

## Aplicación de métodos térmicos controlados para el desarrollo de compuestos bioactivos en galletitas: estudio *in vivo*\*

Mariela Patrignani<sup>a,b</sup>, Gustavo Juan Rinaldi<sup>b</sup>, Paula A. Conforti<sup>a,c</sup>, Cecilia Elena Lupano<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> *Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), Facultad de Ciencias Exactas, UNLP - CCT La Plata - CONICET, 47 y 116, 1900 La Plata, Argentina.*

<sup>b</sup> *Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata, La Plata, Argentina*

<sup>c</sup> *Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, 60 y 116, 1900 La Plata, Argentina*

Contacto: mariela\_patrignani@hotmail.com; marielapatrignani@biol.unlp.edu.ar

### Resumen

Las galletitas son uno de los alimentos más consumidos en Argentina, aunque muchas veces están asociados a una dieta no saludable. Sin embargo, es posible adaptar sus condiciones de procesamiento de modo tal de obtener un producto final de mejor calidad nutricional y con un alto contenido de compuestos bioactivos, como los productos de reacción de Maillard (melanoidinas). La reacción de Maillard tiene lugar durante la cocción y ha atraído la atención en los últimos años debido a sus efectos sobre la salud. Se ha reportado la posible actividad benéfica de las melanoidinas en sistemas modelo, pero sus efectos *in vivo* aún no han sido estudiados.

En el presente trabajo, la actividad antioxidante, el efecto antihipertensivo y la actividad prebiótica de las melanoidinas en galletitas se evaluó utilizando animales de laboratorio. En total se utilizaron 4 grupos de ratas Wistar alimentados con las siguientes dietas durante 6 semanas: control (dieta AIN-93); Dieta Asc (dieta AIN-93+ácido ascórbico); dieta GAT (con una alta concentración de melanoidinas) y dieta GBT (con baja cantidad de melanoidinas).

Se encontró que el consumo de una dieta con alto contenido de melanoidinas de galletitas incrementa el poder antioxidante en suero a la vez que disminuye su nivel de oxidación lipídica. Además, estos compuestos actuarían como fibra dietaria antioxidante, tienen un efecto antihipertensivo, y no disminuyen la absorción de minerales.

Estos resultados son sumamente favorables y podrían ser utilizados en la producción de alimentos farináceos a fin de reducir la incidencia de enfermedades no trasmisibles en nuestra población

\* Estos estudios forman parte de la tesis doctoral de la Dra. Patrignani titulada "Desarrollo de galletitas más saludables: alternativas para incrementar su contenido de antioxidantes" y han sido publicados en la revista "Food Chemistry" (DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.09.038)

## Introducción y objetivos

Hoy en día existe una demanda creciente de productos saludables en la industria alimentaria. Cada vez hay más consumidores interesados en mejorar su estado de salud a partir de la alimentación, y un alimento con propiedades antioxidantes, con prebióticos o probióticos incrementa su valor agregado. En particular, en los últimos años, se ha prestado especial atención a los alimentos con un alto contenido de antioxidantes ya que los mismos bloquean los efectos de las especies reactivas del oxígeno que pueden conducir a la destrucción de células y daño al ADN (Langner y Rzeski, 2014). Aunque actualmente se utilizan diferentes antioxidantes en la industria alimentaria, el consumidor en ocasiones cuestiona su seguridad (Rufián-Henares y Morales, 2007<sup>a</sup>). Sin embargo, es posible que los compuestos con poder de captar radicales libres se desarrollen naturalmente durante la cocción debido al pardeamiento no enzimático o reacción de Maillard. Actualmente este proceso es un tema de gran interés no sólo en la industria alimentaria sino también en medicina ya que puede tener consecuencias favorables a nivel nutricional y biológico (Delgado-Andrade y col., 2010).

La reacción de Maillard se produce entre los grupos amino de los aminoácidos y los grupos carbonilo, principalmente de los azúcares. Los productos formados mediante este mecanismo es un grupo heterogéneo el cual incluye compuestos de bajo peso molecular (que contribuyen al aroma del producto final) así como productos poliméricos de alto peso molecular (asociados al color y textura de los alimentos) (Wang y col., 2011). En particular, las melanoidinas, formadas en las etapas finales de la reacción de Maillard, han atraído la atención en los últimos años debido a sus efectos sobre la salud. Numerosas investigaciones han reportado la posible actividad antioxidante, antihipertensiva, prebiótica y antimicrobiana que estos compuestos exhiben en sistemas modelo (Borrelli y Fogliano 2005; Kitryté y col., 2012; Rufián-Henares y Morales, 2007<sup>a</sup>). Además, algunos trabajos han evaluado estos efectos en sistemas reales como productos de panadería y café con excelentes resultados: Por ejemplo, Martín y col. (2009) describieron la capacidad de las melanoidinas para proteger las células humanas Hep G2 contra el daño de los radicales libres. Por otro lado, los resultados obtenidos por Monente y col. (2015) indicaron que un alto contenido de melanoidinas de café podría inhibir el crecimiento de bacterias Gram-negativas. Sin embargo, el efecto de estos compuestos mediante ensayos *in vivo* aún no ha sido estudiado.

Es por esto que el objetivo del presente trabajo fue comprobar los efectos fisiológicos de los compuestos de Maillard, como el aumento de la capacidad antioxidante en plasma, la disminución del estrés oxidativo, así como los efectos prebióticos y antihipertensivos, en un ensayo *in vivo* con animales de laboratorio. Nuestros resultados muestran que es posible incrementar el aporte de compuestos bioactivos en nuestra dieta mediante la aplicación de tratamientos térmicos adecuados en los productos de panadería. Esto tendría múltiples efectos beneficiosos en la salud, entre los que se incluyen la prevención o disminución de la incidencia de enfermedades no transmisibles de nuestra población.

## Materiales y métodos

### *Ingredientes*

Harina de trigo (Favorita 000, Molinos Río de la Plata, Buenos Aires, Argentina), almidón de maíz (Maizena, Unilever de Argentina S.A., Buenos Aires), leche en polvo descremada (SanCor, Sunchales, Santa Fe, Argentina), aceite de girasol alto

oleico (Propia, Lezama, Buenos Aires, Argentina), sacarosa (Ledesma, Jujuy, Argentina) y polvo para hornear (Royal, Kraft Foods, Argentina).

### *Preparación y análisis de las galletitas*

Para preparar las galletitas se utilizó la siguiente formulación: 70 g de harina de trigo; 60 g de almidón de maíz; 20 g de leche en polvo descremada; 25 g de azúcar; 1,3 g de polvo para hornear; 20 g de aceite y 36,5 g de agua potable. Los ingredientes secos se colocaron en el recipiente de una batidora Philips Cucina (Sao Pablo, Brasil). El aceite se agregó en tres fracciones, mezclando 1 min a velocidad 1 (711 rpm) después de cada agregado. Luego se incorporó el agua en dos fracciones mezclando 2 min a velocidad 2 (754 rpm) y finalmente se mezcló por 1 min más a velocidad 1. Luego la masa se colocó en una bolsa de polipropileno para evitar la desecación y se la dejó reposar a temperatura ambiente por 15 min.

La masa obtenida se estiró con un rodillo de cocina hasta obtener un espesor de 0,3 cm y se las dejó reposar por 15 min más. Finalmente se cortó la masa en rectángulos (3,3 x 5,2 cm) que fueron colocados sobre planchas de silicona. Se hornearon las masas en horno eléctrico (F9M, Ariston, Fabriano, Italia) 100 °C durante 80 min, o a 150 °C por 30 min. En total se prepararon 5,2 Kg de galletitas, que fueron molidas utilizando una Philips Cucina mixer (HR 7633, Sao Paulo, Brasil). Una vez homogenizadas, se determinó el contenido de lípidos, proteínas, minerales, humedad y fibra mediante los métodos estandarizados de la AACC (1983).

- **Determinación del contenido de calcio, zinc y sodio en galletitas**

Las cenizas obtenidas luego de la mineralización en mufla a 550 °C se disolvieron en ácido y se llevaron a volumen. Se determinó el contenido de minerales utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin Elmer AAnalyst 400, Estados Unidos), con llama de aire-acetileno, ventana de 0,5 mm y longitud de onda de 422,7 nm para el calcio y de 213,9 nm para el zinc. En la solución de lectura se agregó cloruro de lantano, para evitar la interferencia del fósforo en la determinación del calcio (Perkin-Elmer, 1996). El contenido de sodio se determinó por espectrofotometría de emisión atómica (longitud de onda 589,1 nm). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

- **Análisis de melanoidinas en galletitas**

Los compuestos de Maillard presentes en las galletitas se aislaron mediante una hidrólisis enzimática seguida de ultrafiltración tal como describe Martin y col. (2009). Se trató 1 g de galletita enzimáticamente con 30 ml de una solución de Pronasa E (Protease de *Streptomyces griseus*, SIGMA) (0,375 mg/mL) preparada en borato de sodio (0,1 M, pH=8,2). Las muestras se incubaron con la enzima durante 42 hs a 37 °C con agitación continua (Delgado Andrade y col., 2006). Finalizado el tiempo de incubación, las muestras fueron colocadas en hielo y centrifugadas a 4500 × g por 10 min (centrífuga Sigma 2-16 PK Sartorius, Osterode, Alemania). La fracción soluble obtenida fue luego ultrafiltrada utilizando una membrana de polietilsulfona (5000 MW cut off) (Sartorius stedium, Goettingen, Alemania).

Una vez finalizada la ultrafiltración, los compuestos de peso molecular superior a los 5 KDa que no atravesaron el filtro se liofilizaron para su posterior análisis a partir de sus espectros de absorción UV-Vis. Se considera que la absorbancia a 294 nm es un indicador de la presencia de compuestos de Maillard intermedios, mientras que los compuestos finales pueden ser detectados a 420 nm (Yu y col., 2012).

## Diseño de las dietas

Las dietas fueron preparadas en la Cátedra de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (Universidad de Buenos Aires) de acuerdo a los lineamientos de la American Institute of Nutrition Rodent Diets (AIN) (Revers, 1993). Para la confección de las dietas se consideró la composición de las galletitas, y se agregó el resto de los nutrientes (proteínas, hidratos de carbono, minerales, etc.) de manera que todas las dietas fueran isocalóricas ( $372 \pm 8$  kcal/100 g) e isoproteicas.

Se prepararon 3 dietas distintas para alimentar a los 4 grupos de ratas (dos de los grupos consumieron la misma dieta):

- Dieta Control: dieta básica AIN-93.
- Dieta GAT: dieta básica parcialmente reemplazada con galletitas horneadas a alta temperatura (150 °C) (39,1 g de galletita en peso seco por cada 100 g de dieta).
- Dieta GBT: dieta básica parcialmente reemplazada con galletitas horneadas a baja temperatura (100 °C) (39,1 g de galletita en peso seco por cada 100 g de dieta).

La composición de cada una de las dietas se detalla en la Tabla 1. La mezcla mineral que se menciona contenía calcio, fósforo, magnesio, potasio, sodio, cloro, azufre, hierro, zinc, manganeso, cobre, yodo, molibdeno, selenio, cromo, flúor, níquel, silicio, boro, litio y vanadio (Revers, 1993).

Para las dietas parcialmente reemplazadas con galletitas, se ajustó el contenido de Zn, Na y Ca, considerando el contenido de cada uno de estos minerales en las galletitas, para asegurar un aporte idéntico de estos minerales en todas las dietas.

La mezcla vitamínica incorporada a las dietas contenía ácido nicotínico, ácido pantoténico, piridoxina, tiamina, riboflavina, ácido fólico, biotina, y vitaminas B12, K, A, E y D. La dextrina fue adicionada como carbohidrato hasta completar el kilo de dieta.

**Tabla 1.** Composición de las dietas

Composición (g/Kg de dieta)	Dieta		
	Control	GAT	GBT
Caseína (85%proteína)	140	87	87
Mezcla mineral	35	35	35
Mezcla vitamínica	10	10	10
L-Cistina	1,8	1,8	1,8
Aceite de soja	40	7,8	7,8
Colina (ml)	7,1	7,1	7,1
Fibra	50	40,9	40,9
Galletita (g secos)	----	391	391

Una vez preparadas las dietas fueron conservadas a 4°C hasta su uso.

## Animales, mantenimiento y diseño experimental

Para evaluar el efecto de los compuestos de Maillard *in vivo* se utilizaron 24 ratas Wistar machos de 8 semanas de edad (250-300 g de peso corporal) obtenidas en el Centro Atómico Ezeiza (Buenos Aires, Argentina).

Antes de iniciar el período experimental, los animales fueron aclimatados durante una semana a las condiciones del bioterio ( $23 \pm 5^\circ\text{C}$ ; ciclos luz-oscuridad de 12 horas y en jaulas galvanizadas con piso de malla). Una vez finalizado el período de adaptación, se pesaron los animales y se les midió la presión arterial para poder separarlos en 4 grupos experimentales homogéneos de 6 ratas cada uno: grupo G-CO y grupo G-ASC (alimentados con la dieta control), grupo G-GAT (alimentado con dieta GAT); G-GBT (alimentado con dieta GBT). Todos los animales tenían libre acceso al alimento y al agua de bebida. Al grupo G-ASC se le administró como antioxidante ácido ascórbico (300 mg/Kg.día) en el agua de bebida (Sönmez y col., 2005).

El consumo de la dieta se fue monitoreando diariamente, por diferencia de peso del comedero. El aumento peso de los animales se midió una vez por semana durante las seis semanas que duró la experiencia. A partir del aumento de peso total de los animales (g) y del alimento total consumido a lo largo de todo el ensayo (expresado en g secos) se determinó la eficiencia del alimento (Delgado-Andrade y col., 2013):

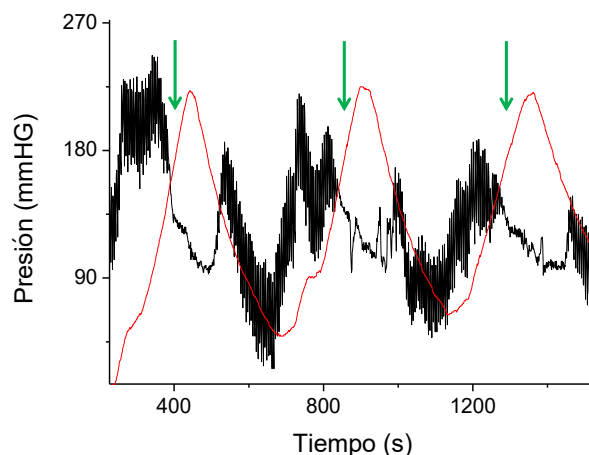
$$\text{Eficiencia Alimentaria} = \frac{\text{Aumento de peso (g)}}{\text{Alimento consumido (g secos)}} \quad \text{Ec. 1}$$

- Medida de la presión arterial

Durante la primera, segunda, cuarta y sexta semana se midió la presión arterial de los animales por el método indirecto considerando la presión arterial como la presión que se debe ejercer desde afuera del vaso para ocluirlo (Fritz y Rinaldi, 2008).

Para una óptima visualización del pulso primero se colocó a la rata 10 min en una incubadora a  $40^\circ\text{C}$  para dilatar la arteria de la cola sobre la que se mediría el pulso. Para esto el animal se ubicó dentro de una incubadora con control de temperatura.

El pulso del animal se registró utilizando un transductor de pulso; la señal era ampliada y registrada en la computadora mediante un sistema de adquisición de datos. Paralelamente, se midió la presión ejercida sobre la cola (que también fue ampliada) y ambas señales fueron digitalizadas en un único gráfico tal como se puede ver en la Figura 1. La presión arterial se determinó gráficamente como la presión que se debe ejercer sobre la cola cuando el pulso desaparece.



**Figura 1.** Registro on-line del pulso (líneas negras) y de la presión del manguito (línea roja). Las flechas verdes indican el momento en el que la señal del pulso se detiene.

Los valores de presión para cada animal se obtuvieron promediando al menos tres mediciones exitosas (sin perturbación) de la señal. Se consideró la medida de la presión obtenida durante el inflado del manguito ya que ésta coincide mejor con el valor arterial intrasistólico real.

- **Microbiota de homogenatos fecales**

Para evaluar el efecto prebiótico de los compuestos de la reacción de Maillard se evaluó la microbiota fecal de los animales al inicio (semana 1) y al final de la experiencia (semana 6). Para esto se recogió la materia fecal fresca de los animales y se homogeneizó una cantidad perfectamente medida (1,000 g) en 10 ml agua peptona (0,1 g/L) estéril. Luego se realizaron diluciones seriadas y se realizó una siembra en superficie para el recuento de microorganismos viables en dos medios distintos.

Para el recuento de mesófilos aerobios totales se utilizó agar PCA (plate count agar) que es un medio no selectivo (ANMAT, 2014). El mismo contiene extracto de levadura (2,5 g/L), tripteína (5 g/L) glucosa (1 g/L) y agar (15 g/L). Se sembró 1 ml de la dilución correspondiente sobre el medio; la alícuota se extendió utilizando perlas de vidrio estériles. Las placas fueron incubadas en condiciones aeróbicas durante 48 horas a 37°C.

De forma similar se sembraron alícuotas en agar MRS con cisteína. Este medio se utiliza para la cuantificación de bacterias ácido lácticas y ha sido utilizado para la detección de las mismas en materia fecal (Jiménez-Escrig y col., 2013). El agar MRS contiene proteosa peptona (10 g/L), extracto de carne (10 g/L), extracto de levadura (5 g/L) y glucosa (20 g/L), que constituyen la fuente nutritiva, ya que aportan nitrógeno, carbono, vitaminas y minerales. También contiene monoleato de sorbitán, y sales de sodio, magnesio y manganeso que proveen cofactores para el crecimiento bacteriano y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos. Contiene además citrato de amonio (2 g/L) que actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram negativas. Una vez sembradas las muestras se incubaron anaeróbicamente a 37 °C por 48 hs.

Finalizado el tiempo de incubación, el recuento de colonias se realizó en las placas de Petri que tenían entre 20 y 200 unidades formadoras de colonias (UFC). Los resultados se expresaron como log UFC por gramo de peso seco de materia fecal. Cada determinación se realizó por duplicado sobre dos pools diferentes de heces de rata.

Las bacterias lácticas son microorganismos no esporulados, gram positivos y carecen de catalasa. Considerando esto, se procedió a una confirmación preliminar de la presencia de estas bacterias en las colonias crecidas en agar MRS mediante la tinción de Gram y el ensayo de la catalasa.

- **Absorción aparente de minerales**

Durante la última semana se determinó el consumo de alimento y se recogieron las heces de los animales para calcular el porcentaje de absorción de minerales.

Las dietas y heces se calcinaron en mufla a 500 °C hasta peso constante. La absorción aparente de minerales se determinó considerando los minerales consumidos ( $minerales_c$ ) y los minerales excretados ( $minerales_e$ ) utilizando la siguiente ecuación (Jiménez-Escrig y col., 2013):

$$Absorción\ aparente\ de\ minerales\ (\%) = 100 \frac{minerales_c(g) - minerales_e(g)}{minerales_c(g)} \quad Ec. 2$$

Las cenizas obtenidas se disolvieron en ácido nítrico y se utilizaron para determinar la concentración de zinc mediante la técnica descrita anteriormente para la cuantificación de minerales en dietas.

La absorción aparente de zinc se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación, donde  $zinc_c$  indica el contenido de zinc consumido (g) y  $zinc_e$  indica el valor de zinc excretado (g):

$$\text{Absorción aparente de zinc (\%)} = 100 \frac{zinc_c (g) - zinc_e (g)}{zinc_c (g)} \quad \text{Ec. 3}$$

### *Sacrificio de las ratas*

Al final del período experimental, las ratas fueron anestesiadas con diazepam (0,05 mg/Kg de peso corporal) y pentobarbital (25 mg/Kg de peso corporal). A continuación, los animales se sacrificaron por desangrado desde la aorta abdominal. Las muestras de sangre se recogieron en tubos y se separó el suero mediante centrifugación a baja velocidad (1000 x g, 10 min). Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80°C hasta su análisis.

- Poder antioxidante en el suero

El poder antioxidante en el suero se determinó mediante dos técnicas distintas: ABTS y FRAP (Jimenez-Escrig y col., 2003). En el caso de la actividad antioxidante cuantificada por el método de ABTS, para diluir el reactivo se utilizó buffer fosfato (5 mM) pH 7,4. Para la expresión de los resultados se realizó una curva de calibración con Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, un análogo de la vitamina E) y los resultados se expresaron como  $\mu$ moles equivalentes de TROLOX/mL.

- Determinación de compuestos reactivos al TBA

Para determinar la extensión de la oxidación lipídica sobre las muestras de plasma se utilizaron tubos de vidrio de 10 mL en los que se colocaron 200  $\mu$ L de suero, 10  $\mu$ L de butilhidroxitolueno (BHT) (2,2 g/L), 10  $\mu$ L de FeCl<sub>3</sub> (2,7 g/L) (se utiliza como catalizador de la reacción), 1 mL de buffer HCl-Glicina (pH 3,5) y 1 mL de solución recién preparada de ácido tiobarbitúrico (TBA) (5 g/L en SDS 0,3 %). Las muestras se llevaron a 5 °C durante 30 min y luego se calentaron a 95 °C durante 60 min para el desarrollo del color, tapando los tubos con bolitas de vidrio. Finalizado el tiempo de reacción los tubos se llevaron a un baño de hielo durante 10 min para enfriarlos. Se tomó una alícuota de 0,5 ml de la mezcla de reacción y se colocó en un eppendorf conteniendo 400  $\mu$ L de butanol. Las muestras se agitaron a 1600 rpm por 30 s y luego se centrifugaron a 4000 x g por 5 min. Se recogió la capa superior de butanol en un tubo limpio y se midió la absorbancia a 532 nm. Paralelamente se realizaron blancos reemplazando el suero por 200  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O destilada (Estepa y col., 2009).

La curva de calibración se realizó con una solución de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) (83,5  $\mu$ mol/L). Este patrón se hidroliza fácilmente en las condiciones de reacción liberando malonaldehído (MDA) en relación equimolar (Sinnhuber y col., 1958). Los resultados se expresaron como nmol MDA/ mL de suero.

## Análisis estadístico

Para evaluar el efecto de los distintos factores se realizó un análisis de varianza (ANAVA) monofactorial. Para comparar entre medias se utilizó el test de “mínimas diferencias significativas” (LSD). En todos los casos, el nivel de significación elegido fue del 95 %. Estos análisis se realizaron mediante el software estadístico InfoStat, 2012 (Córdoba, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

Para evaluar la relación entre las variables se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson (Delgado-Andrade y col., 2013). Este coeficiente es una medida de la magnitud de la asociación lineal entre dos variables y no depende de las unidades de medida de las variables originales. Asume valores en el intervalo [-1;1] y el signo indica la dirección de la asociación. El coeficiente de Pearson representa la covarianza de los valores muestrales estandarizados. Para las variables j-ésima y k-ésima se define como

$$r_{jk} = \frac{S_{jk}}{\sqrt{S_j^2 S_k^2}} \quad \text{Ec. 4}$$

Donde  $S_{jk}$  es la covarianza entre la variable j y la variable k;  $S_j^2$  y  $S_k^2$  son las varianzas de las variables j y k respectivamente.

## Resultados y discusión

### *Composición de las galletitas y caracterización de las melanoidinas*

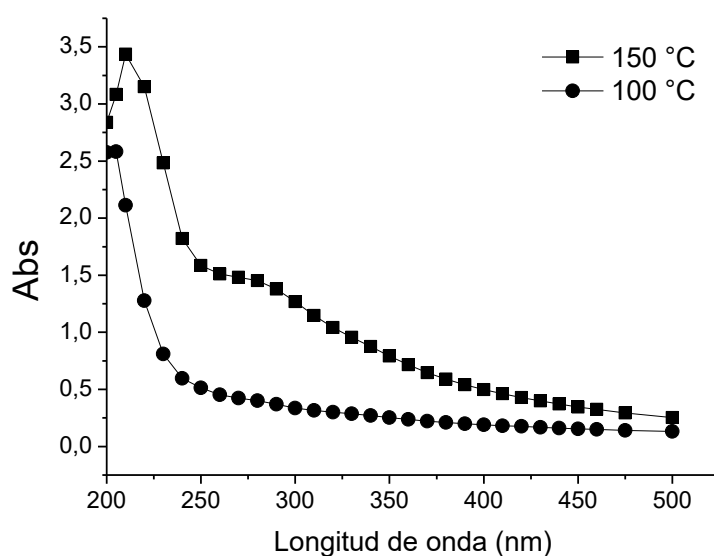
La composición final de las galletitas se determinó con métodos estandarizados de análisis. Las formulaciones contenían 77,8 g de carbohidratos (14,5 % provenientes de la lactosa de la leche; 67,6 % del almidón de la harina, el polvo de hornear y el almidón de maíz, y el 18,1 % restante provenía de la sacarosa utilizada); 11,5 g de proteínas (70 % proteínas de la leche en polvo descremada y 30 % proteínas de la harina); 2,3 g de fibra dietaria; 1,72 mg de zinc; 351,7 mg de calcio y 213,4 mg de sodio por cada 100 g de galletitas en base seca. Tanto en las galletitas horneadas a baja temperatura como en las horneadas a alta temperatura el contenido de humedad fue menor al 10 % (el CAA en su cap. IX, art. 747 establece un límite máximo de 12% de humedad para galletitas sin el agregado de conservantes) (CAA, 2012).

Para corroborar la presencia de compuestos de Maillard en las galletitas incorporadas a las dietas, los mismos fueron aislados y se realizaron análisis de caracterización (espectro de absorbancia UV/VIS). En productos ricos en proteínas como las galletas o el pan, el tratamiento térmico da lugar a la formación de estructuras complejas de melanoidinas, conocidas como melanoproteínas. Estas estructuras son el resultado del entrecruzamiento de las proteínas en los productos panificados y generan una red de alto peso molecular e insoluble (Pastoriza y Rufián Henares, 2014). Para liberar a las melanoidinas de esta estructura se realizó una hidrólisis con pronasa E. Una vez finalizada la hidrólisis, las melanoidinas de alto peso molecular deben ser aisladas mediante un proceso de ultrafiltración seguido de liofilización; sin embargo, por la complejidad de las reacciones de Maillard, no existe



un método estandarizado para su aislamiento. En productos alimenticios se han utilizado distintos métodos para su purificación, que incluyen membranas con tamaño de corte entre 5 (Pastoriza y Rufián Henares 2014) y 10 KDa (Borrelli y col., 2003). En el presente trabajo se seleccionó un tamaño de corte de 5 KDa por haber demostrado tener buenos resultados en la extracción de melanoidinas en cereales de desayuno, galletas y corteza de pan (Pastoriza y Rufián Henares, 2014; Roncero-Ramos y col., 2012).

Los compuestos de alto peso molecular (> 5 KDa) retenidos fueron solubilizados y se analizó su espectro de absorción UV/VIS (400-750 nm). La absorbancia a 294 nm se relaciona habitualmente con la presencia de compuestos intermedios de la reacción de Maillard, mientras que la presencia de compuestos finales es monitoreada mediante la medida de la absorbancia a 420 nm (Vhangani y Van Wyk, 2013). En la Figura 2 se pueden observar los espectros de absorción encontrados para las melanoidinas aisladas de las galletitas horneadas a baja temperatura (100°C por 80 min, utilizada para preparar la dieta GBT) y a alta temperatura (horneada 150°C por 30 min, esta galletita fue utilizada para la dieta GAT).



**Figura 2.** Espectro de absorción de melanoidinas aisladas de galletitas horneadas a 150°C por 30 min y 100°C por 80 min.

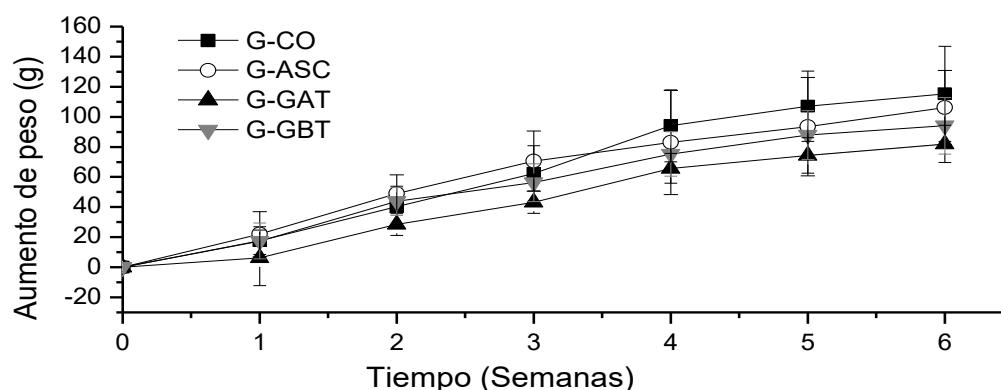
Se puede ver que las galletitas horneadas a 150°C presentan un contenido mayor de compuestos primarios y secundarios de la reacción de Maillard que las galletitas horneadas a 100°C. En ambos casos se puede observar igualmente una importante absorción en el UV lejano (230 nm) que probablemente corresponda al enlace peptídico, remanente de la hidrólisis de las proteínas. Pastoriza y Rufián Henares (2014) aislaron melanoidinas de galletitas, de forma similar a la utilizada en el presente trabajo. Estos autores encontraron que las melanoidinas presentaban aproximadamente un 50 % de estructura proteica en su estructura y un 40 % de carbohidratos.

Se pudo concluir que la dieta GAT, en la que se incorporaron las galletitas horneadas a alta temperatura (150 °C), contenía mayores cantidades de productos de reacción de Maillard (tantos primarios como secundarios), mientras que la dieta GBT preparada con galletitas horneadas a baja temperatura (100°C) tenía un contenido bajo de compuestos de Maillard. La dieta GBT podía ser utilizada

entonces para descartar un posible efecto de los ingredientes de las galletitas en el presente ensayo *in vivo*.

### *Peso de los animales, consumo de alimento y eficiencia alimentaria*

Tal como se puede ver en la Figura 3 los animales aumentaron de peso hasta alcanzar su peso final en las últimas dos semanas de ensayo.

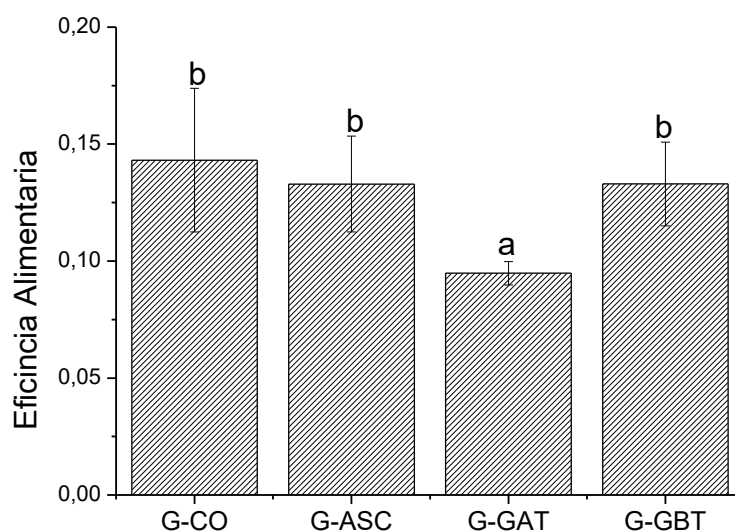


**Figura 3.** Aumento de peso de ratas que consumieron distintas dietas experimentales durante 6 semanas (grupos G-CO, G-AS, G-GAT, G-GBT). Las barras verticales indican las desviaciones estándar.

Durante la experiencia se encontraron diferencias significativas en el incremento de peso de los animales, siendo el grupo alimentado con la dieta GAT el que aumentó menos de peso a lo largo de la experiencia. Finalizadas las 6 semanas de ensayo las ratas de este grupo obtuvieron un peso corporal ( $383,1 \pm 14,1$  g) significativamente menor ( $P \leq 0,05$ ) al de los otros grupos ( $407,6 \pm 19,0$ ;  $410,6 \pm 12,7$  y  $427,4 \pm 17,3$  g para los grupos G-CO, G-ASC y G-GBT, respectivamente). Durante la semana 5 y 6 no se observaron diferencias significativas en el peso de los animales ( $P > 0,05$ ).

Delgado Andrade y col. (2013) estudiaron el aumento de peso en ratas alimentadas con compuestos de Maillard de alto peso molecular obtenidos a partir de la corteza del pan. Sus estudios indicaron que aquellos animales que habían consumido una dieta rica en estos productos presentaban un menor peso que los animales que consumían la dieta control. En este estudio los autores sugirieron que la diferencia se debía a que los animales consumían más la dieta control que la dieta rica en compuestos de Maillard. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que, a pesar de que las ratas alimentadas con la dieta control presentaban un mayor consumo de alimento que las alimentadas con las dietas GAT y GBT (datos no mostrados,  $P \leq 0,05$ ), no se encontró una buena correlación entre el consumo de dieta y el aumento de peso ( $r = 0,14$ ).

Por otro lado, sí se encontró una excelente correlación entre la eficiencia alimentaria y el aumento de peso ( $r = 0,98$ ). Tal como se puede ver en la Figura 4, el grupo G-GAT presentó la menor eficiencia alimentaria ( $P \leq 0,05$ ), mientras que no se encontraron diferencias significativas entre los otros grupos ( $P > 0,05$ ).



**Figura 4.** Eficiencia alimentaria en animales que consumieron las distintas dietas experimentales durante 6 semanas (grupo G-CO; G-ASC; G-GAT, G-GBT). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas en sus medias ( $P > 0,05$ ).

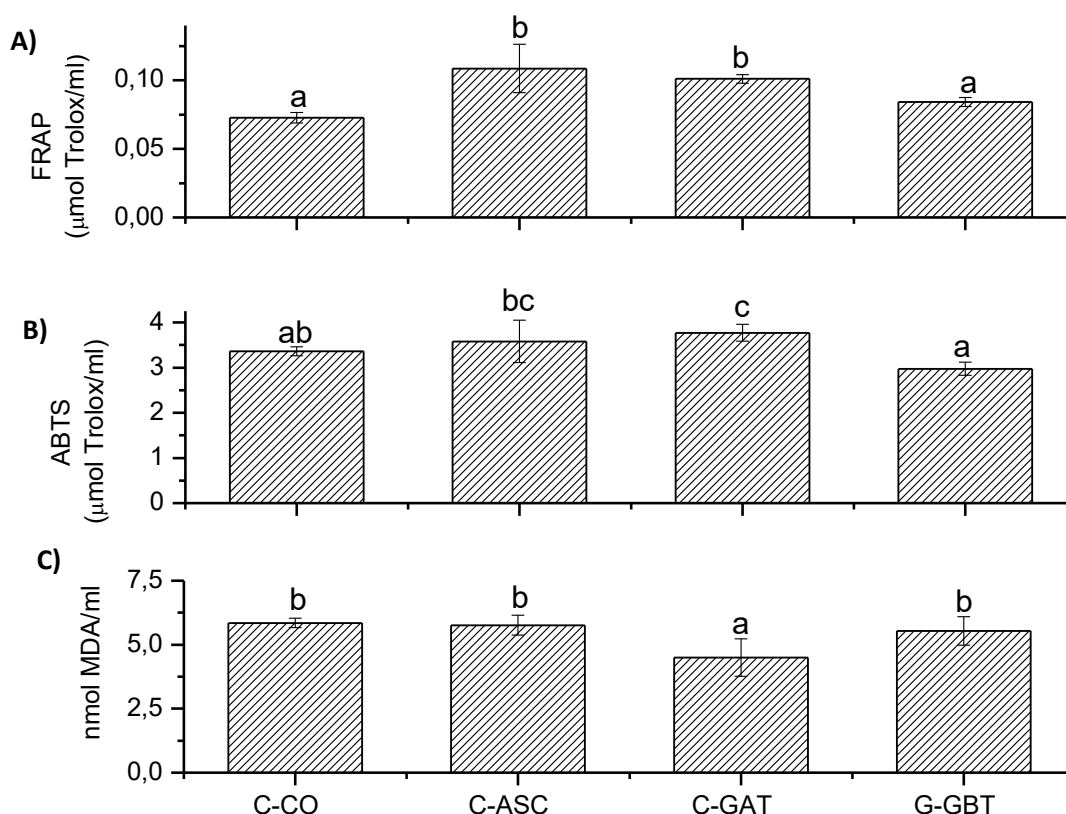
Esto podría explicarse considerando que durante la reacción de Maillard la calidad de las proteínas disminuye por la condensación de los grupos  $\epsilon$ -amino de la lisina con el grupo carbonilo de los carbohidratos. Este proceso puede disminuir la cantidad de lisina disponible (un aminoácido esencial). Además, durante un tratamiento térmico más pronunciado, el entrecruzamiento entre proteínas generaría una mayor proporción de proteína insoluble y menos susceptible a la acción de las enzimas del tracto gastrointestinal, por lo que la digestión de las proteínas disminuiría (Oste y Sjödin, 1984). Podría inferirse entonces que la mayor temperatura utilizada durante la cocción de las galletitas horneadas a 150 °C disminuye la eficiencia alimentaria de las dietas al disminuir y la digestibilidad de las proteínas, generando una reducción significativa en el peso de los animales.

#### *Actividad antioxidante y oxidación lipídica en suero*

El ácido ascórbico es un conocido antioxidante soluble en agua, y su capacidad de prevenir el daño oxidativo en ensayos *in vivo* ya ha sido demostrada (Sönmez y col., 2005). Por esto se utilizó al grupo G-ASC como un control positivo de antioxidantes. Los animales del grupo G-GAT consumieron entonces una dieta rica en antioxidantes con poder de captar radicales libres (como radical hidroxilo, superóxido y peróxido) (Langner y Rzeski, 2014).

El poder antioxidante en suero se determinó con las dos técnicas más utilizadas para este tipo de muestra biológica: FRAP y ABTS. El nivel de oxidación lipídica y el contenido de antioxidantes en suero se pueden observar en la Figura 5. Como era esperado, el contenido de antioxidantes medido mediante el ensayo de FRAP en el suero de las ratas pertenecientes al grupo G-GAT y G-ASC fue significativamente superior al del resto de los grupos. Por otro lado, el contenido de antioxidantes evaluado con la técnica de ABTS siguió la misma tendencia, aunque se observaron algunas mínimas diferencias: el contenido de antioxidantes en el suero de los animales pertenecientes al grupo control (G-CO) y el grupo G-ASC no se diferenciaron significativamente ( $P > 0,05$ ). Sin embargo, los animales del grupo

G-GAT sí presentaron una actividad antioxidante en el suero superior al grupo G-CO ( $P \leq 0,05$ ). Esto indicaría que al menos una parte de los productos de Maillard liberados durante el proceso de digestión pudo ser absorbida en el intestino delgado. De igual manera, Anton y col. (2012) encontraron un mayor contenido de compuestos fluorescentes (característicos de los compuestos de Maillard) en el suero de ratones que habían consumido dietas tratadas térmicamente, ricas en compuestos derivados del pardeamiento no enzimático.



**Figura 5.** Efecto del consumo de distintas dietas (grupos G-CO, G-ASC; G-GAT, G-GBT) en el contenido de antioxidantes del suero medido por (a) FRAP (b) ABTS, y nivel de peroxidación lipídica (c) MDA: malonaldehído. Letras iguales en la misma fila indican que no hay diferencias significativas en sus medias ( $P > 0,05$ ).

El contenido de compuestos derivados de la oxidación lipídica se determinó mediante la medida de sustancias reactivas al TBA (TBARS). Los resultados obtenidos mediante este ensayo fueron similares a los informados por otros autores: si bien el valor del TBARS del grupo control fue levemente superior al obtenido por da Silva y col. (2013), se correspondió correctamente al obtenido por Lado y col. (2015) (en todos estos trabajos se trabajó con ratas Wistar, alimentadas con dieta AIN).

Los resultados encontrados en el presente trabajo mostraron que el grupo de animales que había consumido la dieta GAT presentaba un menor nivel de peroxidación lipídica ( $P \leq 0,05$ ) en comparación con el resto de los grupos, inferior incluso que el grupo G-ASC. Esto sugiere que los compuestos de Maillard derivados de las galletitas serían más efectivos en la protección contra la oxidación lipídica que el ácido ascórbico en las condiciones del ensayo, aunque en el contenido de antioxidantes en suero no se observaron diferencias significativas.

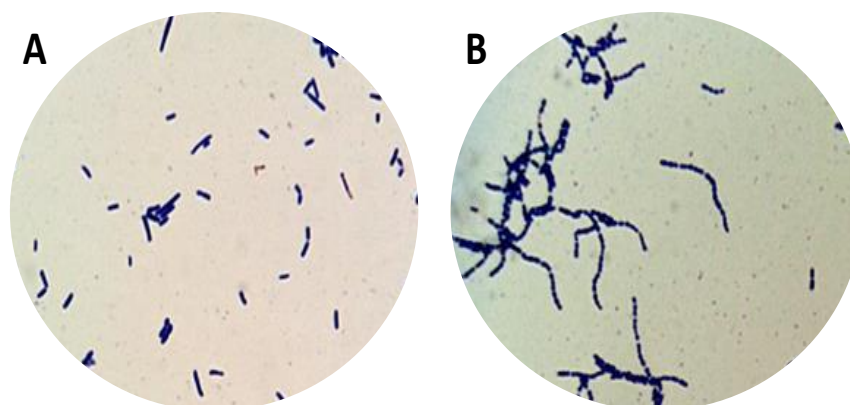
## Microbiota fecal

El efecto benéfico de las bacterias ácido lácticas ha atraído fuertemente la atención durante los últimos años. El interés particular en este tipo de bacterias se debe a que promoverían cambios favorables en el tracto gastrointestinal: reducirían la severidad y frecuencia de diarreas y podrían disminuir el riesgo de cáncer de colon, entre otros beneficios (Masood y col., 2011).

Los prebióticos son compuestos de la dieta que, al no ser digeridos en el intestino delgado, pueden continuar su recorrido por el tracto digestivo, y al llegar al intestino grueso ser utilizados por bacterias benéficas como las bacterias lácticas promoviendo su crecimiento (Jiménez-Escrig y col., 2013).

A pesar de que se sabe que una parte de las melanoidinas no puede ser digerida, es poco lo que se ha estudiado acerca de su potencial efecto prebiótico (Borrelli y col., 2005; Wang y col., 2011).

Para evaluar el efecto prebiótico de los compuestos de Maillard presentes en las galletitas se realizó un recuento de bacterias mesófilas totales y de bacterias lácticas al inicio y al final del ensayo *in vivo*, utilizando distintos medios de cultivo. Sobre las colonias obtenidas en agar MRS en condiciones de anaerobiosis se realizó una tinción de Gram y se evaluó la actividad de la enzima catalasa. Las colonias aisladas resultaron ser catalasa negativa y Gram positivas, características distintivas de las bacterias lácticas. A modo de ejemplo se muestran fotografías obtenidas luego de la tinción de los dos tipos de colonias obtenidas en el agar MRS



**Figura 6.** Microscopía de las colonias aisladas en el agar MRS. Se encontraron bacterias con características de bacilos (A) y cocos (B) (Aumento 400X)

(Figura 6).

No se encontraron diferencias significativas en los recuentos realizados sobre los distintos grupos al inicio del ensayo (el log UFC fue de 9,0 y 8,3 por g de materia fecal seca para bacterias lácticas y totales, respectivamente). Sin embargo, al final de la experiencia se encontró que los animales que habían consumido la dieta GAT (grupo G-GAT) presentaron un recuento de bacterias lácticas significativamente superior a los animales del grupo G-GBT y G-CO ( $P \leq 0,05$ ). Los resultados obtenidos se pueden ver en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Microbiota fecal en ratas alimentadas con distintas dietas (grupo G-CO, G-GAT, G-GBT).

	Grupo G-Co	Grupo G-GAT	Grupo G-GBT
Bacterias lácticas (log UFC/ g material fecal seca)	8,83 ± 0,15 <sup>a</sup>	9,32 ± 0,06 <sup>b</sup>	8,74 ± 0,33 <sup>a</sup>
Bacterias mesófilas (log UFC/ g material fecal seca)	8,27 ± 0,95 <sup>a</sup>	7,66 ± 0,52 <sup>a</sup>	8,25 ± 0,25 <sup>a</sup>
Relación bacterias Lácticas/mesófilas	1,07 ± 0,09 <sup>a</sup>	1,21 ± 0,08 <sup>b</sup>	1,06 ± 0,04 <sup>a</sup>

Los resultados se expresan como promedio ± desviación estándar. Supraíndices iguales en la misma fila indican que no hay diferencias significativas entre las medias (P>0,05)

Por otro lado, a pesar de que no se observaron diferencias significativas en el recuento de bacterias mesófilas totales al final de la experiencia para los distintos grupos (P > 0,05), la relación bacterias lácticas/bacterias mesófilas totales resultó ser significativamente superior en los animales del grupo G-GAT (P ≤ 0,05). Esto sugiere una predominancia de bacterias lácticas en los animales que habían consumido dieta GAT; una alta proporción de estas bacterias podrían modificar favorablemente el ambiente intestinal y en última instancia conducir a una menor incidencia en el cáncer colorrectal (Vargo y col., 1980). También podría disminuir la incidencia de diarreas, tal como lo demostraron Anton y col. (2012) sobre ratones alimentados con una dieta rica en productos de Maillard.

Los resultados obtenidos sugieren que el consumo de una dieta rica en melanoidinas de galletitas durante 6 semanas podría modificar favorablemente la composición de las bacterias colónicas en animales sanos. Esto podría deberse a que parte de las melanoidinas producidas por la cocción a alta temperatura no pueden ser digeridas, y llegan al intestino grueso donde selectivamente incrementan el contenido de bacterias benéficas como las bacterias lácticas.

Existen distintas hipótesis que podrían explicar este resultado. Por un lado, los resultados de Borelli y col (2005) mostraron que las bifidobacterias podrían utilizar a las melanoidinas de la corteza del pan como fuente de carbono y nitrógeno de una manera más eficiente que otras bacterias (*Clostridia*, *Bacteroides spp.*, *Streptococci* y *Enterobacterias*). Una vez liberadas, las melanoidinas podrían ejercer su actividad antimicrobiana ya demostrada sobre distintas cepas patogénicas. Rufián-Henares y col. (2009) demostraron que las melanoidinas del café inhiben el crecimiento de bacterias como *E. Coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Además, es posible que la presencia de antioxidantes presentes en la dieta G-AT pueda haber ejercido cierta influencia sobre los recuentos de bacterias colónicas. En bibliografía se encontró que el consumo compuestos antioxidantes (como el resveratrol, las antocianinas o los compuestos fenólicos) favorecerían el crecimiento de Bifidobacterias y Lactobacilos, a la vez que inhibirían el crecimiento de bacterias patogénicas como *Staphylococcus spp*, *Salmonella spp*, *Helicobacter pylori* y *Bacillus cereus* (Laparra y Sanz, 2010; Saura-Calixto, 2011).

#### *Humedad de materia fecal y absorción aparente de minerales*

El contenido de humedad de la materia fecal de los grupos G-GAT, G-GBT y G-CO se puede ver en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Humedad en materia fecal y absorción aparente de minerales en ratas alimentadas con distintas dietas (grupo G-CO, G-GAT, G-GBT).

	Grupo G-Co	Grupo G-GAT	Grupo G-GBT
Humedad de material fecal (%)	52,8 ± 1,8 <sup>a</sup>	65,3 ± 1,9 <sup>b</sup>	57,4 ± 2,0 <sup>a</sup>
Absorción mineral aparente (%)	61,7 ± 8,5 <sup>b</sup>	51,9 ± 4,6 <sup>b</sup>	29,9 ± 5,9 <sup>a</sup>

Los resultados se expresan como promedio ± desviación estándar. Letras iguales en la misma fila indican que los promedios no se diferencian significativamente ( $P \leq 0,05$ ).

Se observa que el consumo de una dieta rica en melanoidinas incrementó el contenido de humedad de las heces de los animales del G-GAT ( $P \leq 0,05$ ). Estudios previos han documentado la capacidad que tiene la fibra dietaria de incrementar el contenido de humedad de la materia fecal por su capacidad de retener agua (Eastwood, 1992). Por otro lado, en buena concordancia con este hecho, Pérez-Jiménez y col. (2014) evaluaron la contribución de los compuestos de Maillard a la fibra dietaria en un estudio *in vitro*. Sus resultados indicaron que un mayor desarrollo de la reacción de Maillard podría incrementar el contenido de fibra dietaria en productos panificados, aunque su estructura sea diferente a los compuestos actualmente considerados como fibra (polisacáridos distintos al almidón, lignina, almidón resistente, etc). Estos resultados, sumados al hecho que los compuestos de Maillard modularían favorablemente la presencia de bacterias lácticas en el colon y presentan una importante capacidad antioxidante, apoyarían la teoría de que los compuestos de Maillard podrían actuar como “fibra dietaria antioxidante”.

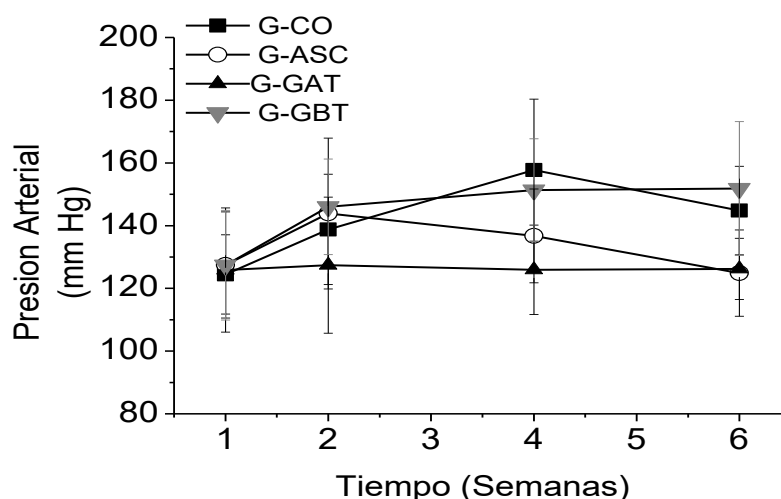
Por otro lado, se evaluó la capacidad quelante que poseen los compuestos de la reacción de Maillard, que ha sido comprobada *in vitro* sobre sistemas modelo o en café (Morales y col., 2005; Rufian-Henares y de la Cueva, 2009). Esto tendría un efecto sumamente negativo en la salud, especialmente sobre los niños que son los más susceptibles (Eastwood, 1992). En nuestro trabajo, los resultados de la absorción mineral aparente en ratas que consumieron una dieta rica en melanoidinas no mostraron diferencias significativas con los de las ratas que se alimentaron con la dieta control ( $P > 0,05$ ). Por el contrario, se encontró que los animales del grupo G-GBT presentaron una menor absorción aparente de minerales ( $P \leq 0,05$ ) que el resto de los grupos. No debemos olvidar que el proceso de cocción genera un gran número de modificaciones en la estructura del alimento, además de la reacción de Maillard. Por lo tanto, sería razonable considerar que, a pesar de que el tratamiento térmico a 100 °C por 80 min no generó altas cantidades de compuestos de Maillard, el producto obtenido posee características diferentes que podrían reducir la biodisponibilidad de los minerales disminuyendo el valor de la absorción mineral aparente.

### *Presión arterial*

Los ensayos *in vitro* realizados por Rufián-Henares y Morales (2007<sup>a,b</sup>) demostraron el poder antihipertensivo de las melanoidinas en sistemas modelo y en distintas bebidas (café, cerveza y vino dulce). A partir de estos ensayos, los autores sugirieron que el efecto antihipertensivo de los compuestos de Maillard podría estar relacionado a la capacidad quelante de las melanoidinas, ya que la angiotensina (hormona que causa la vasoconstricción y posterior aumento de la presión arterial) es zinc dependiente. Sin embargo, existe poca información acerca del efecto de los

compuestos de Maillard sobre la absorción de zinc *in vivo*, y muchas veces los resultados son contradictorios. Sarriá y Vaquero (2001) estudiaron el efecto de los compuestos de Maillard sobre la biodisponibilidad de zinc en ratas lactantes. Sus resultados indicaron que el consumo de una fórmula esterilizada en botella con alto contenido en compuestos de Maillard disminuía la absorción de zinc, comparada con la misma fórmula reconstituida con un menor contenido de compuestos de Maillard. En cambio, resultados recientes obtenidos por Delgado-Andrade y col. (2015) indicaron que el consumo de productos de Maillard provenientes de la corteza del pan no modificaba el balance de zinc en ratas.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo apoyan la idea de que una dieta rica en compuestos de Maillard puede reducir la presión arterial. Tal como se puede ver en la Figura 7, el grupo G-GAT presentó una presión arterial significativamente menor a los otros grupos a lo largo de la experiencia ( $P \leq 0,05$ ). Además, al final del período experimental la presión arterial del grupo de animales al que se le incorporó ácido ascórbico a su agua de bebida, fue significativamente menor a la del grupo control y el grupo G-GBT ( $P \leq 0,05$ ).



**Figura 7.** Presión arterial de ratas alimentadas con distintas dietas (grupos G-CO, G-ASC, G-GAT y G-GBT). Las barras verticales indican las desviaciones estándar

En un intento por explicar este resultado se determinó la absorción aparente de zinc. Los valores obtenidos fueron  $89,5 \pm 6,3$ ;  $51,3 \pm 13,0$ ;  $12,3 \pm 13,2$  % para los grupos G-CO, G-GAT y G-GBT, respectivamente. Sin embargo, no se encontró una buena correlación entre este parámetro y la presión arterial de las ratas ( $r = -0,14$ ), aunque sí se encontraron excelentes correlaciones entre la presión arterial y la actividad antioxidante en plasma ( $r = -0,86$  y  $r = -0,93$  para los ensayos de FRAP y ABTS, respectivamente). Por consiguiente, se podría inferir que la disminución en la presión arterial podría estar asociada al poder antioxidante que presentaban los compuestos de Maillard. En concordancia con esta teoría Rodríguez-Iturbe y col. (2003) encontraron una significativa disminución en la presión arterial de ratas alimentadas con una dieta rica en antioxidantes. Según estos autores, el estrés oxidativo aumenta la presión arterial al disminuir el contenido de óxido nítrico (un vasodilatador). Sería razonable entonces que el consumo de una dieta rica en antioxidantes como las melanoidinas disminuyan la presión arterial.



## Conclusiones

El ensayo *in vivo* mostró que uso de altas temperaturas en la cocción de galletitas disminuiría la digestibilidad proteica, reduciendo la eficiencia alimentaria y provocando una disminución en el peso de los animales que hayan consumido este tipo de alimento.

El consumo de una dieta con altas concentraciones de compuestos de Maillard provenientes de galletitas incrementa la actividad antioxidante del suero y disminuye su nivel de oxidación lipídica. Esto contribuiría a disminuir la presión arterial. Se encontró una buena correlación entre la presión arterial y la actividad antioxidante en el suero, pero no con la absorción aparente de zinc. Esto sugiere que el efecto antihipertensivo de los compuestos de Maillard estaría relacionado a su poder antioxidante, y no a la capacidad quelante de zinc como se había sugerido en bibliografía a partir de ensayos realizados *in vitro*.

Los resultados del presente trabajo son consistentes con la idea de que los compuestos de Maillard se comportan como fibra dietaria: modulan eficientemente la composición de la microbiota fecal incrementando la relación de bacterias lácticas sobre bacterias totales, y aumentan la capacidad de retención de agua de la materia fecal.

Estos resultados podrían ser utilizados y adaptados en la producción de alimentos farináceos a fin de prevenir o reducir la incidencia de enfermedades no transmisibles en nuestra población.

## Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo financiero de la Universidad Nacional de La Plata, CONICET (CCT-LP) y MINCYT. Además, quisiéramos agradecer al Dr. José Ángel Rufián Henares de la Universidad de Granada, España por su colaboración en la extracción de las melanoidinas. Estos estudios contaron con el aval de la Universidad Nacional de la Plata y forman parte de la tesis doctoral titulada "Desarrollo de galletitas más saludables: alternativas para incrementar su contenido de antioxidantes" defendida por la Dra. M. Patrignani en el año 2017.

## Aspectos éticos

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a los lineamientos europeos de uso y cuidado de animales de laboratorio (2010-63), y fueron avalados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata (protocolo número T 04-01-2014).

## Referencias

- AACC International (Ed.), Approved methods of American association of cereal chemists, (1983), St. Paul, Minnesota: AACC International.
- ANMAT, Metodología analítica oficial, análisis microbiológico de alimentos. Microorganismo indicadores, (2014), Red Nacional de Laboratorios Oficiales de Análisis de Alimentos (Reneloa). Disponible en

- [http://www.anmat.gov.ar/renaloea/docs/Analisis\\_microbiologico\\_de\\_los\\_alimentos\\_Vol\\_III.pdf](http://www.anmat.gov.ar/renaloea/docs/Analisis_microbiologico_de_los_alimentos_Vol_III.pdf). [Acceso 27/08/2020].
- Anton, P. M., Craus, A., Niquet-Léridon, C. y Tessier, F. J., Highly heated food rich in Maillard reaction products limit an experimental colitis in mice, (2012), *Food & Function*, 3(9), 941-949.
- Borrelli, R. C. y Fogliano, V., Bread crust melanoidins as potential prebiotic ingredients, (2005), *Molecular Nutrition & Food Research*, 49, 673-678
- Borrelli, R. C., Mennella, C... y Fogliano, V., Characterization of coloured compounds obtained by enzymatic extraction of bakery products, (2003), *Food and Chemical Toxicology*, 41(10), 1367-1374.
- CAA (2014). Código Alimentario Argentino, Capítulo IX:
- da Silva, J. K., Cazarin, C. B. B., Colomeu, T. C., Batista, Â. G., Meletti, L. M., Paschoal, J. A. R., ... y Júnior, M. R. M., Antioxidant activity of aqueous extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves: in vitro and in vivo study, (2013), *Food Research International*, 53(2), 882-890.
- Delgado-Andrade, C., Morales, F. J., Seiquer, I. y Navarro, M. P., Maillard reaction products profile and intake from Spanish typical dishes, (2010), *Food Research International*, 43(5), 1304-1311.
- Delgado-Andrade, C., Roncero-Ramos, I., Haro, A., Morales, F. J., Seiquer, I. y Navarro, M. P., Effects of diets supplemented with MRPs from bread crust on the food intake and body weights in rats, (2013), *Food & Function*, 4, 1016-1022.
- Delgado-Andrade, C., Roncero-Ramos, I., Haro, A., Pastoriza, S. y Navarro, M. P., Do bread-crust-derived Maillard reaction products affect the retention and tissue distribution of trace elements?, (2015), *European Journal of Nutrition*, 1-9
- Delgado-Andrade, C., Rufián-Henares, J. A. y Morales, F. J., Study on fluorescence of Maillard reaction compounds in breakfast cereals, (2006), *Molecular Nutrition & Food Research*, 50(9), 799-804.
- Eastwood, M. A., The physiological effect of dietary fiber: An update, (1992), *Annual Review of Nutrition*, 12, 19-35.
- Estepa, V., Ródenas, S. y Martín, M. C., Optimización de un método para la determinación de la peroxidación lipídica en suero humano, (2009), *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 67(3).
- Fritz, M. y Rinaldi, G.J., Blood pressure measurement with the tail-cuff method in Wistar and spontaneously hypertensive rats: Influence of adrenergic-and nitric oxide-mediated vasomotion, (2008), *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 58, 215-221.
- Jimenez-Escrig, A., Dragsted, L. O., Daneshvar, B., Pulido, R. y Saura-Calixto, F., In vitro antioxidant activities of edible artichoke (*Cynara scolymus* L.) and effect on biomarkers of antioxidants in rats, (2003), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5540-5545.
- Jiménez-Escrig, A., Gómez-Ordóñez, E., Tenorio, M. D. y Rupérez, P., Antioxidant and prebiotic effects of dietary fiber co-travelers from sugar Kombu in healthy rats, (2013), *Journal of Applied Phycology*, 25, 503-512.
- Kitrytė, V., Adams, A., Venskutonis, P. R. y De Kimpe, N., Impact of lipid oxidation-derived aldehydes and ascorbic acid on the antioxidant activity of model melanoidins, (2012), *Food Chemistry*, 135, 1273-1283
- Lado, M. B., Burini, J., Rinaldi, G., Añón, M. C. y Tironi, V. A., Effects of the dietary addition of amaranth (*amaranthus mantegazzianus*) protein isolate on antioxidant status, lipid profiles and blood pressure of rats, (2015), *Plant Foods for Human Nutrition*, 70(4), 371-379.

- Langner, E. y Rzeski, W., Biological properties of melanoidins: A review, (2014), *International Journal of Food Properties*, 17, 344-353.
- Laparra, J. M. y Sanz, Y., Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals, (2010), *Pharmacological Research*, 61(3), 219-225.
- Martín, M. Á., Ramos, S., Mateos, R., Rufián-Henares, J. A., Morales, F. J., Bravo, L. y Goya, L., Biscuit melanoidins of different molecular masses protect human HepG2 cells against oxidative stress, (2009), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(16), 7250-7258
- Masood, M. I., Qadir, M. I., Shirazi, J. H. y Khan, I. U., Beneficial effects of lactic acid bacteria on human beings, (2011), *Critical Reviews in Microbiology*, 37(1), 91-98
- Monente, C., Bravo, J., Vitas, A. I., Arbillaga, L., De Peña, M. P. y Cid, C., Coffee and spent coffee extracts protect against cell mutagens and inhibit growth of food-borne pathogen microorganisms, (2015), *Journal of Functional Foods*, 12, 365-374
- Morales, F. J., Fernández-Fraguas, C. y Jiménez-Pérez, S., Iron-binding ability of melanoidins from food and model systems, (2005), *Food Chemistry*, 90(4), 821-827.
- Oste, R. y Sjödin, P., Effect of Maillard reaction products on protein digestion. In vivo studies on rats, (1984), *The Journal of Nutrition*, 114, 2228-2234.
- Pastoriza de la Cueva, S. y Rufián-Henares, J. A., Contribution of melanoidins to the antioxidant capacity of the Spanish diet, (2014), *Food Chemistry*, 164, 438-445.
- Pérez-Jiménez, J., Díaz-Rubio, M. E., Mesías, M., Morales, F. J. y Saura-Calixto, F., Evidence for the formation of maillardized insoluble dietary fiber in bread: A specific kind of dietary fiber in thermally processed food, (2014), *Food Research International*, 55, 391-396.
- Perkin-Elmer, *Analytical Methods for Atomic Absorption Spectroscopy*, (1996), The Perkin-Elmer Corporation. Norwalk, Connecticut, Estados Unidos.
- Reeves, P. G., Nielsen, F. H. y Fahey Jr, G. C., AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet, (1993), *Journal Nutrition*, 123, 1939-1951.
- Rodriguez-Iturbe, B., Zhan, C. D., Quiroz, Y., Sindhu, R. K. y Vaziri, N. D., Antioxidant-rich diet relieves hypertension and reduces renal immune infiltration in spontaneously hypertensive rats, (2003), *Hypertension*, 41, 341-346.
- Roncero-Ramos, I., Delgado-Andrade, C., Alonso-Olalla, R. y Navarro, M. P., Influence of bread crust-derived Maillard reaction products on phosphorus balance in rats, (2012), *European journal of nutrition*, 51(7), 871-879.
- Rufián-Henares, J. A. y Morales, F. J., Functional properties of melanoidins: In vitro antioxidant, antimicrobial and antihypertensive activities, (2007a), *Food Research International*, 40(8), 995-1002.
- Rufián-Henares, J. A. y Morales, F. J., Effect of in vitro enzymatic digestion on antioxidant activity of coffee melanoidins and fractions, (2007b), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 10016-10021.
- Rufián-Henares, J. A. y Pastoriza de la Cueva, S., Antimicrobial Activity of Coffee Melanoidins: A Study of Their Metal-Chelating Properties, (2009), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(2), 432-438.
- Sarriá, B. y Vaquero, M. P., Zinc and iron bioavailability in a powder or in-bottle-sterilized infant formula estimated by in vitro and in suckling rats, (2001), *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 12, 266-273.

- Saura-Calixto, F., Dietary fiber as a carrier of dietary antioxidants: an essential physiological function, (2011), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,59(1), 43-49.
- Sinnhuber, R. O., Yu, T. C. y Yu, T. C., Characterization of the red pigment formed in the 2-thiobarbituric acid determination of oxidative rancidity, (1958), *Journal of Food Science*,23(6),626-634.
- Sönmez, M., Türk, G., y Yüce, A., The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats, (2005), *Theriogenology*, 63, 2063-2072
- Vargo, D., Moskovitz, M. y Floch, M. H., Faecal bacterial flora in cancer of the colon, (1980), *Gut*, 21(8), 701-705.
- Vhangani, L. N. y Van Wyk, J., Antioxidant activity of Maillard reaction products (MRPs) derived from fructose–lysine and ribose–lysine model systems, (2013), *Food Chemistry*, 137(1), 92-98
- Wang, H. Y., Qian, H. y Yao, W. R., Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity, (2011), *Food Chemistry*, 128(3), 573-584
- Yu, X., Zhao, M., Hu, J., Zeng, S. y Bai, X., Correspondence analysis of antioxidant activity and UV–Vis absorbance of Maillard reaction products as related to reactants, (2012), *LWT-Food Science and Technology*, 46(1), 1-9.