción insoluble se recuperan los compuestos fenólicos asociados a la pared celular que una vez en el colon, podrían ser hidrolizados liberando ácidos fenólicos de menor peso molecular potencialmente biodisponibles (Gessner *et al.*, 2016, Cardona *et al.*, 2013). Si bien estos compuestos que llegan al colon con la fibra dietética no son absorbidos en la misma medida que los que se absorben en el intestino delgado debido a la capacidad del órgano, contribuyen a mantener un ambiente saludable antioxidante al secuestrar los radicales libres y contrarrestar los efectos de los pro-oxidantes de la dieta (Palafox *et al.*, 2011). Una vez que la fibra dietética arriba al colon, se convierte en sustrato fermentable de la microflora intestinal generándose nuevos metabolitos de polifenoles potencialmente biodisponibles (Gessner *et al.*, 2016; Cardona *et al.*, 2013).

La fracción insoluble de salvado de arroz generada en el presente trabajo, es una fuente de fibra antioxidante que constituye un producto innovador hasta la fecha no referenciado en la bibliografía. Es importante remarcar que el alto contenido lipídico recuperado en esta fracción es rico en orizanol y tocoferoles (no analizados en el presente trabajo) que confieren gran capacidad antioxidante (Butsat & Siriamornpun, 2010 Chotimarkorn, *et al.* 2008) pudiendo contribuir a la capacidad antioxidante determinada en la fracción insoluble analizada.

A partir de los resultados obtenidos en este apartado, queda definido un nuevo ingrediente obtenido a partir del salvado de arroz que definimos como fracción enriquecida en antioxidantes. Este ingrediente junto al extracto antioxidante, permite el reciclaje del 100% del salvado de arroz. Cada uno de los ingredientes obtenidos posee una composición nutricional y aportes en antioxidantes que le otorgan ventajas para el desarrollo de nuevos alimentos funcional.

4-Conclusiones del capítulo

El análisis de la composición proximal del salvado de arroz, permitió confirmar al residuo industrial como un alimento rico en ingredientes de gran interés que justifican la búsqueda de alternativas para la alimentación humana.

Se logró la extracción de compuestos bioactivos del salvado de arroz, a partir maceración simple, usando solventes de grado alimentario y reciclables en baja proporción (en torno al 35% de etanol), temperatura ambiente (en torno a los 20°C) y tiempos de extracción medios (cerca a 105 min).

El extracto obtenido es rico en proteínas (12,74 g/100g de MS) y en carbohidratos (77,00 g/100g MS), recuperando el total de fibra dietética soluble (2,23 ±0,10 g/100g MS) con un contenido de lípidos totales de 3,38 ±0,07 g/100g MS y con 4,82±0,06 g/100g MS de cenizas.

El extracto antioxidante seleccionado es rico en polifenoles (71,42±1,60 mg de GAE/ g de extracto) y con elevada capacidad antioxidante (451±14 µmol de TE/g muestra frente a radical ABTS^{•+} y 912±31 µmol de TE/g muestra frente a radicales peroxilos). Este compuesto principalmente por ácido clorogénico (44,84 ± 2,25 mg / 100 g de materia seca) y ácido ferúlico (12,44 ± 0,60 mg / 100 g de materia seca) y presenta un valor de IC₅₀ de 0,14 ± 0,01 y 4,50 ± 0,08 mg/mL contra radicales peroxilos y ABTS^{•+}, respectivamente. Se recupera un 40 % del ácido ferúlico y 25% de ácido clorogénico en los digeridos obtenidos por el proceso simulado de digestión gastrointestinal *in vitro* indicando que están bioaccesibles en el extracto antioxidante y que por tanto, podrían ser absorbidos y ejercer su función fisiológica como antioxidantes.

La recuperación de la fracción insoluble resultante del proceso de obtención de extractos antioxidantes permitió definir un nuevo ingrediente alimentario innovador con uso potencial para ser incorporado en el desarrollo de nuevos alimentos. Es rico en fibra (28,90 ± 0,70 g/100 g MS) y lípidos (17,93 ± 0,30 g/100g MS). Esta fracción tiene actividad antioxidante (236 ± 10 µmoles de TE/g

de muestra) y por tanto es fuente de fibra dietética antioxidante que hasta la fecha estaba siendo desperdiciado.

Se puede afirmar con un 95% de confianza que es posible obtener dos nuevos ingredientes alimentarios de calidad nutricional y funcional a partir de salvado de arroz: extracto antioxidante y fibra dietética antioxidante. Las condiciones de extracción propuestas son de gran simplicidad y de bajo costo de inversión por lo que se alínean al concepto de “extracción verde” destacándose el hecho de no generar nuevos residuos de producción siendo innovadora, ecosostenible y de promisoría implementación en la industria uruguaya.

5- Referencias

- AACC, American Association of Cereal Chemists 2001. The definition of dietary fiber. *Cereal Foods World*, 46(3), 112–126.
- AOAC. (1999). *Official methods of analysis*, 16th edn. Association of Official Analytical Chemists, Washington.
- AOAC. 2012. *Official Methods of Analysis of AOAC international*. 19 th edition. AOAC International, Gaithersburg, Maryland, USA.
- Abdul-Hamid, A., & Luan, Y. S. 2000. Functional properties of dietary fibre prepared from defatted rice bran. *Food Chemistry*, 68(1): 15-19.
- Adom, K. K., & Liu, R. H. 2002. Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6182–6187.
- Aguilar-Garcia, C., Gavino, G., Baragaño-Mosqueda, M., Hevia, P., Gavino, P. 2007. Correlation of tocopherol, tocotrienol, c-oryzanol and total polyphenol content in rice bran with different antioxidant capacity assays. *Food Chemistry* 102: 1228–1232.
- Amagliani, L., O'Regan, J., Kelly, A. & O'Mahony, J. 2017. Composition and protein profile analysis of rice protein ingredients. *Journal of Food Composition and Analysis* 59:18-26.
- Arab, F., Alemzadeh, L., Maghsoudi, V. 2011. Determination of antioxidant component and activity of rice bran Extract. *Scientia Iranica Transactions C: Chemistry and Chemical Engineering*. Artículo in press.
- Arendt, E. & Zannini, E. 2013. *Cereal grains for the food and beverage industries*. WP, New Delhi- India.
- Brewer, M. S. 2011. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(4), 221–247.
- Butsat, S. & Siriamornpun, S. 2010. Antioxidant capacities and phenolic compounds of the husk, bran and endosperm of Thai rice. *Food Chemistry* 119: 606–613.
- Cardona, F., Lacuevac, C., Tulipania, S., Tinahonesb, F. Queipo-Ortuñoa, M. 2013. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *Journal of Nutritional Biochemistry* 24: 1415–1422.
- Carpita NC. 1996. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 445-476.

- Chanput, W., Theerakulkait, C. & Nakai, S., 2009. Antioxidative properties of partially purified barley hordein, rice bran protein fractions and their hydrolysates. *Journal of Cereal Science* 49:422–428.
- Chemat, F., Abert Vian, M., & Cravotto, G. 2012. Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles. *International Journal of Molecular Sciences*: 13: 8615-8627.
- Chen, H., Zhang, M., Qu, Z., & Xie, B. 2008. Antioxidant activities of different fractions of polysaccharide conjugates from green tea (*Camellia Sinensis*). *Food Chemistry*, 106, 559–563.
- Chen, M., McClung, A., Bergman, C. 2016. Concentrations of oligomers and polymers of proanthocyanidins in red and purple rice bran and their relationships to total phenolics, flavonoids, antioxidant capacity and whole grain color. *Food Chemistry* 208: 279–287.
- Chinma, C. E., Ramakrishnan, Y., Ilowefah, M., Hanis-Syazwani, M., & Muhammad, K. 2015. Properties of cereal brans: A review. *Cereal Chemistry*, 92(1):1-7.
- Choi, Y. S., Choi, J. H., Han, D. J., Kim, H. Y., Lee, M. A., Kim, H.W., *et al.* 2011. Effects of rice bran fibre on heat-induced gel prepared with pork salt-soluble meat proteins in model system. *Meat Science*, 88: 59–66.
- Chotimarkorn, C., Benjakul, S., Silalai, N. Antioxidant components and properties of five long-grained rice bran extracts from commercial available cultivars in Thailand 2008. *Food Chemistry* 111:636–641.
- Daou, C. & Zhang, H., 2011. Physico-chemical properties and antioxidant activities of dietary fiber derived from defatted rice bran. *Adv. J. Food Sci. Technol.* 3 (5), 339 e 347.
- Dávalos, A., Bartolomé, B., Suberviola, J., & Gómez-Cordovés, C. 2003. Orac-fluorescein as a model for evaluating antioxidant activity of wines. *Pol. J. Food Nutr. Sci*, 12, 133-136.
- De Vries, J. Prosky, L., Li, B., & Choa, S. 1999. Historical Perspective on Defining Dietary Fiber. *Cereal Foods World*: 5 (44):337-369.
- Dent, M., Dragović-Uzelac, V., Penić, M., Brnčić, M., Bosiljkov, T., & Levaj, B. 2013. The Effect of Extraction Solvents, Temperature and Time on the Composition and Mass Fraction of Polyphenols in Dalmatian Wild Sage (*Salvia officinalis* L.) Extracts. *Food Technol. Biotechnol.* 51 (1) 84–91.

- Díaz, C. & Heinzen, H. 2006. Variaciones en el perfil de flavonoides y en la cantidad de quercetina libre en diferentes extractos de *Achyrocline satureoides*. *Acta Farmaceutica Bonaerense* 25(4):574-577.
- DIEA (Oficina de Estadísticas Agropecuarias del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP)) 2015. Anuario Estadístico www.mgap.gub.uy/unidad-ejecutora/oficina-de...y.../anuarios-diea/anuario2015
- Du, G., Sun, L., Zhao, r., Du, L., Song, J., He, G., Zhang, Y., & Zhang, J. 2016. Polyphenols: Potential source of drugs for the treatment of ischaemic heart disease. *Pharmacology & Therapeutics* 162:23–34.
- Elleuch, M., Bedigian, D., Roiseux, O., Besbes, S., Blecker, C., Attia, H. 2011. Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. *Food Chemistry* 124:411–421.
- Fang, Y., Yang, S. & Wu, G. 2002. Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. *Nutrition*, 18(10): 872-879.
- FAO. Rice Market Monitor. 4. Rome: FAO; 2014.
- Faria, S. A. S. C. Bassinello P. Z, Penteadó, M. V. C. 2012. Nutritional composition of rice bran submitted to different stabilization procedures. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 48 (4) 651-657.
- Faulds, B. & Williamson, G. 1999. The role of hydroxycinnamates in the plant cell wall. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 79:393–395.
- Fernandez-Gomez, B., Lezama, A., Amigo-Benavent, M., Ullate, M., Herrero, M., Martín, M., Mesa, M. & del Castillo, M. 2016. Insights on the health benefits of the bioactive compounds of coffee silverskin extract. *Journal of Functional Foods* 25: 197–207.
- Fernando, B. 2013. Rice as a Source of Fibre. *Journal of Rice Research: Open Access*. 1: e 101. doi: 10.4172/jrr.1000e101
- Friedman, M. 2013. Rice brans, rice bran oils, and rice hulls: composition, food and industrial uses, and bioactivities in humans, animals, and cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 10626–10641.
- Garcia-Salas P., Morales-Soto, A, Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez, A. 2010. Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules* 15: 8813-8826.
- Gesner, D., Ringseis, R., Eder, K. 2016. Potential of plant polyphenols to combat

- oxidative stress and inflammatory processes in farm animals *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*.
- Ghasemzadeh, A, Jaafar, H, Juraimi A and Tayebi-Meigooni A. 2015. Comparative Evaluation of Different Extraction Techniques and Solvents for the Assay of Phytochemicals and Antioxidant Activity of Hashemi Rice Bran. *Molecules* 20.
- Ghosh, M. 2015. Studies on functional and antioxidant property of dietary fibre extracted from defatted sesame husk, rice bran and flaxseed. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 5: 129–136.
- Gil-Chavez, J., Villa, J., Ayala-Zavala, F., Basilio Heredia, J., Sepulveda, D., Yahia, E., González-Aguilar, G. 2013. Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 12: 5-23
- Gökmen, V., Serpen, A., Fogliano, V., 2009. Direct measurement of the total antioxidant capacity of foods: the 'QUENCHER' approach. *Trends in Food Science and Technology* 20: 278–288.
- Gonzalez-Aguilar, G., Blancas-Benitez, F. & Syago-Ayerdi, S. 2017. Polyphenols associated with dietary fibers in plant foods: molecular interactions and bioaccessibility. *Current Opinion in Food Science*: 13:84–88
- Gopinger, E.; Ziegler, V.; Catalan, A.A.S; Krabbe E.L.; Elias, S. ; Xavier, E. 2015. Whole rice bran stabilization using a short chain organic acid mixture. *Journal of Stored Products Research*, v. 60, p. 1-6
- Goszcz, K., Deakin, S. J., Duthie, G. G., Stewart, D., Leslie, S. J., & Megson, I. L. 2015. Antioxidants in cardiovascular therapy: Panacea or false hope? *Front Cardiovasc Med* 2, 29.
- Goufo, P. & Trindade, E., 2014. Rice antioxidants: phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, proanthocyanidins, tocopherols, tocotrienols, γ -oryzanol, and phytic acid. *Food Sci Nutr.* 2(2): 75–104.
- Gray, J. 2006. Fibra dietética definición, análisis, fisiología y salud. International Life Sciences Institute (ILSI Europe). Bélgica-Bruselas. Serie de monografías concisas. ISBN 90-78637-03-X.
- Gul, K., Yousuf, B., Singh, A., Singh, P., Wani A. 2015. Rice bran: Nutritional values and its emerging potential for development of functional food—A review. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 6 .24–30

- Han, S., Chee, K., & Cho, S. 2015. Nutritional quality of rice bran protein in comparison to animal and vegetable
- Havsteen, B.H.2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96:67-202.
- He, J., & Giusti, M. M. 2010. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1(1), 163–187.
- Hollebeeck, S., Borlon, F., Schneider, Y., Larondelle, Y., & Rogez, H. 2013. Development of a standardised human *in vitro* digestion protocol based on macronutrient digestion using response surface methodology q. *Food Chemistry*, 138(2–3), 1936–1944.
- Huang, D., Ou, B. & Prior, R. 2005. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53 (6): 1841 -1856.
- Hwang, E.-S., & Thi, N. D. 2014. Effects of Extraction and Processing Methods on Antioxidant Compound Contents and Radical Scavenging Activities of Laver (*Porphyra tenera*). *Preventive Nutrition and Food Science*, 19(1), 40–48.
- Huang, Y. & Lai, H. 2016. Bioactive compounds and antioxidative activity of colored rice bran, *Journal of Food and Drug Analysis*, 24 (3):564-574.
- Iqbal, S., Bhangar, M., Anwar, F. 2005. Antioxidant properties and components of some commercially available varieties of rice bran in Pakistan. *Food Chemistry* 93:265–272.
- ISO 5984-2002 International Organization for Standardization (2002). Animal feeding stuffs — Determination of crude ash. Geneva, Switzerland.
- Kaur, C., & Kapoor, H. 2001. Review: Antioxidants in fruit and vegetables-the millennium's health. *International Journal of Food Science and Technology*, 36: 703-725.
- Kim, S & Lim,S., 2016. Enhanced antioxidant activity of rice bran extract by carbohydrase treatment, *Journal of Cereal Science*, Volume 68, 2016:116-121.
- Kumar, N., & Pruthi, V.2014. Review: Potential applications of ferulic acid from natural sources .*Biotechnology Reports* 4:86–93.
- Koutsos, A. & Lovegrove, J. 2015. Chapter 12 - An Apple a Day Keeps the Doctor Away – Inter-Relationship Between Apple Consumption, the Gut Microbiota and Cardiometabolic Disease Risk Reduction, In *Diet-Microbe Interactions in the Gut*, edited by Kieran Tuohy and Daniele Del Rio, Academic Press, San Diego, Pages

- Lai, P., Yuon Li, K, Lu, S., Chen, H. 2009. Phytochemicals and antioxidant properties of solvent extracts from Japonica rice bran. *Food Chemistry* 117: 538–544
- Lapornik, B., Prosek, M., Wondra, A.G., 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *J. Food Eng.* 71: 214–222.
- Lerma-García. M., Herrero-Martínez, J., Simó-Alfonso E., Mendonça, C., Ramis-Ramos, G. 2009. Composition, industrial processing and applications of rice bran γ -oryzanol. *Food Chemistry* 115: 389–404.
- Liu, L., Wen, W., Zhang, R., Wei, Z., Deng, Y., Xiao, J., Zhang, M. 2017. Complex enzyme hydrolysis releases antioxidative phenolics from rice bran. *Food Chemistry* 214: 1–8.
- Liu, Q., Cao, X., Zhuang, X., Hana W., Guo, W., Xiong, J., Zhang, X. 2017. Rice bran polysaccharides and oligosaccharides modified by *Grifola frondosa* fermentation: Antioxidant activities and effects on the production of NO. *Food Chemistry*. 223: 49–53
- Chandrika, L. & Fereidoon. S. 2005. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry* 93:47–56
- 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), 265-275.
- Macagnan, F. da Silva, L., Hecktheuer, L. 2016. Dietary fibre: The scientific search for an ideal definition and methodology of analysis, and its physiological importance as a carrier of bioactive compounds *Food Research International* 85: 144–154.
- Mahua, I. 2015. Studies on functional and antioxidant property of dietary fibre extracted from defatted sesame husk, rice bran and flaxseed. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 5: 129–136.
- Manach, C. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727 – 747.
- Marathe, S., Jadhav, S., Bankar & Singhal, R. 2017. Enzyme-Assisted Extraction of Bioactives in M. Puri (ed), *Food Bioactives* pag: 171-204.
- Mokrani, A., Madani, k. 2016. Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit.

Separation and Purification Technology: 68-76.

Muntana, M. & Prasong, S. 2010. Study on total phenolic contents and their antioxidant activities of Thai white, red and black rice bran extracts. *Pak J Biol Sci.* 13(4):170-4.

Naczki, M. & Shahidi, F. 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41:1523–1542.

Nijveldt, R., Van Nood, E., Van Hoorn, D., Boelens, P., Van Norren, K., & Van Leewen, P. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanism of action potential applications. *Journal of Clinical Nutrition*, 74:418-425.

Olivera, D., Finger, A., Rodrigues, T., Salvador, V., Moreira, F., Correa, H., Craig, R., Marchiosi, R., Ferrarese, O., dos Santos, W. 2015. Ferulic acid: a key component in grass lignocellulose recalcitrance to hydrolysis. *Plant Biotechnology Journal*: 13(9):1224-1232.

OPYPA-DIEA-MGAP. 2016. Encuesta de Arroz correspondiente a la zafra 2015/16. <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-pub-arroz,O,es,0>

Ou, B., Hampsch-Woodill M, Prior RL. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 49(10):4619-26.

Oroian, M. & Escriche, I. 2015. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International* 74:10-36

Osborne, T. 1924. In: *The Vegetable Proteins*. 2da. Edición. Ed. Longmans and Green, Nueva York.

Parada J. & J. Aguilera. 2007. Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *Journal of Food Science*. 72(2):21-32

Palafox-Carlos, H., Ayala-Zavala, J. F., & González-Aguilar, G. A. 2011. The Role of Dietary Fiber in the Bioaccessibility and Bioavailability of Fruit and Vegetable Antioxidants. *Journal of Food Science*, 76(1), 6–15.

Palaniappan A., Yuvaraj S., Sonaimuthu S., Antony U. 2017. Characterization of xylan from rice bran and finger millet seed coat for functional food applications. *Journal of Cereal Science*.75: 296-305.

Pérez-Jimenez, J., & Saura-Calixto, F. 2005. Literature Data May Underestimate the Actual Antioxidant Capacity of Cereals. *Journal of Agric. Food Chem.* 53:

5036–5040.

- Pérez-Jimenez, J & Saura-Calixto, F. 2006. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays Food Research International 39: 791–800.
- Povilaitis, D., Sulni, V, Rimantas, Kraujalien, V. 2015. Antioxidant properties of wheat and rye bran extracts obtained by pressurized liquid extraction with different solvents. Journal of Cereal Science 62:117e123.
- Prior, R. 2014. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/ bioactives and health benefits. Journal of Functional Foods, 18: Part B, 797–810.
- Prior, R., Wu, X. & Schaich, K. 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 53 (10):4290-4302.
- Rao, A., Sareddy, G. Phanithi, P., Attipalli, R. 2010. The antioxidant and antiproliferative activities of methanolic extracts from Njavara rice bran. BMC Complementary and Alternative Medicine 10:4.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine, 26(9–10), 1231–1237.
- Renuka Devi, R., Jayalekshmy, A., Arumugan, C. 2007. Antioxidant efficacy of phytochemical extracts from defatted rice bran in the bulk oil system. Food Chemistry 104:658–664.
- Reza, H.M., Gias, Z.T., Islam, P., Sabnam, S., Jain, P., Hossain, M.H., Alam, M.A. 2015. HPLC-DAD system-based phenolic content analysis and *in vitro* antioxidant activities of rice bran obtained from aush dhan (*Oryza sativa*) of Bangladesh. Journal of Food Biochemistry 39 (4):462–470.
- Rice Almanac: source book for the most important economic activity on Earth. Wallingford, United Kingdom: CABI Publishing; 2013.
- Rosniyana, M.A. Hashifah and S.A. Shariffah Norin. 2007. The physico-chemical properties and nutritional composition of rice bran produced at different milling degrees of rice. Journal. Trop. Agric. and Fd. Sc. 35(1): 99– 105.
- Saura-Calixto, F. 1998. Antioxidant dietary fiber product: a new concept and a potential food ingredient. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46 (10), 4303-4306
- Saura Saura-Calixto, F., Serrano, J., Goñi, I. 2007 Intake and bioaccessibility of total

- polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry* 101:492–501.
- Saura-Calixto, F. 2011. Dietary Fiber as a Carrier of Dietary Antioxidants: An Essential Physiological Function. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 59 (1).
- Sarni-machado, P & Cheynier, V. 2006. *Les polyphénols en agroalimentaire*. Lavoisier. Francia
- Schaich, K.M. Tian, X., Xie, J. 2015. Reprint of “Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays”. *Journal of Functional Foods*. 18: Part B: 782–796.
- Serpen, A., Capuano, E., Fogliano, V., Gökmen, V., 2007. A new procedure to measure the antioxidant activity of insoluble food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 7676–7681.
- Serpen, A., Gökmen, V., Fogliano, V. 2012. Solvent effects on total antioxidant capacity of foods measured by direct QUENCHER procedure. *Journal of Food Composition and Analysis* 26:52–57.
- Serpen, A., Gökmen, V., Pellegrini, N., Fogliano, V., 2008. Direct measurement of the total antioxidant capacity of cereal products. *Journal of Cereal Science* 48, 816–820.
- Shahidi, F. and Naczk, M. 2004. *Phenolics in Food and Nutraceuticals*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Shahidia, F& Zhongb, Y. 2015. Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*. 18: Part B: 757–781.
- Shao, Y., Xu, F., Sun, X., Bao, J. & Beta, T. 2014. Identification and quantification of phenolic acids and anthocyanins as antioxidants in bran, embryo and endosperm of white, red and black rice kernels (*Oryza sativa* L.). *Journal of Cereal Science* 59: 211-218.
- Shen, Y., Jin, L., Xiao, P., Lu, Y., Bao, J. 2009. Total phenolics, flavonoids, antioxidant capacity in rice grain and their relations to grain color, size and weight. *Journal of Cereal Science*, 49(1): 106–111.
- Shih, F. F. 2003. Review: An update on the processing of high-protein rice products. *Nahrung/Food*; 47 (6): 420-424.
- Singh, P., Neelam, Y. MishraP., & Sheikh, S. 2013. Utilization of rice bran for the development of value added Indian Sweet. *International Journal of Agricultural and Food Science*, 3(2): 76-79.

- Singleton, V. L., & Rossi Jr., J. A. 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144–158.
- Starmans D, Nijhuis H. 1996. Extraction of secondary metabolites from plant material: a review. *Trends Food Sci Technol* 7(6):191–7.
- Tabaraki, R. & Nateghi, A. 2011. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry* 18:1279–1286.
- Ti, H., Li, Q., Zhang, R., Zhang, M., Deng, Y., Wei, Z., Chi, J., Zhang, Y. 2014. Free and bound phenolic profiles and antioxidant activity of milled fractions of different indica rice varieties cultivated in southern China. *Food Chemistry* 159:166–174.
- Tosha, S., & Yadab, S., 2010. Review. Dietary fibres in pulse seeds and fractions: Characterization, functional attributes, and applications. *Food Research International* 43(2):450–460.
- Wang, L., & Weller, C. 2006 Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology* 17, 300–312.
- Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y. Li, X. 2008. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran *Food Chemistry* 106 (2008) 804–810
- Wang, Ch., Xu, F., Li, D., & Zhang, M. 2015. Physico-chemical and Structural Properties of Four RiceBran Protein Fractions Based on the Multiple Solvent.
- Wang, W., Guo, J., Zhang, J., Peng, J., Liu, T., XinIsolation, Z., 2015. Isolation, identification and antioxidant activity of bound phenolic compounds present in rice bran. *Food Chemistry* 171: 40–49.
- Wang, X., Chen, H., Fu, X., Li, S., & Wei, J. 2017. A novel antioxidant and ACE inhibitory peptide from rice bran protein: Biochemical characterization and molecular docking study. *LWT - Food Science and Technology* 75:93-99.
- Wanyo, P., Meeso, N., Siriamornpun, S. 2014. Effects of different treatments on the antioxidant properties and phenolic compounds of rice bran and rice. *Food Chemistry* 157: 457–463.
- Wattanasiritham, L., Theerakulkait, C., Wickramasekara, S., Stevens, J., Maier, C. 2016. Isolation and identification of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed rice bran protein. *Food Chemistry* 192:156–162.

- Xu, Z., Hua, N., Godber, S. 2001. Antioxidant activity of tocopherols, tocotrienols, and gamma-oryzanol components from rice bran against cholesterol oxidation accelerated by 2,2'-azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(4):2077-2082.
- Ydjedd, S., Bouriche, S., López-Nicolás, R., Sánchez-Moya, T., Frontela-Saseta, C. Ros-Berruezo, G., Rezgui, F., Louaileche, H. & Edine Kati, D. 2017. Effect of *in vitro* Gastrointestinal Digestion on Encapsulated and Nonencapsulated Phenolic Compounds of Carob (*Ceratonia siliqua* L.) Pulp Extracts and Their Antioxidant Capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 65 (4), 827-835.
- Yılmaz, N. 2016. Middle infrared stabilization of individual rice bran milling fractions. *Food Chemistry* 190:179–185.
- Yoshida, H., Tanigawa, T., Kuriyama, I., Yoshida, Y., Tomiyama, Y., & Mizushima Y. 2011. Variation in Fatty Acid Distribution of Different Acyl Lipids in Rice (*Oryza sativa* L.) Brans. *Nutrients* 3: 505-514.
- Zhang, M., Zhang, R., Zhang, F. & Lui, R. 2010. Phenolic Profiles and Antioxidant Activity of Black Rice Bran of Different Commercially Available Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 58: 7580-7587.
- Zhao, Z., Egashira, Y., Sanada, H. 2004. Ferulic acid is quickly absorbed from rat stomach as the free form and then conjugated mainly in liver. *Journal of Nutrition*: 134(11):3083-8.

II- FORMULACIÓN DE UNA GALLETA FUNCIONAL A BASE DE INGREDIENTES EXTRAÍDOS DE SALVADO DE ARROZ

1- Introducción

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2014) las enfermedades no transmisibles son responsables de la muerte de 40 millones de personas cada año, lo que equivale al 70% de las muertes que se producen en el mundo. En los países más pobres los problemas de obesidad se han convertido en una de las pandemias del siglo XXI y según datos de la OMS (2014) más de 1.900 millones de adultos mayores de 18 años tienen sobrepeso, de los cuales más de 600 millones son obesos. El sobrepeso y la obesidad, junto a la hiperglucemia (concentraciones elevadas de glucosa en la sangre); la hiperlipidemia (concentraciones elevadas de grasas en la sangre) y la tensión arterial, contribuyen a incrementar el riesgo para el desencadenamiento de muchas de las enfermedades no trasmisibles (OMS, 2014). Según las previsiones de la OMS (2014), si todo sigue igual, la cifra anual de muertes por enfermedades no transmisibles aumentará a 55 millones en 2030. Una de las propuestas del “Plan de acción mundial para la prevención y control de las enfermedades no trasmisibles 2013-2020” es la promoción de las dietas saludable en todos los estados miembro.

1.1- Alimentos funcionales

El mercado de los “alimentos funcionales” ha tenido un crecimiento sostenido durante los últimos 10 años y se estima una tasa de crecimiento del 7.2% para 2017. Latinoamérica es considerada una región prometedora y potencialmente atractiva en términos de crecimiento e inversión en el desarrollo de estos productos (EUROMONITOR, 2013 presentados por Vicentini *et al.*, 2016). Esto

se explica porque existe una creciente comprensión de la relación existente, entre los alimentos consumidos y las repercusiones positivas y/o negativas que éstos ejercen en nuestra salud. La demanda de los consumidores por alimentos saludables también ha obligado a la investigación científica y a las industrias, a estimular el desarrollo de alimentos con características terapéuticas que van más allá de su papel en la nutrición básica (Kaur & Singh, 2017; Vicentini *et al.*, 2016). El estudio del comportamiento de los consumidores frente al nuevo concepto de alimentos funcionales y a la capacidad de sustitución de los alimentos convencionales por estos nuevos alimentos demanda muchos estudios específicos que resultan ser cruciales para el éxito en la adopción del consumo (Kaur & Singh, 2017, Ares & Gámbaro, 2007). Es más, recientemente Kaur & Singh, (2017) han reconocido 4 variables independientes que explican el comportamiento del consumidor hacia la aceptación de los alimentos funcionales que son clasificados en cuatro categorías, que a su vez son desglosadas en múltiples sub-variables: (1) factores personales, (2) Factores psicológicos, (3) factores culturales y sociales, y (4) factores relacionados con el producto “alimento funcional”.

1.1.1- Evolución y concepto general sobre alimento funcional

El concepto de alimento funcional no es nuevo, comenzó en Japón en la década de los 80 y posteriormente en los 90 se consolidó con la aparición de la denominación “alimentos para uso específico de salud” o “food for specified health” cuya sigla en inglés es mundialmente conocida como FOSHU. Posteriormente, en Europa, se crea un grupo de trabajo promovido por el International Life Sciences Institute (ILSI) y con apoyo de la Comisión Europea como acción concertada del 4º Programa Marco de investigación a través del cual se desarrolla el proyecto Functional Food Science in Europe (o FUFLOSE). En este marco, se proponen una serie de conceptos y definiciones de consenso que sientan las bases para el desarrollo científico de la alimentación funcional. Los resultados de este consenso fueron publicados en el British Journal of Nutrition por Bellisle *et al.*, (1998); y Diplock, (1999) en donde se propone que:

“Un alimento puede considerarse “funcional” si se demuestra satisfactoriamente que, además de sus efectos nutritivos, afecta beneficiosamente a una o más funciones del organismo de modo que mejora el estado de salud o bienestar o reduce el riesgo de enfermedad” (Diplock et al., 1999).

En el trabajo ILSI además se enfatiza que los alimentos funcionales deben seguir siendo alimentos (“no son píldoras o cápsulas”) y deben consumirse en porciones normales. Es así que, un alimento funcional puede ser: un alimento natural, un alimento al que se le ha añadido un componente, o un alimento al cual se le ha eliminado un componente por tecnología o biotecnología. También puede ser un alimento donde la naturaleza de uno o más componentes ha sido modificada, o un alimento en que la biodisponibilidad de uno o más componentes tiene modificación, o cualquier combinación de estas posibilidades. Puede ser para todos los miembros de una población o para determinados grupos de la población, puede definirse, por ejemplo, por edad o por constitución (Bellisle et al., 1998; y Diplock, 1999).

A pesar de los años que lleva la discusión sobre la definición del concepto de “alimento funcional” aún hoy no se tiene una definición totalmente acordada (Palou et al., 2003) y constantemente se están revisando los conceptos y sus implicaciones, principalmente desde el punto de vista legal y de reglamentación. Una definición que recoge varios de los puntos anteriores es la que sigue: *“Un alimento funcional es o parece ser similar a un alimento convencional. Es parte de una dieta estándar y se consume de forma regular, en cantidades normales. Ha demostrado beneficios para la salud o porque mejora el estado de salud y el bienestar o bien que reduce el riesgo de enfermedades crónicas específicas, más allá de los efectos nutricionales habituales” (Doyon & Labrecque, 2008).*

1.1.2 - Marco legal de los alimentos funcionales

La toma de conciencia de la interacción dieta-salud por parte de los consumidores, ha llevado a un aumento de la demanda por mayor información sobre los alimentos que compran y consumen. Para poder afirmar el beneficio

que ofrece un alimento a los consumidores sin caer en un engaño, el efecto debe estar científicamente comprobado y ser informado con mensajes claros y sin ambigüedades que puedan confundir a los consumidores (Palou *et al.*, 2003). Es lo que se conoce como “alegación de salud” y/o “health claims” permitidos en las etiquetas. La reglamentación de estos alegatos de salud es muy compleja y varía entre países (Palou *et al.*, 2003). En Uruguay, a pesar de la creciente oferta en el mercado de los alimentos funcionales, principalmente provenientes de la industria láctea, existe un vacío legal ya que dichos alimentos no están contemplados en el Reglamento Bromatológico Nacional. En general, en nuestro país los vacíos legales a nivel reglamentario en materia de alimentación se cubren con el Codex Alimentarius. De acuerdo al Codex Alimentarius en el apartado 8 (ver Anexo I-Declaraciones Nutricionales y Saludables (CAC/GL 23-1997) Codex Alimentarius) se define: *“Declaración de propiedades saludables como cualquier representación que declara, sugiere o implica que existe una relación causa/efecto entre un alimento, o un constituyente de dicho alimento, y la salud”*. Para todos los casos en el Codex Alimentarius se establece claramente que: *“Las declaraciones de propiedades saludables deben basarse en un sustento científico apropiado y el nivel de la prueba debe ser suficiente para establecer el tipo de efecto que se alega y su relación con la salud, como reconocido por datos científicos generalmente aceptables y el sustento científico se debería revisar a la luz de nuevos datos”*.

1.2- Las Galletas como vehículo de compuestos funcionales

Las galletas son un producto horneado caracterizado por un bajo contenido de agua final (1 a 5%). Tradicionalmente, los tres ingredientes básicos son harina, azúcar y grasa. Otros ingredientes que pueden incluirse en la formulación de galletas son levadura, agentes leudantes químicos, jarabes, sal, emulsificantes (usados en general en bajos niveles) (Pareyt y Delcour, 2008).

Las galletas son uno de los productos de aperitivo o “snacks” más consumidos en todo el mundo, por todos los niveles socioeconómicos (Okpala y Okoli, 2013). El mercado internacional de galletas viene creciendo sostenidamente e inclusive

en la región se destaca a Argentina como el principal consumidor de galletas dulces del mundo, con un promedio anual per cápita de 8,6 Kg/año de acuerdo con los últimos datos presentados por Euromonitor internacional (2017). El alto consumo de este producto, es una cuestión cultural, ya que se considera más como un alimento que como un aperitivo como sucede en otros países, siendo parte de la dieta diaria local. Las galletas dulces son consumidas por todas las clases sociales y la edad no es un factor limitante (Euromonitor internacional, 2016). Para Uruguay no hay datos de consumo pero es de suponer que se tiende a un promedio similar al de Argentina dada la cercanía cultural de ambos países.

1.2.1- Fundamento del uso de edulcorantes en sustitución de la sacarosa para la formulación de las galletas funcionales

Los azúcares simples representan una proporción considerable de la energía total de la ingesta diaria y están vinculados con la aparición de enfermedades crónicas no transmisibles entre las que se mencionan obesidad (Razieh *et al.*, 2017), diabetes tipo 2 (Razieh *et al.*, 2017), hipertensión (Kim & Je, 2016; Xi, *et al.*, 2015) y enfermedad coronarias (Xi, *et al.*, 2015). Las evaluaciones recientes encargadas por la OMS (2015), han concluido que limitar la cantidad de azúcar añadido a los alimentos y disminuir el consumo de bebidas azucaradas (que son una fuente importante de azúcares añadidos) serían beneficiosos para promover la salud pública, especialmente en lo que respecta a la reducción del riesgo de caries dental, diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares (OMS, 2015). En consecuencia, la OMS (2015), recomienda reducir el consumo de azúcares libres (monosacáridos y disacáridos) a lo largo de toda la vida tanto en niños como en adultos, a niveles menores o iguales al 10% de la ingesta calórica total diaria y sostiene que con una reducción adicional a niveles por debajo del 5% o aproximadamente 25 g (6 cucharaditas) por día se obtendrán beneficios mayores en la salud. De acuerdo al Ministerio de Salud Pública (MSP, 2016), en Uruguay, de cada diez adultos entre 25 a 64 años, cuatro presentan sobrepeso y tres, obesidad, por ésta razón, el MSP se acopla estrictamente a las recomendaciones de la OMS, (2015). Según la 2^{da} Encuesta Nacional de Factores de Riesgo de Enfermedades No Transmisibles realizada por el MSP en el año 2013, un 7,6% de la población de nuestro país tiene diabetes, porcentaje que se muestra en

aumento respecto a su medición en 2006. En las nuevas guías alimentarias de Uruguay (MSP, 2016) se reconoce que los hábitos alimentarios actuales han cambiado y que la mayor parte del azúcar que consumimos los uruguayos (sacarosa, fructosa, glucosa, jarabe de maíz de alta fructosa, jarabe de arroz, melaza) proviene de productos como galletitas, alfajores, budines, barras de cereales, cereales de desayuno, jugos industrializados, refrescos y otras bebidas azucaradas (MSP, 2016).

Por otra parte, los azúcares libres en presencia de una fuente de aminoácidos libres, son los sustratos para la reacción de Maillard, que si bien es utilizada en la industria alimentaria para la generación de aromas, color y textura en diversos productos, genera compuestos potencialmente dañinos para el consumidor como acrilamidas, furanos y aminas heterocíclicas (Rannou *et al.*, 2016). Durante dicha reacción se generan compuestos finales de la glicación avanzada o AGEs (Uribarri *et. al.*, 2015). Los AGEs son también conocidos como “glicotoxinas”, un grupo muy diverso de compuestos altamente oxidantes de gran incidencia en diabetes, que también predisponen a otras complicaciones crónicas que afectan la visión (cataratas) y favorecen la arterioesclerosis y neuropatías entre otras patologías (Uribarri *et. al.*, 2010). Los regímenes para diabéticos básicamente deben contemplar el uso de endulzantes (edulcorantes no nutritivos) alternativos a la sacarosa para evitar la hiperglucemia de los pacientes. Dadas las recomendaciones de la OMS (2015), el nivel de ingesta de azúcares libres deben reducirse. Una de las estrategias para lograr este reto es reemplazar el uso estos compuestos por edulcorantes no nutritivos (hipocalóricos y/o no glucémicos) con el fin último de reducir el riesgo de padecer sobrepeso y obesidad a nivel mundial (OMS, 2014).

Los edulcorantes “no nutritivos” aprobados como aditivos alimentarios para el uso en alimentos por la FDA incluyen: sacarina, aspartamo, acesulfame de potasio (Ace-K), sucralosa, neotame, advantame (FDA, 2017). Además de estos seis aditivos alimentarios edulcorantes artificiales la FDA ha otorgado el estatus “generalmente reconocido como seguro” (o GRAS, por sus siglas en inglés) a dos tipos de edulcorantes no nutritivos de alta intensidad, a base de plantas o frutas: extractos de la fruta *Siraitia grosvenorii Swingle*, también conocida como

“luo han guo” o “la fruta del monje” y a ciertos esteviósidos obtenidos de las hojas de la planta *Stevia (Stevia rebaudiana Bertoni)* (FDA, 2017). Además los glicósidos de esteviol (E 960) son un aditivo alimentario autorizado en la Unión Europea amparado en el anexo II del Reglamento (CE) 1333/2008 para su utilización en varias categorías de alimentosa a niveles máximos comprendidos entre 20 y 3300 mg / kg (EFSA ANS Panel, 2015).

La *Stevia rebaudiana Bertoni*, un arbusto paraguayo de la familia de las *Asteraceae*, es la principal fuente de glicósidos de esteviol. Los glicósidos de esteviol (E 960) son constituyentes naturales de sabor dulce, extraídos y purificados de las hojas de dicha planta. El esteviósido y el rebaudiósido A, son los glucósidos de interés principal por sus propiedades edulcorantes. Los glucósidos asociados incluyen el rebaudiósido C, el dulcósido A, el rubusósido, el esteviolibiosido y el rebaudiósido B, que están generalmente presentes en las preparaciones de glucósidos de esteviol a niveles inferiores al esteviósido o rebaudiósido A (EFSA ANS Panel, 2015). La stevia, como se la conoce popularmente, se ha utilizado durante siglos como un bio-edulcorante y para usos medicinales como por ejemplo, bajar el azúcar en la sangre. Este edulcorante natural, hipocalórico posee un poder endulzante de 100-300 veces más dulce que el azúcar de mesa (Goyal *et al.* 2010). Las revisiones de Ruíz-Ruiz *et al.* (2015) y Lemus-Mondaca *et al.* (2012) resaltan que la stevia posee nutrientes y fitoquímicos que la hacen adecuada para la extracción y producción de ingredientes alimentarios funcionales. Ruíz-Ruiz *et al.* (2015), en su revisión de estudios preclínicos y clínicos sugieren aplicaciones antidiabéticos, anticancerígenos, antioxidantes, hipotensores, antihipertensivos, antimicrobianos, antiinflamatorios y antitumorales. Otras ventajas que destacan a este edulcorante natural es que es termoestable a 200 ° C y no es tóxico. La stevia presenta amplias ventajas sobre los edulcorantes artificiales como ingrediente para la industria alimentaria, convirtiéndola así en un sustituto adecuado para la sacarosa en diferentes bebidas, y productos de panadería (Lemus-Mondaca *et al.*, 2012). En general, el consumo mundial de esteviósido y rebaudiósido A, aumenta más rápidamente que el de otros edulcorantes no nutritivos (Sylvetsky & Rother, 2016). Además de su atractivo como edulcorante natural el rebaudiósido A también se percibe como más sabroso que otros

edulcorantes y se espera que los fabricantes de alimentos y bebidas cada vez más, amplíen la incorporación de esteviósido y rebaudiósido A en los nuevos productos formulados (Sylvetsky & Rother, 2016).

En consecuencia, se ha seleccionado a la stevia como edulcorante no nutritivo para la elaboración de la galleta funcional a base de los 2 nuevos ingredientes alimentarios (extracto antioxidante y fracción enriquecida en fibra antioxidante) obtenidos a partir de salvado de arroz que se describen en el capítulo 1 de la presente tesis doctoral.

En la *Tabla 1*, se muestran los criterios que deben cumplir los alimentos para poder utilizar los atributos: “bajo”, “no contiene” y/o “sin adición de azúcar” en su etiqueta de acuerdo a la reglamentación vigente MERCOSUR/GMC/RES. N°01/12.

Tabla 1- *Criterios para la utilización de la Información nutricional complementaria (INC) de acuerdo al reglamento vigente en Mercosur para etiquetado nutricional (MERCOSUR/GMC/RES. N°01/12).*

CONDICIONES	
Bajo	No contiene más de 5 g de azúcares.
	Por 100 g o 100 ml en platos preparados según corresponda Por porción cuando estas son mayores a 30 g o 30 ml. En porciones menores o iguales a 30g o 30 ml se calculará en base a 50 g o 50 ml
Si el alimento no cumple con las condiciones exigidas para el atributo " bajo o reducido en valor energético" deberá consignar en el rótulo junto a la INC la frase "Este no es un alimento bajo o reducido en valor energético", según corresponda, con los mismos caracteres en cuanto al tipo de letra de la INC, de por lo menos 50% del tamaño de la INC, de color contrastante al fondo del rótulo y que garantice la visibilidad y legibilidad de la información.	
No contiene	No contiene más de 0.5 g de azúcares y
	Por 100 g o 100 ml en platos preparados según corresponda Por porción
No contiene en la lista de ingredientes azúcares y/o ingredientes que sean entendidos como alimentos con azúcares, excepto que estos estuvieran declarados con un asterisco, que refiera a una nota después de la lista de ingredientes: "(*) Aporta cantidades no significativas de azúcares" y	
Si el alimento no cumple con las condiciones exigidas para el atributo " bajo o reducido en valor energético" deberá consignar en el rótulo junto a la INC la frase "Este no es un alimento bajo o reducido en valor energético", según corresponda, con los mismos caracteres en cuanto al tipo de letra de la INC, de por lo menos 50% del tamaño de la INC, de color contrastante al fondo del rótulo y que garantice la visibilidad y legibilidad de la información.	
Sin adición de azúcares	1. El alimento no debe contener:
	1.1 azúcares adicionados; 1.2 ingredientes que contengan azúcares adicionados; 1.3 ingredientes que contienen naturalmente azúcares que son agregados a los alimentos para dar sabor dulce como sustituto de los azúcares; 2. No se utiliza algún medio, tal como el uso de enzimas, durante el procesado, que pueda incrementar el contenido de azúcares en el producto final. 3. El alimento de referencia es normalmente es elaborado con azúcares adicionados. 4. Si el alimento no cumple con la condición establecida para el atributo "exento en azúcares", deberá consignarse en el rótulo junto a la INC "contiene azúcares propios de los ingredientes" con los mismos caracteres en cuanto al tipo de letra de la INC, de por lo menos 50% del tamaño de la INC, de color contrastante al fondo del rótulo y que garantice la visibilidad y legibilidad de la información. 5. Si el alimento no cumple con las condiciones exigidas para el atributo " bajo o reducido en valor energético" deberá consignar en el rótulo junto a la INC la frase "Este no es un alimento bajo o reducido en valor energético", según corresponda, con los mismos caracteres en cuanto al tipo de letra de la INC, de por lo menos 50% del tamaño de la INC, de color contrastante al fondo del rótulo y que garantice la visibilidad y legibilidad de la información.

(*) No se permite realizar información nutricional complementaria (INC) respecto a azúcares específicos.

1.2.2- Fundamento de la elección del tipo de harina para la elaboración de las galletas funcionales

Actualmente existe un mercado en aumento para regímenes especiales como es el caso de los alimentos para celíacos. La celiaquía es una enfermedad inflamatoria intestinal crónica, autoinmune, genéticamente determinada, inducida por el gluten de trigo, cebada, centeno (Koidis, 2016, Jnawali *et al.*, 2016). Hasta la fecha, el único tratamiento disponible contra la enfermedad es el de tener una dieta libre de gluten (Jnawali *et al.*, 2016; Torbica *et al.* 2012).

La celiaquía afecta aproximadamente a un uno por ciento de la población mundial y está aumentando significativamente debido a la subestimación de los casos ya que la condición muchas veces se deja sin diagnosticar (Jnawali *et al.*, 2016). De acuerdo a la World Gastroenterology Organisation, la epidemiología de la celiaquía, se asemeja a un témpano: son mucho más los casos no diagnosticados (por debajo de la línea de flotación) que los casos diagnosticados (por encima de la línea de flotación) (WGO, 2017). En general, muchos de los productos libres de gluten presentan baja calidad nutricional y son muy costosos (Koidis, 2016). Por lo tanto, existe una necesidad de desarrollar nuevos productos libres de gluten de mejor calidad, sostenibles y a precios competitivos.

El arroz en todas sus variedades y el salvado de arroz en particular, forman parte de la dieta recomendada para celíacos (WGO, 2017) dado que no contienen gluten. De acuerdo al estudio de Hager *et al.*, (2012), la harina de arroz blanca es baja en grasa (0,98 g/100g) y en proteínas (7,33 g/100g) comparada con la harina de trigo (1,81 y 11,54 g/100g para grasa total y proteína total respectivamente). Por otra parte, las proteínas del arroz son hipoalérgicas, lo que la hace de gran interés para personas alérgicas o poblaciones vulnerables como los niños, siendo cada vez más investigadas para la formulación de alimentos infantiles (Amagliani *et al.*, 2017). Es importante señalar que los productos para celíacos pueden ser consumidos por toda la población y cada vez más, son colocados en puntos visibles en los supermercados (Koidis, 2016). De acuerdo a la legislación vigente en el país, los alimentos "sin gluten" deben

presentar menos de 20 partes por millón (ppm) de gluten (Codex Alimentarius, 2003).

Sumado a lo expuesto, el uso de harina de arroz para la elaboración de las galletas propuestas, se justifica en la idea de incorporar el producto a la línea de elaboración de la industria arrocera que de hecho ya desarrollan galletas dulces aptas para celíacos. El utilizar como ingredientes los productos de venta (harina de arroz y aceite de arroz), más los dos nuevos ingredientes obtenidos del reciclaje total del salvado de arroz, se estima que otorguen mejoras en los costos del producto y en la ecuación económica global de la industria arrocera.

1.2.3 -Ingredientes bioactivos incorporados a la galleta funcional

La fibra dietética y los polifenoles son dos reconocidos constituyentes de los alimentos vegetales a los que se les han reconocido múltiples beneficios para la salud de sus consumidores. La fibra dietética y los compuestos fenólicos se estudian generalmente por separado, probablemente debido a las diferencias en sus estructuras, propiedades fisicoquímicas y biológicas, y vías metabólicas (Quirós-Sauceda, *et al.* 2014, Pérez-Jiménez, 2013; Saura-Calixto, 2011). Sin embargo, desde hace ya varias décadas se viene acuñando el concepto de “fibra antioxidante” y se reconoce a los polifenoles asociados a la fibra dietética como parte de los compuestos que contribuyen a la capacidad antioxidante a la matriz alimenticia y que muchas veces dicho aporte es despreciado por los métodos tradicionalmente empleados en la evaluación de la capacidad antioxidante de los alimentos (Saura-Calixto *et al.* 1991, Saura-Calixto *et al.* 1998). La evidencia científica ha demostrado que los compuestos fenólicos asociados a la pared celular de las plantas son compuestos relevantes de la fibra dietética (Saura-Calixto, 1998; Saura-Calixto & Díaz-Rubio, 2007) y que constituyen aproximadamente el 50% de los antioxidantes dietéticos totales (Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2015; Saura-Calixto, 2011). Por lo tanto, la fibra antioxidante, es cada vez más interesante de estudiar, siendo ingredientes valiosos para la Industria al contribuir en mejorar las propiedades bioactivas y tecnológicas de los diferentes productos (Quirós-Sauceda, *et al.* 2014). La OMS (2003), considera que la fibra dietética es un factor crítico, porque su déficit se asocia a obesidad,

síndrome metabólico e indirectamente a través de la obesidad a diabetes, enfermedades cardiovasculares, cáncer de colon y cáncer de mama por lo que el consumo de la fracción enriquecida en fibra antioxidante además de aportar fibra refuerza su efecto con el aporte de los antioxidantes que podría contribuir a reducir el riesgo de padecer estas patologías crónicas.

La fibra soluble dada su capacidad de formar geles, causa un retardo del vaciamiento gástrico, lo que se traduce en una mejora del proceso de digestión, incremento de la saciedad, mejor control de la glicemia postprandial y los niveles de colesterol LDL (Weickert & Pfeiffer, 2008). Sin embargo, en los productos derivados de cereales (como la fracción rica en fibra antioxidante obtenida en el capítulo 1 de este documento), la fibra dietética es principalmente insoluble, y a pesar que se le asocian beneficios en la prevención de la diabetes tipo 2 el mecanismo de acción aún no ha sido elucidado (Lattimer & Haub, 2010). Los hallazgos de Yao *et al.* (2014), confirman que la ingesta de fibra dietética total puede estar inversamente asociada con el riesgo de diabetes tipo 2. La fibra dietética cuando está presente en la dieta humana, contribuye a reducir la tasa de absorción de glucosa después del consumo de alimentos con alto contenido de carbohidratos glucémicos, lo que conduce a una curva de respuesta de glucosa sanguínea reducida y menor demanda de insulina. El control de la glucemia a través de la intervención dietética se plantea como una estrategia efectiva para reducir el riesgo de diabetes mellitus tipo 2 (T2D) (Goff *et al.*, 2017). De acuerdo a Goff *et al.* (2017) se pueden dilucidar varias posibles rutas por las cuales la fibra soluble e insoluble contribuyen al control de la glucemia entre las que destaca la reducción del vaciado gástrico como se ha mencionado en los párrafos anteriores, modificación de la liberación de las hormonas relacionadas con la digestión y la fermentación, inhibición de la actividad de amilasa lo que retarda la hidrólisis de almidón digestible, reducción en la difusión de productos amilolíticos en las miofibrillas del intestino delgado y el desarrollo de una barrera que reduce la absorción de los azúcares al interior de los enterocitos. Las evidencias científicas disponibles al día de hoy sugieren que todos estos mecanismos podrían estar involucrados en el mecanismo de regulación de la glucosa postprandial por la fibra dietética.

La bioaccesibilidad se define como la cantidad de un constituyente alimenticio que está presente en el intestino, como consecuencia de la liberación de este constituyente de la matriz de alimento sólido, y que puede ser capaz de pasar a través de la barrera intestinal. Solamente polifenoles liberados de la matriz alimenticia por la acción de las enzimas digestivas en el intestino delgado y bacterianas (microflora del intestino grueso) son bioaccesibles en el intestino y; por lo tanto, potencialmente biodisponibles” (Saura Calixto *et al.*, 2007). La biodisponibilidad es entonces definida como la cantidad de antioxidante digerido, absorbido y utilizado en el metabolismo normal (Palafox *et al.*, 2011).

La actividad antioxidante *in vivo* de los compuestos fenólicos asociados a la fibra dietética sigue siendo controversial, ya que los antioxidantes pueden quedar “atrapados” en la estructura compleja de la fibra dietética. El tracto gastrointestinal puede ser considerado como un “extractor” donde tanto la acción mecánica durante la masticación, en la boca como la acción química durante la fase digestiva en el estómago e intestino contribuyen, a la extracción de compuestos fenólicos de matrices sólidas (Palafox, *et al.*, 2011). En general, los polifenoles asociados a la fibra dietética viajan a través del intestino humano “encapsulados” de forma natural en la fibra dietética. Pérez- Jiménez *et al.* (2013) define a estos polifenoles como “polifenoles no extraíbles”, los que llegan al colon casi intactos y son sometidos a una extensa transformación por la microflora de colon. El grado de aportes de estos polifenoles en el colon depende de la microbiota particular de cada huésped, siendo excretados en las heces (Stevens & Maier, 2016).

Los polifenoles no extraíbles incluyen macromoléculas, tales como proantocianidinas de alto peso molecular y compuestos fenólicos simples, tales como ácidos fenólicos, asociado con macromoléculas, principalmente polisacáridos componentes de la fibra dietética y la proteínas (Pérez- Jiménez *et al.*, 2013). Aquellos polifenoles que llegan al colon (la mayoría de los oligómeros y polímeros y también pequeñas moléculas) pueden seguir tres procesos diferentes: (1) la absorción directa por los colonocitos, (2) excreción en las heces, y (3) transformación por la microbiota en metabolitos que puede ser absorbidos o excretados. De hecho, este último proceso es considerado como

uno de los aspectos clave para explicar los efectos biológicos de los polifenoles. La transformación en el colon implica una amplia variedad de reacciones químicas que incluyen hidrólisis, fisión del anillo, reducción, descarboxilación, desmetilación y deshidroxilación. Los beneficios para la salud del consumo de compuestos fenólicos deben atribuirse a sus metabolitos bioactivos y también a la modulación de la población bacteriana intestinal (Cardona *et al.*, 2013; Selma *et al.*, 2009).

Estudios en humanos y animales han demostrado que solamente del 5 al 10% de los polifenoles que se ingieren con la dieta son absorbidos directamente en el duodeno y solamente un 5% de ellos llegan a circulación sanguínea manteniendo la estructura, el resto sufre modificaciones estructurales tales como desglucosilación (Cardona *et al.*, 2013;). Después de la absorción en el duodeno, pueden someterse a una extensa serie de biotransformaciones: Fase I (Oxidación, reducción e hidrólisis) y Fase II (Conjugación) en los enterocitos y luego los hepatocitos, dando como resultado una serie de metabolitos conjugados solubles en agua (derivados de metilo, glucurónido y sulfato) liberados rápidamente en la circulación sistémica para su posterior distribución a órganos y excreción en la orina (Cardona *et al.*, 2013;). En el intestino grueso, las bacterias del colon actúan enzimáticamente sobre los esqueletos polifenólicos del resto (90-95% de la ingesta total de polifenoles), produciendo secuencialmente metabolitos con diferentes efectos fisiológicos (Cardona *et al.*, 2013, Selma *et al.* 2009).

Según Duda-Chodak *et al.*, (2015) debido a la gran diversidad de especies que forman la microbiota intestinal en diferentes individuos, el perfil de los metabolitos generados a partir de los polifenoles y su efecto final en el cuerpo son extremadamente variables dentro de la población humana. En muchas situaciones, sólo un producto del metabolismo bacteriano de un polifenol puede ser absorbido y ejercer un impacto beneficioso en los seres humanos. La falta de especies particulares dentro de la microbiota puede significar que un polifenol no puede ejercer su efecto esperado aunque haya sido consumido.

Esta tesis hace aportes sobre el potencial antioxidante, y las posibilidades de incorporar fibra dietética como ingredientes en alimentos, sin llegar a profundizar en el metabolismo que se genera tras la ingesta de las galletas. Sin embargo, sí se aporta información relativa a liberación de componentes de interés en la salud tras el proceso simulado de digestión *in vitro* y sobre la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos como evaluación previa sobre la pertinencia de futuros estudios *in vivo*.

Cabe destacar que ninguna de las fuentes consultadas hace una recomendación de consumo de fibra basada en el concepto de “fibra antioxidante” antes expuesto. La ingesta diaria recomendada de fibra según OMS, es de 27 a 40 gramos por día, mientras que la Food and Drug Administration (FDA, 2008) recomienda 25 gramos cada 2000 kcal/día. La recomendación de tener una ingesta alta de fibra dietética es enfatizada en las recomendaciones de la mayoría de las asociaciones nutricionales y de diabetes, y está demostrado (con estudios epidemiológicos y clínicos) que la ingesta de fibra y granos enteros tiene una relación inversa con la obesidad, diabetes tipo 2, incidencia de cáncer y de enfermedades cardiovasculares (Lattimer & Haub, 2010).

En la *Tabla 2* a continuación, se presentan las alegaciones de salud sobre contenido de fibra permitidas por el “Reglamento técnico Mercosur sobre información nutricional complementaria (declaraciones de propiedades nutricionales” MERCOSUR/GMC/RES. N°01/12 y las establecidas en el Reglamento (CE) N° 1924/2006 del parlamento Europeo.

Tabla 2-Alegaciones de salud para contenido de fibra según reglamento del MERCOSUR (MERCOSUR/GMC/RES. N°01/12) y Reglamento (CE) N° 1924/2006 del parlamento Europeo.

Reglamento MERCOSUR		Reglamento Comunidad Europea (CE)		
Atributo	Condiciones		Condiciones	
Fuente de fibra	Contiene al menos 3 g de fibra	Por 100 g o 100 ml en platos preparados según corresponda	Contiene al menos 3 g de fibra	Por 100 g
	Contiene al menos 2,5 g de fibra	Por porción	Contiene al menos 1,5 g de fibra	Por 100 Kcal
Alto contenido de fibra	Contiene al menos 6 g de fibra	por 100 g o 100 ml en platos preparados según corresponda	Contiene al menos 6 g de fibra	por 100 g
	Contiene al menos 5 g de fibra	Por porción	Contiene al menos 3 g de fibra	Por 100 Kcal

La porción de galletas equivale a 30 gramos en base a las “Normas para la rotulación y publicidad de los alimentos del MERCOSUR”. Las galletas en el presente trabajo se consideran como un “vehículo” perfecto para los nuevos ingredientes obtenidos a partir de salvado de arroz (extracto antioxidante y fracción enriquecida en fibra antioxidante) basados en que son alimentos “listos para consumir”, muy fáciles de elaborar, con una vida útil larga dado su baja actividad de agua y con una gran aceptación por toda la población.

El uso de galletas como “vehículo” de ingredientes o compuestos bioactivos de interés no es nuevo y de hecho cada vez más investigaciones aparecen proponiendo formulaciones de “galletas funcionales”. Las formulaciones descritas por otros autores que tienen como finalidad aumentar el contenido de fibra dietética e incrementar sus propiedades antioxidantes se basan en el empleo de 10% de harina de lino (Kaur *et al.*, 2017); marros de café (Martinez-Saez, *et al.*, 2017); cáscara de almendra (Kacem *et al.*; 2017), extracto de té verde (Gómez-Mascaraque *et al.* , 2017); harina de chia (Mesías *et al.* 2016); harina de amaranto natural y germinada (Chauhan, *et al.*, 2015); harina de cebada integral (Sharma & Singh, 2013); cascarilla de café (García-Serna, *et al.*, 2014); orujo de uva blanca (Mildner-Szkudlarz, 2013); polvo de hojas secas de *Tinospora cordifolia* (Sharma *et al.*, 2013); pulpa y cáscara de naranja (Nassar *et al.*, 2008).

Este capítulo aporta información relevante y de carácter innovador en el desarrollo de un prototipo de alimentos funcional apto para personas celíacas, libre de azúcar, con alto contenido en fibra y con propiedades antioxidantes a través de la incorporación de dos nuevos ingredientes obtenidos mediante el reciclado total de salvado de arroz.

2- Objetivos específicos del capítulo

2.1-Incorporar los nuevos ingredientes bioactivos obtenidos a partir de salvado de arroz (extracto antioxidante y fracción insoluble enriquecida en fibra dietética antioxidante) en galletas de harina de arroz, evaluando la estabilidad de dichos compuestos y su actividad tras el proceso de elaboración.

2.2-Realizar el estudio *in vitro* de las bioaccesibilidad y bioactividad de las galletas suplementadas con los dos nuevos ingredientes obtenidos a partir del salvado de arroz (“extracto antioxidante y fracción enriquecida en fibra antioxidante”).

3 - Materiales y métodos

3.1- *Ingredientes funcionales sostenibles aislados del salvado de arroz*

Para la formulación de las galletas se utilizaron los 2 ingredientes funcionales obtenidos a partir de salvado de arroz siguiendo los procedimientos ya detallados en el capítulo anterior.

Se entiende como el extracto antioxidante en el contexto de la presente tesis doctoral la fracción soluble resultante de la maceración del salvado de arroz empleando 35% de etanol en la solución extractora a 20°C durante 105 minutos con agitación constante. El extracto que se empleó como ingrediente en la formulación del alimento presentó una capacidad antioxidante de 451 ± 14 $\mu\text{moles TE/g}$ (radical ABTS) y 912 ± 31 $\mu\text{moles TE/g}$ (radical peroxilo-ORAC), respectivamente. El segundo ingrediente objeto de estudio, denominado a lo largo de la memoria de la tesis como fracción enriquecida en fibra antioxidante se corresponde con la fracción insoluble obtenida por la precipitación resultante del proceso de extracción empleado para obtener el extracto antioxidante. La fracción de fibra presentó una capacidad antioxidante de 236 ± 10 $\mu\text{moles de TE/g}$ de muestra (ABTS-QUENCHER). La *Tabla 3* proporciona información relativa a la composición en nutrientes de los ingredientes de salvado de arroz empleados en la formulación de la galleta.

Tabla 3- Composición nutricional de los 2 nuevos ingredientes (extracto antioxidante y fracción enriquecida en fibra antioxidante) obtenidos durante el procedimiento de extracción empleando una solución hidroalcohólica al 35%, 20°C y 105 minutos. Los datos se expresan en g/g de materia seca y representan el valor medio ± desvío estándar de las determinaciones realizadas por triplicado

	Extracto antioxidante	Fracción rica en fibra antioxidante
Proteínas totales	12,74±0,13 a	1,60±0,03 b
Lípidos totales	3,39±0,06 b	17,93±0,30 a
Fibra dietética	2,23±0,10 b	28,91±0,70 a
Cenizas	4,82±0,07 b	8,30±0,32 a
Carbohidratos totales*	77±0,02 a	43,40±0,03 b

*Contenido de Carbohidratos totales estimados por diferencia. Carbohidratos totales= MS-[Proteínas totales + Lípidos totales + Fibra dietética total + Cenizas]

3.2 -Formulación de la galleta

La formulación de las galletas incluyó harina de arroz, y aceite de salvado de arroz (previando la eventual transferencia tecnológica a la industria arrocera) además de los dos nuevos ingredientes producto del reciclaje total del salvado de arroz. Como edulcorante no nutritivo se utilizó stevia que junto al uso de harina de arroz permite ampliar el mercado de consumidores incluyendo a las personas con celiaquía y/o diabéticas.

Tabla 4 -Formulación de la galleta control, galleta fuente de fibra y antioxidante y balance teórico de fibra en g/100g de formulación.

	Galleta Control (%)	Galleta enriquecida con fibra antioxidante y extracto antioxidante (%)	Balance teórico de fibra (%)
Fracción enriquecida en fibra antioxidante	0,0	29,0	8,4
Aceite de arroz	21,8	21,8	-
Harina de arroz	54,0	19,6	0,5
Leche en polvo Descremada	18,0	18,0	-
Extracto antioxidante	-	5,4	0,1
Suero de Leche (80%)	3,0	3,0	-
Vainilla en polvo	1,0	1,0	-
Leudante	1,0	1,0	-
Lecitina de Soja	1,0	1,0	-
Estevia	0,2	0,2	-
TOTAL	100	100	8,9

Se realizó una formulación base a la que se le llamó galleta control (*Tabla 4*), la que fue modificada con el agregado de los 2 ingredientes de interés (extracto antioxidante y fracción enriquecida en fibra antioxidante).

Para poder cumplir con la reglamentación, se sustituyó la harina de arroz de la galleta control con 10% de extracto antioxidante y 54% de fracción enriquecida en fibra antioxidante. Con este nivel de sustitución y los aportes de fibra de la propia harina de arroz, se realizó un balance teórico del contenido de fibra (*Tabla 4*). Con esta formulación se esperó alcanzar un contenido total de 8,9g de fibra cada 100g de galletas o lo que es lo mismo 2,7g de fibra por porción de 30 g y > 6 g de fibra/ 100g, con el fin de tener una galleta a la que se le puede asignar la alegación nutricional “fuente de fibra” de acuerdo a la reglamentación vigente Mercosur (Mercosur/GMC/RES. N°01/12) y “alto en fibra” de acuerdo al Reglamento (CE) N° 1924/2006 del parlamento Europeo, con aportes de antioxidantes.

Con una sustitución del 10% de la harina de arroz, por extracto antioxidante se espera en teoría una capacidad antioxidante en las galletas de al menos 675 μ moles TE/ porción de 30g contra el radical ABTS (en 100g de galletas= [451 μ moles TE/ g fracción soluble* 5 g agregados en la formulación]).

El resto de los ingredientes utilizados fueron harina de arroz (20%) (lo que las hace aptas para celíacos), aceite de salvado de arroz (22%), y leudante en polvo de empresas locales, vainilla en polvo y lecitina líquida (Archer Daniels Midland Company -ADM) y leche en polvo descremada de empresa local, concentrado de proteína de suero de leche al 80% (de Friesland Campina DMV-Países Bajos).

Como edulcorante no nutritivo se utilizó stevia comercial (Ecologica-Natu-Bolivia- Diet www.end-stevia.com) conteniendo 70% esteviósidos (extraídos de las hojas secas de stevia) y 30% de fructosa. Se agregó en una proporción de 0,2% de la formulación que de acuerdo a la composición, aporta: 0,042 g de

esteviósidos y 0,018 g de fructosa por porción de galleta de 30g. Con esta concentración de azúcar la galleta obtenida puede etiquetarse como un producto que “no contiene azúcar” (de acuerdo al reglamento vigente en el Mercosur para etiquetado nutricional - MERCOSUR/GMC/RES. N°01/12) permitiendo que sea un producto apto para diabéticos y para la población en general en sintonía a las nuevas directrices de consumo de azúcar de la OMS, (2015).

Primero se mezclaron y pesaron los ingredientes en polvo de cada formulación mientras que por otro parte, la lecitina de soja fue dispersada en el aceite. A continuación los ingredientes húmedos fueron incorporados a los secos con el agregado de agua suficiente hasta que se formara una masa continua que permitiera formar una lámina de 5 mm de espesor que fue cortada con cortantes de 4 cm de diámetro. Seguidamente fueron horneadas en un horno de convección forzada a 180 °C durante 7 minutos.

3.3 -Análisis nutricional de las galletas

Una vez obtenidas las galletas, fueron caracterizadas fisicoquímicamente de acuerdo a los siguiente análisis: Humedad (13004-AOAC, 1999); proteínas totales por el método Kjeldahl (920.152 -AOAC, 1999); grasas totales (ISO-6492-1999); fibra dietética total por método enzimático (985.29 -AOAC, 1999); cenizas totales por método gravimétrico (ISO 5984-2002) y carbohidratos totales por diferencia (CHOS Disponibles=100-[Proteínas+ Grasa + Cenizas + Humedad+ Fibra dietética]).

3.4 -Análisis de las propiedades antioxidantes de las galletas

Con el objetivo de demostrar el carácter funcional de la nueva formulación de galleta, se determinó la capacidad antioxidante del alimento conteniendo los nuevos ingredientes de SA (extracto antioxidante y fibra antioxidante). Se estimó la contribución de los ingredientes individuales a estas propiedades del alimento

listo para el consumo, mediante el análisis de las fracciones obtenidas por extracción con una mezcla compuesta por agua acidificada y metanol. Estos resultados proporcionan información de la estabilidad de los antioxidantes utilizados como ingrediente a las condiciones del proceso de horneado empleado para la elaboración del alimento. Por otra parte, se obtuvo información relativa a la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos que forman los ingredientes por análisis de los productos de digestión (fracciones soluble y en insoluble) obtenidos por simulación las condiciones días e digestión oral gastrointestinal humana (*Figura 1*).

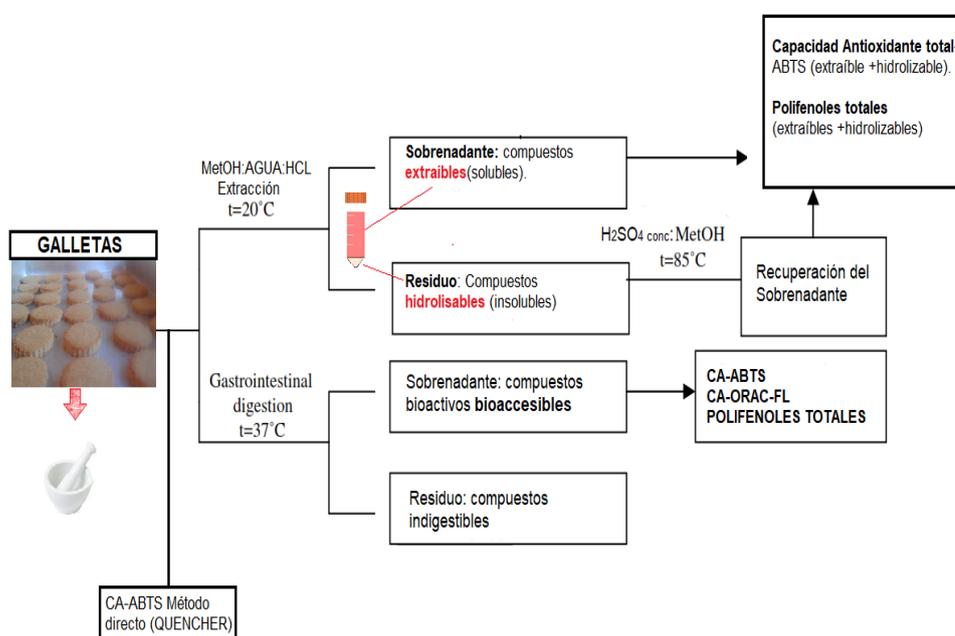


Figura 1 -Esquema de análisis realizados la galleta para evaluación de las propiedades funcionales.

3.4.1-Evaluación de las propiedades antioxidantes del alimento listo para el consumo

Para complementar la información sobre la capacidad antioxidante de la galleta obtenida se utilizó el método de ABTS- directo o QUENCHER (sigla en inglés para Quick, Easy, New, Cheap and Reproducible) descrito por Serpen

et.al.(2007) y Gökmen *et al.*, (2009). El método ha sido detallado en el punto 2.5.2 del capítulo III (“Evaluación de la CA de la fracción insoluble”)

Se decidió utilizar la medida directa de ABTS-QUENCHER, dado que es el método más adecuado para la evaluación de la capacidad antioxidante de matrices alimentarias sólidas tales como cereales, compuestas por antioxidantes con diferente estructura y propiedades físico-químicas (solubilidad). Al utilizar el mismo método de evaluación de la capacidad antioxidante en el análisis de las galletas obtenidas y en los nuevos ingredientes incorporados (extracto antioxidante y fracción enriquecida en fibra antioxidante) es posible estimar la proporción de capacidad antioxidante de la galleta debida a la incorporación de los nuevos ingredientes bioactivos.

Las muestras para el análisis de ABTS-QUENCHER, fueron previamente acondicionadas haciendo pasar los respectivos polvos secos (galleta pulverizada, extracto soluble y fracción enriquecida en fibra) por una tamiz de 0,20 µm para uniformizar el tamaño de partícula y favorecer el contacto entre las mismas y el reactivo de ABTS tal y como ha sido sugerido por Serpen *et al.*, (2007) y Gökmen *et al.*, (2009). Seguidamente, se procedió a pesar 10 mg de cada muestra por triplicado y a continuación se continuó con el procedimiento descrito en 3.5.2 (“Evaluación de la CA de la fracción insoluble”) del capítulo anterior.

3.4.2.-Estimación de la contribución de los ingredientes a las propiedades antioxidantes del alimento listo para el consumo

Los compuestos fenólicos extraíbles (solubles) e hidrolizables de la galletas se extrajeron por extracción según lo sugerido por Vitali *et al.*, 2009 (*Figura 1*). Vitali divide los compuestos fenólicos en 2 grupos: unos solubles, que son los fácilmente extraíbles, y los compuestos hidrolizables que requieren un tratamiento más severo para ser liberados de la matriz (*Figura.1*). Los compuestos fenólicos extraíbles (solubles) se extrajeron empleando una mezcla de HCl_{conc} /metanol/agua (1:80:10 v/v), según las proporciones propuestas por Gao *et al.*, (2002). Se prepararon 3 lotes de galletas y cada uno por separado

fue pulverizado utilizando un mortero de cerámica de laboratorio, hasta que las galletas adquirieran tamaño de polvo lo más homogéneo posible. De cada lote se obtuvieron extractos por triplicado de muestras de alimentos. Los extractos se prepararon empleando de 200 mg de las galletas en polvo y 4 mL de la solución extractora de metanol acidificada, durante dos horas a temperatura ambiente, en tubos Falcon con agitación a 150 rpm (*Figura 1*). Seguidamente, la mezcla se centrifugó a 1358 g durante 10 minutos en una centrífuga de mesa (Thermo Scientific, Sorvall ST-8R) y se recuperó el sobrenadante para el análisis inmediato. La caracterización de los extractos se realizó mediante el análisis del contenido total de polifenoles extraíbles (solubles) y la capacidad antioxidante contra el radical ABTS.

Para la extracción de compuestos hidrolizables (*Figura 1*), se mezcló el precipitado resultante de la extracción de compuestos extraíbles (solubles), con 22 mL de metanol acidificado (10:1 v / v, metanol / H₂SO₄_{conc.}), de acuerdo a lo propuesto por Hartzfeld, *et al.*, (2002). La mezcla se colocó en un baño de agua con agitación a 85 ° C durante 20 horas. Los sobrenadantes obtenidos después de la centrifugación (10 min, 3500 rpm) se utilizaron inmediatamente para la determinación de compuestos polifenoles hidrolizables y de la capacidad antioxidante (ABTS) correspondiente a los compuestos hidrolizables. El contenido de polifenoles totales y la CA-ABTS de la galleta se realizó sumando los valores obtenidos en cada fracción (extraíble + hidrolizable) (*Figura 1*)

3.4.2.1 - Cuantificación de compuestos fenólicos extraídos de las galletas

Los extractos obtenidos por procedimiento de extracción forzada y también para los digeridos resultantes de la simulación gastrointestinal (digestión *in vitro* explicada más adelante) se utilizaron para la determinación del contenido fenólico total usando el método de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi ., 1965) modificado por Gao *et al.* (2002). Se añadió una alícuota de las muestras (0,2 mL) a 1,5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu recién diluido (1:10). La mezcla se dejó reposar durante 5 minutos. Después, se añadieron 1,5 mL de solución de carbonato sódico (60 g / l). La mezcla se incubó durante 90 minutos y la absorbancia se leyó a 725 nm en un espectrofotómetro UV-Visible Shimadzu

1800. Se usó metanol acidificado como blanco y ácido gálico como patrón estándar para las rectas de calibrado (0,1-1,0 mg/mL). Los resultados se expresaron en mg de GAE /g de muestra o porción de galleta.

3.4.2.2.- *Cuantificación de la capacidad antioxidante de los compuestos extraíble e hidrolizables de la galletas*

La capacidad antioxidante de ambas fracciones (extraíble e hidrolizable resultantes de la extracción forzada de la galleta, (*Figura 1*) se midió usando el ensayo de decoloración de catión contra el radical ABTS, tal como se propone *Re et al.* (1999) y fuera explicado en detalle en el capítulo anterior con modificaciones ya que se utilizó etanol: agua al 50% para las diluciones. Se preparó una solución madre del radical ABTS•+ (2,5 mM) por oxidación química del ABTS [ácido 2,2`-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)] 7mM en presencia de persulfato potásico 140mM a temperatura ambiente y se dejó incubar de 14 a 16 horas en oscuridad para la formación del radical ABTS•+ La solución patrón de Trolox se preparó diluyendo en una mezcla etanol: agua (50:50 v / v) y la recta de calibrado se construyó tomando valores de 0 a 2,0 mM concentración final. Para el estudio, la solución radical se diluyó con una mezcla de etanol: agua (50:50 v:v) hasta una absorbancia de 0,70 ($\pm 0,02$) a 734 nm. Para la lectura de las muestras se añadieron 3 mL de esta solución a 30 μ l de extracto o solución patrón de Trolox y se dejó en reposo durante 30 minutos en la oscuridad. Se utilizó etanol: agua (50:50 v:v) como blanco y se tomaron lecturas de absorbancia a 734 nm. Todas las lecturas se hicieron por triplicado.

3.4.3 - *Evaluación de la bioaccesibilidad de compuestos antioxidantes en los digeridos resultantes de la simulación de la digestión gástrica in vitro de galletas*

Las muestras de galletas se digirieron *in vitro* simulando las condiciones fisiológicas de digestión humana empleando el modelo descrito por *Hollebeeck et al.* (2013). Las digestiones se realizaron en Erlenmeyer de 50 mL cerrados en baño de agua a 37 °C y agitación constante a 200 rpm. Se prepararon los digeridos por triplicado de los triplicados de muestras de galletas (n=9). El proceso de digestión *in vitro* constó de tres etapas fundamentales:

Etapa 1-Oral o salivar: el volumen de incubación fue de 10,43 mL, conteniendo α -amilasa (90 unidades/mL, 0,43 mL) a pH 6,9, utilizando buffer fosfato 10 mM pH 6,9. La incubación se realizó a 37 °C por 5 minutos con agitación constante a 50 rpm.

Etapa 2- Gástrica: se agregó pepsina, se ajustó el pH a 2,0 con HCl 1M y se llevó a un volumen de 12,30 mL con buffer fosfato 10 mM pH 6,9. Se incubó por 90 minutos en las mismas condiciones.

Etapa 3- Intestinal-se agregó pancreatina, bilis y se ajustó el pH a 7,0 con NaHCO₃ 0,1 M. Se llevó el volumen a 7,36 mL con buffer fosfato 10 mM pH 6,9 y se lo incubó por 150 minutos en las mismas condiciones. Terminado el tiempo de incubación, se inactivó las enzimas en baño de agua a 90 °C por 10 minutos.

Luego, se centrifugó a 10.000 rpm por 10 minutos y se separó el sobrenadante del pellet el cual se llevó a -20 °C y se liofilizó para mantenerlo estable para los posteriores análisis. Los compuestos que conforman el sobrenadante podrían estar bioaccesibles para su absorción en el intestino. Por otra parte, la fracción insoluble se corresponde al material que pasaría al intestino grueso para ser sometida a fermentación microbiana por las bacterias del colon. Los metabolitos resultantes de la acción de la microbiota serían parcialmente absorbidos y/o tener un efecto en la pared intestinal.

3.4.3.1-Evaluación del contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante de los digeridos resultantes de la simulación in vitro del proceso de digestión oral

La evaluación del contenido en polifenoles totales en los digeridos se realizó por el método de Folin Ciocalteu (Singleton & Rossi Jr., 1965) modificado por Gao *et al.* (2002) descrito en el punto 2.4.2.1 (Cuantificación de compuestos fenólicos extraídos de las galletas) de este capítulo

Para la evaluación de la capacidad antioxidante de los digeridos resultantes de la simulación del proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*, se utilizaron 2 métodos:

- a- Capacidad Antioxidante contra el radical ABTS^{•+}: empleando la metodología descrita en 3.3.3 del capítulo I.
- b- Capacidad antioxidante contra el radical peroxilo mediante el ensayoORAC-FL por la metodología descrita en 3.3.3 del capítulo I

3.5- Caracterización del color superficial de las galletas

Para evaluar el color superficial de las galletas se utilizó un Espectrofotómetro portátil, de la marca Konica Minolta Sensig Ing modelo CM-600d. El almacenamiento de las medidas y el análisis del color se realizaron con el software SpectraMagic NX. Las condiciones de trabajo fueron en modo reflectancia, observador de 10°, iluminación D65 y con una calibración del área blanca de 8mm. Se obtuvo el espacio de color Hunter L, a y b, que es un espacio de color rectangular de 3 dimensiones basada en la teoría de los colores opuestos. El eje L (luminosidad) varía de 0 (negro) a 100 (blanco), el eje a (eje de rojo a verde) presenta valores positivos correspondientes a los rojos y negativos correspondientes a los verdes siendo el 0 neutro y el eje b (eje de azul a amarillo) presenta valores positivos para el amarillo y negativos para el azul siendo el 0 neutro. La lectura se realizó sobre un total de 20 galletas.

3.6-Análisis de aceptabilidad de la galleta funcional

La galleta formulada fue sometida a una prueba de aceptabilidad general e intención de compra. Los atributos sensoriales evaluados incluyeron textura (dureza / suavidad, frescura), apariencia y sabor, entre otros atributos. El panel de catadores estuvo constituido por 88 voluntarios no entrenados con una edad comprendida entre 19 a 68 años. El reclutamiento se llevó a cabo en la Universidad de la República y Universidad Católica del Uruguay, respectivamente. Se seleccionaron para el estudio consumidores regulares de

galletas. La población estudiada estuvo compuesta por 40% hombres y 60 % mujeres. Se sirvió una galleta muestra a cada consumidor en placas de plástico utilizando 2 números aleatorios de tres cifras. Los consumidores evaluaron la aceptabilidad general con una escala hedónica de 9 puntos donde la izquierda se ubica el 1 = " me disgusta mucho" y a la derecha el 9 = "me gusta muchísimo".

La intención de compra se evaluó empleando una escala hedónica de 9 puntos donde 1= "definitivamente no" y 9 = "Definitivamente sí" (*Figura 2*). A continuación, se utilizaron 2 modelos de boletas con el orden de los atributos aleatorizados y fueron repartidos intercaladamente entre consumidores de forma tal que se utilizaron la mitad de cada modelo. Previo a la realización de la cata, los voluntarios fueron informados de que se trataba de una galleta apta para celíacos (por ser de harina de arroz) y diabéticos por el uso de Stevia, elevado contenido de fibra (fuente de fibra para Mercosur y Alto contenido de fibra CE) y antioxidantes por los contenidos respectivos de extracto antioxidante y fracción enriquecida en fibra de salvado de arroz. Se evaluaron veintisiete atributos, los datos se analizaron por frecuencias en las respuestas y expresados como promedio \pm desvío estándar.

BOLETA DE EVALUACIÓN



INSTRUCCIONES:

- Ud. recibirá una muestra de una GALLETITA APTA PARA CELÍACOS Y DIABÉTICOS, ENRIQUECIDA CON FIBRA Y CON ANTIOXIDANTES.
- Por favor, pruebe la galletita y responda las preguntas a continuación utilizando las escalas correspondientes.

¿Cuánto le gusta esta galletita?

Me disgusta muchísimo Me es indiferente Me gusta muchísimo

¿Compraría esta galletita?

Definitivamente NO Quizás Definitivamente sí

Por favor, marque TODAS las palabras o frases que considera se aplican a esta galletita

<input type="checkbox"/> Deliciosa	<input type="checkbox"/> Sabrosa	<input type="checkbox"/> Blanda
<input type="checkbox"/> Desagradable	<input type="checkbox"/> Amarga	<input type="checkbox"/> Muy blanda
<input type="checkbox"/> Rica	<input type="checkbox"/> Sabor a cereal	<input type="checkbox"/> Dura
<input type="checkbox"/> Poco Dulce	<input type="checkbox"/> Sabor a Vainilla	<input type="checkbox"/> Áspera
<input type="checkbox"/> Dulce	<input type="checkbox"/> Sabor Artificial	<input type="checkbox"/> Harinosa
<input type="checkbox"/> Muy Dulce	<input type="checkbox"/> Sabor Extraño	<input type="checkbox"/> Adhesiva
<input type="checkbox"/> Sabor suave	<input type="checkbox"/> Con retrogusto	<input type="checkbox"/> Húmeda
<input type="checkbox"/> Sabor intenso	<input type="checkbox"/> Fibrosa	<input type="checkbox"/> Pastosa
<input type="checkbox"/> Poco Sabor	<input type="checkbox"/> Desmenuzable	<input type="checkbox"/> Crocante

Figura 2- Fragmento del modelo 1 de boleta de evaluación de aceptabilidad e intención de compra de las galletas.

4-Resultados y discusión

4.1- Validación nutricional de las galletas funcionales

A continuación en la *Tabla 5*, se presentan los resultados del análisis de la galleta formulada con los 2 nuevos ingredientes obtenidos del salvado de arroz (“extracto antioxidante” y “fibra antioxidante”) desarrollados en el capítulo anterior (capítulo I). Si se compara la composición nutricional de las galletas control (*Tabla 6*) respecto a las galletas funcionales propuestas (*Tabla 7*).

Tabla 5- Composición nutricional de las galletas funcionales propuestas la información se presenta expresada en g/100g de galletas funcionales Se representa el valor medio \pm desvío estándar de las determinaciones realizados por triplicado.

	Cantidad g/100
Carbohidratos totales *	34,29
Grasas totales	27,60 \pm 0,16
Proteína	13,57 \pm 0,24
Humedad	10,81 \pm 0,16
Fibra dietética total	9,03 \pm 0,43
Cenizas	4,70 \pm 0,01

*Estimado por diferencia entre $100 - \sum \text{Grasas totales} + \text{proteínas} + \text{humedad} + \text{fibra dietética} + \text{cenizas}$.

Las Tablas 6 y 7 muestran un modelo de etiquetado nutricional para el envasado de cada galleta de acuerdo al reglamento vigente en el Mercosur (MERCOSUR/GMC/RES N° 18/94)

Tabla 6- Etiquetado nutricional de la galleta control de acuerdo a la formulación empleada y cumpliendo con el reglamento de rotulado nutricional vigente en el Mercosur (MERCOSUR/GMC/RES N° 18/94).

Galleta control		
Información nutricional		
Tamaño de la Porción 30g (3 galletas)		
Cantidad por porción		
Valor energético (kcal/KJ)		154/644
		%VD (*)
Carbohidratos (g)	16	5
Grasas totales (g)	8	15
Grasas saturadas (g)	5	21
Grasas <i>trans</i> (g)	0	—
Proteína (g)	4	5
Fibra Alimentaria (g)	0	—
Sodio (mg)	38	2
* Valores diario con base a una dieta de 2000 kcal. Sus valores diarios pueden ser mayores o menores dependiendo de sus		

Tabla 7- Etiquetado nutricional de la galleta funcional de acuerdo a la al análisis nutricional de acuerdo al Reglamento de rotulado nutricional vigente en el Mercosur (MERCOSUR/GMC/RES N° 18/94).

Galleta funcional		
Información nutricional		
Tamaño de la Porción 30g (3 galletas)		
Cantidad por porción		
Valor energético (kcal/KJ)		132/552
		%VD (*)
Carbohidratos (g)	10	3
Grasas totales (g)	8	15
Grasas saturadas (g)	5	21
Grasas <i>trans</i> (g)	0	—
Proteína (g)	4	5
Fibra Alimentaria (g)	3	11
Sodio (mg)	38	2
* Valores diario con base a una dieta de 2000 kcal. Sus valores diarios pueden ser mayores o menores dependiendo de sus		

Se destaca el alto aporte de fibra dietética de la galleta funcional (*Tabla 7*), al sustituir parte de la harina de arroz con la fracción insoluble obtenida del salvado de arroz (enriquecida en fibra antioxidante). El contenido de 3 g de fibra dietética por porción, permite reglamentariamente el uso de alegato nutricional de alimento de “alto contenido en fibra” (>6 g fibra/100g) de acuerdo con lo establecido en el Reglamento (CE) 1924/2006 del Parlamento Europeo (Unión Europea, 2006) y “fuente de fibra” (> 2,5 g de fibra dietética por porción de 30 g) de acuerdo al reglamento vigente del Mercosur (Mercosur/GMC/RES. N°01/12). Este mayor aporte de fibra dietética es coherente con las directrices de la OMS (2014 y 2015) contribuyendo con eventuales nuevas opciones en el mercado de alimentos saludables que puedan potencialmente contribuir a la prevención de ocurrencia de enfermedades crónicas no transmisibles, con ventajas directas sobre la prevención potencial de diabetes tipo 2 (Goff *et al.* (2017).

Sumado a lo anterior se trata de una formulación que “no contiene azúcar añadido” de acuerdo a la reglamentación vigente para el MERCOSUR (MERCOSUR/GMC/RES. N°01/12) (*Tabla 1*) y endulzada con edulcorante no nutritivo natural en línea a las recomendaciones de la OMS (2015) hechas en relación en la necesidad de reducir el consumo de azúcares simples tales como sacarosa y se ajusta a las nuevas tendencias del mercado (Sylvetsky & Rother (2016).

A la luz de los datos expuestos y el conocimiento de la existencia de una demanda en aumento por snacks tipo galletas en el mercado (Okpala y Okoli, 2013); principalmente, en nuestra región cuyo consumo es habitual (Euromonitor internacional, 2017) debe ser visualizado como una señal de alerta para la salud pública dado que básicamente las galletas tradicionales son “vehículos” de azúcares libres, grasas saturadas y harina blanca (muy baja en fibra), ingredientes cuyo consumo en exceso constituyen un factor de riesgo de ocurrencia de enfermedades no transmisibles (MSP, 2016). La posibilidad de reformular las galletas control sustituyendo sus ingredientes básicos por alternativas nutricionalmente ventajosos para la salud del consumidor (en concordancia a las recomendaciones de la OMS, 2014 y OMS 2015) junto al agregado de los dos los nuevos ingredientes bioactivos obtenidos del salvado de arroz, ofrece un nuevo producto saludable y apto para regímenes especiales

tales como los celíacos (Jnawali *et al.*, 2016; Torbica *et al.* 2012) siendo a su vez una alternativa sostenible para la revalorización del salvado de arroz que es un residuo abundante de la industria del procesado del arroz.

4.2- Evaluación del potencial como nuevo alimento funcional de las galletas.

4.2.1 Capacidad antioxidante del nuevo alimento

Como se muestra en la *Tabla 8*, tanto en la evaluación por el método de ABTS directo (QUENCHER por sus siglas en inglés), como por ABTS tras la extracción propuesta por Vitali *et al.* 2009 (*Figura 1*), las galletas con sustitución de harina de arroz por los nuevos ingredientes obtenidos a partir del salvado de arroz (extracto antioxidante y fibra antioxidante) presentaron una mayor y significativa capacidad antioxidante ($p < 0,05$) que la galleta control.

Tabla 8-Evaluación de la capacidad antioxidante y del contenido de polifenoles, de las galletas funcionales vs la galleta control, analizadas por el método de ABTS-QUENCHER y método de extracción (Vitali *et al.*, 2009). Se presentan los valores medios \pm desvío estándar obtenido del análisis de cada muestra por sextuplicado. Letras diferentes en una misma fila representan diferencias significativas ($p < 0,05$), test de Tukey.

	Galleta funcional	Galleta control
ABTS Directo -QUENCHER (1)	37,52 \pm 2,44 a	11,37 \pm 0,63 b
ABTS Compuestos extraíbles (1)	16,59 \pm 0,50 a	0,97 \pm 0,06 b
ABTS Compuestos hidrolizables (1)	105,19 \pm 4,99 a	46,26 \pm 2,67 b
Capacidad antioxidante total (ABTS) (1) (*)	121,78 \pm 5,00 a	47,23 \pm 2,67 b
Polifenoles extraíbles (2)	3,30 \pm 0,25	nd
Polifenoles hidrolizables (2)	29,77 \pm 1,57	nd
Polifenoles totales (2) (**)	33,07 \pm 1,59	nd

(1)- $\mu\text{mol TE/g}$ galleta

(2)-mg Gálico equivalente/g de galleta

(*)Capacidad antioxidante total= \sum ABTS Compuestos Extraíbles + ABTS Compuestos Hidrolizable.

(**) Polifenoles totales= polifenoles solubles + Polifenoles hidrolizables

La adición de los nuevos ingredientes funcionales derivados del salvado de arroz a la formulación de galleta incrementó significativamente ($p < 0,05$), la capacidad antioxidante total en 70% por su evaluación contra el radical ABTS por el método directo-QUENCHER y 61% mediante el método de ABTS en las condiciones estándar correspondientes a la suma de compuestos extraíbles e hidrolizables obtenidos por extracción dependiente por el método propuesto por Vitali *et al.* (2009) respecto a la galleta control.

Vitali *et al.* 2009, reportan la actividad antioxidante únicamente de la fracción extraíble (*Figura 1*). En el presente trabajo, se reporta la capacidad antioxidante contra el radical ABTS, como la sumatoria de la capacidad antioxidante de los compuestos extraíbles ($16,59 \pm 0,50 \mu\text{mol TE/g galleta}$) y compuestos hidrolizables ($105,19 \pm 4,99 \mu\text{mol TE/g galleta}$) resultando ser de $121,78 \pm 5,00 \mu\text{mol TE/g galleta}$ o lo que es lo mismo $3653 \pm 150 \mu\text{mol TE/ porción de galleta (30g)}$. El hecho de considerar a los compuestos hidrolizables, se basa en lo reportado por Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, (2005), donde se evidenció que los aportes a la capacidad antioxidante de los polifenoles asociados a la fibra son incluso mayores que la de los compuestos solubles. La capacidad para atrapar los radicales ABTS de los compuestos hidrolizables es inédita y no puede compararse debido a la falta de datos publicados. Sin embargo, la relación entre los compuestos extraíbles e hidrolizables es consistente con el hecho antes mencionado de la cantidad de antioxidantes asociados la fibra dietética (J. Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2005). De hecho, si se observa la *Tabla 8* los compuestos hidrolizables prácticamente representan el 86% de la capacidad antioxidante total así estimada, mientras que el 14% restante es atribuible a los compuestos solubles. Los compuestos insolubles son subestimados en los ensayos tradicionales de evaluación de la capacidad antioxidantes, pero se sabe que pueden ser potencialmente disponibles en el tracto gastrointestinal tras su fermentación en el colon (Cardona *et al.*, 2013, Selma *et al.* 2009).

El contenido de polifenoles en la fracción extraíble de la galleta funcional (*Tabla 8*) fue aproximadamente 10 veces inferior al contenido de compuestos polifenólicos hidrolizables y representan aproximadamente el 10 % de los

polifenoles totales. Esto confirma la necesidad de extraerlos para una evaluación más aproximada (Saura-Calixto, 2010) dado que parte de los compuestos polifenólicos se encuentran asociados a la fibra por enlaces covalentes y requiere de tratamientos más severos (como los ácidos utilizados en este proceso para ser liberados y poder ser cuantificados. El contenido de polifenoles totales resultantes de las galletas funcionales fue más elevado que los reportados por Vitali *et al.* (2009), para las galletas de harina de trigo suplementadas con inulina (10,5%) en combinación con una de las siguientes materias primas: harina de soja, amaranto, algarrobo, fibra de manzana, fibra de avena. Las diferencias pueden deberse a cambios en las formulaciones, contenido en fibra dietética y características de la materia prima y las propiedades de cada componente en particular.

La capacidad antioxidante medida por el método de ABTS directo (QUENCHER) es de $37,52 \pm 2,44$ μ moles TE/g de galleta. Este valor es superior a los obtenidos por Serpen *et al.*, (2012) trabajando con panes multicereales con distintos porcentajes de granos. Los valores reportados por estos autores van de 6,9 a 12,9 μ moles de TE/g de pan. Las galletas funcionales propuestas contienen además de fibra antioxidante aportada por la fracción insoluble de salvado de arroz (fracción enriquecida en fibra antioxidante), fracción soluble del salvado de arroz (extracto antioxidante), por lo que es de esperar que tenga mayor capacidad antioxidante. En la *Tabla 9* se resumen los valores de capacidad antioxidante evaluada por ABTS-QUENCHER de los ingredientes bioactivos ponderado por el % que ocupan en la formulación y la del alimento completo. A diferencia de la evaluación hecha con el método anterior, donde el mayor aporte a la capacidad antioxidante de la galleta funcional se explicó en el aporte de los compuesto hidrolizables (insolubles), con ABTS-QUENCHER el mayor aporte a la capacidad antioxidante total del alimento se debe al alto poder antioxidante del extracto antioxidante. Esto se debe a las diferencias intrínsecas de cada método de evaluación. La eficacia del método de extracción propuesto por Vitali *et al.* (2009) es superior a los del método de ABTS-QUENCHER. Mientras que en el primero la extracción dependiente rompe las estructuras de la matriz con los ácidos y permite “liberar” mayor concentración de compuestos que potencialmente también aportan a la capacidad antioxidante una vez que son

fermentados en el colon, el segundo se basa en una reacción superficial entre los sólidos (alimento antioxidante) y líquidos (radical ABTS).

Tabla 9-Capacidad antioxidante ABTS-QUENCHER de una porción de alimento formulado y la de sus dos ingredientes bioactivos de acuerdo al % ocupado en la formulación, expresado como $\mu\text{moles TE/ 30 g}$ de galleta. Se representa el valor medio \pm desvío estándar de las determinaciones realizados por sextuplicado.

	ABTS-QUENCHER ($\mu\text{moles TE/porción 30g}$)*	% en la formulación
Fracción enriquecida en fibra antioxidantes	271,06 \pm 11,07	29
Extracto antioxidante	632,23 \pm 15,03	5
Galleta reformulada	1125,62 \pm 73,23	100

*Datos promedio \pm desviación estándar

En la *Figura 2*, se observa que existe un 24% de la capacidad antioxidante total de la galleta de diferencia respecto a la suma del aporte individual de los ingredientes.

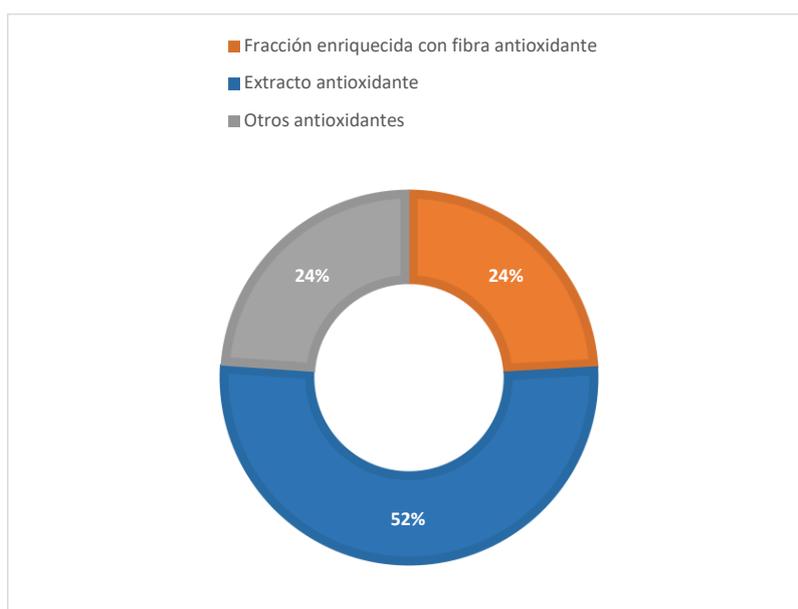


Figura 2-Participación porcentual de los nuevos ingredientes de interés en la capacidad antioxidante global ($1125,62 \pm 73,23$ μ moles de TE) de una porción (30g) de galleta funcional propuesta.

El % de la capacidad antioxidante debida a “otros antioxidantes” es la capacidad antioxidante que presentan las galletas funcionales que no es explicada por la capacidad antioxidante de sus ingredientes bioactivos individuales evaluados en relación a la proporción usada en la formulación (5 g/100 g de Fracción soluble y 29 g/100 g de fracción insoluble del salvado de arroz). Dicho de otra manera, al interactuar todos los ingredientes en la matriz completa la capacidad antioxidante contra el radical ABTS-QUENCHER, difiere de la actividad antioxidante de la suma de sus ingredientes bioactivos individuales. En concordancia a lo publicado por Žilić *et al.*, 2016, puede estar ocurriendo que durante el proceso de horneado a temperaturas controladas (en este caso 180°C por 7 minutos), aumente el contenido total de compuestos fenólicos, al afectar la solubilidad de las formas ligadas asociados a la fibra dietética. Vitali *et al.* (2009) también observaron que durante el horneado el contenido de fenoles biodisponibles aumentó significativamente (35% en promedio). Además de lo anterior, la reacción de Maillard influye sobre el aumento de la capacidad antioxidante en las galletas ya que se forman sustancias que contribuyen al aumento de la capacidad antioxidante (Xu *et al.*, 2016, Žilić *et al.*, 2016, Vitali *et al.* 2009.). Por otra parte, pueden contribuir a la capacidad antioxidante de la fracción “otros” , los polifenoles que naturalmente se encuentra en la harina de arroz que según Sakač, *et al.*, (2011) es de 9.98 ± 0.253 mg GAE/100g de harina.

Se debe tener presente que el salvado de arroz es rico en aceite (15-20%) que mayoritariamente se ha recuperado en la fracción insoluble del salvado de arroz ($17,90 \pm 0,26$ g/100 g de SA) (Tabla 4). Este aceite es rico en compuestos bioactivos y contiene más de 100 antioxidantes diferentes entre los que se destacan tocotrienoles (10,6 mg / 100 g) γ -orizanol (281 mg / 100 g) y más 2% de fitoesteroles (Fradet, 2010). Estos antioxidantes no cuantificados en las galletas funcionales ni en la fracción enriquecida en fibra podrían estar aportando parte de la capacidad antioxidante incluida en “otros”. Sumado a lo anterior se

debe tomar en cuenta la capacidad antioxidante del propio aceite de salvado de arroz incorporado en la formulación a razón de 21,8 g/100g (*Tabla 4*).

A partir de estos resultados expuestos se puede concluir que el enriquecimiento de la formulación con los 2 nuevos ingredientes obtenidos del salvado de arroz y en especial el aporte de la fracción enriquecida en fibra antioxidante, aumentó el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante en las galletas funcionales. Otros autores han presentado resultados similares aunque en ningún caso se incorporaron ingredientes provenientes del salvado de arroz. Por ejemplo Kaur *et al.*, 2017; trabajaron con niveles de sustitución incrementales de harina de lino en sustitución a la harina de trigo (5, 10, 15, 20 y 30%) para la elaboración de galletas. Estos autores observaron incrementos en el contenido de fibra dietética al aumentar el % de sustitución en las galletas al tiempo que se incrementó también el contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante en el orden del 55% respecto al control. Chauhan *et al.* 2015 en galletas elaboradas sustituyendo harina de trigo por harina de amaranto germinado observaron un aumento significativo del orden 23% en la capacidad antioxidante y de 22,5 % en el contenido de fibra dietética. En este artículo se evaluó la capacidad antioxidante y el aumento de fibra dietética total en forma separada atribuyendo la mejora en la capacidad antioxidante a la actividad de las enzimas hidrolíticas durante la germinación del amaranto que pueden dar lugar a la liberación de compuestos fitoquímicos antioxidantes y los productos de la reacción de Maillard que se generan durante el proceso de horneado.

A la luz de nuestros hallazgos es probable que la mejora también pueda explicarse en parte a los compuestos antioxidantes ligados al mayor contenido de fibra dietética reportado. Sharma & Singh, 2014; sustituyeron a la harina de trigo refinada por harina de cebada entera o integral a diferentes niveles (25, 50,75 y 100%) observando aumentos significativos en el contenido de polifenoles totales, flavonoides y capacidad antioxidante (8,8 a 17,0%) de las galletas. Básicamente, las mejoras de las propiedades funcionales de la galleta se asocian al hecho de contar con el salvado de cebada en la harina integral, el cual se sabe concentra los compuestos polifenólicos asociados al mayor contenido de fibra.

Hasta la fecha no se han reportado trabajos en los que se incorpore como ingredientes extractos antioxidantes conjuntamente con fibra antioxidante provenientes del salvado de arroz a galletas. Si comparamos con las investigaciones antes mencionadas, donde se utilizan harinas de diferentes cereales para la sustitución de harina de trigo, podemos concluir que la sustitución directamente con el extracto y la fracción enriquecida con fibra antioxidante parecería tener un impacto mayor en la mejora de la capacidad antioxidante del alimento (70% para ABTS-Quencher y 61 % para ABTS por extracción forzada) respecto al uso de la materia prima de partida.

4.2.2- Bioaccesibilidad de los antioxidantes vehiculizados en el alimento

Para complementar la información anterior y conocer qué proporción de los antioxidantes vehiculizados en la galleta podrían quedar bioaccesibles en el tracto gastrointestinal tras el proceso de digestión del alimento se evaluó la capacidad antioxidante (ABTS y ORAC) y el contenido de polifenoles totales de los digeridos resultantes de la simulación del proceso de digestión *in vitro*. Tras someter la galleta funcional a la digestión enzimática completa, simulando cada una de las etapas del proceso *in vitro* (Hollebeeck, 2013), se obtuvieron 2 fracciones tras la centrifugación final: i)- Un sobrenadante o extracto fisiológico que se asume es lo que potencialmente ingresa a nuestro organismo hasta el intestino delgado inclusive; ii)- un precipitado que se asume es la fracción no digestible en el tracto gastrointestinal que pasa directamente al colon y podría ser fermentada dando lugar a nuevos compuestos bioactivos que podrían ser absorbidos por el organismo o eliminados en las heces. La composición y grado de aprovechamiento de esta fracción que pasa al colon dependerá de las particularidades de la microbiota individual dentro de cada población y cada individuo siendo extremadamente diverso (Duda-Chodak *et al.*, 2015) y no ha sido objeto de estudio en este trabajo. Los compuestos antioxidantes retenidos en la fracción no digestibles podrían también proteger a las células del colon del estrés oxidativo y reducir el riesgo de patologías asociadas a éste (Gessner *et al.* (2016)

En la *Tabla 10*, se presenta la capacidad antioxidante y el contenido de polifenoles totales medidos en la galleta y sus productos de digestión. Si se compara la capacidad antioxidante de los extractos fisiológicos respecto a la capacidad antioxidante total de la galleta (ABTS⁺ compuestos solubles +compuestos hidrolizables), vemos que en los digeridos se recupera aproximadamente un 19 % del total, por lo que se puede asumir que el 81% restante es aportado por la fracción insoluble que directamente arriba al colon donde es potencialmente fermentada y podría llegar a contribuir a modular el crecimiento y desarrollo de la microbiota (Torres *et al.*, 2016; Pérez- Jimenéz *et al.*, 2013). Teniendo en cuenta que en capítulo anterior, tras someter el extracto antioxidante puro a las mismas condiciones de digestión *in vitro* (Hollebeeck *et al.*, 2013), se observaron pérdidas significativas ($p < 0,05$) de la capacidad antioxidante del 21 y 29%, medibles por métodos ORAC y ABTS, respectivamente. Los resultados obtenidos para el alimento se corresponden con los de los encontrados para los ingredientes individuales y sugieren que tras el proceso de digestión podrían quedar bioaccesibles antioxidantes en concentraciones fisiológicamente relevantes. Se requieren de estudios *in vivo* para confirmar los resultados preliminares obtenidos en la presente investigación el presente estudio. Por otra parte, la presencia de los antioxidantes libres podría ejercer una función tecnológica preservando de la oxidación a la fracción de lípidos que componen el alimento y consecuentemente alargar la vida útil del mismo (Arab *et al.*, 2011). .

Tabla 10- Efectos de la digestión oral gastrointestinal *in vitro* en la bioaccesibilidad de los antioxidantes vehiculizados en la galleta funcional. Se presentan valores medios \pm desvío estándar del análisis de la capacidad antioxidante (ABTS⁺ y ORAC-FL) y contenido de polifenoles totales para las galletas y digeridos analizando por sextuplicado.

	Capacidad Antioxidante (μ molTE/g de muestra)		Polifenoles totales	Polifenoles Bioaccesibles
	ABTS	ORAC-FL	(mg GAE/g muestra)	(%)
Galleta funcional	121,78 \pm 5,00 (*)	nd	33,07 \pm 1,59 (**)	17,51 (***)
Extracto fisiológico galleta funcional	22,79 \pm 1,30	218,95 \pm 6,05	5,78 \pm 0,40	

(*)Capacidad antioxidante total= Σ ABTS Compuestos Extraíbles + ABTS Compuestos Hidrolizable.

(**) Polifenoles totales= Polifenoles solubles + Polifenoles hidrolizables

(***) % Polifenoles bioaccesibles = [polifenoles totales en extractos fisiológico/Polifenoles totales (solubles+hidrolizables en la galleta)]*100

El % de bioaccesibilidad indica la cantidad de polifenoles de la galleta que podrían llegar al intestino (fracción soluble), como consecuencia de su liberación de la matriz durante el proceso de digestión y que potencialmente puede ser capaz de atravesar la barrera intestinal. Para la formulación de galleta propuesta el % de polifenoles bioaccesibles siguiendo la metodología de estimación sugerida por Vitali *et al.* (2009) es de 17,51%, el valor estimado es comparable con lo con los reportados por dichos autores en galletas sustituidas con otras fuentes de fibra. De acuerdo a Pérez-Jiménez *et al.* (2013), se puede asumir que el 82,49% de polifenoles restantes pasan al colon intactos siendo potencialmente fermentados por la acción de la microbiota, pudiendo dar lugar a la generación de metabolitos bioactivos absorbibles. Dichos metabolitos pueden llegar a tener un rol preventivo del cáncer colon-rectal y otras enfermedades crónicas no trasmisibles (Jiménez *et al.*, 2013). Es por tanto, relevante su cuantificación en los alimentos y la profundización en los mecanismos de acción y efectos potenciales para la salud de los consumidores.

4.3- Análisis del color superficial de las galletas funcionales

A continuación en la *Figura 3*, se muestra las galletas obtenidas a las que se les midió el color superficial con un espectrofotómetro portátil. No fue posible evaluar el color de la galleta control, sin embargo, en los trabajos revisados en general el valor “normal” de una galleta control (sin agregado de materiales naturales), de L es de 62,52 de a: 8,63 y para b: 23,85 (promedio tomado de los datos publicados por Kaur *et al.* 2017; Chauhan, *et al.* 2015).



Figura 3-Color de la galleta tras el proceso de horneado.

Tabla 11-Análisis del color superficial de la galleta ($L^*a^*b^*$). Se presenta el valor medio \pm desvío estándar para $n=20$ galletas funcionales.

	L	a	b
Galleta suplementada	54,25 \pm 1,25	8,92 \pm 0,88	30,58 \pm 1,23

Valores similares a los obtenidos en el presente trabajo, de $L^* a^* b^*$ fueron reportados por Kaur *et al.*, 2017, (L : 53.43 \pm 0.09; a : 8.55 \pm 0.07; b : 25.13 \pm 0.34) al sustituir el 20% de harina de trigo por harina de lino. Los autores observaron pérdidas significativas ($p < 0,05$) de valores de L respecto a la galleta control a medida que aumentaron el nivel de sustitución de 5 a 30% haciendo a las galletas más oscuras lo que atribuyeron a la incorporación del lino. Comportamiento similares fueron encontrados por Chauhan, *et al.* 2015. Sin embargo, Sharma & Singh, 2014, encontraron que la pérdida de L^* se

correlaciona inversamente con el contenido de proteínas indicando a la reacción de Maillard durante el horneado como principal contribuyente a la formación del color dado el aumento total de proteínas en la formulación. Las galletas del presente trabajo han sido formuladas con stevia, por tanto, el color oscuro de la galleta funcional se explica mayoritariamente por el color pardo de los ingredientes “per sé” (*Figura 4*), más que por la reacción de Maillard. Estudios posteriores deben realizarse para determinar el grado de desarrollo de la reacción de Maillard durante el horneado de este alimento concreto. Sin embargo, otros autores han descrito que la sustitución de sacarosa por stevia reduce significativamente el desarrollo de la reacción y la coloración del alimento debida a los productos de la misma (melanoidinas) (Martinez-Saenz *et al.* 2017)



Figura 4-Color natural de la fracción soluble y fracción insoluble del salvado de arroz.

4.4- Estudio de la aceptabilidad del nuevo alimento

El análisis determinó que el promedio de aceptabilidad general, de las nuevas galletas fuente de fibra y antioxidantes es de $5,23 \pm 1,93$ con una intención de compra de $4,55 \pm 2,34$ (87 evaluaciones). Como se puede ver en la *Tabla 12*, el 49% de los consumidores manifestaron disgusto o mucho disgusto al probar la

galletas. En la *Figura 5*, se muestra la frecuencia de los atributos marcados en la galleta y en la *Figura 6*, se destacan los marcados únicamente por aquellos consumidores que rechazan el producto. Los atributos “blandos, desmenuzables, con retrogusto y sabor extraño” son los más marcados. Con estos resultados, claramente se debe reformular la galleta principalmente buscando mejorar la textura y el enmascaramiento del sabor característico que da la stevia.

Tabla 12-Análisis de la aceptabilidad general de la galleta funcional por frecuencia de respuestas.

Puntos de Escala hedónica	N° personas	%
Disgusta mucho (1-3)	21	24
Disgusta (4-5)	22	25
Gusta (6-7)	38	43
Gusta mucho (8-9)	7	8
Total	88	100

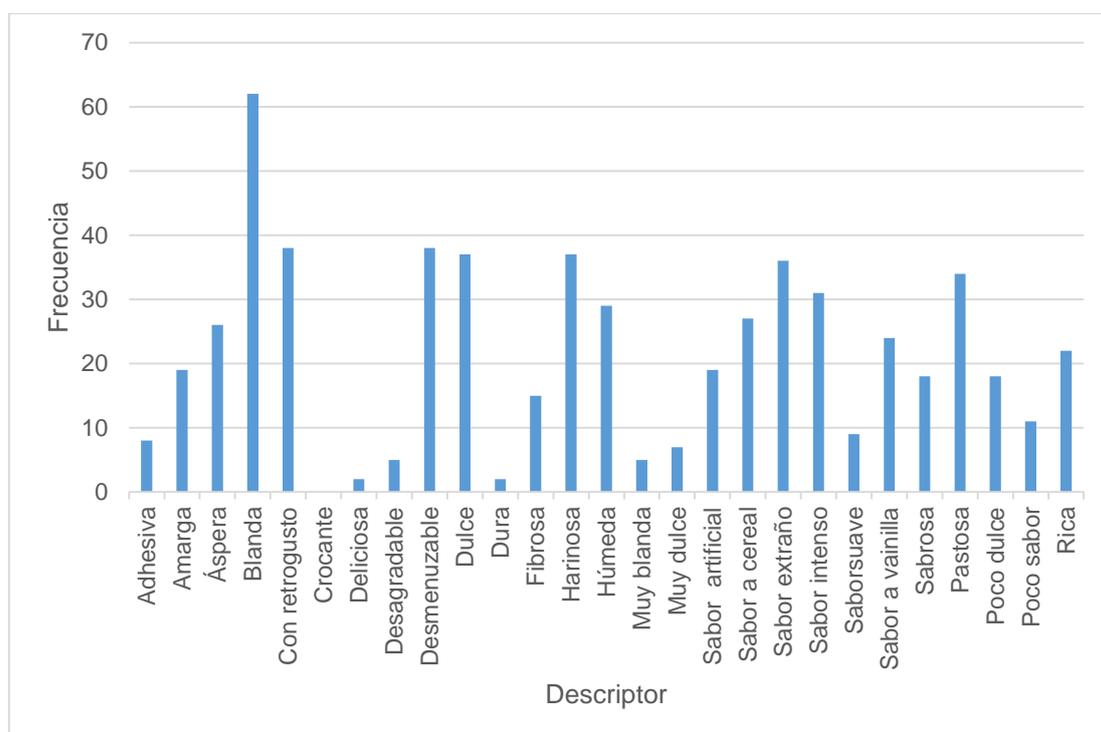


Figura 5-Atributos sensoriales de las galletas sin azúcar añadido y fuente de fibra aptas para celíacos según frecuencia de respuesta con las “palabras” que mejor describen a la galleta funcional (n=88 consumidores).

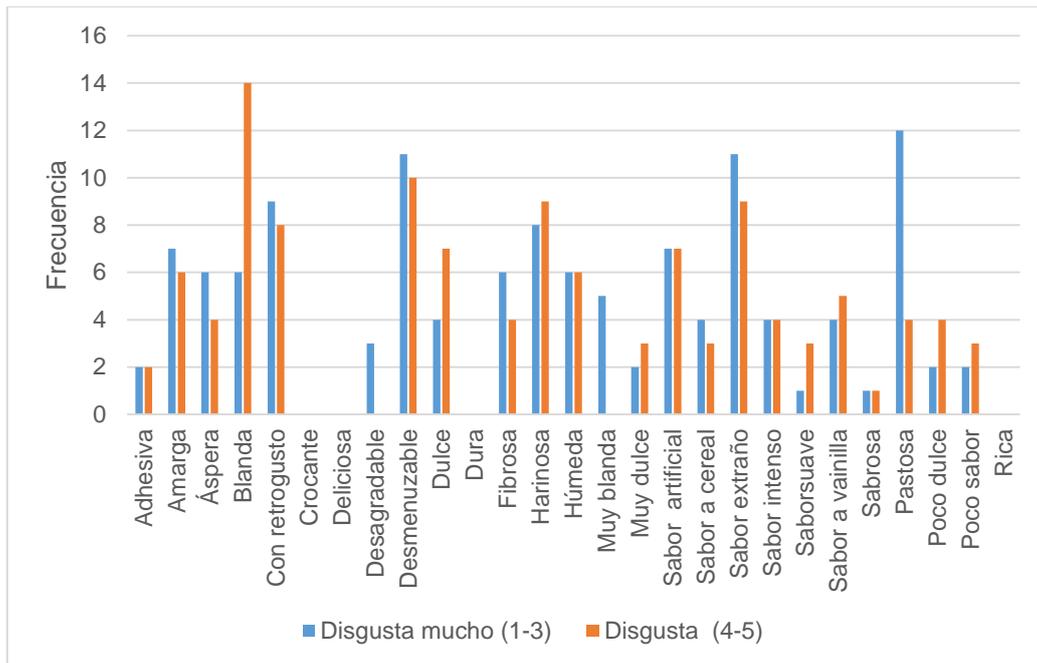


Figura 6 -Atributos marcados por los consumidores que rechazan el producto.

Zahn *et al.* (2013) estudiaron la sustitución parcial de la sacarosa en productos de panadería (muffins) por una mezcla de stevia y varias fibras. El estudio concluyó que la combinación de inulina o povidexrosa con la Stevia (rebaudiósido A) proporciona productos con características cercanas a las de una referencia. Martínez-Saez *et al.*, (2017), recomiendan el uso de oligofruktosa junto a la Stevia en el desarrollo de galletas altas en fibra antioxidante proveniente del café. Según Martínez-Saez *et al.*, (2017), la oligofruktosa con su ligero sabor dulce permite potenciar el sabor de las galletas y enmascarar el sabor y retrogusto de la Stevia (sabor regaliz).

La textura blanda de las galletas puede deberse al alto contenido de humedad ($10,57 \pm 0,24$, *Tabla 2*) siendo el doble de lo mencionado en la definición de galleta de 1 a 5% (Pareyt & Delcour, 2008). Esto puede explicarse en parte por el aumento en el contenido de proteínas que provoca una absorción de agua mayor para formar la masa (Maache-Rezzoug *et al.*, 1998). Además la temperatura del horneado y el tiempo de horneado no fueron optimizados.

Otro factor que puede afectar la textura de las galletas es la ausencia de sacarosa. La sacarosa contribuye a formar “la mordida” de las galletas, de acuerdo a Slade *et al.* 1993 (citado por Pareyt & Delcour, 2008) “la mordera” depende tanto de la forma como de la estructura de la galleta. En la galleta la estructura se da como una “matriz vítrea continua de agua y sacarosa conteniendo gránulos de almidón no gelatinizados embebidos en el gluten y la grasa”. En este trabajo utilizamos stevia (no sacarosa) y harina de arroz sin gluten. Las galletas que son ricas en azúcar se caracterizan por una estructura altamente cohesiva y una textura crujiente, dado que la sacarosa actúa como un agente endurecedor cristalizando a medida que la galleta se enfría, (Maache-Rezzoug *et al.*, 1998). Por el contrario, la adición de esteviósidos (*Stevia rebaudiana Bertonii*) a las galletas reduce la textura, la dureza, mientras que aumenta significativamente la flexibilidad haciéndolas más blandas (Vatankhah *et al.*, 2014). La evaluación sensorial de galletas preparadas con igual proporción de azúcar a esteviósido (50:50 m:m) exhibieron las puntuaciones sensoriales más altas para sabor, color y aceptabilidad general (Vatankhah *et al.*, 2014). Los trabajos de Kulthe *et al.* (2014) lograron la máxima aceptabilidad en cuanto a textura y sabor al reemplazar el 20% de azúcar por stevia.

A partir de estos resultados se concluye que la formulación tiene oportunidades de corrección, con ajustes del proceso (a través de una optimización del tiempo de horneado, temperatura de horneado y dimensiones de la galleta para este trabajo se mantuvieron constantes (180°C, 7 min 0,5 cm alto y 4 cm de diámetro) y mejoras en la formulación con la búsqueda de alternativas tecnológicas especialmente para enmascarar el sabor a regalíz de la stevia y mejorar la textura.

5- Conclusiones del capítulo

Se ha logrado un alimento innovador a partir de la modificación de la receta tradicional de gran consumo regional como lo son las galletas, que reúne varias de las condiciones recomendadas sobre una dieta saludable por la OMS (2014 y 2015) para reducir las enfermedades no transmisibles en un solo alimento. Las galletas son libres de gluten, no contienen azúcar (endulzado con stevia como edulcorante no nutritivo), y son fuente de fibra (3 g /porción) alimentaria antioxidante y con capacidad antioxidante

Las galletas presentaron capacidades antioxidantes de 3653 ± 150 y 1126 ± 73 μ moles de TE/ por porción de galleta por los métodos de ABTS de sus fracciones de extracción de compuestos solubles e hidrolizables y método de ABTS-QUENCHER, respectivamente. Estos valores representan un incremento del 61% y 70% de la actividad antioxidante respecto a las galletas control sin el agregado de los dos nuevos ingredientes bioactivos obtenidos a partir del reciclaje del salvado de arroz: extracto antioxidante y fracción enriquecida en fibra antioxidante.

El % de bioaccesibilidad de los polifenoles presentes en las galletas fue de 17% respecto a los polifenoles totales presentes en una porción de 30g de alimento ($33,07 \pm 1,59$ mgGAE/porción). Se puede esperar que el 82% de polifenoles restantes pasen al colon enlazados a la fibra dietética siendo potencialmente metabolizados por la microbiota colónica generando beneficios a la salud a través de la generación de nuevos metabolitos antioxidantes absorbibles y un ambiente antioxidante general positivo.

El 51% de los catadores (n=88) manifestaron su agrado por el nuevo alimento funcional que contienen los ingredientes de salvado de arroz. Los resultados apoyan que estos componentes pueden vehiculizarse en este tipo de alimentos de elevado consumo por los diferentes grupos poblaciones. La nueva formulación debe considerarse un prototipo inicial sobre el cual debe trabajarse para obtener un alimento de óptima calidad sensorial.

En conclusión, los resultados obtenidos demuestran que el salvado de arroz puede reciclarse totalmente mediante su conversión en dos ingredientes funcionales sostenibles reduciendo el impacto medioambiental de la industria del arroz. Los ingredientes pueden emplearse en la elaboración de una galleta funcional libre de gluten y sin azúcar añadido con una calidad sensorial aceptable.

5-Referencias

- Anari, R., Amani, R., Veissi, M., 2017. Sugar-sweetened beverages consumption is associated with abdominal obesity risk in diabetic patients. *Diabetes Metab Syndr*. pii: S1871-4021(17)30098-X. doi: 10.1016/j.dsx.2017.04.024. [Epub ahead of print]
- Amagliani, L., O'Regan, J., Kelly, A. & O'Mahony, J. 2017. Composition and protein profile analysis of rice protein ingredients. *Journal of Food Composition and Analysis* 59:18-26.
- Ares, G., & Gambaro, A. (2007). Influence of gender, age and motives underlying food choice on perceived healthiness and willingness to try functional foods. *Appetite*, 49(1), 148-158.
- Bellisle F., Diplock A.T., Hornstra G., Kolezko B., Roberfroid M.B., Salminen S., Saris W.H.M., 1998. Functional food science in Europe. *Brit. J. Nutr.*, 80 (Suppl. 1), 1–193.
- Cardona, F., Andrés-Lacueva, C., Tulipani, S., Tinahones, F.J., and Queipo-Ortuño, M.I. 2013. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *Journal of Nutritional Biochemistry* 24:1415–1422. DOI.
- Chauhan, A., Saxena, D., Singh, S. 2015. Total dietary fibre and antioxidant activity of gluten free cookies from raw and germinated amaranth (*Amaranthus* spp.) flour. *Food Science and Technology* 63: 939-945.
- Codex Alimentarius, CAC/GL 23-1997 rev. 2013.
- Diplock A. T., Aggett P. J., Ashwell M., Bornet F., Fern E. B. and Roberfroid M. B. 1999. Scienti®c concepts of functional foods in Europe: Consensus Document. *British Journal of Nutrition* 81 (Suppl. 1), S1±S27.
- Doyon, M. & Labrecque, J. 2008. Functional foods: a conceptual definition. *British Food Journal* 110 (11): 1133-1149.
- Duda-Chodak, A., Tarko, T., Satora, P., & Sroka, P. (2015). Interaction of dietary compounds, especially polyphenols, with the intestinal microbiota: a review. *European Journal of Nutrition*, 54(3), 325–341.
- EFSA ANS Panel (EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food), 2015. Scientific Opinion on the extension of use of steviol glycosides (E 960) as a food additive. *EFSA Journal* 13(6):4146.1- 20.
- Euromonitor Internacional. 2016. En línea: <http://www.euromonitor.com/sweet-biscuits->

snack-bars-and-fruit-snacks-in-argentina/report. Consultado 04/2017.

FDA- United States Food and Drug Administration, Authors. Code of Federal Regulations. Vol. 2 Food and Drug Administration; Silver Spring, MD, USA: 2008. Health claims: fruits, vegetables, and grain products that contain fiber, particularly soluble fiber, and risk of coronary heart disease.

FDA-United States Food and Drug Administration. 2017. Additional Information about High-Intensity Sweeteners Permitted for use in Food in the United States. en: <https://www.fda.gov/food/ingredientpackaginglabeling/foodadditivesingredients/ucm397725.htm> (Consultado 01/07/2017)

Fradet, A. 2010. New hypotheses for the health-protective mechanisms of whole-grain cereals: what is beyond fibre?. *Nutrition Research Reviews* 23: 65–134

Garcia-Serna, E.; Martinez-Saez, N.; Mesias, M.; Morales, F. J.; del Castillo, M. D. 2014. Use of coffee silverskin and stevia to improve the formulation of biscuits. *Polish J. Food Nutr. Sci.* 64:243–251.

Gao, L., Wang, S., Oomah, B. D., & Mazza, G. 2002. Wheat quality: Antioxidant activity of wheat millstreams. *Wheat Quality Elucidation*, 219–233.

Gesner, D., Ringseis, R., Eder, K. 2016. Potential of plant polyphenols to combat oxidative stress and inflammatory processes in farm animals *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*

Goff, H., Repin N., Fabek, H., El Khoury, D. & Gidley, M. 2017. Dietary fibre for glycaemia control: Towards a mechanistic understanding. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*. Available online 12 July 2017. In Press, Corrected Proof.

Gökmen, V., Serpen, A., Fogliano, V., 2009. Direct measurement of the total antioxidant capacity of foods: the 'QUENCHER' approach. *Trends in Food Science and Technology* 20, 278–288.

Gómez-Mascaraque, L., Hernandez-Rojas, M., Tarancon, P., Tenon, M.m Feuillere, N., Velez Ruiz, J., Fiszman, S., Lopez-Rubio, A. 2017. Impact of microencapsulation within electrosprayed proteins on the formulation of green tea extract-enriched biscuits. *Food Science and Technology* 81:77-86.

Goyal, S. K; Samsher & Goyal R. K. 2010. Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: a review *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 61(1): 1–10.

Hager, A., Wolter, A., Jacob, F., Zannini, E., Arendt, E. 2012. Nutritional properties and ultra-structure of commercial gluten free flours from different botanical sources

- compared to wheat flours. *Journal of Cereal Science*.
- Hartzfeld, P. W., Forkner, R., Hunter, M. D., & Hagerman, A. E. 2002. Determination of hydrolyzable tannins (gallotannins and ellagitannins) after reaction with potassium iodate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), 1785–1790.
- Hollebeeck, S., Borlon, F., Schneider, Y. J., Larondelle, Y., & Rogez, H. 2013. Development of a standardised human *in vitro* digestion protocol based macronutrient digestion using response surface methodology. *Food Chemistry*, 138(2–3), 1936–1944.
- Jnawali, P., Kumar, V., Tanwar, B. 2016. Celiac disease: Overview and considerations for development of gluten-free foods. *Food Science and Human Wellness* 5:169–176.
- Kaur, M., Singh, V, Kaur, R. 2017. Effect of partial replacement of wheat flour with varying levels of flaxseed flour on physicochemical, antioxidant and sensory characteristics of cookies. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 9: 14–20.
- Kim Y, Je Y. 2016. Prospective association of sugar-sweetened and artificially sweetened beverage intake with risk of hypertension. *Arch Cardiovasc Dis*. 109(4):242-53.
- Koidis, a. 2016. Developing food products for consumers on a gluten-free diet. In *Developing Food Products for Consumers with Specific Dietary Needs*, A volume in Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition: 201-214.
- Kulthe, A. A., Pawar, V. D., Kotecha, P. M., Chavan, U. D., & Bansode, V. V. 2014. Development of high protein and low calorie cookies. *Journal of Food Science and Technology*, 51(1), 153–157.
- Lafay, S., Gil-Izquierdo, A., Manach, C., Morand, C., Besson, C., and Scalbert, A. 2006. Chlorogenic acid is absorbed in its intact form in the stomach of rats. *Journal of Nutrition* 136:1192–1197
- Lattimer, J. M., & Haub, M. D. (2010). Effects of Dietary Fiber and Its Components on Metabolic Health. *Nutrients*, 2(12), 1266–1289. <http://doi.org/10.3390/nu2121266>.
- Lemus-Mondaca, R. – Vega-Galvez, A. – ZuraBravo, L. – Ah-Hen, K. 2012. Stevia rebaudiana Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry*, 132:1121–1132.
- Maache-Rezzoug, Z., Bouvier, J., Allaf, K., & Patras, C. 1998. Effect of Principal Ingredients on Rheological Behaviour of Biscuit Dough and on Quality of biscuits.

Journal of Food Engineering 35:23-42.

Martinez-Saez, N., Tamargo García, A., Domínguez Pérez, I., Rebollo-Hernanz, M., Morales, F., Martín-Cabrejas, M., del Castillo, M., 2017. Use of spent coffee grounds as food ingredient in bakery products. *Food Chemistry* 216: 114–122.

Mesías, M. Holgado, F., Marquez-Ruiz, G., Morales, J. 2016. Risk/benefit considerations of a new formulation of wheat-based biscuit supplemented with different amounts of chia flour. *Food Science and Technology* 73: 528-535.

Mildner-Szkudlarz, S., Bajerska, J., Zawirska-Wojtasiaka R., D. 2013. White grape pomace as a source of dietary fibre and polyphenols and its effect on physical and nutraceutical characteristics of wheat biscuits. *Sci Food Agric*: 93: 389–395

MSP (Ministerio de Salud Pública Uruguay). 2016. Guía Alimentaria para la Población Uruguaya. Disponible en: <http://www.msp.gub.uy/publicaci%C3%B3n/gu%C3%ADa-alimentaria-para-la-poblaci%C3%B3n-uruguay>

Nassar, A., AbdEl-Hamied A., El-Naggar, E. 2008. Effect of Citrus by-Products Flour Incorporation on Chemical, Rheological and Organoleptic Characteristics of Biscuits. *World Journal of Agricultural Sciences* 4 (5): 612-616.

Okpala, C.O., Okoli, E.C., 2013. Optimization of composite flours biscuits by mixture response surface methodology. *Food Sci. Technol. Int.* 19 (4), 343-350.

OMS (Organización Mundial de la salud). 2013. Plan de acción para la prevención de enfermedades crónicas 2013-2020. En línea: http://www.who.int/entity/cardiovascular_diseases/15032013_updated_revised_draft_action_plan_spanish.pdf?ua=1 Consultado 04/2017.

OMS (Organización Mundial de la salud). 2014. Informe sobre la situación mundial de las enfermedades no transmisibles. En línea: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/149296/1/WHO_NMH_NVI_15.1_spa.pdf?ua=1&ua=1 Consulta en 04/2017.

Palafox-Carlos, H., Ayala-Zavala, J. F., & González-Aguilar, G. A. (2011). The Role of Dietary Fiber in the Bioaccessibility and Bioavailability of Fruit and Vegetable Antioxidants. *Journal of Food Science*, 76 (1): 6–15

Palou, A., Serra, F., & Pico, C. 2003. General aspects on the assessment of functional foods in the European Union. *European Journal of Clinical Nutrition*. 57, Suppl 1, S12–S17.

- Pareyt, B., & Delcour, J. A. 2008. The role of wheat flour constituents, sugar, and fat in low moisture cereal based products: a review on sugar-snap cookies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48: 824-839.
- Pérez-Jiménez, J., Díazaz-Rubio, M., Saura-Calixto, F. 2013. Non-extractable polyphenols, a major dietary antioxidant: occurrence, metabolic fate and health effects. *Nutrition Research Reviews* 26: 118–129.
- Pérez-Jiménez, J., & Saura-Calixto, F. (2015). Macromolecular antioxidants or nonextractable polyphenols in fruit and vegetables: Intake in four European countries. *Food Research International*, 74:315–323.
- Quirós-Sauceda AE, Palafox-Carlos H, Sáyago-Ayerdi SG, Ayala-Zavala JF, Bello-Perez LA, Alvarez-Parrilla E, de la Rosa LA, González-Córdova AF, González-Aguilar GA. 2014. Dietary fiber and phenolic compounds as functional ingredients: interaction and possible effect after ingestion. *Food Funct*:5(6):1063-72.
- Rannou, C., Laroque, D., Renault, E., Prost, C., & Sérot, T. (2016). Mitigation strategies of acrylamide, furans, heterocyclic amines and browning during the Maillard reaction in foods. *Food Research International*, 90, 154-176.
- Roberfroid, M. 1999. What is Beneficial for Health? The Concept of Functional Food. *Food and Chemical Toxicology* 37: 1039-1041.
- Razieh, A., Reza, A., Masoud, V. 2017. Sugar-sweetened beverages consumption is associated with abdominal obesity risk in diabetic patients. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. In Press, Corrected Proof
- Ruiz-Ruiz, J. C., Moguel-Ordoñez Y. B. & Segura-Campos M. R. 2015. Biological activity of *Stevia rebaudiana* and their relationship to health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, doi: 10.1080/10408398.2015.1072083.
- Sakač, M., Torbica, A., Sedej, I., & Hadnađev, M. (2011). Influence of breadmaking on antioxidant capacity of gluten free breads based on rice and buckwheat flours. *Food Research International*, 44, 2806–2813
- Saura Calixto, F.; Goñi, I.; Mañas, E.; Abia, R. Klason. 1991. Lignin, condensed tannins and resistant protein as dietary fibre constituents: determination in grape pomaces. *Food Chemistry* 299-309.
- Saura Calixto, F. 1998. Antioxidant Dietary Fiber Product: A New Concept and a Potential Food Ingredient. *J. Agric. Food Chemistry*, 46:4303–4306.
- Saura-Calixto, F., Serrano, J., & Goñi, I. 2007. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101(2), 492–501.

- Saura Calixto, F. 2011 Dietary Fiber as a Carrier of Dietary Antioxidants: An Essential Physiological Function. *J. Agric. Food Chem.* 59: 43–49 43
- Saura-Calixto F. 2012. Concept and health-related properties of nonextractable polyphenols: The missing dietary polyphenols. *J. Agric. Food Chem.*, 60, 11195-12000
- Selma, M.V., Espín, J.C., and Tomás-Barberán, F.A. 2009. Interaction between phenolics and gut microbiota: Role in human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:6485–6501.
- Serpen, A., Capuano, E., Fogliano V., Gökmen V. 2007. A new procedure to measure the antioxidant activity of insoluble food components. *J Agric Food Chem*: 55(19):7676-8
- Serpen, A, Gökmen, V. Mogol, B. 2012. Effects of different grain mixtures on Maillard reaction products and total antioxidant capacities of breads. *Journal of Food Composition and Analysis* 26:160–168.
- Singleton, V. L., & Rossi Jr., J. A. 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144–158.
- Sharma, P., Velu, V., Indrani, D., Singh, R. 2013. Effect of dried guduchi (*Tinospora cordifolia*) leaf powder on rheological, organoleptic and nutritional characteristics of cookies. *Food Research International* 50: 704–709.
- Stevens, J., & Maier, C. 2016. The chemistry of gut microbial metabolism of polyphenols. *Phytochem Rev*15:425–444.
- Sylvetsky, A. & Rother, K.2016. Trends in the consumption of low-calorie sweeteners. *Physiol Behav.*1 64(Pt B):446-450.
- Torbica, A., Hadnađev, M., Dapčević Hadnađev, T. 2012. Rice and buckwheat flour characterisation and its relation to cookie quality. *Food Research International* 48 (2012) 277–283.
- Torres, J., Ramos-Romero, S., & Pérez-Jiménez. J. 2016. 2 Key Aspects of Polyphenols and Health Metabolic Fate, Mechanisms of Action, and Influence on Gut Microbiota in *Advances in Technologies for Producing Food-relevant Polyphenols* Jose CRC Press
- Uribarri, J., Woodruff, S., Goodman, S. Weijing.C., Chen, X, Pyzik, R., Yong, A., Striker, G., Vlassara, H. 2010. Advanced Glycation End Products in Food and a Practical

- Guide to Their Reduction diet. *Journal of the American Dietetic Association*: 901-916.
- Uribarri, J., del Castillo, MD, de la Maza, MP., Filip, R., Gugliucci, A., Luevano-Contreras, C., Macías-Cervantes, MH, Markowicz Bantos, DH, Medrano, A., Menini, T., Portero-Otin, P., Rojas, A., Sampaio, GR, Wrobel, K., Wrobel, K & Garay ME. 2015. Dietary Advanced Glycation End Products and Their Role in Health and Disease. *Adv Nutr* 6: 461-473.
- Vatankhah, M., Garavand, F., Elhamirad, A., & Yaghbani, M. (2015). Influence of sugar replacement by stevioside on physicochemical and sensory properties of biscuit. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 7(3), 393–400.
- Vicentini, A., Liberatore, L. & Mastrocola, D. 2016. Functional Foods: Trends and development of the global Market. *Ital. J. Food Science* 28:338-351.
- Vitali, D., Dragojević, I. V., & Šebečić, B. (2009). Effects of incorporation of integral raw materials and dietary fibre on the selected nutritional and functional properties of biscuits. *Food Chemistry*, 114(4), 1462–1469.
- World Health Organization (WHO). Guideline: sugars intake for adults and children; Geneva, 015. WGO (World Gastroenterology Organisation). 2017. Practice Guideline - Celiac Disease. Disponible en: <http://www.worldgastroenterology.org/guidelines/global-guidelines/celiac-disease>. Consultado 17/07/2017.
- Weickert, M & Pfeiffer, A. 2008. Metabolic Effects of Dietary Fiber Consumption and Prevention of Diabetes. *J. Nutr.* 138 (3): 439-442.
- Xi B, Huang Y, Reilly KH, Li S, Zheng R, Barrio-Lopez MT, Martinez-Gonzalez MA, Zhou D. 2015. Sugar-sweetened beverages and risk of hypertension and CVD: a dose-response meta-analysis. *Br J Nutr.* 113(5):709-17
- Xu, E, Pan, X., Wu, Z., Long, J., Li, J., Xu, X., Jin, Z. 2017. Aiquan Jiao Response surface methodology for evaluation and optimization of process parameter and antioxidant capacity of rice flour modified by enzymatic extrusión. *Food Chemistry* 212:146–154.
- Yao B1, Fang H, Xu W, Yan Y, Xu H, Liu Y, Mo M, Zhang H, Zhao Y. 2014. Dietary fiber intake and risk of type 2 diabetes: a dose-response analysis of prospective studies. *Eur J Epidemiol*: 29(2):79-88.
- Zahn, S., Forker, A., Krügel, L., Rohm H. 2013. Combined use of rebaudioside A and fibres for partial sucrose replacement in muffins. *Food Science and Technology*

50:695- 701.

Zilic, S., Kocadagli, T., Vancetovic, J., & Gökmen, V. 2016. Effects of baking conditions and dough formulations on phenolic compound stability, antioxidant capacity and color of cookies made from anthocyanin-rich corn flour. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 597-603.