

SUMARIO

1 a 9 - Actualización sobre el contenido de hierro, zinc y selenio en el grano de trigo.

Iron, Zinc and Selenium in wheat grain: A review

García, Pilar Teresa

Foro de la Alimentación, la Nutrición y la salud de la Bolsa de Cereales. (FANUS)

10 a 19 - Potencial antioxidante y Actividad antimicrobiana de extractos de hojas de Mistol (Zizyphuz mistol), Algarrobo blanco (Prosopis alba) y Tusca (Acacia aroma) procedentes de Santiago del Estero, Argentina

Antioxidant potential and antimicrobial activity of leaf extracts of Mistol (Zizyphuz mistol), Algarrobo blanco (Prosopis alba) and Tusca (Acacia aroma) from Santiago del Estero, Argentina

Ruiz, S. C.^{1*}, García, E. M.², Nediani, T.³, Zimerman, M.⁴, Nazareno, M. A.⁵, Martínez, S.⁶

¹ Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria Santiago del Estero (EEASE). Mail: ruiz.silvana@inta.gob.ar

² Instituto de Ciencias Químicas (ICQ), Facultad de Agronomía y Agroindustria, Universidad Nacional de Santiago del Estero (FAyA- UNSE). Mail: marian_s-go@yahoo.com.ar

³ Facultad de Agronomía y Agroindustria, Universidad Nacional de Santiago del Estero (FAyA- UNSE). Mail: tnediani@gmail.com

⁴ Instituto de Investigación Animal del Chaco Semiárido (IIACS), Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Mail: zimerman.maria@inta.gob.ar

⁵ Instituto de Ciencias Químicas (ICQ), Facultad de Agronomía y Agroindustria, Universidad Nacional de Santiago del Estero (FAyA- UNSE), CONICET. Mail: manazar2004@yahoo.com

^{6*} Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICYTA), Facultad de Agronomía y Agroindustria, Universidad Nacional de Santiago del Estero (FAyA- UNSE). Mail: sandraluz08@gmail.com

20 a 28 - Quitosano y sus derivados como fibra dietaria. Utilización para alimentos lácteos funcionales y su efecto en la disponibilidad de nutrientes.

Chitosan and derivatives with dietary fiber function. Utilization for functional dairy food and their effect on nutrient availability.

Dello Staffolo, M*

Planta Piloto de Ingeniería Química – PLAPIQUI (UNS-CONICET), Bahía Blanca, Argentina.

Departamento de Ing. Química, Facultad de Ingeniería, UNLP, La Plata, Argentina.

29 a 37 - Efecto de la variedad de centeno, cultivado en la Argentina, en el contenido de fibras y proteínas.

The effects of the rye variety, cultivated in Argentine, on the fiber and protein content .

Gómez Castro, M.L.; Larregain, C. C.; Moreyra, F.²; Insaurralde Bordón, F.; Aguerre, R. J.¹; Coscarello, E.N. ^{*}; García P. T.³. Laboratorio de Agroalimentos 503, Facultad de Agronomía y Ciencias Agroalimentarias, Universidad de Morón

¹ CONICET

² INTA Bordenave, Partido de Puán, Provincia de Buenos Aires.

³ Foro de la Alimentación, la Nutrición y la salud de la Bolsa de Cereales. (FANUS)

38 a 47 - Uso de sal esférica para la reducción de sodio sin variación del gusto salado en la obtención de una hamburguesa de carne de cordero con aptitudes tecnológicas y sensoriales

Use of spherical salt for reducing sodium content with no change in salty perception in the development of a lamb meat burger with high-rated technological and sensory properties

Soterias, T ^{a*}, Cunzolo, SA ^a, Carduza, FJ ^a & Grigioni, G.^{a, b}

^a Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Centro de Investigación de Agroindustria (CIA), Instituto Tecnología de Alimentos (ITA) - Nicolás Repetto y De los Reseros s/n, Hurlingham, CP 1686, Buenos Aires, Argentina

^b Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) – Rivadavia 1917, C1033AAJ, Buenos Aires, Argentina

^a National Institute of Agricultural Technology (INTA), Agribusiness' Research Center, Food Technology Institute - Nicolás Repetto y De los Reseros s/n, Hurlingham, CP 1686, Buenos Aires, Argentina

^b National Council of Scientific and Technical Research (CONICET) – Rivadavia 1917, C1033AAJ, Buenos Aires, Argentina

La Revista del Foro de la Alimentación, Nutrición y Salud (RFANUS) pretende contribuir a la mejora de la salud pública a través de investigaciones y actualizaciones tendientes a un mejor entendimiento de las ciencias relacionadas con la producción primaria y la industrialización de los alimentos con los sectores relacionados a la salud y nutrición pública.

Esta original iniciativa intenta integrar el estudio de las varias disciplinas relacionadas, contemplando los intereses de dichos sectores para converger en una mejor salud y nutrición de la población.

Dado el reconocimiento de la importancia de la alimentación en la salud y la calidad de vida existe una demanda creciente de la transferencia de conocimientos a profesionales de los sectores de la cadena alimentaria y de la salud y nutrición pública.

El objetivo fundamental de la RFANUS es construir una comunicación efectiva entre todos los sectores involucrados en la cadena alimentaria y el sector de la salud y nutrición humana y animal.

Periodicidad: Tres volúmenes anuales: abril, agosto y noviembre

Lectores: La RFANUS estará dedicada a todos los sectores de la cadena alimentaria, desde el productor de la materia prima, los integrantes de su industrialización y comercialización hasta los sectores directa o indirectamente vinculados con la salud.

Temas a cubrir

1. Efecto de los sistemas de producción en los contenidos de los nutrientes mayores, así como de los microelementos y sustancias bioactivas de interés en la nutrición humana y animal.
2. Efecto de la post cosecha en los contenidos y biodisponibilidad de las sustancias bioactivas.
3. Efecto de los procesos industriales en los contenidos y biodisponibilidad de las sustancias bioactivas.
4. Acciones desarrolladas para vincular la cadena alimentaria con la calidad nutricional de los alimentos
5. Efecto de la biodisponibilidad de las sustancias bioactivas en la salud humana.
6. Biodisponibilidad de sustancias bioactivas y microelementos y competitividad de los alimentos.
7. Influencia de los cambios en la calidad nutricional de los alimentos en la comercialización en mercado nacional y mundial.

Cuerpo editorial

Director: Dr. Adrián Vera. Director Ejecutivo de la Bolsa de Cereales y de FANUS

Comité Editorial: Consejo Directivo de FANUS

Comité Editorial externo:

Dr. Claudio Galmarini. EEA La Consulta Mendoza INTA.

Dra. Marta Cuniberti. EEA Marcos Juárez INTA.

Dr. Guillermo Eyherabide. EEA Pergamino INTA.

Dr. Aníbal Pordomingo. EEA Anguil INTA.

Dra. Roxana Beatriz Páez. EEA Rafaela INTA.

Dra. Noemi Zaritzky. CIDCA. CONICET. CIC.

Lda. Estela Kneeteman. Laboratorio Agroalimentos, Toxicología y Nutrición. INTI.

Dra. Lía Gerschenson. CONICET. FCEN. UBA.

Dr. Gustavo Polenta. Instituto Tecnología Alimentos. INTA Castelar.

Dra. Paola Finocchietto. Hospital de Clínicas José de San Martín. UBA.

Dra. Laura M. J. Brandani. Facultad de Ciencias Médicas Universidad Favaloro.

Dr. Rubén Daniel Rampa. División Oncología. Hospital Español de Buenos Aires.

Lda. María Inés Somoza. Facultad de Ciencias Médicas Universidad Favaloro.

Información para autores / Proceso editorial de los manuscritos - En <http://fanus.com.ar/rfanus>

Actualización sobre el contenido de hierro, zinc y selenio en el grano de trigo.

Iron, Zinc and Selenium in wheat grain: A review

García, Pilar Teresa

Foro de la Alimentación, la Nutrición y la salud de la Bolsa de Cereales. (FANUS)

* Correspondencia: pitegarcia@yahoo.com

Resumen

La deficiencia en micronutrientes, conocida como “hambre oculta” afecta a billones de personas, tanto en países en desarrollo como en los países desarrollados. Para superar la malnutrición se emplean diversas estrategias para desarrollar cultivares de trigo con mayores concentraciones en Fe (hierro), Zn (zinc) y Se (selenio). La biofortificación con micronutrientes de los cultivos básicos se considera como una herramienta útil para combatir las deficiencias de ellos. Esta alternativa busca incrementar el contenido de nutrientes mediante técnicas de fertilización, fitomejoramiento tradicional o fitomejoramiento asistido con biotecnología. Para que un programa de biofortificación tenga éxito no debería afectar el rendimiento, debe demostrar su eficacia para disminuir una determinada deficiencia y debe ser aceptado por productores y consumidores. Debe tener en cuenta las características agroecológicas y tener como objetivo los requerimientos dietarios de los humanos.

Abstract

Micronutrient deficiency, also known as “hidden hunger” is a serious problem for billions of persons in developed and non-developed countries. To overcome malnutrition several strategies are used to obtain wheat cultivars with more content of bioavailable Fe, Zn and Se in the grain. Biofortification is the process of increasing the content and bioavailability of essential vitamins and minerals in staple crops, through breeding or agronomic practices, to improve nutritional status. With micronutrient malnutrition, or hidden hunger, continuing to affect nearly one-third of the world’s population, biofortification is a promising and sustainable agriculture-based strategy to target mineral deficiencies. The biofortification used should be sensitive to agroecological and soil particularities, human dietary requirements but with no negative effects on the quality and quantity of the crops.

Introducción

La deficiencia en microelementos, minerales y vitaminas, constituye en la actualidad un problema que afecta a billones de personas (Knez y Graham, 2013; Sami UL-Allh, 2018; Wells y Graham, 2004). La deficiencia de hierro (Fe) alcanza a casi 1,6 billones y la de zinc (Zn) a casi 1/3 de la población mundial. Estas deficiencias llevan a una variedad de problemas asociados a la salud humana. El Zn es el número 11 y el Fe el número 6 entre las mayores deficiencias. Mundialmente 43% de niños y 29% de mujeres en la edad reproductiva tienen anemia y la mitad de los casos se debe a deficiencia de Fe (WHO 2015) y la deficiencia de Zn afecta a 155 millones de niños (WHO 2013). Estas deficiencias afectan también a países desarrollados. En el Reino Unido la mitad de las adolescentes y un cuarto de las mujeres adultas tienen un LRNI menor a lo aconsejado (Roberts et al., 2018). La vida y salud humana y animal exigen 22 elementos esenciales: C, H, O, N, Na, P, K, Ca, S y Cl y microelementos que están en trazas (Mg, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Se, Mo, I, Zn y Cu) que son requeridos en muy pequeñas concentraciones ya que cantidades excesivas pueden ser tóxicas (Kopittke et al., 2017).

Los cereales, naturalmente pobres en Fe, Zn y Se, son, sin embargo, una fuente significativa de dichos nutrientes en países donde el consumo de cereales es importante. Ello ha motivado numerosos estudios

internacionales que están desarrollando diversas estrategias para incrementar sus concentraciones, muy especialmente en el endosperma amiláceo que conforma la semilla y contiene las reservas para el desarrollo del embrión. Las concentraciones de Fe, Zn y Se varían en su contenido, según la variedad particular del alimento y las condiciones climáticas y agronómicas en las que se produce, comercializa, almacena y prepara, que, sumados a las características del suelo, definen las concentraciones de dichos nutrientes.

La denominada “Green Revolution” exitosa en el incremento de la producción de granos ha contribuido, sin embargo, a disminuir el aporte de Fe y Zn en el grano de trigo por un efecto de dilución y ello se atribuye a una falta de reconocimiento de la importancia de los mismos, al empleo de variedades de alto rendimiento, al riego en gran escala y al uso de una gran fertilización con macronutrientes (Grassini et al., 2016; Curtis y Halford 2014).

2. Ubicación en el grano del hierro, zinc y selenio

El grano de trigo está conformado básicamente por el pericarpio, el endosperma y embrión. El endosperma está compuesto por la capa de aleurona más externa, endosperma corneo vitro y amiláceo. Es en la capa de aleurona del grano maduro, donde se encuentran las concentraciones mayores de Fe y Zn en conjunción con compuestos como el ácido fítico, polifenoles y fibras que inhiben su biodisponibilidad (Beasley et al., 2019). El Fe se encuentra preferentemente en la capa aleurona y el Zn en el embrión. La significancia biológica de esas diferencias en ubicación no es todavía conocida (Balk et al., 2019). Estudios recientes han determinado la distribución del Fe en granos de *Triticum aestivum* por medio de técnicas que usan “Synchrotron X-ray fluorescence” (De Brier et al., 2016). Consecuentemente la remoción la capa aleurona y el germen hace que la harina tenga valores menores de Fe y Zn. Si en el grano entero tenemos por ejemplo 28,2 mg/kg de Fe y 28,6 mg/kg de Zn, en la harina tenemos 6,7 mg/kg de Fe y 8,4 mg/kg de Zn (Tang et al., 2008).

3. Factores que determinan la concentración en el grano

La concentración de Fe, Zn y Se en el grano de trigo depende de muchos factores inherentes al suelo, la temperatura, el clima, la variedad, el manejo, la aplicación de fertilizantes, etc. (Sherry et al., 2013; Zhao et al., 2009). El contenido del mineral en el suelo, la forma química del mismo que permita ser utilizada por la planta, el pH, el contenido de materia orgánica, las concentraciones de ácido fítico y polifenoles, el aporte de sustancias promotoras como el ácido ascórbico y ciertos probióticos, la actividad microbiana, etc. son los factores más relevantes que determinan el contenido de dichos minerales en el grano de trigo.

Las plantas difieren en su habilidad para extraer cada nutriente del suelo. Granos con altos niveles de micronutrientes producen mejoras en las plantas cuando se siembran en suelos deficientes y esa ventaja inicial se traduce en mayores rendimientos. La baja concentración en el suelo de Zn y Se y la baja biodisponibilidad del Fe son factores que afectan el contenido en el grano. El 50% de los suelos dedicados a la producción de trigo son pobres en Zn y Se. La forma química en que se encuentra el mineral para que pueda ser utilizada por la planta. El pH del suelo muchas veces determina la forma química en la que están disponibles los nutrientes, no siendo la forma química asimilable por la planta y quedando retenido en el suelo. El agregado de materia orgánica afecta las características químicas, físicas y biológicas del suelo, muchas veces aumenta el contenido de vitaminas y minerales del cultivo, mejora la estructura física del suelo, haciendo crecer más la extensión de las raíces y aumenta el microbiota y la actividad de la fauna. La presencia de factores anti nutricionales, como los fitatos y algunos polifenoles, que reducen la absorción del Fe y del Zn. Estas sustancias forman complejos, la mayoría insolubles, con cationes di o trivalentes que no se absorben durante la digestión intestinal. El ácido fítico es la reserva más importante de fosforo de la semilla. El fosforo es hidrolizado del fitato durante la germinación. Si el suelo es pobre en fosforo, bajar el fitato en semillas puede afectar el crecimiento de las semillas. Este efecto negativo se puede corregir aumentando los promotores de la biodisponibilidad aun en presencia de fitatos. Los fenoles y polifenoles, taninos hidrolizables o condensados y fenil propionoides, pueden unirse al Fe y Zn y disminuir su biodisponibilidad. Otros actuando como antioxidantes reducen la oxidación de Fe⁺⁺⁺ a Fe⁺⁺ aumentando su biodisponibilidad. La actividad microbiana que controla la disponibilidad al generar fitasas que liberan los minerales de los complejos con fitatos (Connorton et al.,

2017).

Actualmente se considera necesario detectar cultivares con bajos niveles de fitatos. Liu et al. (2006) encontraron en 86 genotipos de trigo una variación del 30% en los niveles de fitatos. Ficco et al. (2009) determinaron los contenidos de fitatos y microelementos en una colección de trigos italianos. Guttieri et al. (2004) identificaron y caracterizaron trigos con bajos niveles de ácido fítico. Joyce et al. (2005) estudiaron las concentraciones y distribución del ácido fítico y ciertos micronutrientes en el grano de trigo en variedades con bajas concentraciones del mismo. Sin embargo, Gomez Coronado et al., (2018) evaluaron, en las condiciones del clima mediterráneo, el potencial de 9 nuevos genotipos de trigo y encontraron que las diferencias en los contenidos de Fe y Zn en el grano dependían mayormente del cultivar y del año. Dichos autores encontraron que si las concentraciones diarias requeridas son de 12,5 mg de Fe y 13,5 mg de Zn el mejor cultivar proveería en 100g el 26,4 % de Fe y 35,9% de Zn de los requerimientos. Ahmad et al., 2013 destacan sin embargo el uso del ácido fítico como “marker” de diversos grupos genéticos de trigo.

4. Estrategias de biofortificación

La magnitud de las deficiencias en micronutrientes ha generado, sobre todo en los países con suelos deficientes en estos minerales, traducidos en deficiencias en sus poblaciones, el desarrollo de diversas estrategias basadas en las biofortificaciones agronómicas y genéticas. La fertilización foliar ha sido bastante exitosa en el caso del Zn, pero no tanto en el caso del Fe (Filkelstein et al., 2017; Zhang et al., 2010). La fertilización con Se del suelo ha sido muy exitosa en países como Finlandia. Los estudios realizados en diversos países, con un gran consumo de trigo, indican que los valores actuales de Fe, Zn y Se en el grano de trigo están por debajo de los valores recomendados (Cakmak et al., 2018; Aslam et al., 2018).

La biofortificación puede ser agronómica o genética (convencional con cruzamientos y modificaciones genéticas). Aplicaciones foliares de Zn como ZnSO₄ aumentan un 60% el contenido total del grano de trigo (Cakmak et al., 2018). En el caso del Fe no resulta tan fácil y solo se puede incrementar si se lo combina con fertilización con N₂ (Aciksoz et al., 2011) lo cual puede ser económica o ambientalmente no aceptable. Numerosos programas implementados por el Internacional Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT) no pudieron sin embargo desarrollar líneas de trigo con altas concentraciones de Fe (Bouis et al., 2017). El progreso de las estrategias transgénicas está asociadas a un mayor conocimiento de cómo las plantas toman y distribuyen los micronutrientes, principalmente a través de la identificación de genes para el transporte de minerales y la biosíntesis de “orgánico metal chelators”. Este conocimiento explotado por la biotecnología demuestra que es posible incrementar Fe y Zn no solo en todo el grano sino también en el endosperma, demostrando que no hay razones biológicas para que el Fe y en Zn no puedan depositarse en el endosperma amiláceo (Borril et al., 2014; Kenzhebayeva et al., 2019).

5. Zinc

Zn es uno de los microelementos más importantes en el cuerpo humano con un promedio entre 1,4 a 2,3 g (Calesnick y Dinan, 1988). Cumple importantes funciones fisiológicas en los sistemas biológicos e interactúa con muchas enzimas y otras proteínas. Un 10% de las todas las proteínas del cuerpo humano son Zn-dependientes (Krezel y Marat, 2016). El RDA sugerido por el International Zinc Nutrition Consultative Group (IZiNCG) varía entre 9 y 19 mg/día para adultos que consuman una dieta basada en cereales no refinados, dependiendo de estados especiales como el embarazo y la lactación (Brown et al., 2004). Por ejemplo, un individuo que consume 400 g harina diariamente, consume solo 3,2 mg de Zn. Hay una muy alta asociación entre deficiencia del Zn en el suelo y deficiencia en humanos (Alloway, 2009; Cakman et al., 2018).

El Zn se localiza en la capa de aleurona y en el embrión. En el endosperma puede haber 10 mg por kilo y en el embrión y capa de aleurona más de 100 mg (Ozturk et al., 2006). En una harina blanca puede haber solo 5-10 mg de Zn por kilo (Peterson et al., 1983). Las concentraciones de Zn en el grano varían generalmente entre 20 a 35 mg/kg-1 con valores promedio de 28-30mg/kg-1. En suelos pobres en Zn puede ser menor a 20mg/kg-1. En Australia y Turquía el grano puede tener menos de 10mg/kg-1 pero si se lo fertiliza con Zn puede llegar a 20mg/kg-1. El objetivo final deseado es producir trigo con 40-50 mg/kg-1 (Cakmak et al., 2010). Otros estudios indican valores en el grano de trigo entre 7 a 85mg/kg con valores en distintas partes

del grano, pero muy escasos en el endosperma, y aconsejan la necesidad de llegar a valores adecuados, de 8 y 30 mg/kg en el mismo (Cakmak, et al., 2018). El CIMMYT ha conseguido desarrollar líneas con 20-40 % más de Zn en India y Pakistan (Velu et al., 2014 y 2018). Cultivares primitivos o salvajes pueden tener 2 o tres veces más de Zn (Graham et al., 1992; Grassini et al., 2016). El 50% de los suelos destinados al cultivo de trigo son pobres en Zn disponible. La disponibilidad del Zn en las raíces es muy baja en suelos alcalinos y ello ocurre globalmente en un 30% de las áreas sembradas (Alloway, 2009). Las concentraciones de Zn disminuyen 30 veces por cada unidad de aumento del pH del suelo entre 5 y 7 (Marschner, 1993). A pH mayores a 8 el Zn se une a óxidos de hierro y calcitas disminuyendo así la disponibilidad del Zn en las raíces. Además el contenido de humedad del suelo y el contenido de materia orgánica limitan la cantidad de Zn soluble especialmente en el ambiente que rodea a las raíces. Estas características son comunes en áreas destinadas a la producción de Zn (Rengel, 2015). Es interesante considerar que la deficiencia Zn en el trigo ocurre a menudo cuando la humedad del suelo es limitada e irregular como ocurre por ejemplo en Australia y en ciertos países asiáticos (Graham et al., 1992; Bagci et al. 2007; Huang et al. 2019). La reducción del contenido en fitatos aumenta la biodisponibilidad del Zn (Gibson et al., 2010). El fitato se localiza en principalmente en el embrión y la capa aleurona y casi nada en el endosperma lo que indica que, si aumentamos Zn en el endosperma, este será potencialmente más biodisponible. El Zn llega al grano absorbido continuamente del suelo por las raíces y traslocado al grano, o, depositado en hojas y tejidos vegetativos y luego para ser translocado en el grano durante el estado reproductivo. La relativa contribución de esos dos factores a la acumulación de Zn en el grano es función de factores que dependen de las plantas y del suelo. Estos factores incluyen disponibilidad de Zn y agua disponible durante el llenado del grano, longitud del llenado del grano y del estado nutricional de la planta. Para la biofortificación de cereales con Zn es crítico mantener una cantidad adecuada de Zn en el suelo o una gran disponibilidad de Zn disponible en los órganos vegetativos durante el llenado del grano. El proyecto Harvest Zinc realizó diversos experimentos durante 7-8 años en 12 países con trigo, arroz y maíz con diversas aplicaciones en suelo y foliar y el trigo tuvo una buena respuesta a la fertilización con Zn. Aplicaciones en el suelo fueron efectivas en varias situaciones agroecológicas, variedad *Triticum durum* L. 60 a 250% y variedad *Triticum aestivum* L. 20 a 90%, siendo las aplicaciones foliares aún más eficientes. Tanto la aplicación como el momento de la aplicación foliar son muy importantes. En el momento de la floración se detectaron más Zn en el endosperma del grano. Los resultados actuales sugieren que tanto la entrada de Zn como la removilización son importantes para determinar la concentración en el grano. Los mecanismos genéticos y moleculares que controlan la translación de las hojas al grano son aún poco conocidos. La biofortificación foliar con Zn también aumenta la concentración del Fe. Magallanes et al. (2017) estudiaron la variabilidad en el contenido de Zn y ácido fítico en 46 variedades de cultivares de *Triticum durum* L. y los efectos de una irrigación reducida. Los valores de Zn oscilaron entre 24,8 – 48,8 mg/kg y los porcentajes de fitatos entre 0,462-0,952 % y la relación molar fitatos/Zn osciló entre 16,9-23,6. Ficco et al. (2009) estudiando 84 cultivares de trigo durum italiano encontraron valores para Zn de 28,5 a 46,3 mg /kg y para el fósforo inorgánico de 0,46 a 0,76 mg/kg. Hui Liu et al. (2014) en 655 muestras de trigo obtuvieron para el Zn 30,4 mg/kg-1 en primavera y 30,3/kg-1 en invierno. Fe y Zn estuvieron positivamente correlacionados entre sí, pero negativamente con el rendimiento. Valores de 88- 87% para Fe y Zn respectivamente fueron inadecuados respecto al nivel de Zn deseado. En España y Portugal el 10% de la población es deficiente en Zn, y considerando que las RDI en Europa son de 15mg/Zn día, el 56% de población consume menos de los dos tercios recomendados del RDI (Gomez-Coronado et al., 2018). En suelos con baja disponibilidad de Zn, la mejor estrategia para aumentar las concentraciones en el grano parece ser seleccionar los cultivares más eficientes en acumular Zn con el agregado de aplicaciones de Zn en suelo y en forma foliar.

6. Hierro

El cuerpo humano contiene 3-5 g de Fe y la mayoría (60-70%) se encuentra en las células rojas de la hemoglobina. El RDI recomendado es de 10mg Fe/día para la mujer y 15mgFe/día para hombres entre 25-50 años (FAO 2017).

En el suelo tenemos Fe⁺⁺⁺ y Fe⁺⁺ pero las plantas toman preferentemente Fe⁺⁺ y para ello deben reducir Fe⁺⁺⁺ a Fe⁺⁺ a través de la enzima reductasa situada en la membrana plasmática de la raíz. Esta enzima

alcanza su máxima actividad a pH 4-5. Temperaturas extremas, mayores o menores de 25°C, pH mayores de 7,5 disminuyen el desarrollo radicular y provocan una reducción de la capacidad de absorción del Fe por la planta. Elevadas concentraciones de macro y micro nutrientes así como metales pesados también afectan su actividad. La solubilidad del Fe en condiciones aeróbicas y con pH neutros y alcalinos precipita en formas insolubles mientras que a pH ácidos y condiciones reductoras la concentración del Fe será mayor. La solubilidad del Fe en el suelo depende de la materia orgánica. La asociación del Fe con los agentes quelantes de la materia orgánica da lugar a la formación de complejos que incrementan notablemente su concentración y la movilidad de este nutriente en la disolución de suelo. En los suelos calizos el pH esta entre 7,5 y 8,5 y por lo tanto la solubilidad del Fe es muy baja. Ficco et al. (2009) estudiando 84 cultivares de trigo durum italiano dan valores para Fe de 33,6 a 65,5 mg/kg-1 y para el P inorgánico de 0,46 a 0,76 mg/kg-1. Magallanes et al. (2017) estudiaron la variabilidad en el contenido de Fe y ácido fítico en 46 variedades de cultivares de trigo durum en un sistema con una reducida irrigación. Los valores de Fe oscilaron entre 25,5 – 40,05 mg/kg-1 y los de fitatos entre 0,462-0,952 % y la relación molar fitatos/Fe fue 12,1-29,6. Hui Liu et al. (2014) en 655 cultivares de trigo obtuvieron para el Fe 48,2 mg/kg-1 en primavera y rendimiento. 63% y 72% respectivamente fueron inadecuados respecto del valor recomendado. Shahzad et al. (2014), encontraron que La concentración de Fe en el grano de trigo entero fue de 29-73mg/kg y el 75% se encuentra en distintas partes del grano, pero no en el endosperma.

(Kenzhebayera et al., (2019) con un contenido de Fe en el grano de trigo de 40,9 a 89.0 mg/kg y una variación en las relaciones molares ácido fítico/Fe de 1,40 a 5,32 observaron que, si bien la biodisponibilidad del Fe es muy baja, alrededor del 5%, la disminución del contenido de fitatos puede aumentar la misma 4 veces. Gupta et al. (2015) monitorearon en germoplasma de trigos la relación entre los contenidos de Fe y de ácido fítico. Gomez Coronado et al. (2018) en 9 variedades de trigo en condiciones mediterráneas encontraron que el contenido de Fe en el grano fue afectado solo por la variedad más que por el clima, con un rango de Fe entre 29-37mg/kg. Un radio molar fitato/Fe inferior a 10 indica una buena biodisponibilidad del Fe (Engle et al. 2005).

7. Selenio

El organismo requiere solo trazas de selenio, pero este es un componente básico de nuestra dieta. Es un componente estructural de las seleno-proteínas y enzimático en la producción de la hormona tiroidea, donde actúa como antioxidante y catalizador. Evita el desarrollo de la virulencia e inhibe el crecimiento de HIV y es requerido por el sistema inmune, movimiento del esperma y disminuye las posibilidades de abortos. Participa en la producción de enzimas antioxidantes. Es parte esencial del metabolismo humano a través de las seleno proteínas.

Su relación con la CVD y el cáncer es motivo de numerosos estudios (Li, HF et al. 2008). Existe un estrecho margen entre toxicidad, esencialidad y deficiencia y ello es de gran importancia por sus efectos en la salud humana (Fordyce, 2006). Las recomendaciones en el Reino Unido son entre 60 y 75 ug/día para hombres y mujeres. Sin embargo, la entrada de Se declino de 60ugSe/día en 1970 a 35ugSe/día en 1990 atribuyéndolo a menor Se en el suelo y otros factores. En el Reino Unido disminuyeron en el 2008 los niveles de Se en la población al dejar de importar trigo de EEUU, proveniente de suelos altos en Se. Aunque las concentraciones de Se en cereales son muy bajas, entre 10 y 550 ug Se/kg-1 según regiones, son una fuente importante de Se (Hawkeford y Zhao, 2007). Se del suelo está bajo control geológico y en algunos casos de la atmosfera (actividad volcánica). Como metal oscila en suelos entre 0,1-2,0 mg/kg y en zonas seleníferas puede llegar a 10mg/kg (Fordyce, 2006). Trigos europeos son muy bajos en Se, en muchos países no superan los 50mg Se/kg, pero en EEUU (400mgSe/kg) y Canadá (700mgSe/kg) los valores son mucho más altos. El Se en el suelo predomina como selenato en suelos bien aireados y alcalinos. Tanto como selenito o sulfato los transportadores lo toman como sulfato. Hay muchas variaciones en la acumulación de Se entre variedades y especies (Guerrero et al., 2014).

En 1970 la entrada de Se por parte de la población de Finlandia era de 0,025mg/kg y por ello en 1984 se implementó un programa suplementación de fertilizantes con Se en forma de selenato de sodio. Desde 1985 todos

los fertilizantes contienen 15mg Se/kg. Como efecto de ello se aumentó el contenido de Se en un 15% en cultivos, 6% en carne bovina, 2% en porcina y un 3% en leche. El consumo promedio de la población paso de 0,04mg Se/día a 0,08mg/Se día y las concentraciones en plasma aumentaron de 0,89umg Se/L a 1,40umg/SeL, valor que se considera un valor optimo (Alfthan et al., 2015).

UK, Australia y China han iniciado programas para evaluar los niveles de Se en sus cultivos y adecuar las dosis a aplicar (Hawkeford et al. 2007; Broadley et al., 2010; Riaz, et al., 2018). Aunque los cereales presentan bajas concentraciones de Se, 10-550 ug/kg-1, según región, presenta ventajas pues en el trigo esta como selenio-metionina (60%) que es la forma más biodisponible y en menor cantidad como Se-cisteína, Se-metil-selenio-cisteína, selenato y selenito (Hart et al 2010). En Portugal los valores de Se en grano de trigo son 34ug/kg-1 (Ventura et al., 2007). En sistemas hidropónicos se demostró que en bajas concentraciones el Se estimula el crecimiento, pero en altas concentraciones reduce la elongación de las raíces en el grano de trigo (Guerrero et al., 2014). El Se presente en el grano de trigo presenta ventajas pues en los procesos posteriores las transformaciones son mínimas (alrededor del 10%) y que está en formas de Se más biodisponibles (80% del total ingerido) en comparacion del Se presente en la carne y el pescado (Hart et al., 2011).

Conclusiones

La biofortificación con micronutrientes de los cultivos básicos se considera como una herramienta útil para combatir las deficiencias de ellos (Asiam et al., 2018, Balk et al., 2019; Garcia et al.,2018). Esta alternativa busca incrementar el contenido de nutrientes mediante técnicas de fertilización, fitomejoramiento tradicional o fitomejoramiento asistido con biotecnología. Para que un programa de biofortificación tenga éxito no debería afectar el rendimiento, debe demostrar su eficacia para disminuir una determinada deficiencia y debe ser aceptado por productores y consumidores. El uso de fertilizantes debe ir más allá de NPK incluyendo microelementos, pero en cada caso será diferente. No es posible, inclusive no es necesario, tener un fertilizante con una composición balanceada de los 14 nutrientes, debido a una gran variación en las características del suelo, las necesidades temporales de cada cultivo y la negativa interacción de los nutrientes. Debe tener en cuenta las características agroecológicas y tener como objetivo los requerimientos dietarios de los humanos.

“The right nutrient combination is use for the right crop and at the right place and time” (Dimkpa, CO y Bindraban, 2016)

8. Referencias bibliograficas

Aciksoz, SB, Yaziki, A, Ozturk, L. (2011) *Biofortification of wheat with iron through soil and foliar application of nitrogen and iron fertilisers. Plant and Soil* 349:215-229.

Ahmad, I, Mohammad, F, Zeb, A, Noorka, IR. (2013) *Determination and inheritance of phytic acid as marker in diverse genetic group of bread wheat. American Journal of Molecular Biology* 3:158-164.

Alfthan, G, Euroola, M, Ekhim, P. et al. (2015) *Effects of nationwide addition of selenium to fertilizers on foods, and animal and human health in Finland: From deficiency to optimal selenium status of the population. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 31:142-147.

Alloway, BJ. (2009) *Soil factors associated with zinc deficiency in crops and human. Environmental Geochemistry & Health* 31: 537-548.

Aslam, MF, Ellis, PR, Berry SE et al. (2018) *Enhancing mineral bioavailability from cereals: current strategies and future perspectives. Nutrition Bulletin* 43:184-188.

Bagci, SA, Ekiz, H, Yilmaz, A, Cakmak, I. (2007) *Effects of zinc deficiency and drought on grain yield of field-grown wheat cultivars in Central Anatolia. Journal of Agronomy & Crop Science* 193:198-206.

Balk, J, Connorton, JM, Wan, Y, Lovegrove, A, Moore, KL, Uauy, C, Sharp, PA. (2019) *Improving wheat as a source of iron and zinc for global nutrition. Nutrition Bulletin* 44 :53-59.

Beasley, JT, Bonneau, JP, Sanchez-Palacios, JT, et al. (2019) *Metabolic engineering of bread wheat improves*

grain iron concentration and bioavailability. <https://doi.org/10.1111/pbi.13074>.

Borril, F, Connorton, JM, Balk, J, Miller, AJ, Sanders, D, UAUY, C. (2014) Biofortification of wheat grain with iron and zinc integrating novel genomic resources and knowledge from model crops. *Frontiers in Plant Science* 5: Article 53.

Bouis, HEI, Saltzman, A. (2017) Improving nutrition through biofortification: A review of evidence from Harvest Plus, 2003 through 2016. *Global Food Security* 12: 49-58.

Broadley, MR, Alcock, JP, Alford, J, et al. (2010) Selenium biofortification of high yielding winter wheat by liquid or granular selenium fertilization. *Plant Soil* 332:5 -18.

Brown, KH, Hambidge, KM, Ranum, P. (2010) Zinc fortification of cereal flours current recommendations and research needs: *Food and Nutrition Bulletin*. 31: S72-S74)

Cakmak, I, Pfeiffer, WH, McClafferty, B. (2010) Biofortification of durum wheat with zinc and iron. *Cereal Chemistry* 87:10-20.

Cakmak, I, Kutman, UB. (2018) Agronomic biofortification of cereals with zinc: a review. *European Journal of Soil Science* 69:172-180.

Calesnick, B, Dinan, AM. (1988) Zinc deficiency and zinc toxicity. *American Family Physician Journal* 37:267-270.

Connorton, JM, Balk, J, Rodriguez-Celma, J. (2017) Iron transport in plants – a brief overview. *Metallomics Journal* 9:813-823.

Curtis, T, Halford, NG. (2014) Food security: The challenge of increasing wheat yield and the importance of not compromising food safety. *Annals of Applied Biology* 164:354-372.

De Brier, N, Gomand, SV, Donner, E, et al. (2016) Element distribution and iron speciation in mature wheat grains (*Triticum aestivum* L.) using synchrotron X-ray fluorescence near-edge structure (XANES) imaging. *Plant Cell and Environment* 39:1835-1847.

Dimkpa, CO, Bindraban, P. (2016) Fortification of micronutrients for efficient agronomic production. *Agronomy for Sustainable Development* 36:1-26.

Engle-Stone, R, Yeung, A, Welch, R, Glahn, R. (2005) Meat and ascorbic acid can promote Fe availability from phytate but not from Fe- tannic acid complexes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53: 10276-10284.

Ficco, DBM, Riefolo, C, Nicastrò, G, et al. (2009) Phytate and mineral elements concentration in a collection of Italian durum wheat cultivars. *Field Crops Research* 111:235-242

Finkelstein, JL, Haas, JD, Mehta, S. (2017) Iron-biofortified staple food crops for improving iron status: a review of the current evidence. *Current Opinion in Biotechnology* 44:138-145.

Fordyce, F. (2006) Selenium deficiency and toxicity in the environment. *Essentials Medical Geology* 373-415.

Garcia-Oliveira, AL, Chander, S, Ortiz, R, Menkir, A, Gedi, M. (2018). Genetic basis and breeding perspectives of grain iron and zinc enrichment in cereals. *Plant Science* 9:937-943.

Gibson, RS, Bailey, KB, Gibbs, M, Ferguson, EL. (2010) A review of phytate, iron, zinc and calcium concentrations in plant-based foods used in low-income countries and implications for bioavailability. *Food & Nutrition Bulletin* 31: S134-S146.

Gomez Coronado, F, Almeida, A, Santamaria, O, Cakmak, I, Poblaciones, MJ. (2018) Potential of advance breeding lines of bread-making wheat to accumulate grain minerals (Ca, Fe, Mg and Zn) and low phytates under Mediterranean conditions. *Journal of Agronomy and Crop Science* 1-12.

Graham, RD, Ascher, JS, Hynes, SC. (1992) Selecting zinc-efficient cereal genotypes for soils of low zinc status. *Plant and Soil* 146:241-250.

Grassini, P, Eskridge, KM, Cassman, KG. (2016) Distinguishing between yield advances and yield plateaus in historical crop production trends. *Nature Communications* 4, 2918.

Guerrero, B, Llugani, M, Palacios, O, Valiente, M. (2014) Dual effects of different selenium species on wheat.

Plant Physiology and Biochemistry 83:300-307

Gupta, RK, Gangoliya, SS, Singh, NK. (2015) Screening and characterization of wheat germplasm for phytic acid and iron content. *Journal of Agricultural Science and Technology* 17:747-756.

Guttiere, M, Bowen, D, Dorch, JA, Raboy, V, Souza, E. (2004) Identification and characterization of a low phytic acid wheat. *Crop Science* 44: 418-424.

Hart, DJ, Fairweather-Tait, SJ, Broadley, MR, Dickinson, SJ et al. (2011) Selenium concentrations and speciation in biofortified flour and bread of selenium during grain biofortification, processing and production of Se-enriched food. *Food Chemistry* 126-1771-1778.

Hawkeford, MJ, Zhao, FJ. (2007) Strategies for increasing the Selenium content of wheat. *Journal Cereal Science* 46:282-292

Huang, T, Huang, Q, She, X, et al. (2019) Grain zinc concentration and the relation con soil nutrient availability in different wheat cropping regions of China. *Soil and Tillage Research* 191:57-65

Hui Liu, Wang ZH. (2014) Grain iron and zing concentrations of wheat and the relationships to yield in major wheat production areas in China. *Field Crops Research* 156:151-160.

Joyce, C, Deneau, A, Peterson, K, Ockenden, I, et al. (2005) The concentration and distribution of phytic acid phosphorus and other mineral micronutrients in wild-type and low phytic Js-12-LPA wheat grain. *Canadian Journal of Botany* 83:1599-1607.

Kenzhebayeva, S, Abekova, A, Atabayera, S, et al. (2019) Mutan lines of spring wheat with increased iron, zinc, and micronutrients in grains and enhanced bioavailability for human health. *BioMed Research International*: article D 9692053.

Knez, M, Graham, RD. (2013) The impact of micronutrient in agricultural soils and crops on the nutritional health of human deficiencies. O. Selinus et al. (eds) *Essential of Medical Geology: Revised edition*.

Kopittke, PM, Wang, P, Dalal, RC. (2017) Soil physicochemical properties impacting upon and animal and human health. In *The nexus of soils, plants and human health* (pp 64-71) Stuttgart. Germany: Catena-Schweizerbart.

Krezel, A, Marat, W. (2016). The biological inorganic chemistry of zinc ions. *Archives of Biochemistry & Biophysics* 611:3-29.

Li, HF, McGrath, SP, Zhao, FJ. (2008) Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenite or selenite. *New Phytol Journal* 178:92-102

Liu, ZH, Wang, HY, Wang, XE, Zhang, Chen, PD, Liu, DJ. (2006) Genotypic and spike positional difference in grain phytase activity, phytate, inorganic phosphorus, iron, and zinc contents in wheat (*Triticum aestivum* L). *Journal Cereal Chemistry* 44:212-219.

Magallanes-Lopez, AM, Hernandez-Espinosa, N., Velu, G, et al. (2017) Variability in iron, zinc and phytic acid content in a worldwide collection of commercial durum wheat cultivars and the effect of reduced irrigation on these traits. *Food Chemistry* 237:499-505.

Marschner, H. (1993) Zinc uptake from soils. In *Zinc in Soils and Plants* (Edited AD Robson pp 59-77).

Ozturk L, Yazici, MA, Yucel, C, Torum, A et al. (2006) Concentration and localization of zinc during seed development and germination in wheat. *Physiologia Plantarum* 128: 144-152.

Peterson, CJ, Johnson, VA, Mattern PJ. (1983). Evaluation of variation in mineral element concentrations in wheat flour and bran of different cultivars. Cereal Chemistry, 60:450-455.

Rengel, Z. (2015) Availability of Mn, Zn and Fe in the rhizosphere. Journal of Soil Science & Plant Nutrition 15:397-409.

Riaz, A, Abbas, A, Huda, N-ul, Mubeen, H., Ibrahim, N. Raza, S. (2018) Methods to enhance Selenium in wheat through biofortificacion: A review. Journal Biotechnology & Biomaterials 8:282-284

Roberts, C, Steers, T, Maplethorpe, N, et al. (2018) National Diet and Nutrition Survey Results from Years 7 and

- 8 of the Rolling Programme 2014/2015-2015/2016. London: Public Health England and Food Standard Agency.
- Sami UL-Allh. (2018) Combating hidden hunger in Agriculture Perspective. *Deficiencies in Micronutrients. World Review of Nutrition and Dietetics* 118:161-162.
- Shahzad, Z, Rouached, H, Ralcha, A. (2014) Combating mineral malnutrition through iron and zinc biofortification of cereals. *Comprehensive Reviews Food Science and Food Safety* Doi 10.1111/1541-4337.12063.
- Sharper, N, Hawkesford, M, Pironen, V. et al. (2013) Natural variation in grain composition of wheat and related cereals. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 61:8295-8303.
- Tang, J, Zou, C, Je, Z, et al. (2008) Mineral element distribution in milling fractions of Chinese wheats. *Journal of Cereal Science* 48: 821-828.
- Velu, G, Ortiz-Monasterio, I, Cakmak, I, Hao, Y, Sing, RP. (2014) Biofortification strategies to increase grain zinc and iron concentrations in wheat. *Journal Cereal Chemistry* 59. (3): 365-372.
- Velu, G, Tutus, Y, Gomez- Becerra, HF, Hao, Y, Demir, L, Kara, R. (2018) QTL mapping for grain zinc and iron concentrations and zinc efficiency in a tetraploid and hexaploidy wheat mapping populations. *Plant Soil* 411,81-99.
- Ventura, MG, Campo-Freitas, M. (2007) Selenium content in selected Portuguese Foods. *European Food Res Technology* 224:395-402.
- Wells, RM, Graham, RD. (2004) Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. *Journal Experimental Botany* 55:353-364.
- WHO (World Health Organization) (2013) *World Health Researches for Universal Health Coverage*. WHO Genève Switzerland.
- WHO (World Health Organization) (2015) *The Global Prevalence of Anaemia in 2011*. WHO Genève Switzerland.
- Zhang, Y, Shi, R, Razaul, KM, Zhang, F, Zou, C. (2010) Iron and zinc concentrations in grain and flour of winter wheat as affected by foliar applications. *Journal Agricultural Food Chemistry* 58: 12268-12274.
- Zhao, FJ, Su, YH, Dunham, SJ, et al. (2009) Variation in mineral micronutrient concentrations in grain of wheat lines of diverse origin. *Journal of Cereal Chemistry* 49: 290-295.

Potencial antioxidante y Actividad antimicrobiana de extractos de hojas de Mistol (*Zizyphuz mistol*), Algarrobo blanco (*Prosopis alba*) y Tusca (*Acacia aroma*) procedentes de Santiago del Estero, Argentina

Antioxidant potential and antimicrobial activity of leaf extracts of Mistol (*Zizyphuz mistol*), Algarrobo blanco (*Prosopis alba*) and Tusca (*Acacia aroma*) from Santiago del Estero, Argentina

Ruiz, S. C.^{1*}, García, E. M.², Nediani, T.³, Zimerman, M.⁴, Nazareno, M. A.⁵, Martínez, S.⁶

¹ Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria Santiago del Estero (EEASE). Mail: ruiz.silvana@inta.gob.ar

² Instituto de Ciencias Químicas (ICQ), Facultad de Agronomía y Agroindustria, Universidad Nacional de Santiago del Estero (FAyA- UNSE). Mail: marian_sgo@yahoo.com.ar

³ Facultad de Agronomía y Agroindustria, Universidad Nacional de Santiago del Estero (FAyA- UNSE). Mail: tnediani@gmail.com

⁴ Instituto de Investigación Animal del Chaco Semiárido (IIACS), Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Mail: zimerman.maria@inta.gob.ar

⁵ Instituto de Ciencias Químicas (ICQ), Facultad de Agronomía y Agroindustria, Universidad Nacional de Santiago del Estero (FAyA- UNSE), CONICET. Mail: manazar2004@yahoo.com

⁶ Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICYTA), Facultad de Agronomía y Agroindustria, Universidad Nacional de Santiago del Estero (FAyA- UNSE). Mail: sandraluz08@gmail.com

* Autor responsable de correspondencia.

Resumen

Las especies leñosas son fuentes de metabolitos secundarios, especialmente de compuestos fenólicos, muy valiosos por sus propiedades bioactivas, razón por la cual el objetivo de este trabajo fue optimizar la extracción de estos compuestos para obtener extractos naturales que puedan ser utilizados como conservantes en productos alimenticios. Se realizó la extracción de compuestos bioactivos de hojas de *Prosopis alba* (AB), *Acacia aroma* (T) y *Zizyphuz mistol* (M) por ultrasonido y agitación con solventes: agua, metanol y etanol; y mezclas: metanol-agua (50:50v/v); etanol-agua (50:50v/v), acetona-agua (70:30v/v). Se evaluó el contenido total de compuestos fenólicos (CFT) y la capacidad antioxidante (CA). Se obtuvo mayor eficiencia en la extracción de CFT en hojas AB asistida por ultrasonido con acetona-agua (70:30v/v) (9,77±1,63 mg Acido Gálico/ g materia seca (MS)). Por el método de DPPH•, la mayor CA se obtuvo en extractos con acetona-agua (70:30v/v) (M:0,36±0,03; AB:0,4±0,04; T:0,39±0,01 g Acido Gálico/100 g MS). Por el método ABTS•+ la mayor CA fue para los extractos de etanol-agua (50:50v/v) en M y AB (0,12±0,01 y 0,11±0,03 M Trolox/100 g MS). No se encontraron diferencias significativas en extractos acetona-agua (70:30v/v) (M:0,09±0,01; AB:0,07±0,01; T:0,09±0,01, M Trolox/100g MS). Se determinó actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar utilizando: *Salmonella*, *E. coli*, *S. aureus*; *S. spp.*, *L. innocua*, *B. cereus*; *M. luteus*. Se observó inhibición media de los extractos frente *S. aureus*, inhibición alta de extractos AB con etanol-agua (50:50v/v) en *S. spp.* Estas especies nativas podrían ser potenciales recursos para ser utilizados como aditivos conservantes naturales.

Palabras claves: *Prosopis alba*, *Acacia aroma*, *Zizyphuz mistol*, compuestos bioactivos, actividad antimicrobiana.

Abstract

Woody species are sources of secondary metabolites, especially of phenolic compounds, very important for their bioactive properties; hence, the aim of this work was to optimize the extraction of these compounds to obtain natural extracts that can be used as preservatives in food products. The extraction of bioactive compounds from *Prosopis alba* (AB), *Acacia aroma* (T) and *Zizyphuz mistol* (M) leaves were used by ultrasound and agitation with solvents: water, methanol and ethanol; and mixtures: methanol-water (50:50v/v), ethanol-water (50:50v/v), acetone-water (70:30v/v). Total phenolic compounds (TPC) and antioxidant compounds (AC) were evaluated. Greater efficiency in the extraction of TPC was obtained in AB leaves by ultrasound method with acetone-water (70:30 v/v) (9,77±1,63 mg Gallic Acid / g dry material (DM)). By the DPPH• method, the highest AC was obtained in acetone-water extracts (70:30v/v) (M:0,36±0,03, AB:0,4±0,04, T:0,39±0,01 g Gallic Acid / 100 g DM). By ABTS•+ method, the highest AC was obtained in ethanol-water extracts (50:50v/v) in M and AB leaves (M:0,12±0,01 and AB:0,11±0,03 M Trolox/100 g DM). No significant differences were found in acetone-water extracts (70:30v/v) (M:0,09±0,01; AB:0,07±0,01; T:0,09±0,01 M Trolox/100g DM). Antimicrobial activity was determined in vitro by agar diffusion method using: *Salmonella*, *E. coli*, *S. aureus*; *S. spp.*, *L. innocua*, *B. cereus*; *M. luteus*. Medium inhibition of extracts against *S. aureus* and high inhibition of AB extracts with ethanol-water (50:50v/v) in *S. spp.* was obtained. These native species could be potential resources to be used as natural preservative extracts.

Keywords: *Prosopis alba*, *Acacia aroma*, *Zizyphuz mistol*, bioactive compounds, antimicrobial activity.

Introduction

En la actualidad la demanda de productos frescos mínimamente tratados ha ido en aumento (Rodríguez Saucedo, 2011) y los consumidores se han vuelto más exigentes al preferir productos con menor agregado de aditivos y conservantes sintéticos (Pérez Chabela, 2008; Kim et al., 2005, Shan et al., 2008), y que además de propiedades nutricionales aporten otras características a la salud como es el caso de los alimentos funcionales (Rodríguez Saucedo, 2011).

El mercado busca obtener productos alimenticios de calidad a través del control de las distintas etapas del proceso productivo, desde la obtención, conservación y presentación de los mismos para mejorar y preservar las características organolépticas, prolongar su vida útil y garantizar que su consumo no cause daños a la salud humana (Hernández Bautista y Ríos Rincón 2010).

Las formas de deterioro más importantes que presentan los alimentos son la oxidación de las grasas, así como también las alteraciones producidas por microorganismos, lo cual representa el factor limitante de la vida útil de muchos de ellos. Para evitar estos tipos de daños, las industrias alimentarias utilizan diferentes técnicas, que van desde el envasado al vacío hasta el uso de sustancias con propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Ibañez et al., 2003; Rodríguez Saucedo, 2011).

Los antioxidantes pueden ser sintéticos o naturales, sin embargo, el uso de antioxidantes sintéticos tales como el butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), terbutilhidroquinona (TBHQ), entre otros, está siendo muy cuestionado y son cada vez menos utilizados en los alimentos por el riesgo que pueden generar en la salud de los consumidores (Sánchez Escalante et al., 2008), mientras que los antioxidantes naturales son obtenidos de fuentes vegetales como hojas, tallos o frutos; y los antimicrobianos naturales son obtenidos de fuentes animales y microbianas (Tajkarimi et al., 2010; Kunyanga et al., 2012; Kim et al., 2013; Velioglu et al., 1998; Isaza Maya et al. 2013). Entre los compuestos antioxidantes se destacan los compuestos fenólicos, un amplio grupo de moléculas que se caracterizan por poseer un anillo aromático con al menos un grupo hidroxilo (OH) (Morales Gómez, 2011).

Los agentes antimicrobianos también son utilizados para controlar el proceso de deterioro de los alimentos, minimizando o inhibiendo el crecimiento de microorganismos, incluidos los microorganismos patógenos (Tajkarimi et al., 2010). De esta manera el crecimiento microbiano durante el almacenamiento puede reducirse prolongando la vida útil y manteniendo la inocuidad y seguridad del alimento (Gomez y Lorenzo, 2012).

El uso de plantas o partes de ellas es una alternativa económica ya que éstas son una fuente importante para la obtención de extractos vegetales con actividad antioxidantes y antimicrobiana (Rodríguez Pedroso et al., 2012). Se han encontrado numerosas investigaciones en plantas medicinales y comestibles cuyo objetivo es la obtención de compuestos bioactivos (Sánchez et al., 2010; Arias Toledo, 2009; Ardoino et al., 2013).

Santiago del Estero es una de las provincias que integra el Gran Chaco Americano, rica en vegetación que se caracteriza por presentar diversas especies nativas tales como Algarrobo blanco (*Prosopis alba*), Tusca (*Acacia aroma*) y Mistol (*Zizyphuz mistol*) (Araujo et al., 2008), entre otras. Estas son especies que cuentan con una gran cantidad de sustancias bioactivas en sus diferentes tejidos, tales como hojas, tallos, frutos, lo cual permite ser considerada una fuente interesante de obtención de conservantes naturales e ingredientes con capacidades antioxidantes y antimicrobianas (Tamayo et al., 2008; Colares y Arambarri, 2008; Arias et al., 2004; Corzo et al., 2009).

Se han desarrollado numerosas investigaciones respecto a la obtención de extractos ricos en compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes y antimicrobianas a partir de diversas fuentes naturales (Rodríguez-Carpena et al., 2011; Rodríguez Saucedo 2011; Kim et al., 2013; Fernández López et al., 2005; Armenteros et al., 2013; Cando et al., 2014; Ganhão et al., 2011; Utrera et al., 2015). García et al., (2017) han estudiado la actividad biológica de un tipo de antioxidante, taninos condensados, de las especies leñosas utilizadas en el presente trabajo, para ser utilizadas en la alimentación de ganado caprino, sin embargo, no se conoce información como conservantes en alimentos.

El objetivo del presente trabajo fue optimizar la extracción de compuestos fenólicos, antioxidantes antimicro-

crobianos de hojas de especies leñosas: Algarrobo blanco, Mistol y Tusca, a partir de la utilización de dos métodos de extracción: agitación y ultrasonidos, con diferentes solventes en distintas proporciones y de esta manera optimizar la extracción de hojas de una especie que pueda ser utilizada como conservante en alimentos.

2. Materiales y métodos

2.1. Recolección de la materia prima:

Se colectaron al azar hojas frescas de *Prosopis alba* (Algarrobo blanco, AB), *Acacia aroma* (Tusca, T) y *Zizyphuz mistol* (Mistol, M), tres plantas distintas por cada especie (García et al., 2017), procedentes del Campo Anexo Experimental "Francisco Cantos" perteneciente a la Estación Experimental Agropecuaria del INTA Santiago del Estero; durante los meses de noviembre y diciembre de 2015, a partir de las cuales se trabajó con una muestra compuesta por cada especie. Las mismas se cosecharon verdes y secaron a temperatura ambiente de aproximadamente 25 °C, dispuestas en papel absorbente en habitaciones cerradas; luego se molieron, envasaron y congelaron hasta su procesamiento.

2.2. Preparación de los extractos:

Los compuestos bioactivos se extrajeron en el Instituto de Ciencias Químicas (ICQ) de la FAyA, UNSE, a partir del material vegetal mediante el uso de diferentes solventes o mezclas de solventes y diferentes métodos, con el fin de optimizar la extracción y establecer cuál de ellos mejora la eficiencia en la extracción de dichos compuestos. Se prepararon 10 ml de extractos de cada especie al 1%, utilizando los solventes y proporciones que se detallan a continuación: agua destilada (100%), etanol- agua (50:50 v/v), etanol (100%), metanol: agua (50:50 v/v), metanol (100%) y acetona- agua (70:30 v/v). Los métodos de extracción, se describen a continuación:

•Extracción por agitación:

El material vegetal fue sometido a un proceso de agitación a 20 °C durante 1 hora, utilizando un agitador magnético (Decalab S.R.L). Posteriormente, se lo centrifugó a 3000 x g durante 15 minutos, el sobrenadante se transvasó a un matraz de 10 ml y enrasó. Los extractos fueron preparados por duplicado y conservados en refrigeración en frascos de color caramelo hasta su análisis.

•Extracción por ultrasonido:

El material vegetal fue sometido a períodos de 15 min de ultrasonido refrigerado durante 1 hora, utilizando ultrasonido (Branson 2210). Posteriormente, se centrifugó a 3000 x g durante 15 minutos y el sobrenadante se transvasó a un matraz de 10 ml y enrasó. Los extractos fueron preparados por duplicado y conservados en frascos de color caramelo en refrigeración hasta su análisis.

2.3. Determinación del Contenido Total de Compuestos Fenólicos:

La determinación de compuestos fenólicos totales (CFT) se realizó por el método de Folin- Ciocalteu siguiendo la metodología de Singleton y Rossi (1965). La absorbancia, medida a 725 nm, fue determinada por triplicado utilizando un espectrofotómetro UV- visible (JENWAY 7315). Los resultados fueron expresados como mg de Ácido Gálico/ g de materia seca (MS).

2.4. Determinación de la Capacidad antioxidante in vitro:

•Ensayo de decoloración del radical libre del 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH•):

Se realizó por el método descrito por Ozgen et al., (2006). La absorbancia, medida a 515 nm, fue determinada por triplicado utilizando un espectrofotómetro UV- visible (JENWAY 7315). La actividad antioxidante se expresó como mg de Ácido Gálico/ g de materia seca (MS).

•Ensayo de decoloración del catión del ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6- sulfónico (ABTS•+):

Se realizó por el método descrito por Ozgen et. al., (2006). La absorbancia, medida a 734 nm, fue determinada por triplicado utilizando un espectrofotómetro UV- visible (JENWAY 7315). Los resultados fueron expresados en mM de Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) por gramo de materia seca (MS).

2.5. Evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro:

2.5.1. Cepas y condiciones de cultivo bacteriano:

Se utilizó un total de siete cepas bacterianas para evaluar los efectos antimicrobianos de los extractos de hojas de especies nativas: T, M y AB. Estas corresponden a cinco cepas de bacterias Gram positivas: *Staphylococcus* spp (*S. spp*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Listeria innocua* (*L. innocua*), *Bacillus cereus* (*B. cereus*) y *Micrococcus luteus* (*M. luteus*) y dos bacterias Gram negativas: *Salmonella* sp y *Escherichia coli* (*E. coli*). Todas las cepas utilizadas son conocidas como patógenos bacterianos transmitidos por los alimentos en productos cárnicos, y fueron aportadas por la Cátedra de Microbiología correspondiente al departamento de Ciencias de los Alimentos de la Facultad de Agronomía y Agroindustrias de la Universidad Nacional de Santiago del Estero.

Se utilizaron cultivos de bacterias jóvenes activadas por inoculación en Infusión Cerebro Corazón (Caldo BHI, Britania, Argentina). Para ello, se transfirieron 10 µl de cultivo en 10 ml de caldo BHI y se incubaron a 37 °C durante 24 horas con el fin de obtener células en fase exponencial.

2.5.2. Método de difusión en agar:

La actividad antibacteriana de los extractos se determinó utilizando el método de difusión en agar descrito por Rodriguez Carpena et al., (2011). Para lo cual, 100 µl del cultivo de bacterias que contienen >10⁶ UFC/ml, medida con la escala de Mc Farland, se extendieron en placas de petri con agar BHI mediante siembra en césped. Se impregnaron discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro, previamente esterilizados, con 20 µl de cada extracto, los cuales se colocaron posteriormente en las placas inoculadas con las diferentes cepas. Se utilizó como control positivo discos de 5 µg Ciprofloxacina, y como control negativo los solventes y mezclas de solventes utilizados en la preparación de los extractos, con el fin de establecer si los mismos tienen efecto antimicrobiano en las diferentes cepas estudiadas. El análisis se realizó por triplicado y las placas inoculadas se incubaron a 37 °C durante 24 hs. La actividad antimicrobiana se determinó sobre la zona de inhibición (zona clara) producida alrededor de los discos, medido con un calibre digital. Los resultados se expresaron de acuerdo al grado de inhibición obtenida en: - : sin inhibición, +: inhibición baja, ++: inhibición media, +++: inhibición alta.

2.6. Análisis estadístico:

Se trabajó con un diseño factorial 3x6, donde el factor A corresponde a las especies vegetales, con tres niveles: M, T y AB, el factor B a los solventes de extracción con 6 niveles: 100% agua, 100% etanol, etanol- agua (50: 50 v/v), 100% metanol, metanol- agua (50: 50 v/v) y acetona- agua (70: 30 v/v). Para ello se utilizó el siguiente modelo estadístico:

$$y_{ij}^k = \mu + A_i + B_j + ABC_{ij} + \epsilon$$

Donde:

es la observación de las variables respuestas correspondiente al i-ésimo nivel del factor A, al j-ésimo nivel del factor B y al m-ésimo nivel del factor C (para el contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante)

μ es la media general

A_i es el efecto fijo debido al i-ésimo nivel de la especie vegetal (i:1, 2 y 3).

B_j es el efecto fijo debido al j-ésimo nivel de solventes y mezclas de solventes (j: 1, 2,3,4,5,6).

B_{ij} es el efecto fijo debido al ij-ésimo nivel de la interacción especie vegetal x solvente (i: 1,2, 3; j: 1,2,3,4,5,6)

ϵ_{ij} es el error o residuo del modelo.

La comparación de medias se realizó a través de un análisis de la varianza (ANOVA) utilizando la prueba de Tukey como test a posteriori. Las diferencias fueron consideradas significativas para valores de $p < 0,05$. Para el análisis de datos se utilizó el software estadístico InfoStat versión Professional, 2017 (Di Rienzo et al., 2017).

3.Resultados y discusión

3.1.Compuestos fenólicos totales:

En la Tabla 1 se muestra el CFT de los extractos de las especies M, T y AB obtenidos por diferentes métodos de extracción, solventes y mezclas de solventes.

De los resultados obtenidos se observa que en la extracción por agitación de los compuestos bioactivos fueron más eficientes las mezclas acetona- agua (70: 30 v/v) y metanol- agua (50: 50 v/v), siendo mayor con la mezcla acetona: agua para las tres especies estudiadas. Por otro lado, en la extracción por ultrasonido las mezclas de acetona y etanol con agua resultaron ser más efectivas, obteniendo con acetona mayor cantidad de compuestos fenólicos en hojas M y AB. Si bien con metanol se obtuvieron buenos resultados tanto en extracciones por ultrasonido como por agitación, según diversos autores (Fernández Agulló et al., 2013, Zhou et al., 2004 y Polorný et al., 2001) no es un solvente GRAS (por sus siglas en inglés Generally Recognised as Safe), por lo que no sería un solvente adecuado para realizar este tipo de extracción; además, por la toxicidad que podría obtenerse en estos extractos, consideran conveniente sustituir el metanol por etanol. Los resultados han indicado que el solvente más eficiente para la extracción de compuestos fenólicos en hojas T, AB y M fue acetona-agua en la proporción 70:30, lo cual coincide con lo informado por Michiels et al., (2012), quienes indicaron que las mezclas de solventes con base de acetona extraen una mayor cantidad de compuestos fenólicos que otras mezclas. Diversos autores (Upadhyay et al., 2013; Ojito Ramos et al., 2012; Yung et al., 2014; Fernández Agulló et al., 2013; Zhou et al., 2004; Tomson et al., 2012; Michiels et al., 2012) indicaron que la gran variabilidad obtenida en los contenidos de compuestos fenólicos de los extractos se debe básicamente al tipo de solvente empleado, las proporciones de los mismos, la relación solvente- sólido, la temperatura de extracción y especialmente el material a extraer, esto último se refleja claramente en las hojas estudiadas, al observar que, independientemente del método de extracción las hojas de AB y M presentaron mayor CFT.

Por otro lado, si se comparan los resultados obtenidos en función de los métodos de extracción con acetona-agua (70: 30 v/v) (mejor solvente de extracción), las diferencias fueron significativas ($p = 0,0219$), obteniendo mejores resultados por ultrasonido que por agitación. Esto coincide con lo indicado por Azuola et al., (2007), quienes han comprobado que el método de extracción por ultrasonido es más eficiente en comparación con otros métodos tradicionales.

No se encontraron muchos estudios, en la bibliografía consultada, que informen trabajos realizados en hojas de las especies que aquí se analizan. Colares y Arambarri (2008), han realizado solo pruebas rápidas de determinación de taninos en M, donde comprobaron la presencia de los mismos, así como también García et al., (2017), quienes determinaron taninos condensados en las tres especies M, T y AB. Por su parte Arias et al., (2004), evaluaron el CFT en hojas de T, a partir de extractos de etanol- agua (60: 40 v/v) mediante diversas formas de extracción (maceración, lixiviación, decocción), obteniendo un mayor cantidad de estos compuestos por lixiviación (10 mg cumarina/ ml extracto).

3.2.Capacidad antioxidante in vitro:

En función de los resultados obtenidos en el punto anterior, para la determinación de la capacidad antioxidante, se trabajó con extractos obtenidos por ultrasonido, y si bien se utilizó acetona como solvente de extracción también se seleccionó etanol- agua (50: 50 v/v) por ser el segundo más eficiente en este tipo de extracción. Se descartó los extractos en metanol por no ser GRAS.

Los resultados obtenidos en la determinación de capacidad antioxidante (CA) por los métodos DPPH• y ABTS•+ se presentan en la Tabla 3.

En la tabla 3 se puede observar que la mayor CA de los extractos determinada por el método de ABTS•+ se

obtuvo en extractos de M y AB con etanol- agua (50: 50 v/v), mientras que no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) con acetona- agua (70: 30 v/v) para las especies estudiadas. Por otro lado, la CA determinada por el método de DPPH•, fue mayor con extractos de acetona- agua (70: 30), no encontrándose diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las especies T, M y AB. La discrepancia en los resultados obtenidos frente a los distintos solventes de extracción y métodos de medición utilizados puede deberse a los diferentes mecanismos de reacción, al tipo de compuestos bioactivos extraídos y a las especies vegetales estudiadas (Yung et al., 2014; Zhou et al., 2004).

3.3. Actividad antimicrobiana in vitro:

La actividad antibacteriana de los extractos de hojas nativas se presenta en la Tabla 4. Se puede observar que las bacterias Gram positivas: *B. cereus*, *L. innocua*, *M. luteus*, fueron resistentes frente a los extractos estudiados, ya que no se observó inhibición; mientras que la cepa de *S. aureus* fue más sensible, en comparación con las otras cepas Gram positivas evaluadas, en la cual se destaca una inhibición media en los extractos naturales evaluados. Por otro lado, el análisis de los resultados ha manifestado que los extractos de AB con etanol- agua (50: 50 v/v) presentaron inhibición alta frente al crecimiento de *S. spp.* En lo que respecta a las bacterias Gram negativas: *E. coli* y *Salmonella spp.*, las inhibiciones de los extractos fueron de baja a nula.

Según la bibliografía consultada las diferencias observadas en la actividad antibacteriana de los extractos se puede atribuir a que las bacterias Gram positivas son más sensibles que las Gram negativas (Kim et al., 2013), ya que estas últimas cuentan con una membrana externa de peptidoglicano que ejerce un efecto protector adicional (Ramírez et al., 2007; Rodríguez Carpena et al., 2011; Arias et al., 2004). Además, los extractos de estas hojas nativas son ricos en compuestos fenólicos, los cuales presentan en su estructura un núcleo aromático con grupos funcionales polares (OH-, grupos hidroxilos). La posición y el número de estos grupos OH- en los compuestos fenólicos pueden influir en su actividad antimicrobiana, de manera tal que cuanto mayor sea su hidroxilación, mayor será su efecto antimicrobiano (Tamayo et al., 2008; Colares y Arambarri 2008; Arias et al., 2004; Shan et al., 2008; Domingo y Brea 2003). Los compuestos fenólicos también están implicados en la inactivación de proteínas e influyen en la replicación del ADN bacteriano, interrumpiendo, de esta manera, la función protectora de las membranas celulares bacterianas (Pelczar et al., 1988 citado por Kim et al., 2013), lo que podría causar una alteración morfológica considerable y daños en las bacterias, ejerciendo así su efecto bacteriostático o bactericida (Shan et al., 2008). Esto explicaría los efectos inhibitorios que presentaron los extractos estudiados en las cepas de *S. aureus* y *S. spp.* Por todo lo expuesto, es posible advertir que el uso de extractos obtenidos de fuentes naturales podría prevenir la descomposición microbiológica de los alimentos, inhibiendo o retardando el crecimiento de microorganismos patógenos, lo que podría contribuir a prolongar su vida útil (Dermici et al., 2008).

4. Conclusiones:

Los resultados obtenidos mostraron que tanto la eficiencia de extracción de compuestos fenólicos y actividad antioxidante estuvieron influenciados por la especie vegetal estudiada y las proporciones y tipo de solvente empleado. La extracción con acetona- agua (70:30 v/v) fue más eficiente para la obtención de compuestos fenólicos en hojas AB y M, independientemente del método de extracción utilizado y si bien el potencial antioxidante estuvo influenciado por el método empleado en la determinación; por el método de DPPH• la mezcla de solvente más eficientes también fueron las de acetona- agua (70: 30 v/v) en todas las especies evaluadas. Con respecto a la actividad antimicrobiana, si bien se ha encontrado un cierto grado de inhibición para las cepas de *Staphylococcus* evaluados, se considera necesario realizar un estudio más exhaustivo, utilizando cepas de referencias. Este trabajo forma parte de un ensayo exploratorio de una tesis doctoral, por lo que se considera necesario continuar con investigaciones que permitan ampliar las conclusiones que aquí se mencionan. En una segunda instancia, sería útil determinar la inocuidad de los extractos con el fin de descartar posibles efectos negativos para el organismo humano, de manera tal que los extractos obtenidos puedan ser utilizados como aditivos conservantes capaces de extender la vida útil de productos alimenticios.

Tabla 1: Contenido total de compuestos fenólicos en extractos de Tusca, Mistol y Algarrobo blanco obtenidos por agitación con diferentes solventes.

	Mistol	Algarrobo blanco	Tusca
Acetona 70%	8,62 ± 0,35 ^{ab}	9,29±0,55a	6,56±0,76cd
Etanol 100%	1,20 ± 0,58 ^{ef}	2,32±0,69e	1,62±0,15ef
Etanol 50%	1,27±0,11ef	1,48±0,12ef	1,49±0,42ef
Metanol 100%	0,85±0,23f	1,39±0,08ef	0,90±0,12f
Metanol 50%	7,56±0,80bc	8,43±1,55ab	5,23±0,25d
Agua 100%	0,79±0,10f	1,16±0,35ef	0,51±0,06f

Datos expresados en mg Acido Gálico/ g MS: promedio ± desviación estándar (DE). Medias con letras distintas (a-f) son significativamente diferentes ($p<0,05$) en la interacción doble solvente* material vegetal.

Tabla 2: Contenido total de Compuestos fenólicos en extractos de Tusca, Mistol y Algarrobo blanco obtenidos por ultrasonido con diferentes solventes.

	Mistol	Algarrobo blanco	Tusca
Acetona 70%	9,88±1,29a	9,77±1,63a	7,82±0,61abc
Etanol 100%	4,65±0,89ef	3,63±0,73ef	5,59±2,62cdef
Etanol 50%	7,58±0,54abcd	7,28±0,89abcde	4,89±0,61def
Metanol 100%	6,59±0,72bcde	8,65±0,85ab	7,76±1,94abc
Metanol 50%	6,53±0,84bcde	7,14±0,34abcde	5,26±0,34cdef
Agua 100%	1,54±0,24gh	1,34±0,37gh	0,63±0,12h

Datos expresados en mg Acido Gálico/ g MS: promedio ± desviación estándar (DE). Medias con letras distintas (a-h) son significativamente diferentes ($p<0,05$) en la interacción doble solvente* material vegetal.

Tabla 3: Capacidad antioxidante de los extractos de hojas de Mistol, Algarrobo blanco y Tusca.

		ABTS**A	DPPH*B
Mistol	Acetona 70%	0,09±0,01bc	0,36±0,03abc
	Etanol 50%	0,12±0,01a	0,21±0,01d
Algarrobo blanco	Acetona 70%	0,07±0,01cd	0,4±0,04a
	Etanol 50%	0,11±0,03ab	0,33±0,03bc
Tusca	Acetona 70%	0,09±0,01bc	0,37±0,05ab
	Etanol 50%	0,06±0,01d	0,31±0,05c

Datos expresados como promedio ± desviación estándar (DE). Medias con letras distintas (a-d) son significativamente diferentes ($p<0,05$) para la interacción solvente* especie vegetal en una misma columna. A: M Trolox/ 100 g MS. B: g Ácido Gálico/ 100 g MS.

Tabla 4: Actividad antimicrobiana in vitro de extractos de hojas de Mistol, Tusca y Algarrobo blanco.

Actividad antimicrobiana in vitro							
Cepas Microbianas/ Antimicrobianos	<i>Salmonella</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus spp</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Listeria innocua</i>
A	+	-	++	-	-	-	-
B	-	-	++	+++	-	-	-
C	+	-	++	-	-	-	-
D	-	-	++	-	+	-	++
E	+	-	++	-	-	-	-
F	-	-	++	-	-	++	+
C1	-	-	-	-	-	-	-
C2	-	-	-	-	-	-	-
CIP	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

-: sin inhibición, +: inhibition baja, ++: inhibition media, +++: inhibition alta. A: Extractos de Algarrobo blanco con acetona- agua (70: 30), B: Extractos de Algarrobo blanco con etanol- agua (50: 50), C: Extractos de Mistol con acetona- agua (70: 30), D: Extractos de Mistol con etanol- agua (50: 50), E: Extractos de Tusca con acetona- agua (70: 30), F: Extractos de Tusca con etanol- agua (50:50), C1: etanol- agua (50: 50), C2: acetona- agua (70:30), CIP: Ciprofloxacina.

5. Agradecimientos:

Este Trabajo fue financiado por Proyectos del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA): TUSGO- 1231205- Contribución al desarrollo integral de Oeste de Santiago del Estero y PNAIyVA 1120032: Proyecto Nacional de Agregado de Valor y Agroindustria, Tecnologías de Transformación de Alimentos. Proyectos de la Universidad Nacional de Santiago del Estero (UNSE) N° 23/A186: Producción caprina en sistemas sustentables, costos y calidad de carne. Se agradece la contribución de los laboratorios de Antioxidantes y Procesos Oxidativos y Microbiología de la UNSE.

6. Referencias:

- Araujo, P, Iturre, MC, Acosta, VH, Renolfi, RF. (2008) Estructura del bosque de "La María" EEA INTA Santiago del Estero. *Quebracho* 16: 5-19.
- Ardoino, SM, Boeris, MA, Toso, RE. (2013) Caracterización fisicoquímica de *Prosopis var. Flexuosa* (algarrobo) y *Prosopis flexuosa var. Depressa* (alpataco), plantas y acción farmacológica. *Revista Ciencias Veterinarias* 15: 115-125.
- Arias, ME, Gómez, JD, Cudmani, NM, Vattuone, MA, Isla, MI. (2004) Antibacterial activity of ethanolic and aqueous extracts of *Acacia aroma* Gill. ex Hook et Arn. *Life Sciences* 75: 191-202.
- Arias Toledo, B. (2009) Diversidad de usos, prácticas de recolección y diferencias según género y edad en el uso de plantas medicinales en Córdoba, Argentina. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 5: 389-401.
- Armenteros, M, Morcuende, D, Ventanas, S, Estévez, M. (2013) Application of Natural Antioxidants from Strawberry Tree (*Arbutus unedo* L.) and Dog Rose (*Rosa canina* L.) to Frankfurters Subjected to Refrigerated Storage. *Journal of Integrative Agriculture* 12: 1972-1981.
- Azuola, R, Vargas- Aguilar, P. (2007) Extracción de sustancias asistida por ultrasonidos (EUA). *Tecnología en marcha*, 20: 30-40.
- Cando, D, Morcuende, D, Utrera, M, Estévez, M. (2014) Phenolic-rich extracts from Willowherb (*Epilobium hirsutum* L.) inhibit lipid oxidation but accelerate protein carbonylation and discoloration of beef patties. *Eur*

Food Res Technol 238: 741–751.

Colares, MN, Arambarri, AM. (2008) *Ziziphus mistol* (Rhamnaceae): Morfo-anatomía y Arquitectura Foliar. *Latin American Journal of Pharmacy* 27: 568-77.

Corzo, AG, Bravo, E, Serrano, F, Vattuone, A. (2009) Actividad antibacteriana de extractos de hojas de *Prosopis alba*, Griseb, frente a cepas patógenas humanas y fitopatógenas. *Quebracho* 17: 106-114.

Demirci, F, Guven, K, Demirci, B, Dadandi, MY, Baser, KHC. (2008) Antimicrobial activity of two *Phlomis* essential oils against food pathogens. *Food Control* 19: 1159- 1164.

Di Rienzo, JA., Casanoves, F, Balzarini, MG, Gonzalez, L, Tablada, M, Robledo, CW. (2017) Software estadístico InfoStat, versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

Domingo, D, Lopez- Brea, M. (2003) Plantas con acción antimicrobiana. *Research Gate Rev. Esp. Quimioterp* 16: 385- 396.

Fernández Agulló, A, Pereira, E, Freire, MS, Valentão, P, Andrade, PB, González Álvarez, et al., (2013) Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) Green husk extracts. *Industrial crops and products* 42: 126-123.

Fernández López, J, Zhi, N, Aleson Carbonell, L, Pérez Alvarez, JA, Kuri, V. (2005) Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat Science* 69: 371- 380.

Ganhão, R, Estévez, M, Morcuende, D. (2011) Suitability of the TBA method for assessing lipid oxidation in a meat system with added phenolic-rich materials. *Food Chemistry* 126: 772–778.

García, ME, Cherry, N, Lambert, BD, Muir, JP, Nazareno, MA, Arroquy, JL. (2017) Exploring the biological activity of condensed tannins and nutritional value of tree and shrub leaves from native species of the Argentinean Dry Chaco. *J. Sci Food Agric* 97: 5021-5027.

Gómez, M, Lorenzo, JM. (2012) Effect of packaging conditions on shelf-life of fresh foal meat. *Meat Science* 94: 513-520.

Hernández Bautista, J, Río Rincón, GF. (2010) ¿Calidad de carne o carne de calidad? *Nacameh*, 4: 1-10.

Ibáñez, FC, Torre, P, Irigoyen, A (2003) Aditivos alimentarios. Disponible en <https://muybio.com/wp-content/uploads/2012/10/aditivos-alimentarios.pdf>.

Isaza Maya, YL, Restrepo Molina, DA, López Vargas, JH. (2013) Oxidación lipídica y antioxidantes naturales en derivados cárnicos. *Journal of Engineering and Technology* 2: 2256- 3903.

Kim, YS, Hwang, ChS, Shin, DH. (2005) Volatile constituents from the leaves of *Polygonum cuspidatum* S et. Z. and their antibacterial activities. *Food Microbiology* 22: 139- 144.

Kim, SJ, Cho Ah, R, Han, J. (2013) Antioxidant and antimicrobial activities of leafy Green vegetable extracts and their applications to meat product preservation. *Food control* 29: 112-120.

Kunyanga, CN, Imungi, JK, Okoth, MW, Biesalski, HK, Vadivel, V. (2012) Total phenolic content, antioxidant and antidiabetic properties of methanolic extract of raw and traditionally processed Kenyan indigenous food ingredients. *LWT. Food Science and Technology* 45: 269- 276.

Michiels, JA, Kevers, C, Pincemal, J, Defraifne, JO, Dommes, J. (2012) Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. *Food chemistry* 130: 986- 993.

Morales Gómez, P. (2011) Vegetales silvestres de uso alimenticio: determinación de compuestos bioactivos y valoración de la capacidad antioxidante. Memoria para optar el grado de Doctor. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Medicina, departamento de nutrición y farmacia. ISBN: 978- 84- 695- 1009- 4. Disponible en <http://eprints.ucm.es/14444/>.

Ojito Ramos, K, Herrera Sánchez, Y, Vega Pérez, N, Portal Villafaña, OC. (2012) Actividad antioxidante in vitro y toxicidad de extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* spp (*Rutaceae*). *Revista cubana de plantas medicinales* 17: 368- 379.

Ozgen, M, Reese, NR, Tulio, AZJ, Scheerens, JC, Miller, AR. (2006) Modified 2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoli-

ne-6-sulfonic Acid (ABTS) Method to Measure Antioxidant Capacity of Selected Small Fruits and Comparison to Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and 2,2¢-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Methods. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54: 1151- 1157.

Pérez Chabela, ML. (2008) *Probióticos en productos cárnicos. Nacameh 2: 56-62.*

Polorný, J, Korczak, J. (2001) *Preparation of natural antioxidants. Food Science 311-327.*

Ramirez, LSA, Diaz, HEB. (2007) *Actividad antibacteriana de extractos y fracciones del Ruibarbo (Rumex conglomeratus). Scientia et Technica 33: 397-400.*

Rodríguez Carpena, JG, Morcuende, D, Andrade, MJ, Kylli, P, Estéves, M. (2011) *Avocado (Persea americana Mill) Phenolics, in vitro antioxidant and antimicrobial activities, and inhibition of lipid and protein oxidation in porcine patties. Journal Agricultural and Food Chemistry 59: 5625- 5635.*

Rodríguez Pedroso, AT, Ramirez Arrebato, MA, Bautista Baños, S, Cruz, TA, Rivero, D. (2012) *Actividad anti-fúngica de extractos de Acacia farneciana sobre el crecimiento in vitro de Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici. Revista científica UDO Agrícola 12: 91-96.*

Rodríguez Saucedo, EN. (2011) *Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. Revista de sociedad, cultura y desarrollo sustentable 7: 153-170.*

Sánchez Escalante, A, Torrescano Uttutia, GR, Camou Arriola, JP, González Méndez, NF, Hernández Watanabe, G. (2008) *Sistema combinados de conservación para prolongar la vida útil de la carne y los productos cárnicos. Nacameh 2: 124- 159.*

Sánchez, E, Garcia, S, Heredia, N. (2010) *Extracts of Edible and Medicinal Plants Damage Membranes of Vibrio cholerae. Applied and Environmental Microbiology 76: 6888-6894.*

Shan, B, Cai, YZ, Brooks, JD, Corke, H. (2008) *Antibacterial properties of Polygonum cuspidatum roots and their major bioactive constituents. Food Chemistry 109: 530-537.*

Singleton, VL, Rossi, JA (1965) *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic- phosphotungstic acid reagents. Am. J. Enol. Vitic 144-156.*

Tomsone, L, Kruma, Z, Galoburda, R. (2012) *Comparison of different solvents and extraction methods for isolation of phenolic compounds from Horseradish Roots (Armoracia rusticana). International Journal of biological, biomolecular, agricultural, food and biotechnological engineering 6: 236-241.*

Tajkarimi, MM, Ibrahim, SA, Cliver, DO. (2010) *Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control 21: 1199-1218.*

Tamayo, LMA, Arteaga González, DM, Garcés, YJ. (2008) *Propiedades farmacológicas del Algarrobo (Hymenaea courbaril Linnaeus) de interés para la industria de alimentos. Revista Lasallista de Investigación 5: 100-111.*

Upadhyay, R, Jha, A, Singh, SP, Kumar, A, Singh, M. (2013) *Apropiate solvents for extracting total phenolic, flavonoids and ascorbic acid from different kind of millets. Association of Food Scientists & Technologists 52: 472- 478.*

Utrera, M, Morcuende, D, Ganhão, R, Estévez, M. (2015) *Role of phenolics extracting from rosa canina L. on meat protein oxidation during frozen storage and beef patties processing. Food Bioprocess Technol 8: 854-864.*

Yung, D, Yang, G, Yue, J, Qian, B, Lia, Z, Wang, D, Zhong, Y, Zhao, Y. (2014) *Influences of ripening stages and extracting solvents on the polyphenolic compounds, antimicrobial and antioxidant activities of blueberry leaf extracts. Food control 38: 184- 191.*

Zhou, K, Yu, L. (2004) *Effects of extraction solvents on wheat bran antioxidant activity estimation. Lebensm-Wiss u. Technol 37: 717- 721.*

Quitosano y sus derivados como fibra dietaria. Utilización para alimentos lácteos funcionales y su efecto en la disponibilidad de nutrientes.

Chitosan and derivatives with dietary fiber function. Utilization for functional dairy food and their effect on nutrient availability.

Dello Staffolo, M*

Planta Piloto de Ingeniería Química – PLAPIQUI (UNS-CONICET), Bahía Blanca, Argentina.

Departamento de Ing. Química, Facultad de Ingeniería, UNLP, La Plata, Argentina.

*Correo electrónico: mdellostaffolo@plapiqui.edu.ar

Resumen

El objetivo de los trabajos realizados, fue estudiar en primer término, la influencia del quitosano adicionado a un alimento modelo como el yogur, en la disponibilidad de glucosa, calcio y hierro por medio de una simulación “in vitro” del entorno gastroduodenal. Luego, se evaluó la influencia de la adición de quitooligosacárido al yogur en la absorción de lípidos, mediante la evaluación de la lipólisis y el perfil de los ácidos grasos, empleando el mismo modelo gastroduodenal. En el primer trabajo, también se emplearon fibras de otros orígenes: achicoria, bambú, manzana y trigo para comparar y valorar los resultados obtenidos. La adición de quitosano al yogur disminuyó la disponibilidad de glucosa, calcio y hierro, debido a su capacidad de formar flóculos a pH alcalino como ocurre en el medio duodenal. Las demás fibras utilizadas en estos ensayos, presentaron diferente comportamiento según su naturaleza química y según el nutriente estudiado. El quitooligosacárido adicionado a yogur en una concentración de 0,1 % p/p, solo disminuyó levemente el contenido de CLA de éste producto lácteo. Es decir que, la adición de quitosano o alguno de sus derivados al yogur, puede ser empleado para formular alimentos funcionales para personas con necesidades nutricionales específicas.

Palabras claves: Quitosano, quitooligosacárido, yogur, simulación digestiva

Abstract

The objective of the performed works was to study the influence of chitosan added to a model food (yogurt), on the availability of glucose, calcium, and iron employed a digestive chemical experimental model at first. Then, the influence of chitooligosaccharide addition to yogurt on the lipid absorption by lipolysis measurement and fatty acid profile determination was assessed using the same digestive model. In the first work, fibers from other sources: chicory, bamboo, apple, and wheat were also used to compare and evaluate the results obtained. The addition of chitosan to yogurt decreased the availability of glucose, calcium and iron, owing to its ability to form flocks at alkaline pH, as it occurs in the duodenal environment. Other fibers used in these tests showed different behavior according to their chemical nature and to the nutrient studied. Chitooligosaccharide added to yogurt, at 0.1% w/w, only slightly decreased the CLA content. Accordingly, the addition of chitosan or its derivatives to yogurt can be utilized to formulate functional foods for people with specific nutritional needs.

Keywords: Chitosan, chitooligosaccharide, yogurt, digestive model

Introduction

La quitina es un amino-polisacárido que contiene enlaces β -(1,4) como los que posee la celulosa. Es un componente de los exoesqueletos de los artrópodos marinos (como cangrejos y langostas) y de las paredes celulares de muchos hongos. El quitosano, es un polímero de glucosamina que se obtiene por la desacetilación de la quitina. También, se puede obtener quitooligosacáridos (COS) mediante la hidrólisis del quitosano. Los COS tienen un tamaño molecular más pequeño que el quitosano y, por lo tanto, menor viscosidad y mayor solubilidad en soluciones acuosas. Ambos compuestos son carbohidratos resistentes a la hidrólisis por las enzimas alimentarias humanas, por lo que se los utiliza como nuevas fuentes de fibra dietaria (Westenbrink y col., 2013). Además, son biocompatibles y no tienen toxicidad en los órganos animales (Muzzarelli, Terbojevich y Cosani, 1996). Como moléculas bioactivas, los COS muestran efectos antitumorales “in vivo” e “in vitro”, aumento de la absorción de calcio y aumento de la resistencia ósea, beneficios en el tratamiento del asma y modulación de la obesidad y la inflamación asociada (Baboota y col., 2013).

La ingesta de fibra puede influenciar en diferentes formas la absorción de nutrientes en el tracto gastrointestinal. Se denomina biodisponibilidad a la cantidad de nutriente que está disponible para su absorción en la forma química que es fisiológicamente utilizable (Van Campen y col., 1999). En el caso de glucosa, un aumento en el contenido total de fibra de los alimentos ingeridos puede disminuir la respuesta glicémica (Goff y col., 2018). No obstante, algunos carbohidratos no-digeribles pueden impedir la absorción de minerales y elementos traza en el intestino delgado debido a la capacidad de unión o secuestro de átomos o moléculas que poseen por la presencia de residuos de ácido galacturónico y ácido fítico (Tunland y col., 2002). El ion calcio (Ca^{++}) regula procesos fisiológicos (formación de huesos y dientes) y bioquímicos (excitabilidad muscular, coagulación sanguínea, procesos secretorios de proteínas y hormonas, integridad y transporte en la membrana plasmática, reacciones enzimáticas) importantes. Para asegurar estos procesos, la concentración plasmática es mantenida dentro de límites muy estrechos por un sistema regulador formado por las hormonas paratiroidea y calcitriol, en el cual interviene la proteína fijadora de calcio generada por las células epiteliales intestinales (Kiela y col., 2012). El hierro se absorbe como Fe^{++} en todas las porciones del intestino delgado por un mecanismo en el cual interviene la proteína apotransferrina (Collins y col., 2018).

Existen distintas maneras de estudiar la disponibilidad de nutrientes. Hay estudios en personas del balance de nutrientes (que tienen en cuenta la ingesta y excreción de los mismos), estudios con animales de experimentación y estudios “in vitro”, es decir realizados a escala de laboratorio. Estos últimos ofrecen una alternativa a los estudios en animales o humanos, ya que son relativamente simples, rápidos, permiten mejor control de los factores intervinientes, y proveen de información válida (Luccia y Kunkel, 2002). El objetivo de los estudios “in vitro” es simular el tracto digestivo humano ya sea el ambiente del estómago, del intestino delgado, del intestino grueso o ambos dependiendo de la hipótesis a estudiar.

El propósito de los trabajos realizados en este campo, fue estudiar en primer término, la influencia del quitosano adicionado a un alimento modelo como el yogur, en la disponibilidad de glucosa (macronutriente), calcio (macromineral) y hierro (micromineral) por medio de una simulación “in vitro” del entorno gastro-duodenal. Además, se emplearon fibras de otros orígenes para comparar y valorar los hallazgos obtenidos. En un estudio posterior, se evaluó la influencia de la adición de COS en la absorción de lípidos mediante la evaluación de la lipólisis, el perfil de los ácidos grasos y el contenido de ácido linoleico conjugado (CLA) en yogures luego de su digestión empleando el mismo modelo gastroduodenal.

Materiales y métodos

Materiales

El quitosano fue obtenido a partir de quitina de crustáceo en el Laboratorio de Investigación básica y Aplicada de Quitina (LIBAQ), de la Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina. La quitina fue aislada a partir del exoesqueleto del camarón (*Pleoticus mülleri*), que es un desecho de la industria del pescado. Este material fue homogeneizado y triturado en un triturador industrial (Westinghouse model DASO6). El producto fue lavado a temperatura ambiente con agua para remover todos los materiales que no fueran la

quitina. El residuo limpio fue tratado con una solución de NaOH 9 % p/p (Lab Chem, Inc., Pittsburgh, PA) a 65 ° C por 90 min., para quitar las proteínas, luego fue desmineralizado con una solución de HCl 10 % v/v (Merck, Buenos Aires, Argentina) a 20 ° C por 15 min. Por último, fue lavado con agua a temperatura ambiente y secado al aire. El quitosano fue preparado directamente por desacetilación heterogénea de este material con una solución de NaOH 50 % p/p. Se obtuvieron tres quitosanos de características diferentes (Rodríguez y col., 2008), de los cuales se utilizó para este estudio el que poseía un contenido de humedad de 6,0 % p/p, un contenido de cenizas de 0,55 % p/p, un grado de desacetilación (DD) de 85 % y una viscosidad de 130 mPa.s.

Para obtener los COS se llevó a cabo la hidrólisis del quitosano, preparado previamente, con 12,5 % v/v de H₂O₂ durante 20 min. a temperatura ambiente. Después de irradiarse en un horno de microondas a 700 W durante 4 min, la muestra se enfrió a temperatura ambiente y se filtró a presión reducida. Los quitoooligosacáridos se precipitaron con 150 ml de etanol al 98% v/v del filtrado. Después de 15 min., el residuo se filtró a presión reducida y se lavó varias veces con etanol hasta que una reacción negativa con KMnO₄ (0,02 M) confirmó la ausencia de H₂O₂. El producto resultante se disolvió en agua destilada y se liofilizó. Todos los reactivos fueron de grado analítico. El peso molecular promedio de los COS fue de 2.764 kDa, el contenido de humedad fue de 13,3 % p/p, el contenido de cenizas fue de 2,60 % p/p y el DD fue de 68 %.

Las fibras empleadas fueron: inulina (Frutafit-inulin, Imperial Sensus, Holanda), bambú (Qualicel, CFF, Alemania), trigo (Wheatcel, CFF, Alemania), manzana (Vitacel, JRS, Alemania), psyllium (Metamucil, Procter & Gamble Co., USA).

El yogurt fue preparado utilizando leche en polvo reconstituida (15 % p/p), sacarosa (5 % p/p) y agua (80 % p/p). Esta mezcla se homogeneizó y se trató térmicamente a 85 ° C durante 30 min., se enfrió a temperatura ambiente y se inoculó con un cultivo iniciador al 0,03 % p/p (Dello Staffolo y col., 2004). El iniciador estaba constituido por una mezcla 1:1 de *Streptococcus thermophilus* (Cp2, colección 321 de CIDCA: Centro de Investigación y desarrollo en Criotecnología de Alimentos, La Plata) y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Lbp, colección 332 de CIDCA, La Plata). Las muestras se incubaron a 43 ° C en un baño de agua a pH 4,4-4,6 (Fizman y col., 1999) y se almacenaron a 4 ° C, una vez completado el proceso de fermentación. Muestras de yogurt fueron adicionadas con 1,3 % p/p de cada fibra dietaria. La cantidad de fibra fue seleccionada siguiendo las regulaciones de los Estados Unidos para productos fortificados con fibra (Fernández-García y McGregor, 1997).

Simulación química del ambiente gastroduodenal y técnicas analíticas empleadas

El modelo experimental tenía como fin reproducir en el laboratorio, las reacciones que tienen lugar en el estómago y duodeno del ser humano. En los ensayos para estudiar la disponibilidad de glucosa se utilizaron mezclas conteniendo yogurt, fibra y glucosa. Para calcular la cantidad de glucosa a utilizar se tuvieron en cuenta los carbohidratos disponibles de una dieta humana mixta y una concentración de glucosa en el volumen final de digesto que proporcionara absorbancias medibles con el espectrofotómetro. Los ensayos para estudiar la disponibilidad de calcio se realizaron sin adición de calcio exógeno debido que el yogurt es una importante fuente de este mineral en la dieta humana (de la Fuente y col., 2003). También se realizó la simulación digestiva con una muestra control de yogurt sin fibras para considerar la disponibilidad de glucosa y calcio al 100%. Los experimentos para estudiar la disponibilidad de hierro fueron desarrollados con mezclas conteniendo yogurt, fibra y 100 mg de Sulfato de hierro II, de acuerdo a los requerimientos nutricionales vigentes y a la regulación del Código Alimentario Argentino para la suplementación de hierro en productos lácteos. Muestras control de yogurt con sulfato ferroso sin fibra, también se sometieron a la simulación digestiva. Su resultado se consideró como un 0 % de retención de hierro (o 100 % de hierro dializado) y se empleó para calcular los porcentajes de retención de hierro para cada fibra. Con estas muestras de yogurt control, se puede considerar la interacción del hierro con los fragmentos peptídicos de caseína, para que no interfiera con la determinación de su disponibilidad. Los péptidos bioactivos se forman a partir de caseínas durante la elaboración de productos lácteos (queso, yogurt) bajo la acción de enzimas endógenas de la leche (plasmina, catepsina, entre otros) o de microorganismos. Estos fragmentos peptídicos, que ya están presentes en el yogurt, también pueden fijar hierro según el trabajo de Bouhallab y Bouglé (2004).

La simulación digestiva fue llevada a cabo en los siguientes pasos:

- a) Las mezclas correspondientes fueron homogeneizadas en HCL 0,1 M durante 60 minutos agitando a 37 ° C con pH 1,0-2,0, para reproducir el ambiente gástrico.
- b) Luego, se procedió a aumentar el pH hasta 6,8-7,5 unidades, por adición de NaHCO₃ de 15 g/L e incrementar la velocidad de agitación simulando el pasaje del contenido estomacal al duodeno. La temperatura se mantuvo constante, pero la velocidad de la agitación fue aumentando desde 30 hasta 300 r.p.m. para reproducir el ambiente duodenal.
- c) Para estudiar la disponibilidad de glucosa y calcio, las simulaciones digestivas se dejaron descansar por 15 minutos. Durante este lapso de tiempo hubo separación en dos fases. Luego, se tomaron alícuotas de la fase superior del digesto para determinar la concentración de glucosa y calcio.
- d) Para estudiar la disponibilidad de hierro, c/u de las simulaciones gastroduodenales se colocaron en tubos de diálisis compuestos por una membrana de celulosa (43 mm de espesor y 27 mm de diám.). Los tubos de diálisis se sumergieron en agua destilada, manteniéndose a 37 ° C con agitación por fuera del tubo. Esta membrana tenía el objetivo de simular la pared duodenal. A los 30 y 60 minutos se tomaron alícuotas de los dializados y se determinó el contenido de hierro en cada uno de ellos.

Las técnicas analíticas empleadas para cuantificar glucosa, calcio y hierro fueron: el método enzimático de la glucosa oxidasa (Wiener Lab Glicemia enzimatic AA Kit, Argentina), método espectrofotométrico con cresoltaleina complexona (Wiener Lab Ca-color Kit, Argentina) y el método espectrofotométrico con PBTS: piridil bis-fenil trazina sulfonato (Wiener Lab Fe-color Kit, Argentina), respectivamente (Rodríguez y col., 2008; Dello Staffolo y col., 2011). Los experimentos con quitosano y las demás fibras se realizaron cinco veces usando yogurt recién preparado.

e) Para realizar el perfil lipídico de los yogures adicionados con COS al 0,1 % p/p antes y después de la simulación digestiva, se llevó a cabo la extracción de los lípidos con una solución de cloroformo/metanol 2:1 v/v, luego se realizó la metilación para extraer finalmente los metil ésteres de los ácidos grasos con n-hexano, lavados con NaOH 1,2 % p/v. Estas muestras fueron secadas con corriente de nitrógeno líquido para llevar a cabo el análisis cromatográfico. Por otra parte, alícuotas de estas muestras fueron disueltas en cloroformo deuterado para el análisis por resonancia magnética nuclear (NMR) para estudiar la lipólisis. Se utilizó un cromatógrafo 7890B equipado con espectrómetro de masas 5977A (Agilent Technologies). La composición de ácidos grasos fue expresada como porcentajes relativos. Los isómeros del CLA fueron identificados comparando sus tiempos de retención y sus perfiles de fragmentación con patrones internacionales. Los espectros ¹H NMR de los lípidos extraídos fueron obtenidos con un espectrómetro Bruker Avance Ultrashield 300 MHz NMR (Vela Gurovic y col., 2015).

Análisis Estadístico

Los resultados de los ensayos con quitosano se expresaron como la media ± desviación estándar para 5 repeticiones. La influencia de diferentes fibras dietéticas sobre el porcentaje de reducción de la disponibilidad de glucosa y calcio y el porcentaje de retención de hierro se analizaron estadísticamente mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA) para encontrar diferencias significativas ($p < 0,05$) y se utilizó la prueba de Tukey para comparar medias. Los resultados de los ensayos con COS se expresaron como la media ± el error estándar de la media. Para estudiar si hubo diferencias significativas entre los yogures con y sin COS se utilizó el test ANOVA. Para comparar las medias se empleó el test de Bonferroni con un nivel de significación del 5 %.

Resultados y discusión

Se observaron diferentes comportamientos macroscópicos durante las simulaciones llevadas a cabo para estudiar la disponibilidad de glucosa y calcio (Fig. 1) y la biodisponibilidad de hierro (Fig. 2), según el tipo de fibra adicionada a los yogures. Se conoce que el quitosano se disuelve en medio ácido como el que posee el estómago y no lo hace en medio alcalino. Por lo tanto, con el aumento del pH por el pasaje al duodeno, el quitosano

formó flóculos con el yogur. El psyllium produjo una dispersión viscosa; mientras que bambú, inulina, manzana y trigo conformaron junto con el yogur, una fase menos definida y más reducida que con quitosano o psyllium.

Mediante la cuantificación de glucosa y calcio, luego de la simulación digestiva, se observó una reducción significativa ($p < 0,05$) en la biodisponibilidad de la glucosa con quitosano ($17,7 \pm 2,1$), con psyllium ($15,3 \pm 1,8$ %), que fue menor con trigo ($9,5 \pm 2,1$ %) y con inulina ($5,7 \pm 1,8$ %). Por el contrario, manzana y bambú no redujeron la biodisponibilidad de glucosa en el sistema (Tabla 1). Con respecto a la disponibilidad del calcio, el análisis estadístico confirmó que hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) en el comportamiento de las diferentes fibras que estuvo dado principalmente por la gran reducción en la biodisponibilidad de calcio en presencia de quitosano ($21,0 \pm 2,5$) que forma flóculos y de fibra de manzana ($16,5 \pm 1,6$) que posee un 75% de fracción insoluble y un 25% de soluble (Tabla 1). Sin embargo, según el test de Tukey no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) en la reducción del calcio entre las fibras insolubles: trigo ($12,1 \pm 1,2$) y bambú ($11,0 \pm 1,2$) ni entre psyllium ($8,1 \pm 0,9$) e inulina ($7,0 \pm 0,9$) que son fibras parcial y totalmente solubles, respectivamente (Rodríguez y col., 2008).

En el estudio de la biodisponibilidad de hierro, los digestos antes de la diálisis también presentaron la formación de flóculos con quitosano y aumento de la viscosidad con psyllium. Solamente en los yogures con fibra de manzana se observó una coloración marrón más oscura que en los ensayos de glucosa y calcio. Esto podría deberse a la presencia del sulfato ferroso, que podría estar intensificando la coloración que ya posee la fibra de manzana. En la figura 3 se pueden apreciar los porcentajes de retención de hierro para los distintos yogures con y sin fibras a los 30 y 60 min. de cada simulación. Los yogures con quitosano presentaron el mayor porcentaje de retención de hierro tanto a 30 como a 60 min. De mayor a menor, prosiguieron los yogures con psyllium. Además, se observó que los yogures con bambú o con trigo, ambas fibras insolubles, se comportaron aumentando significativamente ($p < 0,05$) la retención de hierro luego de 60 min. de diálisis y no se hallaron diferencias significativas entre sus porcentajes de retención. Los yogures con fibra de manzana o con inulina no mostraron retención de hierro durante el ensayo (Dello Staffolo y col., 2011). Este hallazgo está de acuerdo con estudios de otros investigadores, en los cuales se indica que la inulina no interfiere con la absorción de hierro (Azorín-Ortuño y col., 2009).

Los yogures adicionados con 0,1 % de COS luego de la simulación digestiva, no presentaron variaciones significativas en los perfiles lipolíticos (Fig. 4). La lipólisis se evidenció mediante diferentes patrones de las señales de RMN ^1H entre 3,5 y 4,5 ppm asignadas a los protones de glicerilo (señales Gly2 en la Fig. 4). Antes de la digestión, estas señales aparecían como un sistema de dos dobles dobletes a 4.29 y 4.15 ppm. Se conoce que el cambio químico y la multiplicidad de éstas señales se ven notablemente afectados por la presencia o ausencia de las cadenas de acilo unidas al esqueleto de glicerilo (Nieva-Echevarría y col., 2014) como se pudo observar con estos resultados. Mono y di-glicéridos provenientes de la lipólisis, fueron evidenciados por nuevas señales que aparecen entre 4,17 ppm y 3,60 ppm. Ambas muestras digeridas, es decir, los yogures control y los suplementados con COS mostraron perfiles lipolíticos (Fig.4) y de ácidos grasos casi idénticos (Tabla 2). Solamente el CLA y sus isómeros, disminuyeron significativamente ($p < 0,05$) en presencia de 0,1 % de COS, luego de la digestión "in vitro". Esto pone en evidencia que sustancias lábiles como el CLA pueden ser afectadas por la presencia de COS en sistemas químicos que semejan los procesos gastrointestinales (Vela Gurovic y col., 2015).

Varios investigadores han utilizado métodos de digestión in vitro para analizar cambios estructurales, biodisponibilidad y digestibilidad de los alimentos, lo que indica que estos sistemas de digestión in vitro son herramientas comunes y útiles para el análisis de alimentos y medicamentos. Sin embargo, se han observado algunas diferencias entre los modelos in vitro y los estudios in vivo. Por lo tanto, se recomienda complementar y correlacionar los estudios in vitro con los in vivo, para tener un panorama más completo de los estudios digestivos que se pretenden realizar (Hur, 2011).

Conclusiones

Con los resultados de estos estudios se pudo concluir que la adición de quitosano disminuye la disponibilidad

de glucosa, calcio y hierro, debido a la capacidad que posee de formar flóculos a pH alcalino como ocurre en el medio duodenal. Otras fibras utilizadas en estos ensayos tienen diferente comportamiento según su naturaleza química y según el nutriente estudiado. Los COS, adicionados a yogur en una concentración de 0,1% p/p solo afectan el contenido de CLA de éste producto lácteo. Es decir que, la adición de quitosano o sus derivados al yogur, puede ser utilizada como instrumento para formular un alimento que, siendo incorporado en dietas para personas con necesidades nutricionales específicas (por ejemplo: dietas hipoglucémicas, hipocalóricas, hipotriglicéridémicas, hipocolesterolémicas), permita aprovechar los beneficios para la salud que se le atribuyen a estas sustancias en numerosos estudios clínicos, más allá del ámbito exclusivamente nutritivo.

Tabla 1- Reducción en la disponibilidad (%) de glucosa y calcio de los diferentes yogures con fibra con respecto al yogur control sin fibra, luego de la simulación digestiva. De Rodríguez y col., 2008

Yogures con diferentes fibras	Reducción en la disponibilidad de glucosa (%)	Reducción en la disponibilidad de calcio (%)
Bambú	0,3 ± 0,0 ^c	11,0 ± 1,2 ^c
Inulina	5,7 ± 1,8 ^b	7,0 ± 0,9 ^d
Manzana	0,0 ± 0,0 ^c	16,5 ± 1,6 ^b
Psyllium	15,3 ± 1,8 ^a	8,1 ± 0,9 ^d
Qitosano	17,7 ± 2,1 ^a	21,0 ± 2,5 ^a
Trigo	9,1 ± 2,1 ^b	12,1 ± 1,2 ^c

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas con $p < 0.05$.

Tabla 2- Perfiles de ácidos grasos de yogures control y adicionados con 0.1% de COS luego de la digestión química. De Vela Gurovic y col., 2015.

Ácidos grasos	Yogures control	Yogures con 0.1% COS
C14:0	7,27 ± 0,04	3,36 ± 1,47
C14:1	0,54 ± 0,04	0,18 ± 0,18
C15:0	1,27 ± 0,06	0,43 ± 0,43
C16:0	33,85 ± 1,49	30,03 ± 1,53
C16:1(n-7)	0,58 ± 0,14	0,40 ± 0,40
C16:1(n-9,trans)	2,54 ± 0,43	1,54 ± 1,54
C17:0	1,38 ± 0,74	0,23 ± 0,23
C18:0	25,23 ± 5,00	33,59 ± 12,04
C18:1(n-9,cis)	13,68 ± 0,52	13,88 ± 2,19
C18:1(n-7)	2,29 ± 0,19	1,46 ± 0,31
C18:1(n-9,trans)	1,05 ± 0,15	0,54 ± 0,54
C18:2(n-6)	7,33 ± 1,77	8,98 ± 3,51
CLA	0,42 ± 0,07 ^a	0,17 ± 0,02 ^b
No Identificado	2,86 ± 0,89	5,77 ± 0,88

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas con $p < 0.05$.

Fig. 1- Comportamiento de las diferentes fibras adicionadas a yogur luego del pasaje al duodeno en las simulaciones digestivas para estudiar la disponibilidad de glucosa y Ca⁺⁺. (1) Trigo, (2) Psyllium, (3) Manzana, (4) Inulina, (5) Quitosano y (6) Bambú. De Rodríguez y col., 2008.

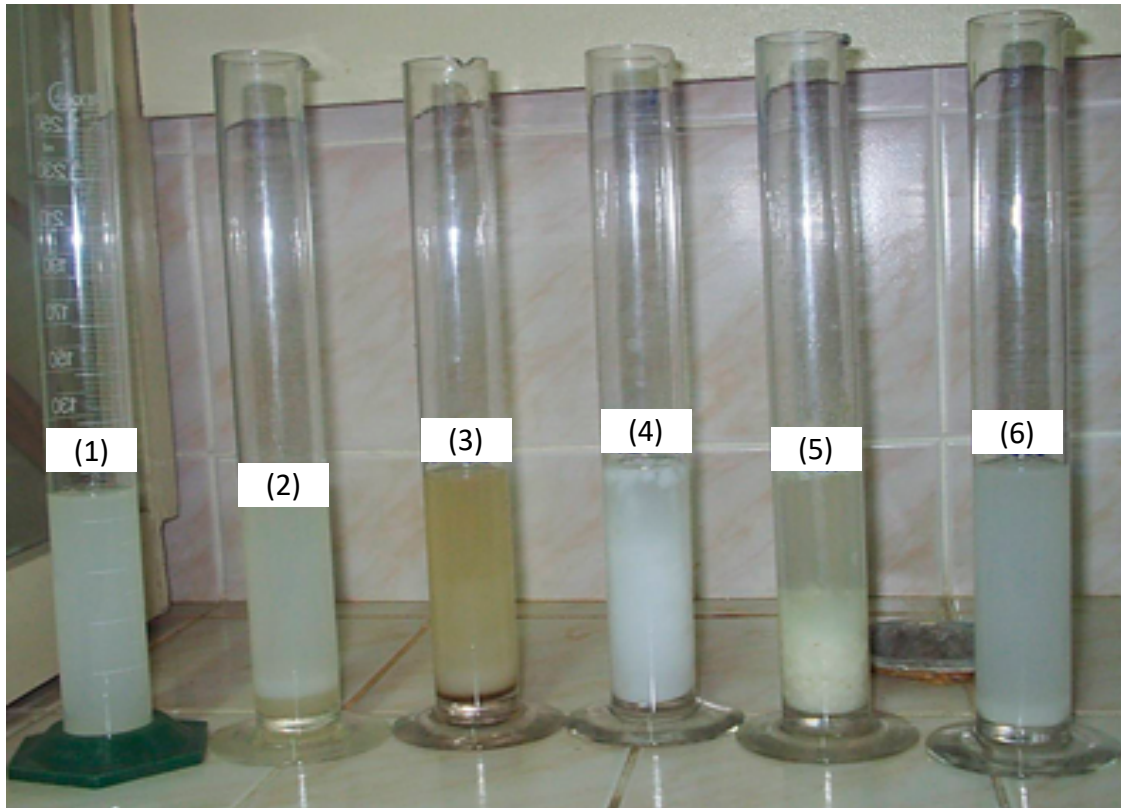


Fig. 2- Etapa de diálisis de la simulación digestiva en el estudio de la disponibilidad de hierro en presencia de diferentes fibras adicionadas al alimento. (1) Yogur con Psyllium, (2) Yogur con Trigo, (3) Yogur con Quitosano, (4) Yogur control sin fibra. De Dello Staffolo y col., 2011.

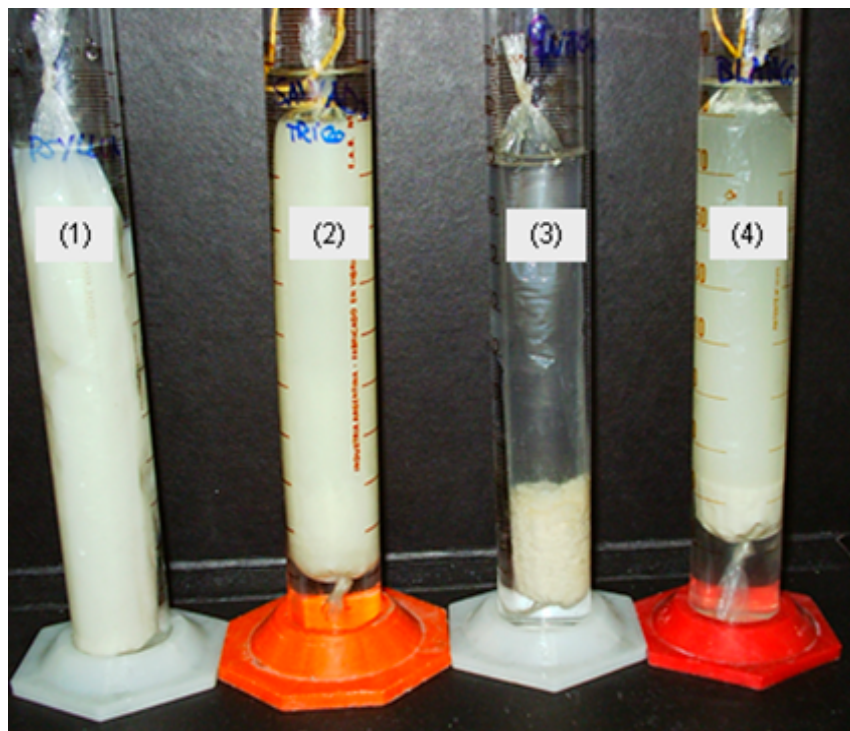


Fig. 3- Evaluación de la retención de hierro por parte de las diferentes fibras adicionadas a yogur luego de 30 y 60 min. del pasaje al duodeno en la simulación digestiva. De Dello Staffolo y col., 2011.

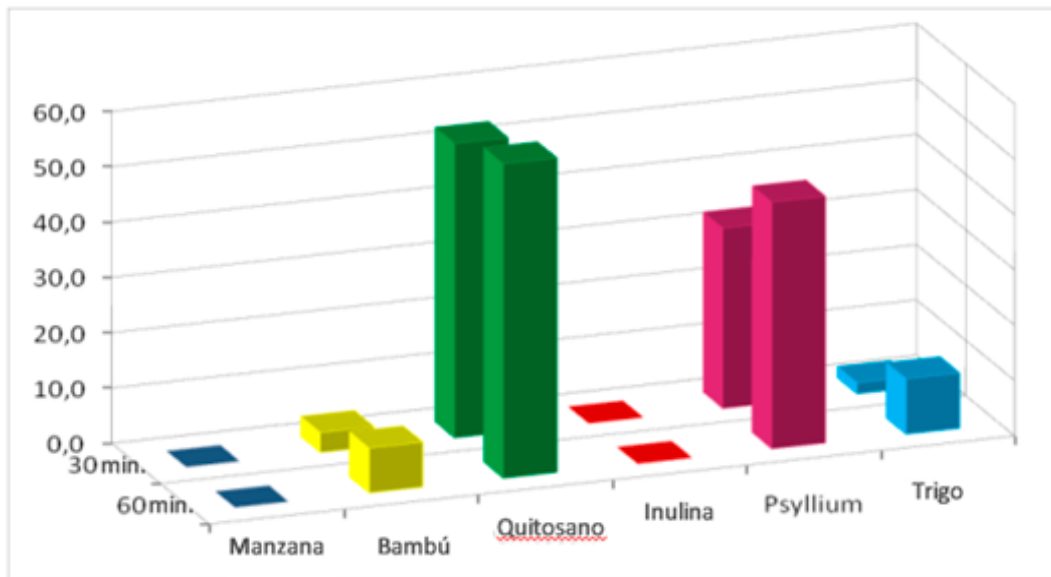
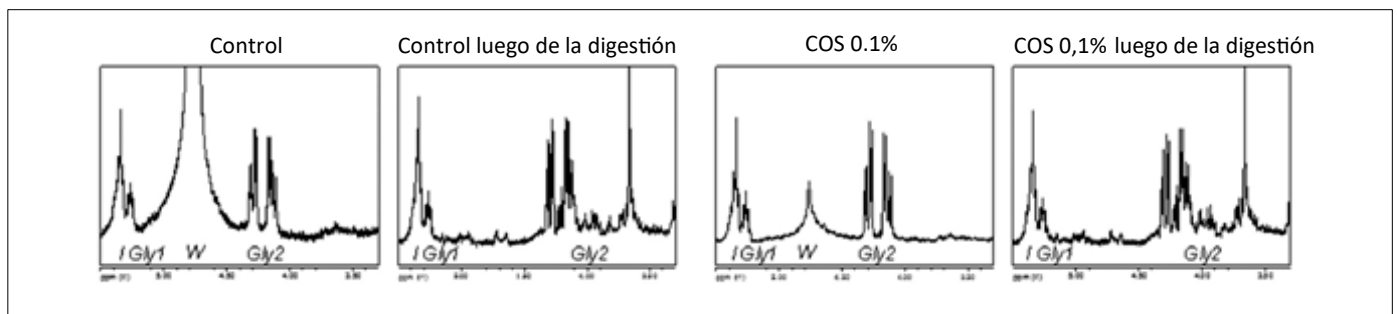


Fig. 4- Secciones de los espectros RMN H1 de los lípidos aislados de los yogures. Gly1 y Gly2 son los protones del grupo glicerilo unidos a los carbonos C2 y C1 / C3, respectivamente. I= protones olefínicos. W= señal del agua. De Vela Gurovic y col., 2015.



Agradecimientos Se agradece el apoyo financiero de la Universidad Nacional del Sur (Bahía Blanca, Argentina) a través del Proyecto PGI-UNS N° 24/Q057, del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) de Argentina a través de los proyectos PIP N° 5395 y PIP N° 0480; de la Universidad Nacional de La Plata (La Plata, Argentina) a través de los proyectos I124, X541 y a los proveedores de fibras de distintos orígenes: Imperial Sensus (Holanda), CFF y JRS (Alemania).

Bibliografía

- Azorín-Ortuño, M, Urbán, C, Cerón, JJ, Tecles, F, Allende, A, Tomás-Barberán, FA, Espín, JC. (2009) Effect of low inulin doses with different polymerisation degree on lipid metabolism, mineral absorption, and intestinal microbiota in rats with fat-supplemented diet. *Food Chem* 113:1058-1065.
- Baboota, RK, Bishnoi, M, Ambalam, P, Kondepudi, KK, Sarma, SM, Boparai, RK, et al. (2013) Functional food ingredients for the management of obesity and associated co-morbidities–A review. *J Funct Foods* 5:997-1012.
- Bouhallab, S, Bouglé, D. (2004) Biopeptides of milk: Caseinophosphopeptides and mineral bioavailability. *Reprod*

Nutr Dev 44:493-498.

Collins, JF, Flores, SRL, Wang, X, Anderson, GJ. *Mechanisms and Regulation of Intestinal Iron Transport*. En *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. 6ta Edición, Editor Said, HM. Londres, Reino Unido. Academic Press (2018) 1451-1483.

De la Fuente, M.A., Montes, F., Guerrero, G., Juárez, M. (2003) *Total and soluble contents of calcium, magnesium, phosphorus and zinc in yogurts*. *Food Chem*. 80:573-578.

Dello Staffolo, M, Bertola, N, Martino, M, Bevilacqua, A. (2004) *Influence of dietary fibre addition on sensory and rheological properties of yogurt*. *Int. Dairy J* 14:263-268.

Dello Staffolo M, Martino M, Bevilacqua A, Montero M, Rodríguez MS, Albertengo, L. (2011) *Chitosan Interaction with Iron from Yoghurt Using an In Vitro Digestive Model: Comparative Study with Plant Dietary Fibers*. *Int J Mol Sci* 12:4647-4660.

Fernández-García, E, McGregor, JU. (1997) *Fortification of sweetened plain yogurt with insoluble dietary fiber*. *Z Lebensm Unters Forsch* 204:433-437.

Fizman, SM, Lluch, MA, Salvador, A. (1999) *Effect of addition of gelatin on microstructure of acidic milk gels and yoghurt and on their rheological properties*. *Int. Dairy J* 9:895-901.

Goff, HD, Repina, N, Fabekb, H, El Khourya, D, Gidleyc, MJ. (2018) *Dietary fibre for glycaemia control: Towards a mechanistic understanding*. *Bioact Carbohydr Dietary Fibre* 14:39-53.

Hur, SJ, Lim, BO, Decker, EA, McClements, DJ. (2011) *In vitro human digestion models for food applications*. *Food Chemistry* 125:1-12.

Kiela, PR, Collins, JF, Ghishan, FK. *Molecular Mechanisms of Intestinal Transport of Calcium, Phosphate, and Magnesium*. En *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. 5ta edición, Editor Johnson, LR. Londres, Reino Unido. Academic Press (2012) 1877-1919.

Luccia, BHD, Kunkel, ME. (2002) *In vitro availability of calcium from sources of cellulose, methylcellulose, and psyllium*. *Food Chem* 77:139-146.

Muzzarelli, RAA, Terbojevich, M, Cosani, A. *Unspecific activities of lipases and amylases on chitosans*. En *Chitin Enzymology*. Editor Muzzarelli, RAA. Grottammare, Italia. Atec (1996) 69-101.

Nieva-Echevarría, B, Goicoechea, E, Manzanos, MJ, Guillén, MD. (2014). *Food Res Int* 66:379-387.

Rodríguez, MS, Albertengo, L. (2005) *Interaction between chitosan and oil under stomach and duodenal digestive chemical conditions*. *Biosci Biotechnol Biochem* 69:2057-2062.

Rodríguez, MS, Montero, M, Dello Staffolo, M, Martino, M, Bevilacqua, A, Albertengo, L. (2008) *Chitosan influence on glucose and calcium availability from yoghurt: In vitro comparative study with plants fibre*. *Carbohydr Polym* 74:797-801.

Tungland, B, Meyer, D. (2002) *Nondigestible oligo- and Polysaccharides (Dietary Fiber): Their Physiology and Role in Human Health and Food*. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 3:73-91.

Van Campen, DR, Glahn, R. (1999) *Micronutrients bioavailability techniques: Accuracy, problems and limitations*. *Field Crops Res* 60:93-113.

Vela Gurovic, MS, Dello Staffolo, M, Montero, M, Debbaudt, A, Albertengo, L y Rodríguez, MS. (2015) *Chitooligosaccharides as novel ingredients of fermented foods*. *Food Funct* 6:3437-3443.

Westenbrink, S, Brunt, K, van der Kamp, J-W. (2013) *Dietary fibre: Challenges in production and use of food composition data*. *Food Chem* 140:562.-567.

Efecto de la variedad de centeno, cultivado en la Argentina, en el contenido de fibras y proteínas.

The effects of the rye variety, cultivated in Argentina, on the fiber and protein content .

Gómez Castro, M.L.; Larregain, C. C.; Moreyra, F.²; Insaurralde Bordón, F.; Aguerre, R. J.¹; Coscarello, E.N. *; García P. T.³. Laboratorio de Agroalimentos 503, Facultad de Agronomía y Ciencias Agroalimentarias, Universidad de Morón

¹ CONICET

² INTA Bordenave, Partido de Puán, Provincia de Buenos Aires.

³ Foro de la Alimentación, la Nutrición y la salud de la Bolsa de Cereales. (FANUS)

* Correspondencia: ecoscarello@hotmail.com

Resumen

Se estudió el contenido de fibras y proteínas, en las variedades de centeno Camilo INTA, Fausto INTA, Emilio INTA, Don Ewald INTA, Lisandro INTA, Quehue INTA, provenientes del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA Bordenave, Partido de Puán, Provincia de Buenos Aires. En el análisis de la calidad de las semillas, se categorizaron las variedades según su viabilidad y su capacidad de germinar. Las semillas de Don Ewald INTA y Camilo INTA presentaron una alta viabilidad y poder germinativo. Fausto INTA y Emilio INTA valores intermedios. Mientras que las de Lisandro INTA y Quehue INTA resultaron viables, pero sin poder germinativo, por ese motivo se descartaron. El contenido promedio de fibras totales es de 18 g, el de fibras insolubles 16 g y el de fibras solubles de alto peso molecular es de 2 g en 100 g de harina de grano entero. Este alto contenido de fibra, promueve efectos positivos en la digestión humana, y en la regulación de enfermedades crónicas no transmisibles. Existen diferencias significativas en el contenido de proteínas de las variedades analizadas. Siendo Camilo INTA la que presenta el mayor contenido proteico (14,2 g de proteínas en 100 g de harina).

Palabras claves: Centeno, fibras, poder germinativo, calidad de semillas, almacenamiento.

Abstract

The fiber and protein content was studied in the varieties of rye Camilo INTA, Fausto INTA, Emilio INTA, Don Ewald INTA, Lisandro INTA, Quehue INTA, from the National Institute of Agricultural Technology, INTA Bordenave, Puán Party, Province of Buenos Aires. In the analysis of the quality of the seeds, the varieties were categorized according to their viability and their ability to germinate. The seeds of Don Ewald INTA and Camilo INTA presented high viability and germination power. Fausto INTA and Emilio INTA intermediate values. While those of Lisandro INTA and Quehue INTA were viable but without germination, for that reason they were discarded. The average content of total fibers is 18 g, that of insoluble fibers 16 g and that of soluble high molecular weight fibers is 2 g in 100 g of whole grain flour. This high fiber content promotes positive effects on human digestion, and on the regulation of chronic non communicable diseases. There are significant differences in the protein content of the varieties analyzed. Camilo INTA is the one with the highest protein content (14.2 g of protein in 100 g of flour).

Keywords: Rye, fibers, germinative power, seed quality, storage.

Introduction

El centeno es el segundo cereal forrajero de invierno en importancia en la Argentina con un promedio de más de 300.000 hectáreas sembradas en las campañas 2015-2016-2017 (MAGYP, 2017). Un 12% de ellas (aproximadamente 40.000 hectáreas) son destinadas a la cosecha del grano. En este contexto el rendimiento en grano promedio a nivel nacional ha sido de 1770 kg/ha. Parte del grano producido es destinado a la producción de semilla y parte es destinada a la industria molinera debido a que la harina de centeno es utilizada para la producción de galletitas y panificación (Tomaso, 2008). Las principales características que favorecen su cultivo son la rusticidad, que le brinda una excelente adaptación a condiciones de sequía, muy bajas temperaturas y suelos livianos presentes en la región semiárida (Moreyra y otros, 2015), la mayor competencia con las malezas (Carreto y Vigna, 2016) y la posibilidad de utilizarlo como cultivo de cobertura (Fernández y otros, 2013). Los cultivares incluidos en el presente estudio podrían dividirse en 3 grupos según el momento de inscripción en el Registro Nacional de Propiedad de cultivares del Instituto Nacional de semillas de la República Argentina. El primer grupo estaría conformado por Quehue INTA y Lisandro INTA con una genética antigua, en el segundo grupo estarían Fausto INTA y Camilo INTA con genética más moderna y por último Emilio INTA y Don Ewald INTA conformarían el grupo de mejor rendimiento. Lisandro y Quehue son dos centenos diploides que han sido inscriptos por el INTA Bordenave en el año 1994 y 1997 respectivamente, y se caracterizan por tener un rápido crecimiento inicial (precoz), excelente producción de granos, con buena a muy buena capacidad de rebrote bajo condiciones de pastoreo y con muy buena tolerancia al frío y la sequía (Amigone y Tomaso, 2006) que las convierte en las dos variedades más sembradas del país. Camilo INTA es un centeno tetraploide y Fausto INTA uno diploide inscriptos en el año 2004 y 2005, respectivamente. Ambos tienen un crecimiento inicial moderado con una producción mayor de forraje durante el período otoño-invernal que los cultivares del primer grupo, lo que permite que sean sembrados en una fecha temprana. En cambio, Fausto INTA posee mejor capacidad de rebrote y mayor tolerancia a frío que Camilo INTA. Por su parte Camilo INTA, tiene un muy buen potencial de producción de grano, de mayor tamaño por ser tetraploide, con buena calidad comercial y muy buen tenor de proteína (Amigone y Tomaso, 2006). Finalmente, Don Ewald INTA y Emilio INTA son dos cultivares diploides inscriptos en el año 2010 y 2012 respectivamente que difieren en el crecimiento inicial, siendo Don Ewald INTA más rápido (ciclo corto) que Emilio INTA (ciclo largo). Ambos cultivares poseen un elevado potencial de rendimiento en grano destacándose Emilio por la excelente calidad comercial (Moreyra y otros, 2014). Los beneficios funcionales del centeno derivan de su alto contenido en fibra dietaria, lo que se traduce en efectos positivos sobre la digestión y disminución del riesgo de enfermedades coronarias, hipercolesterolemia, obesidad y diabetes. Retrasa el tiempo de vaciado del estómago, por lo cual disminuye la sensación de hambre entre horas y brinda protección contra algunos tipos de cáncer (Zhang y otros, 1994; Kritchevsky, 2001). Una de las estrategias para aumentar la producción de centeno es utilizarlo en la manufactura de alimentos ricos en fibra. Con este fin es necesario disponer de datos de las harinas integrales de grano entero de las diferentes variedades, cultivadas en nuestro país.

El objetivo del presente trabajo fue determinar el contenido de fibras totales e insolubles, así como el contenido de proteínas en seis variedades de centeno, con el fin de evaluar si existen diferencias entre ellas.

Materiales y Métodos

Se estudiaron las variedades Camilo INTA, Fausto INTA, Emilio INTA, Don Ewald INTA, Lisandro INTA, y Quehue INTA obtenidas en el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA Bordenave. Partido de Púan. Provincia de Buenos Aires. Se recibieron muestras de 2 kg de cada variedad, en tres partidas desde el 2014 al 2018, obtenidas mediante un muestreo al azar. Para la determinación de fibras y de proteínas, se tomaron 20 g aproximadamente de granos de cada variedad, se molieron en un molinillo Ionomex durante 2 minutos y luego se tamizó la harina integral de grano entero, empleando un tamiz de malla 10.

1. Análisis de la calidad de semillas por variedad:

1.1 Peso de semillas según Norma IRAM 15853.

Se seleccionaron las semillas y se determinó la humedad a 105 °C hasta peso constante. El control de la humedad es un factor decisivo en muchos procesos industriales tales como la molienda de cereales, y en la elaboración de pan. Se determinó el peso de 1000 semillas según la norma IRAM 15853.

1.2 Análisis viabilidad con reactivo Cloruro de 2, 3, 5 Trifenil Tetrazolium (TZ).

Se realizó según International Seed Testing Association (ISTA) 2007. Se hidratan las semillas en agua durante 2 horas para iniciar la actividad de las enzimas deshidrogenasas. Se colocaron 100 semillas hidratadas en Placa de Petri y se sumergieron en solución de TZ al 0,5 % por un período de 18 horas. Se evalúa su viabilidad, en base al patrón de tinción e intensidad del color, optimizado para este cereal, para lograr esto el analista debe familiarizarse con la anatomía de la semilla de esta especie.

1-3 Poder germinativo.

Se determinó según ISTA 2006, en primera instancia se optimizó el método según las necesidades del grano. El proceso de germinación es el indicador primario y más sensible que pone de manifiesto el nivel de deterioro de cualquier grano almacenado.

2. Determinación de las fibras totales e insolubles.

Se realizó según el método Official Method of Analysis (AOAC) 991.43. La fibra soluble de alto peso molecular se determinó por diferencia entre la fibra dietaria total y la insoluble.

3. Determinación de proteínas.

Se empleó el método AOAC Official Method 2001.11 (con modificaciones) Proteína cruda. Método de Kjeldahl, utilizando 5,83 como el factor de conversión de nitrógeno a proteína.

4. Determinación de la materia grasa.

Materiales: Sistema extractor Soxhlet. Solvente n-hexano.

5. Determinación gravimétrica de cenizas.

Se pesó exactamente aproximadamente 1g de muestra a calcinar hasta cenizas blancas y luego en mufla a 540 °C durante 5 hs.

6. Determinación gravimétrica de humedad.

Se pesó aproximadamente 1 g de harina integral de grano entero de cada muestra y se llevó a estufa a 105 °C durante 5 horas

Análisis Estadísticos

Las determinaciones de los métodos descriptos, se realizaron por cuadruplicado y los resultados se informaron como valor promedio. Se realizó un Análisis de la Varianza (ANOVA). Para las comparaciones a posteriori y se utilizó la prueba de Tukey con un nivel de significación global del 5%.

Resultados y Discusión

A fin de minimizar los riesgos que implica utilizar semillas que no tienen una adecuada capacidad para producir buenas cosechas, es necesario realizar un control de calidad de las mismas. Del análisis de la calidad de semillas por variedad, observamos en la Tabla 1 el peso de 1000 semillas y el porcentaje de humedad de cada variedad. Las humedades están en el rango habitualmente utilizadas para la conservación a largo plazo del cereal. En estudios previos, se ha estudiado el poder germinativo de semillas almacenadas por períodos de hasta 16 semanas, con distintos contenidos de humedad (10%, 12,5%, 15 %, 17,5%), pudiéndose concluir que las más adecuadas se logran con contenidos de humedad del grano menores a 12.5% y temperaturas inferiores a 20°C (Aguerre, 2018). El almacenamiento seguro del centeno y otros cereales puede definirse como el período de tiempo durante el que los granos pueden conservarse sin pérdida significativa de su calidad. Los facto-

res que afectan la calidad del material almacenado son el grado de madurez, contenido de humedad, temperatura de almacenamiento, tiempo de almacenamiento, hongos, insectos, ácaros, y manejo del grano. Entre estos factores, la humedad y la temperatura son las variables más importantes a controlar. Con respecto al peso de 1000 semillas, las semillas de mayor peso fue la variedad Camilo INTA y las de menores pesos son de las variedades Emilio INTA y Fausto INTA.

Los mayores porcentajes de viabilidad corresponden a las variedades Don Ewald INTA y Camilo INTA, dato que se correlaciona con la germinación (Tabla 2). Contrariamente, las variedades Quehue INTA y Lisandro INTA carecen de poder germinativo, sin embargo, el test de viabilidad no dio un valor nulo. En la Figura 1 se observa una semilla variedad Don Ewald INTA teñida con TZ 0.5%. En la Figura 2 se observa una semilla de centeno germinada. En las comparaciones de las distintas variedades observamos diferente eficiencia en las viabilidades y germinaciones. Don Ewald INTA y Camilo INTA poseen los valores de germinación y viabilidad más altos, Emilio INTA y Fausto INTA presentan valores intermedios, aunque ambas poseen alta viabilidad, no germinan con un porcentaje menor, si bien el embrión puede estar vivo no expresa la misma eficiencia en la germinación. Las variedades Quehue y Lisandro no arrojaron resultados óptimos. La prueba de TZ se basa en la actividad de ciertas enzimas denominadas deshidrogenasas, que participan en las reacciones de respiración que se produce en la mitocondria de las células vivas. Al ser hidratadas las semillas, la actividad de las deshidrogenasas se incrementa, produciendo la liberación de iones hidrógeno, lo que reduce a la solución de tetrazolio, -2,3,5- triphenil tetrazolum chloride (TZ), incoloro- a formazán -color rojo-. El formazán tiñe las células vivas de color rojo, en tanto que las muertas permanecen sin colorear, refleja las diferencias en la actividad respiratoria de cada estructura. La viabilidad de las semillas se determina en función del patrón de tinción del embrión y de la intensidad de la coloración. Que una semilla sea viable, nos indica que es capaz de germinar y producir una plántula normal. Sin embargo, podría estar dormida, y en ese caso no germinaría inmediatamente. La germinación comienza con la activación o el “despertar” de la semilla de su estado de latencia. Es un procedimiento muy común en horticultura, a fin de acelerar el desarrollo de la siembra, remojar las semillas varias horas en agua. En este período, la semilla absorbe agua y pone en marcha procesos que inactivan anti nutrientes, pre-digieren nutrientes existentes e incrementan su contenido nutricional. Tras el proceso de activación, las semillas quedan listas para la germinación. En la germinación es necesario crear un ambiente ventilado y húmedo para las semillas, pero no anegado.

La determinación de fibra dietaria total, soluble e insoluble en harina de granos de centeno fue realizada en las variedades Don Ewald INTA, Camilo INTA, Fausto INTA y Emilio INTA. Las variedades Lisandro INTA y Quehue INTA presentaron bajos resultados en germinación y viabilidad por ese motivo se desestimó determinar el valor de contenidos de fibras. Los resultados se expresan en la Tabla 3. Se observa que en todas las variedades, no existen diferencias estadísticamente significativas en el contenido de fibra dietaria total la cual es de aproximadamente 18 g por cada 100 gramos de harina integral de grano entero. Esto promueve el uso de esta harina para elaborar alimentos ricos en fibras. Un alimento con contenido de fibra superior al 6 %, puede ser catalogado con el rótulo: “alto contenido de fibra “según el Código Alimentario Argentino (CAA).

En el contenido de proteínas existen diferencias estadísticamente significativas en las variedades analizadas. La variedad Camilo INTA presenta mayor contenido proteico que el resto de las variedades ($14,19 \pm 0,57$). El contenido proteico de las variedades Emilio INTA, Quehue INTA y Don Ewald INTA no difiere significativamente. La variedad Fausto INTA presenta menor contenido proteico ($9,53 \pm 0,24$)(Tabla 4).

Los valores obtenidos en nuestro estudio nos permiten categorizar como las mejores variedades a Don Ewald INTA y Camilo INTA. El contenido nutricional y el valor energético promedio de estas dos harinas integrales de grano entero, fue de aproximadamente 310 kcal/J en 100g. (Tabla 5).

De acuerdo con la definición del Código Alimentario Argentino (CAA) Capítulo IX, Artículo 689 (Res 711, 25.4.85), se entiende por “Harina integral de centeno” al producto obtenido de la molienda del grano limpio y sano del centeno con sus respectivas envolturas celulósicas. La harina fabricada a partir del centeno es de bajo contenido en gluten y contiene una mayor proporción de fibras que la harina desprendida del trigo. Es un alimento que se destaca por su significativo aporte de fibra, hidratos de carbono, y calorías. Por otra parte, su bajo contenido de grasas lo convierte en un aliado de aquellas personas con sobrepeso. Las propiedades funcionales tecnológicas que presenta la fibra dietaria como la capacidad de retención de agua y aceite, tienen

efectos benéficos en los productos alimenticios mejorando sus características organolépticas y efectos fisiológicos en el organismo del ser humano. La fibra dietaria contenida en el centeno es la más alta entre los cereales comunes. El típico pan de centeno contiene aproximadamente tres veces más fibra que el pan blanco de harina de trigo, porque el endospermo del centeno contiene dos veces más componentes en las paredes de sus células. Los principales componentes de la fibra de centeno son arabinosa (7,5 – 10,3 %), fructano (3,6 – 4,6%), β -glucano (1,4 – 1,5%), celulosa y almidón (2,6 – 3,5%) (Poutanen, K., 2013).

La epidemia creciente de enfermedades crónicas que aqueja tanto a países desarrollados como en vías de desarrollo está relacionada con cambios de los hábitos alimentarios y del modo de vida. La nutrición constituye un determinante importante de enfermedades crónicas no transmisibles. Su prevención está ligada a estrategias aplicadas en relación a la relevancia de la dieta, la nutrición y la actividad física. En tal sentido, es posible establecer la importancia del consumo de cereales en la dieta diaria. La pirámide de alimentación saludable propuesta por el Departamento de Nutrición de la Universidad de Harvard propone en su segundo nivel el consumo de frutas, verduras, aceites, grasas saludables y cereales integrales. El hambre y la malnutrición siguen siendo algunos de los problemas más devastadores que enfrenta la mayoría de las naciones en vías de desarrollo. La reunión de expertos en nutrición humana de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) acordó que la ingesta de carbohidratos debería ser de al menos 55 partes en 100 del total de calorías (FAO and WHO/FAO, 2004). La ingesta calórica debe ser principalmente carbohidratos complejos disponibles con un índice glucémico bajo y ricos en fibras (Morrison, W. R. 1984), tales como el centeno.

La demanda de alimentos elaborados con ingredientes de granos integrales que mejoran la salud continúa creciendo. Los beneficios para la salud de los cereales integrales son conocidos y se atribuyen a la presencia de fibra dietaria. El consumo de cereales integrales se ha asociado con la protección contra las enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo 2. Las harinas integrales de centeno tienen un contenido total de fibra que contribuye de manera saludable a la alimentación diaria de la población (Coscarello y col.,2019).

Es necesario seguir trabajando en la evaluación del centeno de distintas variedades sometido a diferentes procesos tecnológicos, con el fin de generar beneficios en la elaboración de productos alimenticios incorporándoles propiedades funcionales.

Conclusiones

De acuerdo a los datos obtenidos, las variedades Don Ewald INTA y Camilo INTA son las de mayor viabilidad y poder germinativo. Los contenidos de fibras dietaria total, insoluble y soluble de alto peso molecular, no mostraron diferencias significativas en las distintas variedades analizadas. Los resultados obtenidos señalan a estas harinas integrales de centeno como una fuente de fibra dietaria, con una fracción soluble la cual es potencialmente prebiótica, esto favorece su utilización en el diseño de panificados ricos en fibra.

El contenido de proteínas evidencia que existen diferencias estadísticamente significativas en el contenido de proteínas de las variedades estudiadas. Se concluye con un nivel de significación del 5% que Camilo INTA tiene un porcentaje mayor de proteínas que las demás. Los contenidos nutricionales de la harina de centeno de las variedades Don Ewald INTA y Camilo INTA, propician a estas harinas como materias primas de panes saludables.

Tabla 1. Peso húmedo, % de humedad y peso seco de 1000 semillas de las variedades estudiadas.

Variedad de centeno	Peso húmedo	Humedad %	Peso seco promedio de 1000 semillas en g
Camilo	30,45±0,05	10,35±0,5	27,30
Lisandro	24,45±0,04	10,05±0,4	22,01
Don Ewald	21,20±0,03	9,90±0,4	19,10
Quehue	19,95±0,04	8,80±0,5	18,20
Fausto	16,55±0,04	10,00±0,5	14,91
Emilio	15,25±0,05	11,50±0,5	13,40

Tabla 2. Viabilidad con TZ 0.5% (ISTA2007) y germinación (ISTA2006) en las variedades estudiadas.

Variedad	% Viables	% No viables	% Germinado	% Sin germinar
Don Ewald	100±0,8	0	100±0,8	0
Camilo	90±0,5	10±0,7	100±0,9	0
Emilio	86±0,9	14±0,5	80±0,8	10±0,6
Fausto	90±0,8	10±0,7	80±0,6	10±0,7
Lisandro	15±0,5	85±0,6	0	100±0,6
Quehue	20±0,5	80±0,6	0	100±0,5

Tabla 3. Porcentajes de fibra total, soluble e insoluble de las variedades Don Ewald INTA y Camilo INTA. Resultados expresados en base a un análisis estadístico de ANOVA y el test Tukey.

	%Fibra Total	%Fibra Insoluble	%Fibra Soluble por diferencia
Don Ewald INTA	18,72 ± 1,86 ^a	16,9 ± 1,67 ^b	1,90
Camilo INTA	17,35 ± 0,44 ^a	15,2 ± 1,50 ^b	2,00
Emilio	18,70 ± 0,98 ^a	16,80 ± 0,88 ^b	1,90
Fausto	17,54 ± 1,48 ^a	15,00 ± 1,42 ^b	2,54

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas con $p < 0.05$.

Tabla 4. Porcentajes de proteína en harina integral de centeno de las variedades estudiadas.

Proteína Total (%)	
Camilo INTA	14,19 ^b ± 0,57
Don Ewald INTA	11,98 ^{ab} ± 0,79
Quehue INTA	11,58 ^{ab} ± 0,59
Emilio INTA	10,58 ^{ab} ± 0,55
Fausto INTA	9,53 ^a ± 0,24

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas con $p < 0.05$.

Tabla 5. Contenido nutricional de la harina integral de grano entero de las variedades Don Ewald INTA y Camilo INTA

Variedad	Fibra Total	Proteínas	Grasas	Humedad	Cenizas	Hidratos de carbono	Valor energético Kcal/100g Promedio
Don Ewald INTA	18,72 ± 1,8	11,98 ± 0,7	1,62±0,4	9,9±0,4	0,55±0,3	57,23±1,8	310,45
Camilo INTA	17,35 ± 0,4	14,19 ± 0,5	1,45±0,5	10,35±0,5	0,67±0,3	55,99±1,7	311,12

Figura 1. Tinción de semillas con Tetrazolio 0.5%.

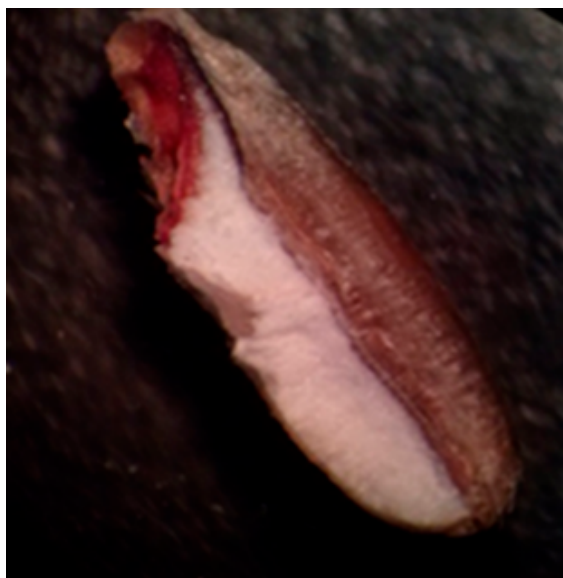


Figura 2. Germinación de semillas de centeno.



Agradecimientos Agradecemos la colaboración de la Dra. Adriana Pazos. INTA Castelar. Instituto de Alimentos (Determinación de proteínas). Este trabajo se realizó por medio de proyectos subvencionados por la Universidad de Morón.

Referencias bibliográficas

- Abrams, SA, Griffin, IJ, Hawthorne, KM, Liang, L, Gunn, SK, Darlington, G, Ellis, KJ. (2005) A combination of prebiotic short and long-chain inulin type fructans enhances calcium absorption and bone mineralization in young adolescents. *Am J Clin Nutr* 82:471-476.
- Aguerre, RJ, Gómez Castro, ML, Larregain, CC, Zabala, S, Peluso, A, Coscarello, EN. (2018) Viabilidad del Centeno: Influencia en las condiciones de preservación. VII Jornadas de Ciencia y Tecnología. Facultad de Agronomía y Ciencias Agroalimentarias. Universidad de Morón.
- Álvarez, C, Quiroga A, Santos D, Bodrero M. (2013) Contribuciones de los cultivos de coberturas a la sostenibilidad de los sistemas de producción. Ediciones INTA. ISBN978-987-679-177-9. Junio de 2013. 196 pp.
- Amigone, MA, Tomaso, JC. (2006) Principales características de especies y cultivares de verdes invernales. Informe para Extensión N° 103, EEA INTA Marcos Juárez, 11p.

- AOAC Method 991.43. Total, soluble, and insoluble dietary fiber in foods. Enzymatic-gravimetric method, *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 1992, 15th ed., 3rd suppl. Association: Ariington, VA,.
- Ashwell, M. (2005) *Conceptos sobre Alimentos Funcionales*. ILSI Europe Concise Monograph Series, ILSI Press.
- Carretto, L, Vigna M. (2016) *Habilidad competitiva de verdeos de invierno frente a Lolium multiflorum y Brassica napus*. *Actas del VIII Congreso Nacional de Trigo – VI Simposio de Cereales de siembra otoño-invernal – II Reunión del Mercosur*. Pergamino, 14-15 y 16 de septiembre de 2016, Argentina.
- Cloetens, L, DePreter, V, Sweennen, JA, Rutggerts, P, Verbeke, K, Broekaert, K, Courtin, C., Delcour, M. (2008) *Dose-response effect of arabino-xylo-oligosaccharides on gastrointestinal motility and on colonic bacterial metabolism in healthy volunteers*. *Journal of the American College of Nutrition* 27:512-512.
- Coscarello EN, Aguerre R. J; Gómez Castro ML, Larregain CC. (2019). *Healthy Component in Whole Wheat and Rye Flours* DOI: 10.5772/intechopen.83341 <https://www.intechopen.com/online-first/fibers-healthy-component-in-whole-wheat-and-rye-flours>
- Coussement, P. (1995) *A new generation of dietary fibers*. *European Dairy Magazine*, 3:22-24.
- Código Alimentario Argentino Ley 18284. Decreto 2126/1971.
- Diet Nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of a Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and World Health Organization WHO/FAO Expert Consultation* GENOVE; 2004
- Danisco, Sweeteners (2006) *Ingredientes con beneficios funcionales*. *Revista Énfasis Alimentación Año XII*, N° 5.
- Fernández R, Quiroga A, Noellemeyer E (2013) *Cultivo de cobertura como antecesor del cultivo de maíz en la Región Semiárida Pampeana - cultivos de cobertura - inta.gob.ar*
- Grootaert, C, Delcour, J, ACourtin, C, Broekaert, M, Verstraete, W, Van de Wiele, F. (2007) *Microbial metabolism and prebiotic potency of arabinoxylan oligosaccharides in the human intestine*. *Trends in food science and technology* 18: 64-71.
- Hubner, F, Schehl, B, Gebruers, K, Courtin, C, Delcour, J, Arendt E. (2010) *Influence of germination time and temperature and the properties of rye malt and rye malt based worts*. *Journal of Cereal Science* 52: 72-79.
- INTA Bordenave <http://inta.gob.ar/documentos/variedades-de-centeno-obtenidos-por-la-eea-bordenave> (visitado el 15/08/2013).
- I.S.T.A. 2006. *Handbook on Seedling Evaluation*. Published by The International Seed Testing Association (ISTA). Switzerland.
- I.S.T.A. 2007. *International Rules for Seed Testing*. Published by The International Seed Testing Association (ISTA). Switzerland.
- Jie, Z, Bang-Yao, L, Ming-Jie, X, Hai-Wei, L, Zu-Kang, Z, Ting-Song, W, Craig SA. (2000) *Studies on the effects of polydextrose intake on physiologic functions in Chinese people*. *Am J Clin Nutr* 72:1503-9.
- Kaisa Poutanen and Per Åman, *Rye and Health* (2014) Editor: Amer Assn of Cereal Chemists ISBN-13: 978-1891127816
- Kaur, N, Gupta, A. (2002) *Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition*. *J Bio Scientia* 27: 703-714.
- Kim YI, AGA, (2000) *Technical Review: impact of dietary fiber on colon cancer occurrence*. *Gastroenterology* 118:1235-57.
- Kleesen, B, Sykura, B, Zunft, HJ, Blaut, M. (1997) *Effects of inulin and lactose on fecal microflora, microbial activity and bowel habit in elderly constipated persons*. *Am J Clin Nutr* 65:1397-402.

- Kolida, S, Tuohy, K, Gibson, G. (2002) *Prebiotic effects of Inulin and Oligofructose*. *Br J Nutr.* 87, Suppl. 2, S193-S197.
- Kritchovsky D, Prosky L, Roberfroid M, Flamm G1, Glinsmann W (2001), *Inulin and oligofructose as dietary fiber: a review of the evidence*. *Crit Rev Food Sci Nutr.* Jul;41(5):353-62.
- Lajolo, MF. (2001) *Fibra Dietética en Iberoamérica: tecnología y salud. Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos*. Brasil. Editora Varela.
- Langlands, SJ, Hopkins, MJ, Coleman, N, Cummings, JH. (2004) *Prebiotics carbohydrates modify the mucosa associated microflora of the human large bowel*. *Gut* 53:1610-1616.
- Lu, Z, Walker, X, Muir, KZ, Mascara TJG, ODea, K. (2000) *Arabinoxylan fibre improves metabolic control in control in people with type II diabetes* *European Journal of Clinical Nutrition* 58:621-628.
- MAGYP. 2017. *Sistema Integrado de Información Agrícola perteneciente al Ministerio de Agroindustria*. <https://datos.magyp.gov.ar/reportes.php?reporte=Estimaciones>.
- Montani M. (2005) *Capturar la oportunidad en Alimentos Funcionales*. *Orafti Latinoamérica*. *Revista Énfasis Alimentación*; Año XI, N° 2:78-82. <<http://www.enfasis.com>.
- Moreyra F, Conti V, González G, Vallati A. y Giménez F. (2014). *Mejoramiento de verdeos de invierno*. En: Moreyra, F., Giménez F., López J. R., Tranier E., Real Ortellado M., Krüger
- Morrison WR. *Plant lipids in Research in Food Science and Nutrition*(1984).Dublin. Boole Press; 5:247-260
- H., Mayo A. y Labarthe F. 2014. *Verdeos de invierno*. Ediciones INTA. Colección Divulgación. ISBN 978-987-521-567-2. 52 pp.
- Palmetti Rectas Néstor, Castells Cristina. (2010) *Alimentos saludables*. Madrid V Edición.
- Rao, AV. (1999) *Dose-response effects of inulin and oligofructose on intestinal bifido genesis effects*. *J Nutr*, 129: 1442S-1445S.
- Roberfroid, MB. (2005) *Introducing inulin-type fructans*. *Br J Nutr.* Apr; 93Suppl 1: S13-25.
- Suzuki, T, Hara, H. (2004) *Various non digestible saccharides open a paracellular calcium transport pathway with the induction of intracellular calcium in human intestinal Caco-2 Cells*. *J Nutr.* 134:1935-1941.
- Tomasso, J.C. (2008). *Cereales Menores de Invierno: Mejoramiento Genético de Avena, Cebada Cervecera, Centeno y Cebada Forrajera. Producción y Utilización en la Argentina*. INTA Bordenave, Argentina. pp. 57-77.
- Van Loo, J, Coussement, P, De Leenheer, L, Hoebregs, H, Smits, G. (1995) *On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the Western Diet*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35:6, 525-552, DOI: 10.1080/10408399509527714.
- Zhang, J-X., Lundin, E., Hallmans, G., Adlercreutz, H., Andersson, H., Bosaeus, I., Åman, R., Stenling, R. and Dahlgren, S. (1994). *Effect of rye bran on excretion of bile acids, cholesterol, nitrogen, and fat in human subjects with ileostomies*, *Am. J. Clin. Nutr.* 59:389-394.

Uso de sal esférica para la reducción de sodio sin variación del gusto salado en la obtención de una hamburguesa de carne de cordero con aptitudes tecnológicas y sensoriales

Use of spherical salt for reducing sodium content with no change in salty perception in the development of a lamb meat burger with high-rated technological and sensory properties

Soteras, T ^{a*}, Cunzolo, SA ^a, Carduza, FJ ^a & Grigioni, G. ^{a, b}

^a Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Centro de Investigación de Agroindustria (CIA), Instituto Tecnología de Alimentos (ITA) - Nicolás Repetto y De los Reseros s/n, Hurlingham, CP 1686, Buenos Aires, Argentina

^b Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) – Rivadavia 1917, C1033AAJ, Buenos Aires, Argentina

^a National Institute of Agricultural Technology (INTA), Agribusiness' Research Center, Food Technology Institute - Nicolás Repetto y De los Reseros s/n, Hurlingham, CP 1686, Buenos Aires, Argentina

^b National Council of Scientific and Technical Research (CONICET) – Rivadavia 1917, C1033AAJ, Buenos Aires, Argentina

* Correspondencia: soteras.trinidad@inta.gob.ar

Resumen

Se utilizó sal esférica como estrategia para la reducción del contenido de sodio en una hamburguesa de carne de cordero con respecto a una hamburguesa control —elaborada con sal de mesa al 1,5%— con el objeto de conservar la misma percepción de gusto salado en el producto final. La formulación de este último fue definida mediante una serie de pruebas desarrolladas con un panel de evaluadores entrenados en percepción de gusto salado. Se determinó el contenido de sodio, la composición centesimal y el contenido graso del producto crudo y se estimaron el rendimiento y la humedad expresible. Mediante un ensayo hedónico con 112 consumidores se determinó la aceptabilidad del producto final. Se logró desarrollar una hamburguesa con 14,75% menos de sodio y sin diferencias perceptibles en el gusto salado con respecto a la muestra control, valorada positivamente por más del 85% de los consumidores. Adicionalmente, las características tecnológicas del nuevo producto se hallaron dentro de los parámetros esperados.

Palabras claves: Sal esférica, reducción de sodio, gusto salado, hamburguesa de cordero, evaluación sensorial.

Abstract

A spherical salt was the strategy used to reduce the sodium content in a lamb meat burger in relation to a control sample —formulated with 1.5% sodium content— in order to maintain the same salty taste perception. The final product was defined by a series of tests developed with a sensory panel trained for salty taste detection. Sodium content, centesimal composition and fat composition were analyzed on raw burgers. Cooking yield and expressible moisture were estimated. A hedonic test was performed with the final product to assess overall acceptability. The developed burger contained 14.75% (w/w) less sodium than the control sample but no difference in its salty taste and presented adequate technological features. Furthermore, the burger obtained 87.5% of positive reviews in the acceptance test.

Keywords: Spherical salt, sodium reduction, salty taste, lamb burger, sensory evaluation.

Introduction

Elevated sodium intake has been associated with a number of non-communicable diseases (NCDs) including hypertension, cardiovascular disease and stroke. NCDs are the main contributor to mortality and morbidity globally. A lower intake of sodium may reduce blood pressure and the risk associated to NCDs (World Health Organization, 2012).

Even though salt enhances flavour, preserves freshness and improves appearance and texture of food, there are strategies for its reduction. It is possible to modify the size and the structure of the salt particle thereby enhancing its dissolution. The change in the structure promotes the same salty taste with reduced salt level in the product (McGuire, 2010). Salt microspheres (SODA LO[®]) are made by a patented technology that turns standard salt crystals into free-flowing crystalline microspheres. These low-density crystals efficiently deliver salty taste by maximizing surface area relative to volume. While spherical salt is represented by hollow crystalline microspheres of sodium chloride of 10-20 µm of diameter, crystals of table salt have an approximate size of 500 µm. However, a successful salt reduction depends on multiple aspects related to type of product, composition, processing requirements and manufacturing conditions. These factors will determine whether the product is suitable for modification as well as the technological limitations for salt reduction (Ruusunen & Puolanne, 2005). It is well known that about 75% of the dietary sodium comes from processed and restaurant foods, whereas only a small portion comes from salt added to food when cooking or eating. Commercial classic burgers contain large amount of sodium (De Landeta et al., 2012) and represent a very popular and accepted frozen product.

On the other hand, nowadays lamb meat does not represent an important part of daily diet of many countries, representing less than 2 kilograms/capita/year (OECD.org, 2015). Argentinian population barely consume this type of meat for several reasons as the lack of habit and lack of knowledge about its nutritional composition, but also because of its seasonal availability and because there are not practical cuts for an easy cook or storage available in the market (Iglesias, 2013). As stated by Moré et al. (2000), the global image of lamb meat for Argentinian consumers is good despite its low consumption (approximately 1.5 kg/person/-year). To achieve the potentiality reflected by its image, the authors propose a modification on the supply conditions considering products, presentations, designs and target population.

The aim of this work was to analyze the use of spherical salt (at 1.1%, 1.3% and 1.5%) for sodium content reduction in a lamb meat burger with no changes in the salty taste perception in relation to a control sample, assessed by sensory analysis. Also, to study the effect of that salt replacement over the technological properties, the composition and the product acceptability.

2. Materials and methods

2.1. Burgers formulation

Lamb leg meat and fat represented the raw material for the burgers elaboration. Forty male Corriedale lambs were reared to 24.5 ± 1.5 kg live weight on natural pasture of Mesopotamic region of Argentina. Lambs were conventionally slaughtered in a commercial abattoir and legs were taken after 24 h at 4°C ($K = T^{\circ}\text{C} + 273.15$) and transferred to a frozen chamber ($-18 \pm 2^{\circ}\text{C}$). The day before each elaboration lamb legs were transferred to a refrigerator ($4 \pm 2^{\circ}\text{C}$). All subcutaneous and intermuscular fat was removed and used as the fat source. Lean meat and fat were minced through 10 mm plate of a meat grinder (Altamura S.A., Argentina). Subsequently the meat and fat were placed in the freezer ($-18 \pm 2^{\circ}\text{C}$) for 20 min. The concentration of fat selected was 15% (w/w).

The types of salt used were table salt (NaCl, Celusal[™]) for the salty taste training (at different levels) and for the formulation of the control sample (at 1.5%), and spherical salt (SODA-LO[®] salt microspheres, Tate&Lyle) for the lamb meat burger development (at 1.1%, 1.3% and 1.5%). It is important to emphasise that the NaCl level chosen for the control sample (1.5%) arises from the lowest sodium content found between the nutritional information labels of beef burgers available in Buenos Aires capital city market. Beef burgers were considered for market research instead of lamb meat burgers, since there were not commercial lamb meat burgers

available in the city market at the time. The first step of the elaboration was the addition of the salt to the fat in a partially frozen state for preventing the dissolution of the spherical salt particles —microspheres are water-soluble and the fat is expected to protect them—. The type and concentration of salt was added according to the formulation. Later, the lean meat and the fat (5.7:1) were mixed and the additives added. The additives used were: sodium tripolyphosphate 0.15% w/w (Na₅P₃O₁₀, Arysa Argentina SA) as texturizer, binder and preservative and butyl hydroxyl toluene 0.01% w/w (Ytrio SRL, Argentina) as antioxidant.

In each elaboration three-kilogram batches of the formulation were mixed by hand until a homogenous mix was obtained (approximately 5 min) and then processed into square meat burgers (1 cm thick and 7 cm side) by using a semiautomatic plastic shaper.

Burgers were placed between plastic sheets, vacuum packed and frozen at $-18 \pm 2^{\circ}\text{C}$ until the assays.

2.2. Cooking procedure and cooking yield

Burgers were cooked according to AMSA guidelines (Belk et al., 2015) from frozen state for 13 min (to achieve an internal temperature of 71°C) in a preheated electric grill ($155 \pm 5^{\circ}\text{C}$) (George Foreman®, Spectrum Brands, USA). Internal temperature was verified using a probe-type thermocouple connected to a data acquisition system (Hewlett Packard 39470A). The thermocouple was inserted as close to the geometric centre of the burger as possible. The cooking yield of lamb meat burgers in function of salt type (table salt and SODA-LO™) and salt concentration (1, 1.5 and 2%) was studied. Cooking measurements were done over nine replicates. Per cent cooking yield was determined (Equation 1).

Cooking Yield (%) = (Cooked burger weight / Frozen uncooked burger weight) x 100

2.3. Sensory tests

2.3.1. Sensory panel selection and training sessions

Recruitment and selection of panellists were carried out and a basic tastes recognition test (ISO 8586-1:1993) was performed. The subjects who achieve 75% or more correct answers were selected (Meilgaard et al., 2007). Then they performed a ranking test for assessing differences among 4 codified samples of sodium chloride solutions based on the intensity of salty taste (ISO 8587:2006). Those subjects who ranked the samples in the correct order and those who inverted only adjacent ones were selected (Meilgaard et al., 2007). The Best Estimated Threshold (BET) for salty taste of each subject was determined. Sensory tests were carried out twice in morning sessions on consecutive days. The group BET was determined with the geometric means of the individual thresholds (ISO 3972:2009; ASTM E679-04).

The training with burgers was conducted once the subjects gained experience in the recognition of salty taste with solutions. Different concentrations of table salt were used for the elaboration of the burgers for the training sessions (Table 1). A thirteen-member trained sensory panel was calibrated in the salty taste descriptor. Assessors received lamb meat burger samples (1 x 1 cm wide) with 0, 1, 1.5, 2 and 2.5% of table salt coded like showed in Table 1. After a group discussion these samples were given scores of 0.5, 4, 6, 8 and 10 respectively on a 10 cm salty taste intensity scale. The sample with no added salt but all the other ingredients was not considered the zero on the scale since the additives provide a slight salty taste.

During training sessions an unstructured scale was used where, in first instance, each sample was localized according to its intensity in salty taste. In successive sessions, the training continued only with the control sample marked on the scale to allow subjects to calibrate in the intensity scale. The members received the other 4 samples coded with 3-digit numbers and had to score them according to the consensus score, with a variation in the scale no greater than ± 1.5 point. Water was provided for palate cleansing between samples over all sessions.

2.3.2. Sensory tests for product determination

The first step aimed to confirm that the salting power of the spherical salt in the lamb meat burgers was different to that of the table salt. Burgers with different concentrations of spherical salt were formulated and then

evaluated by the trained panel in three sessions with the control sample (table salt 1.5%) as reference marked on the 6 of the intensity scale. Spherical salt samples were formulated at 1%, 1.5% and 2.5%. The trained panel had to score them according to saltiness in the intensity scale.

Then, two types of tests were conducted: a qualitative one —paired comparison test— and a hedonic test —acceptance test—. The paired comparison tests (ISO 5495:2005) were carried out to determine which of the formulations with spherical salt could not be differentiated from the control sample, meaning that both samples had a similar saltiness. Four different lamb meat burger formulations with SODA-LO™ were prepared to do the comparisons against the control sample: 1.5%, 1.3%, 1.1% and 0.9%. Each test was replicated twice on different days to achieve the number of responses required = 26. The parameters selected for the test were: $\alpha = 0.05$, $\beta = 0.50$ and $pd = 40\%$.

A hedonic test (ISO 11136) was performed to assess the acceptability of the final formulation of lamb meat burger. Samples of hot burger of 2 x 2 cm were served in closed thermic recipients. A 9-point hedonic scale was used where 9 = like extremely and 1 = denoted dislike extremely. The acceptance testing was carried out with 112 consumers (Hough et al., 2006) between 18 to 65 years old.

2.4. Determination of sodium content

Sodium content was assessed according to AOAC 968.08 (1995) method. The analysis was performed by duplicate. The results were expressed on mg Na/100g of sample.

2.5. Centesimal composition

Water content and ash were determined by gravimetric method (Kolar, 1992). Fat was determined by the Soxhlet method, using Soxtec System HT 1043 (Tecator, Sweden) according to AOAC (1990) procedures. Total nitrogen was determined by the Kjeldahl procedure (Kjeltec, 2020 Analyzer, Foss Tecator, United Kindom) (Price et al., 1994). All tests were performed in triplicate and the results were expressed as percentage (%).

2.5.1. Fatty acid analysis

Lipid extraction followed Folch et al. method (1957) modified. An aliquot of 5 ± 0.5 g of sample was grounded with the addition of 5 ml chloroform and 10 ml of anhydrous methanol and homogenised for 3 minutes (Omni International, 17106, USA). Then, 5 ml of chloroform were added and the sample homogenised 1 minute. Then 2.5 ml of distilled water were added and the sample was homogenised 1 more minute. The mix was filtrated with vacuum and the filtrated was centrifuged to separate the phases. The superior phase (aqueous) was eliminated by aspiration and the lower phase (chloroform) was filtrated to eliminate solid impurities to obtain the chloroform crude extract. Methyl esters were prepared by trans methylation with a methylating reagent (methanol + 4% HCl). Fatty acid methyl esters were quantified by gas chromatography. The fatty acid composition was analysed by GC CP-3800 (Varian, USA), equipped with a flame ionisation detector, automatic injector and a fused silica capillary Varian WCOT column (100 m 0.25mm CP-Sil 88 for FAME $df = 0.2\mu m$). The carrier gas was ultra-pure nitrogen at a constant flow of 2.5 ml min⁻¹; the injector and the detector temperature were set at 250°C. The column temperature was 70°C, held 4 min, raised to 170°C at a rate of 8°C min⁻¹, held for 25 min, and raised to 200°C at a rate of 2.5°C min⁻¹, held 15 min, and finally raised to 220°C at a rate of 5°C min⁻¹. Fatty acids were identified by comparing the retention times of FAME with standard PUFA n°2 (Animal Source, Supelco, USA). The results were expressed in g per 100 g of total lipids.

2.6. Expressible moisture

Expressible moisture was determined following Szerman et al. (2012) method. Samples were run in triplicate.

2.7. Statistical analyses

A two-way ANOVA was used for evaluating the effect of the type of salt and the level of salt over burgers' yield. The following model was used: $X_{ijk} = \mu + T_i + \beta_j + \gamma_{ij} + \epsilon_{ijk}$ where μ is the overall mean response, T_i is the effect due to the i -th level of factor A, β_j is the effect due to the j -th level of factor B and γ_{ij} is the effect due to any interaction between the i -th level of A and the j -th level of B. A randomized complete block design was used for the training sessions. The following model was used: $Y_{ij} = \mu + T_i + \beta_j + \epsilon_{ij}$, where Y_{ij} is the dependent variable, μ is the overall mean of all experimental units, β_j is the effect of block j , T_i is the effect of the treatment and ϵ_{ij} are the random errors. Data were evaluated with a significance level $\alpha=0.05\%$. When significant differences were found, means were compared using a Tukey test. GLM procedure of InfoStat software (2015) was used for the analysis. Data from paired comparison tests were compared with tabular data according to binomial distribution.

3. Results

3.1. Panel members' selection and training

The process began with the methods of recognition of basic tastes and ranking of solutions by salty taste intensity. Thirteen out of 30 candidates recruited for selection conformed the final group and achieved the training sessions.

The group threshold for salty taste calculated as the geometric mean of the individual thresholds was 0.27 g/l of NaCl.

3.2. Product characterisation

3.2.1. Product yield

ANOVA showed significant effect of salt level at 5% level (Table 2). Salt type effect and interaction type*level showed no significant differences ($p > 0.05$). The cooking yield averages and SD were: $89.47 \pm 6.13\%$ for 2% formulations, $79.01 \pm 3.75\%$ for 1.5% formulations and 75.64 ± 2.36 for 1% formulations. As expected, samples with a level of 2% had higher cooking yield values than samples with 1.5% ($p < 0.05$) and these, higher cooking yield values than samples with 1% because of the properties of NaCl over water retention (Ruusunen & Puolanne, 2005). The cooking yield recorded in the final product was 77.07 ± 4.31 .

3.2.2. Sensory evaluation

Table 3 shows the effect that the replacement of table salt for spherical salt in lamb meat burgers had on the perception of salty taste, always offering the control sample (1.5% table salt) identified to the assessors which corresponded to a 6 on the salty perception scale according to the training sessions.

With a LSD of 0.9 no significant differences were found between control sample and that formulated with spherical salt 1% ($p > 0.05$). The samples formulated with spherical salt 1.5% and 2.5% were found to be saltier than the control sample ($p < 0.05$) which could imply a stronger salting power of the spherical salt over the table salt at the same level.

According to these results, the salt concentration interval of SODA LO™ between 1% and 1.5% was selected to analyze perceptible sensory differences in the salty taste in relation to the control sample and find out if an achievement of a sodium reduction could be possible without affecting the salty taste. Paired comparison tests were carried out between the control sample (1.5% of table salt) and four formulations of lamb meat burgers with spherical salt: 1.5, 1.3, 1.1 and 0.9% of spherical salt.

On the first paired comparison test carried out, 1.5% spherical salt burger was saltier than control burger ($p < 0.05$). On the second test, no differences were found between control sample and 1.3% spherical salt burger ($p > 0.05$) indicating these results the lack of a difference in salty taste perception between both formulations. On the third test the control sample was considered saltier than 1.1% spherical salt burger ($p < 0.05$). Due to these results, the comparison between control sample and 0.9% spherical salt formulation was not carried out.

Thus, the formulation with 1.3% of spherical salt was defined as the aim product.

3.2.3. Sodium content

Table 4 shows the results of the sodium determination of different burger formulations.

Remarkably, the sodium content of the formulation selected was 555 ± 4 mg 100g⁻¹, representing 14.75% less sodium than the control sample. It is important to highlight that the spherical salt used contains a 6% less sodium than the table salt selected (36.30 g% vs 38.53 g% respectively). This fact allows to explain the difference between the sodium content between formulations with the same level of different salts.

3.2.4. Chemical composition

Table 5 shows the proximal composition of the final burger, formulated with 1.3% spherical salt.

Although the theoretical fat content of the burger formulation was 15% (w/w), the centesimal composition showed a lower value (12.19%). This difference could be attributed to undifferentiated connective tissue mixed with the added fat on the successive elaborations.

The fatty acids profile obtained is shown in Table 5. Main fatty acids ratios and indexes are also shown.

Regarding this topic, many studies have been focused on the improvement of fatty acid composition of meat and meat products, according to human diet requirements. On this regard, the relative amounts of polyunsaturated fatty acids (PUFA) and saturated fatty acids (SFA) seem to play a key role in a healthy and balanced diet (Pighin et al., 2016). Interestingly, results obtained in the present study show a PUFA: SFA ratio above 0.4 and a n-6 : n-3 ratio under 4. Moreover, since meat and fat of ruminants are one of the few fat sources with low levels of n-6, these products also represent an option for reducing the excessive intake of this fatty acid. It is worth noting that lamb meat from extensive production is a lean meat with a low content of saturated fat and cholesterol (García, 2004). The high content of SFA found could be associated to the addition of subcutaneous fat on the formulation. The same reason was possibly the responsible of the reduction of PUFA. SFA and MUFA contents were similar to those reported by Linares et al. (2012) in lamb leg meat burgers, but PUFA content was higher. They also reported a lower n6 : n3 ratio (0.45), and lower atherogenic index (AI) and thrombogenic indexes (0.74 and 1.00 respectively). These differences could be related to the no addition of extra subcutaneous fat in their study.

3.2.5. Consumer acceptability

Figure 1 shows the results of the hedonic test carried out with the final product (1.3% spherical salt). A high level of acceptance of the final product was obtained. The proportion of positive reviews was higher than the negative ones (85.7% vs 6.3% respectively) with 8% of neutral answers (neither like nor dislike).

5. Discussion

In relation to the 13 members panel trained, the group threshold for salty taste —0.27 g/l of NaCl— was consistent with the values described by other authors. Viñas & Salvador (1998) reported a threshold of 0.21g/l achieved by the ascending method, and World Health Organization (2003) reported threshold values between 0.2 and 0.3 g/l. This result was encouraging to continue the training.

The trial in which the burgers formulated with different concentrations of spherical salt were faced against control sample hinted at the existence of a difference implying a stronger salting power of the spherical salt in relation to the table salt at least in that concentration range studied and this represented the starting point to define the working salt concentration interval —between 1% and 1.5% of spherical salt—.

Once defined the final product from the paired comparison tests developed, the sodium content determined let us confirm a reduction of 14.75% in relation to the control sample. Considering that no change in the salty perception was perceived, this point represented the most important result of our experiment. Subsequent

determinations helped us characterise the product. The burger physico-chemical assessments showed similar parameters to those described for commercial burgers. Considering the cooking yield as a key feature on meat products development, it was imperative to ensure this characteristic. In lamb meat burgers Cózar et al. (2013) and Paseto Fernandes et al. (2014) reported cooking yield values between 72% and 79.9% in formulations with 1% of table salt (w/w) and between 75% and 78% in formulations with 2%. The results obtained for 2% table salt burgers in this work were even higher than those previously mentioned and the cooking yield of the final product was 77.07 ± 4.31 , within the expected range. This difference could be related to the type of formulation, achieving an improvement in cooking yield when raw material of good quality is used (Cózar et al., 2013). The proximate analysis of the final burger showed a similarity to that described for Linares et al. (2012) for lamb burgers: moisture: 62.18%, protein: 17.23%, fat: 10.71% and ash: 1.91%. Both results are comparable to moisture (64%) and protein: (18%) content reported by Bender (1992) for lamb leg composition on a FAO report.

The consumer acceptability test carried out revealed an optimal position of the product to take into account at the time of a possible launch onto the market. This result is very valuable considering that the sensory appeal is the essential platform without which the product is unlikely to succeed (Lawless & Heymann, 2010).

Conclusions

A lamb meat burger with a sodium reduction of 14.75% and with no perceptible modifications in salty taste in relation to a control sample was developed by utilising a SODA LO™ salt microspheres. The trained sensory panel conformed for this purpose constituted the adequate manner for achieving our aim. Considering that reducing salt intake is an important public health target and that maintaining consumer acceptance of the products is a challenge, this development represents an example of the existence of possibilities for reducing the content and consequently the intake of sodium from this type of products.

7. Acknowledgements

This research was financially supported by the Scholarship Program of the National Institute of Agricultural Technology (INTA) and the meat was provided by the National Program for the Development and Sustainability of Territories. We want to thank to Tate&Lyle, to Cecilia Barreto and Dr. Darío Pighin from the Biochemistry and Nutrition Laboratory, and to Karina Moreno from Sensory and Physical Analysis Laboratory from the Food Technology Institute of the National Institute of Agricultural Technology for the technical assistance and contribution in product analysis.

Table 1 Levels of table salt used in the formulation of lamb meat burgers for training sessions

Table salt (%)	Code
0	F1
1	F2
1.5	Control sample
2	F3
2.5	F4

Table 2 Two-way ANOVA results for cooking yield. n=9

Parameter	Salt type effect		Salt level effect		Type * level effect	
	F-ratio	P-value	F-ratio	P-value	F-ratio	P-value
Cooking Yield	1.30	0.259	48.21	<0.0001	0.51	0.601

Table 3 Salty taste perception in different formulations of lamb meat burger

Parameter	Spherical salt (%)			SEM	P-value
	1	1.5	2.5		
Salty taste perception	5.2 ^c	6.9 ^b	8.1 ^a	0.26	<0.0001

Table 4 Means ± SD of sodium content of the lamb meat burgers according type and level of salt added (n =3)

Type of salt	Level (%)	Sodium content (mg 100g ⁻¹)
Table salt	1.5	651 ± 2
Spherical salt	1.5	612 ± 7
Spherical salt	1.3	555 ± 4

Table 5 Means ± SD of composition of the lamb meat burger with 1.3% spherical salt (n =3)

Parameters	
	mg%
Sodium	555 ± 4
	%
Moisture	67.61 ± 0.35
Protein	17.31 ± 0.88
Ash	1.55 ± 0.08
Fat	12.19 ± 0.19
Fatty acids	g%
SFA ^a	47.81 ± 1.03
UFA	38.79 ± 0.68
MUFA ^b	34.24 ± 0.69
PUFA ^c	4.56 ± 0.01
CLA	1.41 ± 0.19
n-3 ^d	1.59 ± 0.09
n-6 ^e	2.97 ± 0.08
n-6/n-3 ratio	1.88 ± 0.16
UFA/SFA	0.81 ± 0.12
MUFA/SFA	0.72 ± 0.01
PUFA/SFA	0.10 ± 0.01
AI ^f	0.96 ± 0.01
TI ^g	2.00 ± 0.04

a: Total saturated fatty acids, SFA (C14:0 + C16:0 + C18:0)

b: Total monounsaturated fatty acids, MUFA (C16:1 + C18:1 n-9)

c: Total polyunsaturated fatty acids

d: n-3 (C18:3 + C20:5 + C22:5 + C22:6)

e: n-6 (C18:2 + C20:3 + C20:4 + C22:4)

f: atherogenic index (4 x C14:0 + C16:0) / (MUFA + n-6 + n-3)

g: thrombogenic index (C14:0 + C16:0 + C18:0) / (0,5 . MUFA + 0,5 . n-6 + 0,5 . n-6 + 3 . n-3 + n-3/n-6)

Graphical abstract



8. References

- AOAC. (1990). *AOAC Official Methods* 960.39. Gaithersburg, MD, USA.
- AOAC. (1995). *AOAC Official Methods* 968.08Da. Arlington, VA, USA.
- ASTM. (2004). *E679-04: Standard practice for determination of odor and taste thresholds by a forced-choice ascending concentration series method of limits*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA.
- Belk, KE, Dikeman, ME, Calkins, CR, Andy King, D, Shackelford, SD, Hale, D & Laird, H. 2nd ed. *Research Guidelines for Cookery, Sensory Evaluation, and Instrumental Tenderness Measurements of Meat*. American Meat Science Association (2015)
- Bender, A. *Meat and meat products in human nutrition in developing countries*. FAO. Rome (1992)
- Cózar, A, Linares, M, Garrido, M & Vergara, H. (2013). *Physicochemical, microbiological quality and oxidative stability in spiced lamb meat burgers*, *J Microbiol Biotechnol Food Sci* 14(33): 217–222.
- De Landeta, MC, Pighín, AF, Marchesich, C, Cabrera Mildred, M & Marchini, M. (2012). *Composición centesimal y contenido de minerales en comidas rápidas: hamburguesas y salchichas de viena de primeras marcas crudas y cocidas*. *Diaeta*, 30(140): 18–24.
- Folch, J, Lees, M, & Sloane-Stanley, G. (1957). *A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues*. *Can J Biochem Phys* 37(8): 911–917.
- García, P. (2004). *Características de la carne del cordero Patagónico*. *Revista IDIA XXI. Ovinos*. 7:16-21
- González Viñas, M, & Salvador, M (1998). *Comparison of two simple methods for the measurement of detection thresholds for basic, umami and metallic tastes*. *J Sens Stud*, 13: 299–314.
- Hough, G, Wakeling, I, Mucci, A & Chambers, E (2006). *Number of consumers necessary for sensory acceptability tests*. *Food Qual Pref* 17: 522–526.
- Iglesias, DH (2013). *Análisis de la cadena de carne ovina en Argentina*. *Rev Estudios Socioeconómicos de los*

Sistemas Agroalimentarios y Agroindustriales, 11, 201.

ISO 8586-1 (1993). *Assessors for sensory analysis. Part 1: Guide to the selection, training and monitoring of selected assessors*.

ISO 5495 (2005). *Sensory Analysis. Methodology. Paired comparison test*.

ISO 8587 (2006). *Sensory Analysis. Methodology. Ranking*.

ISO 1136 (2007). *Sensory Analysis. Methods/Texture profile*.

ISO 5492 (2008). *Sensory Analysis. Vocabulary*.

ISO 3972 (2009). *Sensory Analysis. Methodology. Method of investigating sensitivity of taste*.

Kolar, K. (1992). *Gravimetric determination of moisture and ash in meat and meat products: NMKL interlaboratory study*. *J AOAC Int* 75(6):1016–1022.

Lawless, H, & Heymann, H. *Sensory evaluation of food: principles and practices*. 2nd ed. New York. Springer-Verlag (2010).

Linares, MB, Cózar, A, Garrido, MD, & Vergara, H (2012). *Chemical and sensory quality of lamb meat burgers from Manchego Spanish breed*. *Int. J. Food Sci. Nutr* 63(7): 843–852.

McGuire, S. (2010). *Strategies to Reduce Sodium Intake in the United States*. *Adv Nutr* 1:49–50.

Meilgaard, M, Civille, GV, & Carr, BT. (2007). *Sensory evaluation techniques*. 4th ed. Boca Raton-FL. CRC Press (2007).

Moré, MR, Mc Cormick, M, Gambetta, R & Nieto, DA (2000). *Posición de la carne ovina en el consumo general de cárneos*. *Cuadernos Del Ceagro* 2:27–42.

OECD. *Meat consumption (indicator)*. (2017). doi: 10.1787/fa290fd0

Accessed on 23 February 2017.

Organización Mundial de la Salud. (2003). *Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas (Vol. 916)*. Diamond Pocket Books (P) Ltd.

Paseto Fernandes, RP, Trindade, MA, Tonin, FG, Pugine, SMP, Hirano, M. H., Lorenzo Rodríguez, JM et al (2014). *Physicochemical parameters and sensory properties of lamb burger manufactured with different concentrations of oregano extract*. In: *60th International Congress of Meat Science and Technology*. Punta Del Este, Uruguay 17-22 August 2014.

Pighin, D, Pazos, A, Chamorro, V, Paschetta, F, Cunzolo, SA, Godoy et al (2016). *A Contribution of Beef to Human Health: A Review of the Role of the Animal Production Systems*. *Sci World J* 2016, 1–10.

Price, C, Webb, N, Smith, W & Marks, H. (1994). *Comparison of mercury and copper based catalysts in the Kjeldahl determination of nitrogen in meat and meat products: Collaborative study*. *AOAC Int* 77(6): 1542–1556.

Ruusunen, M & Puolanne, E (2005). *Reducing sodium intake from meat products*. *Meat Sci* 70(3): 531–541.

Sarıçoban, C, Yılmaz, MT, & Karakaya, M. (2009). *Response surface methodology study on the optimisation of effects of fat, wheat bran and salt on chemical, textural and sensory properties of patties*. *Meat Sci* 83(4): 610–619.

Szerman, N, Gonzalez, CB, Sancho, AM, Grigioni, G, Carduza, F & Vaudagna, SR (2012). *Effect of the addition of conventional additives and whey proteins concentrates on technological parameters, physicochemical properties, microstructure and sensory attributes of sous vide cooked beef muscles*. *Meat Sci* 90(3): 701–710.

Tobin, BD, O'Sullivan, MG, Hamill, RM & Kerry, JP (2012). *Effect of varying salt and fat levels on the sensory quality of beef patties*. *Meat Sci*, 91(4): 460–465.

World Health Organization. (2003). *Chloride in Drinking-water Background document for development WHO Guidelines for Drinking-water Quality*. Geneva.

World Health Organization. (2012). *Guideline Sodium intake for adults and children Sodium intake for adults and children*. Geneva.