

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de
Doctor en Ciencias Biológicas

**“DESARROLLO Y EVALUACIÓN NUTRICIONAL DE
ALIMENTOS ELABORADOS A BASE DE GRANOS
ENTEROS DE ARROZ. EFECTOS DE LOS PROCESOS DE
REMOJO, GERMINACIÓN Y EXTRUSIÓN SOBRE EL
CONTENIDO Y DISPONIBILIDAD DE NUTRIENTES”**

LIC. MICAELA ALBARRACIN

DIRECTORA: Dra. Silvina R. Drago

CO-DIRECTOR: Ing. Rolando J. González

**Laboratorio de Cereales y Oleaginosas
INSTITUTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**

UNL

2014

*Cada trecho recorrido enriquece al peregrino
y lo acerca un poco más a hacer realidad sus sueños*

Paulo Coelho

*Dedicada a mi querida familia...
y muy especialmente a mi abuela Blancaflor*

AGRADECIMIENTOS

A **Silvina Drago**, mi Directora, y a **Rolando González**, mi co-Director, por permitirme hacer el doctorado bajo su dirección. Además de haberme ayudado y aconsejado en toda esta etapa, tanto en lo profesional como en lo personal.

A mis compañeros del **Grupo de Cereales y Oleaginosas**, y demás integrantes del **Instituto de Tecnología de Alimentos**, ya que colaboraron y me acompañaron durante todo este tiempo en el Instituto.

A la **ANPCyT** por haberme otorgado una beca asociada al proyecto PICT 2007-nº1105 para realizar el doctorado, y al **CONICET** por haberme otorgado la beca Tipo II para la finalización del mismo.

A la **Universidad Nacional del Litoral**, la **Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas** y el **Instituto de Tecnología de Alimentos** (Facultad de Ingeniería Química) por la calidad de la enseñanza recibida y por la posibilidad de continuar formándome a través de mi carrera profesional.

A las **cátedras de Bromatología y Nutrición** pertenecientes a la **Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires** por haberme permitido desarrollar parte de mis estudios en sus laboratorios. Agradezco especialmente a **Angela Zuleta y Adriana Weisstaub** por su colaboración.

A mis amigos de siempre...

A todos los que no nombré y que me han acompañado durante toda mi vida, viendo mi crecimiento tanto personal como profesional...

A TODOS...MUCHAS GRACIAS.

Publicaciones y presentaciones a reuniones científicas a partir de la presente tesis

Publicaciones en revistas científicas

- “Effect of soaking process on nutrient bioaccessibility and phytic acid content of brown rice cultivar”. M. Albarracín, R. J. González, S. R. Drago. LWT - Food Science and Technology, 53 (2013) 76 - 80.
- “Effect of extruded whole maize, polydextrose and cellulose as source of fibre on Ca bioavailability and metabolic parameters of growing Wistar rats” M. Albarracín, A. R. Weisstaub, A. Zuleta, P. Mandalunis, R. J. González and S. R. Drago. Food & Function, 5 (2014), 804.
- “Soaking and extrusion effects on physicochemical parameters, phytic acid, nutrient content and mineral bio-accessibility of whole rice grain” Micaela Albarracín, Rolando J. González and Silvina R. Drago. Int. Journal of Food Science & Nutrition. En prensa.

Trabajos completos presentados en reuniones científicas

- “Efectos del remojo de arroz integral sobre el contenido de ácido fítico” Albarracín M, Drago Silvina R, González Rolando J. Trabajo completo en el XIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CYTAL®), 19 al 21 de octubre de 2011 en Buenos Aires. ISBN 978-987-22165-4-2.
- “Influencia del tiempo y la temperatura de remojo de granos integrales de arroz en la retención de nutrientes” Albarracín M, Drago Silvina R, González Rolando J. Presentación oral, trabajo completo en el XIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CYTAL®), 19 al 21 de octubre de 2011 en Buenos Aires. ISBN 978-987-22165-4-2.
- Efectos del remojo y la extrusión en el contenido de ácido fítico y nutrientes de arroz integral (*Oryza Sativa*)”. M. Albarracín, S. R. Drago. Trabajo completo, exposición oral y poster en las XX Jornadas de Jovens Pesquisadores -AUGM 2012- Universidade Federal do Paraná, Curitiba (Brasil), del 3 al 5 de octubre de 2012.
- “Efectos de la extrusión sobre las propiedades físicas y el contenido de fitatos de expandidos de harina de arroz integral germinado”. Albarracín M, Drago SR, González R J. Trabajo completo y poster en el IV Congreso Internacional de

Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CICYTAC 2012) 14 al 16 de noviembre de 2012, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba. ISBN: 978-950-33-1069-4.

Resúmenes presentados en reuniones científicas

Internacionales

- “Efecto del consumo de arroz integral, remojado y germinado sobre la retención de calcio”. Weisstaub A, Albarracín M, Cian R, Mambrín C, Orzuza R, Drago, SR, Zuleta A. XVI Congreso Latinoamericano de Nutrición, 12 al 16 noviembre de 2012 en La Habana, Cuba.
- “Efecto del consumo de arroz integral, remojado y germinado en el contenido de TG hepáticos y el estrés oxidativo”. Albarracín M, Weisstaub A, Zuleta A, Drago, SR. XVI Congreso Latinoamericano de Nutrición, 12 al 16 noviembre de 2012 en La Habana, Cuba.

Nacionales

- “Influencia del remojado en la retención de sólidos, minerales y proteínas de arroz integral” Albarracín M., Drago S., González R. Poster en la XXXIII Reunión de CASLAN y II Jornadas Internacionales de Actualización y Perfeccionamiento en Nutrición y Tecnología de Alimentos, 14 y 15 de octubre de 2010, Córdoba. Resumen TAA1 pág. 42.
- “Efecto del consumo de grano entero de maíz extrudido sobre la absorción y retención de calcio en ratas en periodo de crecimiento” Weisstaub A, Albarracín M, Bryk G, Orzuza R, Zeni SN, Drago, SR y Zuleta A. Poster en el XVIII Congreso Argentino de Nutrición, 10 al 13 de agosto de 2011 en Buenos Aires.
- “Evaluación del efecto de grano entero de maíz extrudido sobre parámetros indicadores del estrés oxidativo” Albarracín M., Weisstaub A., Abdala V., Zuleta A., Drago S.R. Poster en la XXXIV Reunión anual del capítulo argentino de la sociedad latinoamericana de nutrición (CASLAN) y III Jornadas internacionales de actualización en nutrición y tecnología de alimentos, 15 y 16 de septiembre de 2011 en Rosario.
- “Disponibilidad de Ca en ratas en dietas adicionadas de maíz entero extrudido” Weisstaub A, Dyner L, Abdala V, De la Casa L, Albarracín M, Zuleta A, Drago S.R. Poster en la XXXIV Reunión anual del capítulo argentino de la sociedad latinoamericana de nutrición (CASLAN) y III Jornadas internacionales de

actualización en nutrición y tecnología de alimentos, 15 y 16 de septiembre de 2011 en Rosario.

- “Efectos del remojo de arroz integral sobre el contenido de ácido fítico” Albarracín M, Drago Silvina R, González Rolando J. Trabajo completo y poster en el XIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CYTAL®), 19 al 21 de octubre de 2011 en Buenos Aires.
- “Influencia del tiempo y la temperatura de remojo de granos integrales de arroz en la retención de nutrientes” Albarracín M, Drago Silvina R, González Rolando J. Presentación oral, trabajo completo y poster y en el XIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CYTAL®), 19 al 21 de octubre de 2011 en Buenos Aires.
- “Fibra dietaria total, soluble e insoluble en granos enteros de interés nutricional luego de distintos tratamientos tecnológicos” Dyner L, Weisstaub A, Albarracín M, Drago SR y Zuleta A. XXXV Reunión Anual del Capítulo Argentino de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición (CASLAN) 28 y 29 de septiembre de 2012 Universidad Nacional de Luján, Luján, Buenos Aires.
- “Efectos de la extrusión sobre las propiedades físicas y el contenido de fitatos de expandidos de harina de arroz integral germinado”. Albarracín M, Drago SR, González R J. Trabajo completo y poster en el IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CICYTAC 2012) 14 al 16 de noviembre de 2012, Córdoba.
- “Efecto del consumo de arroz integral, remojado y germinado extrudidos sobre la función intestinal”. Weisstaub A, Albarracín M, Cian R, De la Casa, Dyner , L, Zuleta A, Drago, S. IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CICYTAC 2012) 14 al 16 de noviembre de 2012, Córdoba.
- “Desarrollo de ingredientes a base de grano entero (Arroz cáscara-Oryza sativa)” M. Albarracín. XVII Encuentro de jóvenes investigadores de la UNL (EJI 2013), 4 y 5 de septiembre de 2013, Santa Fe.
- “Efecto de la aplicación de diversos procesos tecnológicos en granos enteros de arroz en la relación molar ácido fítico / catión*”. Dyner, L.; Rodríguez, V.; Albarracín, M.; Drago, S. y Zuleta, Á. XXXVI Reunión del Capítulo Argentino de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición (CASLAN) "Tecnología, nutrición y

salud: El desafío de mejorar los hábitos de vida" 8, 9 y 10 de agosto 2013, Mendoza.

- “Contenido de inositoles fosfato en granos enteros de arroz luego de aplicar distintos tratamientos tecnológicos”. Dynner L.; Rodríguez, V.; Albarracín, M.; Drago, S. y Zuleta, Á. XIV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 23, 24 y 25 de octubre de 2013, Rosario, Santa Fe, Argentina.
- “Efecto del consumo de arroz integral, remojado y germinado extrudidos en el metabolismo lipídico y ambiente oxidativo hepático de ratas” Albarracín M, Weisstaub A, Zuleta A, Drago, S. V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CICYTAC 2014) 16 al 19 de noviembre de 2014, Córdoba.

INDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE CONTENIDOS	VIII
INDICE DE TABLAS	XVI
INDICE DE FIGURAS	XIX
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	XXIV
RESUMEN	XXVI
ABSTRACT	XXXI
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 GRANOS ENTEROS (GE)	2
I.1.1 Aspectos Generales, Definición y Recomendaciones	2
I.1.2 GE: composición	4
I.1.3 GE en la dieta: efectos beneficiosos en la Salud	6
I.2 ARROZ	7
I.2.1 Generalidades	7
I.2.2 Estructura del grano de arroz y valor nutricional	10
I.2.3 Clasificación del arroz	11
I.3 ENFERMEDAD CELÍACA	12
I.3.1 Definición	12
I.3.2 Alimentos libres de gluten	13
I.4 BIODISPONIBILIDAD DE MINERALES	13
I.4.1 Definición	13
I.4.2 Hierro (Fe)	14
I.4.2.1 Funciones del hierro en el organismo. Deficiencias	14
I.4.2.2 Inhibidores de la absorción de Fe	15
I.4.2.3 Promotores de la absorción de Fe	16
I.4.3 Zinc (Zn)	17
I.4.3.1 Funciones del Zn en el organismo. Deficiencias	17
I.4.3.2 Inhibidores y promotores de la absorción de Zn	18
I.5 ACIDO FITICO	18
I.5.1 Estructura	18
I.5.2 Fitasas	20
I.5.3 Efectos de los fitatos en la biodisponibilidad de los minerales	20
I.5.4 Efectos de los fitatos sobre la digestibilidad de las proteínas	21

I.5.5 Efectos de los fitatos sobre la biodisponibilidad de los carbohidratos.....	22
I.6 PROCESOS PARA MEJORAR LA BIOACCESIBILIDAD DE	
NUTRIENTES	22
I.6.1 REMOJO	23
I.6.1.1 Condiciones de remojo.....	23
I.6.1.2 Efectos del remojo en los componentes de los granos	23
I.6.2 GERMINACIÓN	26
I.6.2.1 Condiciones de germinación	27
I.6.2.2 Efectos de la germinación en los componentes de los granos	28
I.6.3 EXTRUSIÓN.....	29
I.6.3.1 Proceso de extrusión	29
I.6.3.2 Tipos de extrusores	30
I.6.3.3 Transformaciones del material durante la extrusión	31
I.6.3.4 Efectos de la extrusión en algunos componentes de los cereales.....	32
I.6.4 CARACTERIZACIÓN DE PROPIEDADES FISICAS	33
I.7 ESTUDIO DEL EFECTO DEL CONSUMO DEL GRANO ENTERO EN	
ANIMALES DE EXPERIMENTACION	34
I.7.1 Fibra	34
I.7.2 GE y la Fibra	35
I.7.3 Efecto del consumo de fibra en la salud.....	36
I.7.3.1 Efectos sobre la glucosa y lípidos en sangre	36
I.7.3.2 Efectos sobre la función intestinal	36
I.7.3.3 Fermentabilidad de la fibra y efectos sobre la microbiota	37
I.7.3.4 GE y Estrés oxidativo.....	38
I.7.3.4.1 Sistemas de defensa antioxidante: primarios y secundarios	39
I.7.3.5 GE y Metabolismo del calcio (Ca).....	43
I.7.4 Modelos animales.....	44
II. OBJETIVOS	46
II.1 Objetivos generales.....	47
II.2 Objetivos específicos	47
III. MATERIALES Y METODOS	48
III.1 MATERIALES	49
III.1.1 Materia Prima	49
III.1.2 Clasificación del Arroz.....	49

III.2 METODOLOGIA.....	49
III.2.1 Estudio del proceso de remojo de Arroz: Integral y Cáscara	49
III.2.1.1 Remojo a es cala laboratorio	49
III.2.1.2 Remojo a escala piloto	50
III.2.2 Estudio del proceso de germinación de Arroz Cáscara	50
III.2.2.1 Absorción de agua y germinación a escala piloto	50
III.2.2.2 Germinación a escala piloto	51
III.2.3 Secado y molienda.....	51
III.3 ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES NUTRICIONALES DE LOS	
PRODUCTOS OBTENIDOS POR REMOJO Y GERMINACIÓN.....	52
III.3.1 Estudio de la composición centesimal.....	52
III.3.2 Mineralización por vía seca.....	52
III.3.3 Determinación del contenido de minerales (Fe y Zn)	53
III.3.4 Determinación del P-libre y P-AF del agua de remojo	53
III.3.5 Determinación de fósforo del AF (P-AF) del grano.....	53
III.3.6 Determinación del contenido de Fósforo Total (FT).....	53
III.3.7 Determinación del contenido de polifenoles Libres (PF Lib)	54
III.3.8 Evaluación de la capacidad antioxidante (CAO).....	54
III.3.9 Bioaccesibilidad de minerales (BM)	54
III.3.10 Determinación del contenido de Nitrógeno no proteico (NNP).....	55
III.3.11 Digestibilidad proteica (DP).....	55
III.4 ESTUDIO DEL EFECTO DE LAS VARIABLES DE EXTRUSIÓN SOBRE	
LAS CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DE LOS EXTRUDIDOS DE	
ARROZ INTEGRAL CON TRATAMIENTOS DE REMOJO Y	
GERMINACIÓN.....	56
III.4.1 Condiciones del proceso de extrusión	56
III.4.1.1 Extrusión de granos integrales	57
III.4.1.2 Extrusión de granos remojados	57
III.4.1.3 Extrusión de granos germinado.....	57
III.4.2 Molienda.....	57
III.4.3 Evaluación de las propiedades fisicoquímicas de los productos expandidos	
obtenidos por extrusión	58
III.4.3.1 Consumo Específico de Energía Mecánica (CEEM)	58
III.4.3.2 Expansión (E)	58

III.4.3.3 Volumen Específico (VE)	58
III.4.3.4 Evaluación sensorial de la dureza (DS).....	59
III.4.3.5 Evaluación mecánica de la textura: dureza mecánica (DM)	59
III.4.3.6 Solubilidad en agua (S)	59
III.4.3.7 Absorción de agua (AA).....	60
III.5 CARACTERIZACIÓN DE LAS HARINAS EXTRUDIDAS DE ARROA	
REMOJADO Y GERMINADO	60
III.5.1 Estudio de la composición y propiedades fisicoquímicas y nutricionales <i>in vitro</i>	60
III.5.1.1 Contenido de proteínas y nitrógeno no proteico NNP	60
III.5.1.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE - SDS).....	60
III.5.1.3 Determinación de Lisina disponible (LD).....	61
III.5.1.4 Digestibilidad proteica <i>in vitro</i> (DP)	62
III.5.1.5 Determinación de Almidón Total	62
III.5.1.6 Fibra Total, Soluble e Insoluble	62
III.5.1.7 Lípidos (extracto etéreo) y Perfil de ácidos grasos	62
III.5.1.8 Determinación del perfil de inositoles fosfatos (IP).....	63
III.5.1.9 Evaluación de actividad antioxidante (CAO).....	64
III.5.1.10 Contenido de polifenoles Totales, Libres y Ligados (PF Lib y PF Lig).....	64
III.5.2 Propiedades físicas de las harinas	64
III.5.2.1 Determinación del grado de cristalinidad por difracción de Rayos X	64
III.5.2.2 Isotermas de Adsorción	64
III.5.2.3 Temperaturas de transición vítrea (Tg)	65
III.6 EVALUACIONES NUTRICIONALES <i>IN VIVO</i> CON ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	65
III.6.1 Modelo de experimentación	65
III.6.1.1 Dietas	66
III.6.1.2 Animales.....	66
III.6.2 Determinaciones relacionadas al metabolismo óseo y mineral.....	68
III.6.2.1 Absorción aparente de Ca.....	68
III.6.2.2 Contenido y densidad mineral ósea.....	68
III.6.2.3 Estudio de la composición ósea en el Fémur Derecho	68

III.6.3 Determinaciones sobre el ciego y contenido cecal.....	69
III.6.3.1 Determinación de IgA	69
III.6.3.2 Determinación de enzimas cecales.....	69
III.6.4 Determinaciones relacionadas con el metabolismo lipídico	70
III.6.5 Determinaciones relacionadas con el estrés oxidativo	70
III.6.5.1 Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.....	70
III.6.5.2 Determinación de Catalasa.....	71
III.6.5.3 Determinación de la actividad de Glutación reductasa (GR).....	71
III.6.5.4 Determinación de la actividad de Glutation peroxidasa (GPx).....	72
III.6.5.5 Determinación de los contenidos de GSH y GSSG	72
III.6.6 Determinación del contenido de proteínas	73
III.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	73
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	75
IV.1 ESTUDIO DEL PROCESO DE REMOJO DEL ARROZ INTEGRAL.....	76
IV.1.1 Composición de la materia prima.....	76
IV.1.2 Estudio del proceso de remojo del arroz integral.....	76
IV.1.2.1 Fósforo libre en el agua de remojo (P libre agua).....	78
IV.1.2.2 Fósforo del AF en el agua de remojo (P AF agua).....	79
IV.1.2.3 Fósforo del AF del grano (P AF grano)	80
IV.1.2.4 Fósforo total del grano (P total)	81
IV.1.2.5 Pérdida de sólidos.....	81
IV.1.2.6 Pérdida de proteínas	82
IV.1.2.7 Retención de Fe y Zn (Ret. de Fe y Zn)	83
IV.1.3 Optimización del diseño experimental correspondiente al proceso de remojo de arroz integral.....	84
IV.1.4 Digestibilidad proteica y bio-accesibilidad mineral.....	86
IV.1.5 Conclusiones parciales	86
IV.2 ESTUDIO DEL PROCESO DE REMOJO DEL ARROZ CASCARA Y DEL PROCESO DE EXTRUSIÓN DE HARINAS DE ARROZ DE GRANO ENTERO REMOJADO.....	88
IV.2.1 Composición de la materia prima.....	88
IV.2.2 Estudio del proceso de remojo del arroz cáscara	89
IV.2.2.1 Fósforo libre y del AF en el agua de remojo (P libre y P-AF agua) ...	90
IV.2.2.2 Pérdida de fósforo del AF del grano (Pérdida AF grano)	92

IV.2.2.3 Pérdida de sólidos.....	93
IV.2.2.4 Pérdida de cenizas y proteínas	93
IV.2.3 Optimización del diseño experimental correspondiente al proceso de remojo de arroz cáscara	94
IV.2.4 Estudio del proceso de extrusión de harinas de arroz de grano entero remojado.....	95
IV.2.4.1 Consumo Específico de Energía Mecánica (CEEM)	98
IV.2.4.2 Expansión (E).....	99
IV.2.4.3 Volumen específico (VE).....	100
IV.2.4.4 Evaluación de la Dureza Sensorial (DS) y Mecánica (DM)	100
IV.2.4.5 Absorción de Agua (AA) y Solubilidad (S).....	102
IV.2.4.6 Polifenoles Libres (PF Libres) y Capacidad Antioxidante (CAO) ..	103
IV.2.5 Optimización del diseño experimental de extrusión del arroz cáscara remojado.....	106
IV.2.6 Evaluación del producto de arroz cáscara remojado extrudido elaborado a escala piloto.....	107
IV.2.7 Conclusiones parciales	108
IV.3 ESTUDIO DEL PROCESO DE GERMINACIÓN DEL ARROZ CASCARA Y DEL PROCESO DE EXTRUSIÓN DE HARINAS DE ARROZ DE GRANO ENTERO GERMINADO	110
IV.3.1 Composición de la materia prima.....	110
IV.3.2 Ensayo de Germinación	110
IV.3.2.1 Absorción de agua de los granos.....	110
IV.3.2.2 Germinación a escala laboratorio.....	111
IV.3.3 Germinación y Extrusión a escala piloto.....	113
IV.3.3.1 Consumo Específico de Energía Mecánica (CEEM)	115
IV.3.3.2 Expansión (E).....	116
IV.3.3.3 Volumen específico (VE).....	116
IV.3.3.4 Evaluación de la Dureza Sensorial (DS) y Dureza Mecánica (DM). 117	
IV.3.3.5 Absorción de Agua (AA) y Solubilidad (S).....	118
IV.3.3.6 Polifenoles Libres (PF Libres) y Capacidad Antioxidante (CAO) ...	120
IV.3.4 Optimización del diseño experimental de extrusión del arroz germinado .	123
IV.3.5 Evaluación del producto de arroz germinado extrudido elaborado a escala piloto	124

IV.3.6 Conclusiones parciales	128
IV.4 CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS Y NUTRICIONALES DE LAS HARINAS DE GRANO ENTERO DE ARROZ OBTENIDAS POR DIFERENTES PROCESOS.....	130
IV.4.1 Características químicas y nutricionales de las harinas de grano entero de arroz.....	130
IV.4.1.1 Proteínas	130
IV.4.1.2 Lípidos.....	135
IV.4.1.3 Fibra Dietaria.....	138
IV.4.1.4 Contenido de cenizas.....	139
IV.4.1.5 Carbohidratos	139
IV.4.1.6 Perfil de Inositoles fosfatos (IP).....	140
IV.4.1.7 Capacidad antioxidante (CAO).....	142
IV.4.1.8 Polifenoles (PF Libres y PF Ligados)	143
IV.4.2 Propiedades físicas de las harinas de grano entero de arroz	145
IV.4.2.1 Absorción de Agua (AA) y Solubilidad (S).....	145
IV.4.2.2 Patrón de rayos X y Cristalinidad (%)	146
IV.4.2.3 Isotermas de adsorción	147
IV.4.2.4 Termogramas de las harinas de arroz de grano entero (DSC).....	151
IV.4.3 Conclusiones Parciales.....	152
IV.5 ESTUDIO <i>IN VIVO</i> DE LAS PROPIEDADES NUTRICIONALES DE HARINAS DE GRANO ENTERO DE ARROZ CON DIFERENTES TRATAMIENTOS	156
IV.5.1 Efecto del consumo de las dietas de grano entero de arroz en la ingesta de alimentos y la ganancia de peso	156
IV.5.2 Efecto del consumo de las dietas de grano entero de arroz a nivel intestinal	158
IV.5.3 Efecto del consumo de las dietas de grano entero de arroz en el metabolismo del calcio	162
IV.5.3.1 Absorción aparente de Ca	162
IV.5.3.2 Contenido y densidad mineral.....	163
IV.5.3.3 Estudio de la composición ósea en el Fémur Derecho.....	164
IV.5.4 Efecto del consumo de las dietas de grano entero de arroz en el contenido de IgA y actividad de enzimas cecales	166

IV.5.5 Efecto del consumo de las dietas de grano entero de arroz en el metabolismo lipídico	167
IV.5.6 Efecto del consumo de las dietas de grano entero de arroz en marcadores y enzimas del estrés oxidativo.....	169
IV.5.7 Conclusiones parciales	171
V. CONCLUSIONES GENERALES	172
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	176

INDICE DE TABLAS

Tabla I.1 Metodologías de remojo de arroz.

Tabla I.2 Metodologías de germinación de arroz.

Tabla III.1 Condiciones cromatográficas para determinación de perfiles de IP.

Tabla III.2 Composición de las dietas control y de grano entero de arroz extrudidas: Control (C), Integral (I), Remojado (R) y Germinado (G).

Tabla IV.1 Composición centesimal del arroz integral.

Tabla IV.2 Variables independientes y respuestas evaluadas para el remojo de arroz integral.

Tabla IV.3 ANOVA para las respuestas analizadas del diseño experimental correspondiente al proceso de remojo de arroz integral.

Tabla IV.4 Coeficientes de regresión de la ecuación polinómica de segundo orden para las respuestas evaluadas para el remojo de arroz integral.

Tabla IV.5 Digestibilidad proteica y bio-accesibilidad de Fe y Zn.

Tabla IV.6 Composición centesimal del arroz integral (proveniente de arroz cáscara).

Tabla IV.7 Variables independientes y respuestas evaluadas para el remojo de arroz cáscara.

Tabla IV.8 ANOVA para las respuestas analizadas del diseño experimental correspondiente al proceso de remojo de arroz cáscara.

Tabla IV.9 Coeficientes de regresión de la ecuación polinómica de segundo orden para las respuestas evaluadas para el remojo de arroz cáscara.

Tabla IV.10 Evaluación fisicoquímica de los productos provenientes de la extrusión de arroz cáscara remojados.

Tabla IV.11 ANOVA para las respuestas analizadas del diseño de extrusión de arroz cáscara remojado.

Tabla IV.12 Coeficientes de regresión de la ecuación polinómica de segundo orden para las respuestas evaluadas para la extrusión del arroz cáscara remojado.

Tabla IV.13 Contenido de AF, digestibilidad de proteínas y bio-accesibilidad de Fe y Zn del arroz integral descascarado en Planta Piloto (P.P), el arroz cáscara remojado y arroz cáscara remojado-extrudido.

Tabla IV.14 Evaluación físico-química de los productos extrudidos de arroz germinado.

Tabla IV.15 ANOVA para las respuestas analizadas del diseño de extrusión de arroz cáscara germinado.

Tabla IV.16 Coeficientes de regresión de la ecuación polinómica de segundo orden para las respuestas evaluadas para la extrusión del arroz cáscara germinado.

Tabla IV.17 Composición del arroz integral (desc. P.P), arroz germinado y arroz germinado-extrudido.

Tabla IV.18 Contenido de proteínas, lípidos (extracto etéreo), Fibra Dietaria Total, Cenizas, Almidón e Hidratos de Carbono disponibles.

Tabla IV.19 Digestibilidad proteica de las materias primas y sus productos de grano entero.

Tabla IV.20 Contenido de ácidos grasos de las materias primas y de las muestras procesadas por remojo y germinación.

Tabla IV.21 Absorción de agua (AA), Solubilidad (S), Intensidad de los picos característicos y Cristalinidad de las harinas de grano entero de arroz.

Tabla IV.22 Parámetros de los modelos (BET y GAB) para las isotermas de adsorción.

Tabla IV.23 Análisis por DSC del arroz integral (AI) y el arroz integral extrudido (AIE) en el rango de a_w estudiado.

Tabla IV.24 Ingesta Total, Ingesta Diaria, Ganancia de Peso y Eficiencia.

Tabla IV.25 Ciego vacío, ciego vacío relativo al peso corporal y pH del contenido cecal.

Tabla IV.26 Pesos de heces en base húmeda (b.h) y base seca (b.h), y % Agua de las heces (%).

Tabla IV.27 Contenido mineral total (CMT y CMT t60), Densidad Mineral Total t60 (DMT t60), del Fémur (F-DM t60), Columna (C-DM t60) y Tibia proximal (T-DM t60) (mg/cm²).

Tabla IV.28 Composición ósea del fémur derecho. Cenizas, Contenido Orgánico (CO), relación Cenizas/CO, Calcio, Fósforo (P) y relación Ca/P.

Tabla IV.29 Contenido de IgA en el contenido cecal

Tabla IV.30 Contenido de Triglicéridos (TG), colesterol y malondialdehído (MDA) en suero e hígado.

Tabla IV.31 Actividad de las enzimas Catalasa, Glutation Reductasa (GR) y Peroxidasa (GPx), glutati3n reducido (GSH) y oxidado (GSSG) y relaci3n GSH/GSSG en h3gado.

INDICE DE FIGURAS

Figura I.1 Pirámide Alimentaria

Figura I.2 Óvalo nutricional

Figura I.3 Mecanismos de acción del consumo de GE en enfermedades crónicas

Figura I.4 Proceso de descascarado y pulido para el arroz.

Figura I.5 Principales zonas de producción de arroz en la Argentina

Figura I.6 Estructura del grano de arroz.

Figura I.7 Estructura del Acido fítico

Figura I.8 Esquema de un extrusor monotornillo.

Figura I.9 Sistemas enzimáticos de defensa antioxidante. GSH: glutatión; GSSG: glutatión oxidado; NADP: nicotinamida adenindinucleótido-fosfato; NADPH: nicotinamida adenindinucleótido-fosfato reducido; SOD: superoxido dismutasa.

Figura III.1 Resumen de los procesos tecnológicos y productos finales obtenidos.

Figura III.2 Esquema del equipo utilizado en la determinación de AA. a) pipeta graduada, b) embudo Büchner con papel de filtro.

Figura IV.1 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y el tiempo en el contenido de P libre en el agua de remojo (P libre agua) del arroz integral.

Figura IV.2 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y el tiempo en el contenido de P del AF en el agua de remojo (P-AF agua) del arroz integral.

Figura IV.3: Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y el tiempo de remojo en el contenido del P del AF remanente en el grano (P-AF grano) de arroz integral.

Figura IV.4 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y el tiempo de remojo en el contenido de P total remanente en el arroz integral remojado.

Figura IV.5 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y el tiempo de remojo en la pérdida de sólidos del arroz integral.

Figura IV.6 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y el tiempo de remojo en la pérdida de proteínas del arroz integral.

Figura IV.7 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y el tiempo de remojo en la retención de Fe del arroz integral.

Figura IV.8 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y el tiempo de remojo en la retención de Zn del arroz integral.

Figura IV.9 Optimización del diseño experimental del remojo de arroz integral.

Figura IV.10 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y el tiempo de remojo en el contenido de P libre en el agua de remojo para arroz cáscara.

Figura IV.11 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y el tiempo de remojo de arroz cáscara en el contenido de P-AF en el agua de remojo.

Figura IV.12 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y el tiempo de remojo de arroz cáscara en las pérdidas de AF del grano.

Figura IV.13 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y el tiempo de remojo de arroz cáscara en las pérdidas de sólidos de los granos.

Figura IV.14 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y el tiempo de remojo de arroz cáscara en las pérdidas de cenizas.

Figura IV.15 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y el tiempo de remojo de arroz cáscara en las pérdidas de proteínas.

Figura IV.16 Optimización del diseño experimental del remojo de arroz cáscara.

Figura IV.17 Productos obtenidos por extrusión de la harina de arroz cáscara remojado en diferentes condiciones de humedad y temperatura.

Figura IV.18 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y la humedad en el consumo específico de energía mecánica (CEEM) del proceso de extrusión de arroz cáscara remojado.

Figura IV.19: Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y la humedad en la Expansión (E) de arroz cáscara remojado extrudido.

Figura IV.20 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y la humedad en el Volumen específico (VE) de arroz cáscara remojado extrudido.

Figura IV.21 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y la humedad en la Dureza Sensorial (DS) de arroz cáscara remojado extrudido.

Figura IV.22 Correlación entre la dureza sensorial (DS) y la dureza mecánica (DM) de productos extrudidos de arroz cáscara remojado.

Figura IV.23 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y la humedad en el contenido de polifenoles libres (PF Libres) de arroz cáscara remojado extrudido.

Figura IV.24 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y la humedad en la capacidad antioxidante (CAO) de los productos extrudidos de arroz cáscara remojado.

Figura IV.25 Relación entre los polifenoles libres (PF Libres) y la capacidad antioxidante (CAO) de los productos extrudidos de arroz cáscara remojado.

Figura IV.26 Optimización del diseño experimental correspondiente a la extrusión del arroz cáscara remojado.

Figura IV.27 Absorción de agua del arroz cáscara a diferentes temperaturas de remojo.

Figura IV.28 a: Arroz remojado 24 h a T ambiente y **b:** arroz germinado 24 h- 35 °C.

Figura IV.29 Contenido de AF de los granos luego de diferentes tiempos de germinación. (AI: Arroz integral; AR: Arroz remojado; AG24h, 36h y 48h: Arroz germinado 24, 36 y 48 h, respectivamente).

Figura IV.30 Productos obtenidos por extrusión de la harina de arroz cáscara germinado, en diferentes condiciones de humedad y temperatura.

Figura IV.31 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y la humedad en el consumo específico de energía mecánica (CEEM) del proceso de extrusión de arroz cáscara germinado.

Figura IV 32 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y la humedad de extrusión en la Expansión (E) de productos de arroz cáscara germinado.

Figura IV.33 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y la humedad en el Volumen específico (VE) de arroz cáscara germinado extrudido.

Figura IV.34 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y la humedad en la Dureza Sensorial (DS) de arroz cáscara germinado extrudido.

Figura IV.35 Correlación entre la dureza sensorial (DS) y la dureza mecánica (DM) de productos extrudidos de arroz cáscara germinado.

Figura IV.36 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y la humedad en la Absorción de Agua (AA) de arroz cáscara germinado extrudido.

Figura IV.37 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y la humedad en la Solubilidad (S) de arroz cáscara germinado extrudido.

Figura IV.38 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y la humedad en el contenido de polifenoles libres (PF Libres) de arroz cáscara germinado extrudido.

Figura IV.39 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y la humedad en la capacidad antioxidante (CAO) de los productos extrudidos de arroz cáscara germinado.

Figura IV.40 Optimización del diseño experimental correspondiente a la extrusión del arroz germinado.

Figura IV. 41 Contenido de polifenoles (PF) Libres y Ligados y capacidad antioxidante (CAO) de arroz integral descascarado en planta piloto (AC); arroz germinado 24 h (AG); arroz germinado extruido (AGE).

Figura IV.42 SDS-PAGE de los diferentes productos. Std: estándar de proteínas, arroz integral (AI), arroz integral extrudido (AIE), arroz integral descascarado P.P (AC), arroz

cáscara remojado (AR), arroz remojado extrudido (ARE), arroz germinado (AG), arroz germinado extrudido (AGE).

Figura IV.43 Contenido de lisina disponible de las materias primas de grano entero y sus productos. Arroz integral (AI), arroz integral extrudido (AIE), arroz integral descascarado P.P (AC), arroz cáscara remojado (AR), arroz remojado extrudido (ARE), arroz germinado (AG), arroz germinado extrudido (AGE).

Figura IV.44 Contenido de fibra dietaria soluble (FDS) e insoluble (FDI) correspondiente a las materias primas y sus productos de grano entero de arroz. Arroz integral (AI), arroz integral extrudido (AIE), arroz integral descascarado P.P (AC), arroz cáscara remojado (AR), arroz remojado extrudido (ARE), arroz germinado (AG), arroz germinado extrudido (AGE).

Figura IV.45 Representación del perfil de inositoles fosfatos (IP) de las materias primas y sus productos. Arroz integral (AI), arroz integral extrudido (AIE), arroz integral descascarado P.P (AC), arroz cáscara remojado (AR), arroz remojado extrudido (ARE), arroz germinado (AG), arroz germinado extrudido (AGE).

Figura IV.46 Capacidad antioxidante (CAO) de las materias primas y sus productos. Arroz integral (AI), arroz integral extrudido (AIE), arroz integral descascarado P.P (AC), arroz cáscara remojado (AR), arroz remojado extrudido (ARE), arroz germinado (AG), arroz germinado extrudido (AGE).

Figura IV.47 Polifenoles (PF) Libres y Ligados de las materias primas y sus productos. Arroz integral (AI), arroz integral extrudido (AIE), arroz integral descascarado P.P (AC), arroz cáscara remojado (AR), arroz remojado extrudido (ARE), arroz germinado (AG), arroz germinado extrudido (AGE).

Figura IV.48 Rayos X del arroz integral (AI), arroz cáscara remojado (AR), arroz germinado (AG) (líneas continuas) y arroz integral extrudido (AIE), arroz remojado extrudido (ARE), arroz germinado extrudido (AGE) (líneas de puntos).

Figura IV.49 Isotermas de adsorción para arroz integral (AI) y arroz integral extrudido (AIE) a 24 °C. Puntos experimentales y GAB (líneas).

Figura IV.50 Isotermas de adsorción a 24 °C para arroz cáscara (AC), arroz cáscara remojado (AR), arroz remojado extrudido (ARE), arroz germinado (AG) y arroz germinado extrudido (AGE); Puntos experimentales y GAB (líneas).

Figura IV.51 Termogramas correspondientes al arroz integral en el rango de a_w estudiado.

Figura IV.52 Termogramas correspondientes al arroz integral extrudido en el rango de a_w estudiado.

Figura IV.53 Peso heces (b.s) y contenido de agua de las heces (%). Dieta control (C), dieta a base de arroz integral (I), dieta a base de arroz remojado (R) extrudido, dieta a base de arroz germinado extrudido (G)

Figura IV.54 Ingesta Diaria de Ca, Excreción fecal diaria de Ca y Absorción aparente de Ca (% Ab_{ap} Ca). Dieta control (C), dieta a base de arroz integral (I), dieta a base de arroz remojado (R) extrudido, dieta a base de arroz germinado extrudido (G).

Figura IV.55 Actividad de β -Glucosidasa y β -Glucuronidasa en contenido cecal. Dieta control (C), dieta a base de arroz integral (I), dieta a base de arroz remojado (R) extrudido, dieta a base de arroz germinado extrudido (G).

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

- AA:** absorción de agua
- AAs:** Aminoácidos
- AC:** arroz cáscara
- ACV:** accidente cerebro vascular
- ADN:** ácido desoxirribonucleico
- AF:** Acido Fítico
- AG:** arroz germinado
- AGCC:** ácidos grasos de cadena corta
- AGE:** arroz germinado extrudido
- AI:** arroz integral
- AIE:** arroz integral extrudido
- AR:** arroz remojado
- ARE:** arroz remojado extrudido
- a_w:** actividad de agua
- CAA:** Código Alimentario Argentino
- CAO:** capacidad antioxidante
- CAT:** catalasa
- CEEM:** consumo específico de energía mecánica
- DM:** dureza mecánica
- DP:** digestibilidad proteica
- DS:** dureza sensorial
- DSC:** Calorimetría diferencias de barrido
- E:** expansión
- EE.UU:** Estados Unidos de América
- FAD:** flavín adenín dinucleótido
- FAO:** Food and Agriculture Organization
- FDA:** Food and Drug Administration
- FD-PF:** Fibra Dietaria-Polifenoles
- FDT:** Fibra Dietaria Total
- FI:** fibra insoluble
- FOS:** fructooligosacáridos
- FS:** fibra soluble
- FT:** fósforo total

GABA: ácido gamma-aminobutírico
GE: Grano entero
GOS: galactooligosacáridos
GPx: glutathion peroxidasa
GR: glutathion reductasa
GSH: glutathion reducido
GSH: glutatión;
GSSG: glutathion oxidado
HR: Humedad relativa
HTST: High-temperature short-time
IP: Inositol fosfato
LD: lisina disponible
LDL: low density lipoproteins (del inglés)
MDA: malondialdehído
NADP: nicotinamida adeninucleótido-fosfato
NADPH: nicotinamida adeninucleótido-fosfato reducido
NNP: nitrógeno no proteico
NT: nitrógeno total
P-AF: fósforo del ácido fítico
PF Lib: polifenoles libres
PF Lig: polifenoles ligados
PF: Polifenoles
P-Libre: fósforo libre
ROS: especies de oxígeno reactivas
S: solubilidad
SOD: superoxido dismutasa
T: Temperatura
TACC: Trigo Avena Cebada Centeno
Tg: temperatura de transición vítrea
TOS: transgalactooligosacáridos
Ts: temperatura de almacenamiento
UF: Unidades fitasa
USDA: United States Department of Health and Human Services.
VE: volumen específico

RESUMEN

El arroz constituye uno de los principales alimentos básicos de más de la mitad de la población mundial. Es el producto de la semilla de la planta *Oryza sativa L.*, cuyo fruto es una cariósida elíptica, o grano, rodeado de brácteas escamosas que forman una cáscara seca alrededor de la semilla. La producción argentina representa menos del 1% de la producción mundial (aproximadamente 1,5 millones de toneladas) y en Argentina es el tercer cereal más producido para consumo humano, luego del maíz y del trigo. En los últimos años, se han añadido recomendaciones sobre el consumo de grano entero (GE) a las directrices dietéticas generales de muchos países. Los GEs están vinculados con un menor riesgo de obesidad o aumento de peso; menor riesgo de enfermedad cardiovascular (incluyendo enfermedades coronarias, hipertensión y accidentes cerebro vasculares), mejoran la salud intestinal y disminuyen el riesgo de cáncer del intestino superior, lo que posiblemente conlleva a un menor riesgo de cáncer colo-rectal y por consiguiente, menor tasa de mortalidad. Sin embargo, los GEs contienen fitatos, principal forma de almacenamiento del fósforo en las semillas de las plantas, los cuales forman complejos con los minerales de la dieta, especialmente con el hierro y el zinc, y causan deficiencias minerales en los seres humanos. También tienen un impacto negativo sobre la utilización de las proteínas y de los lípidos. Existen diferentes técnicas de procesamiento, tales como remojo, germinación, malteado, fermentación y extrusión, que reducen el contenido de fitatos, mediante el aumento de la actividad de las fitasas presentes de forma natural en las semillas, por lixiviación en los medios o por hidrólisis.

El objetivo general de la tesis fue obtener productos e ingredientes a base de arroz entero utilizando procesos de remojo, germinación y extrusión; y estudiar el efecto de su consumo en animales de experimentación.

Para evaluar los efectos del proceso de remojo ácido en el contenido de fitatos y de nutrientes (Fe, Zn, y proteínas) del grano de arroz integral, se utilizó una metodología de superficie de respuesta con un diseño experimental factorial 3^2 . Las variables independientes fueron el tiempo (24, 36 y 48 h) y la temperatura (35, 45 y 55 °C) de remojo. Los resultados mostraron que el remojo disminuyó el contenido de fósforo total (TP) a valores de 35 a 92,4 mg/100 g en comparación con los 255 mg/100 g iniciales que contenía el arroz integral. Las pérdidas de fitatos de los granos fueron entre 86 y 91%; el fósforo correspondiente al ácido fítico remanente en los granos se encontró entre 15,1 y 24 mg/100 g. Estos resultados indicaron que el tratamiento más efectivo fue el remojo a 45 °C durante 48 h. Las pérdidas de los diferentes nutrientes fueron altas en todos los

tratamientos de remojo, alcanzando más del 50% en el caso del Fe, y más del 64% del Zn, y alrededor del 45% de proteínas. Aunque se mejoraron la digestibilidad proteica y la dializabilidad de minerales, el remojo ácido del arroz integral no se propone como un proceso útil para reducir los fitatos de granos de arroz integral, si el objetivo principal constituye la producción de un ingrediente o alimento básico para la población.

Luego se estudió una combinación de los procesos de remojo y extrusión de arroz cáscara. Se evaluaron los efectos de la temperatura (35 - 55°C) y el tiempo (24 - 48 h) de remojo en las pérdidas de ácido fítico (AF), proteínas y cenizas, utilizando un diseño factorial. El remojo del arroz cáscara a 45 °C durante 24 h permitió la reducción del 36% en el contenido de AF y bajas pérdidas de proteínas (5%). Luego, los grits de arroz cáscara remojado fueron extrudidos mediante un extrusor Brabender monotornillo. Se evaluaron los efectos de la temperatura de extrusión (160-190 °C) y humedad (14-19 g agua/100 g) sobre las características del producto utilizando la metodología de superficie de respuesta. Los valores correspondientes a las diferentes respuestas fueron: Expansión (1,64-3,28), Volumen Específico (5,68 - 11,06 cm³/g), Absorción de Agua (3,41 - 4,43 mL/g) y Solubilidad (45.44 - 66.20 g/100 g). Los compuestos fenólicos libres (PF-Lib) y la capacidad antioxidante (CAO) resultaron modificados según el tratamiento. Teniendo en cuenta las propiedades físico-químicas, el análisis de dureza sensorial (DS) y el sabor, se seleccionó como mejor condición de extrusión aquella a 160 °C-16,5% humedad para la producción a escala piloto del producto de arroz cáscara remojado extrudido. El contenido de AF se redujo desde 740,09 a 163,47 mg/100 g (alrededor del 80% menos) después de ambos procesos, resultando en una mayor bioaccesibilidad mineral y un 8,5% de disminución de la digestibilidad proteica. Ambos tratamientos fueron importantes para obtener un producto de arroz entero mejorado nutricionalmente por remoción de inhibidores de la absorción de nutrientes.

Con el fin de reducir la cantidad de AF del arroz entero y producir otro tipo de ingrediente de tipo GE, se estudió otra combinación de procesos. Se produjo un arroz germinado y se determinaron los efectos de las condiciones de extrusión en el contenido de AF y las propiedades fisicoquímicas de los productos extrudidos de GEs germinados. Las condiciones de germinación fueron de 24 h a 35 °C, con un proceso de remojo previo a temperatura ambiente durante 24 h. Este proceso produjo un porcentaje de germinación promedio del 75% y un 35% de remoción del AF. Se aplicó un diseño experimental de superficie respuesta para el estudio de la extrusión de arroz integral germinado. Las respuestas evaluadas fueron: Consumo Específico de Energía Mecánica (CEEM),

Expansión (E), Volumen Específico (VE), Dureza Sensorial (DS) y Mecánica (DM), Absorción de agua (AA), Solubilidad (S), compuestos fenólicos libres (PF-Lib) y la Capacidad Antioxidante (CAO). Los resultados de las propiedades fisicoquímicas, como la expansión, la dureza sensorial y mecánica mostraron que 175 °C y 14% de humedad fueron las condiciones más apropiadas para obtener productos expandidos y harinas precocidas basadas en el arroz germinado. Se logró un producto final germinado extrudido con alrededor del 38% menos del contenido de AF, mayor bioaccesibilidad de Fe, mayor cantidad de PF-Lib (46%) y PF-Lig (28%), y un aumento mayor al 50% en la capacidad antioxidante en comparación con el arroz entero sin tratamientos. El proceso de germinación-extrusión podría ser un método potencial para obtener productos expandidos o harinas a base de arroz integral con propiedades beneficiosas para la salud.

Se realizó una comparación entre los productos de GEs de arroz con los diferentes tratamientos, en relación a la composición, las propiedades físico-químicas y las características estructurales. Se evaluaron: el perfil electroforético de las proteínas, la lisina disponible, la digestibilidad proteica, el almidón total, la fibra dietaria, los lípidos extraíbles, el perfil de ácidos grasos, el perfil de inositoles fosfatos, la capacidad antioxidante y el contenido de polifenoles, libres y ligados. También se determinaron las propiedades de hidratación (Absorción de agua-AA y Solubilidad en agua-S), la cristalinidad, las isotermas de adsorción y la temperatura de transición vítrea (Tg) de las muestras. La composición cambió significativamente durante los procesos, el contenido de proteínas se redujo significativamente por la lixiviación durante los procesos de remojo. Los lípidos extraíbles en éter (debido a la formación de complejos con la matriz) y la fibra dietaria total se redujeron por la extrusión. La AA y la S aumentaron por el proceso de extrusión en relación a las muestras no extrudidas (5,81 - 7,47 mL/g vs. 2,47 a 3,05; y 24,1 - 53,76 vs. 3,17- 4,98 g/100 g, respectivamente), la cristalinidad se redujo (30-33 vs. 4-16%). Las isotermas de adsorción (modeladas por BET y GAB) mostraron que las muestras extrudidas tuvieron un mayor contenido de humedad de equilibrio en comparación con sus correspondientes muestras no extrudidas (5,9 - 19 vs. 4.0-16 g agua/g de sólidos). No se observaron cambios en los valores de Tg en el rango de humedad estudiados (3,8 a 16 g/100 g). Estos resultados contribuyen al conocimiento de las propiedades fisicoquímicas de los productos de GEs de arroz y brindan información para la incorporación de harinas de arroz entero con diferentes tratamientos en los alimentos.

Finalmente, se realizaron estudios *in vivo* para evaluar los efectos del consumo de los productos de grano entero con diferentes tratamientos utilizando un modelo animal en

crecimiento. Se estudiaron los efectos a nivel cecal, sobre la biodisponibilidad Ca, el perfil lipídico y el estado oxidativo. Para ello, se alimentaron ratas Wistar machos (n=32) con las dietas control (C), arroz integral extrudido (I), arroz remojado extrudido (R) y arroz germinado extrudido (G) durante 60 días (Tf). Las ratas se pesaron semanalmente y se evaluó el consumo de las dietas cada dos o tres días para determinar la eficiencia y el consumo de Ca. También se registraron las heces producidas por los animales cada 15 días y la excreción de Ca fecal, a fin de determinar la absorción aparente de Ca (%Abs_{ap} Ca). Al Tf, los animales fueron sacrificados, se retiró el ciego, se midió su peso (lleno y vacío) y el pH del contenido cecal. Se midieron el contenido mineral total (CMT y CMT t60), la densidad mineral total (DMT t60), del Fémur (F-DM t60), Columna (C-DM t60) y Tibia proximal (T-DM t60) (mg/cm²), y la composición del fémur derecho (cenizas, contenido orgánico, Ca y P). Por otra parte, se analizó el contenido de TG, colesterol y MDA a nivel sérico y hepático. Además de la actividad de las enzimas catalasa, glutatión peroxidasa y reductasa, y el contenido de GSH y GSSG a nivel hepático. Los resultados mostraron que la eficiencia de C y G fueron mayores que la de las dietas I y R (0,24 ± 0,01 para I y R vs. 0,27 y 0,29 ± 0,01 para C y G, respectivamente; *p* < 0,0001). No hubo aumento del peso del ciego por el consumo de las dietas de GE de arroz, pero se produjo una acidificación del contenido cecal. La producción promedio de las heces a lo largo de la experiencia en los animales alimentados con las dietas I, R y G fue significativamente menor que la de los animales alimentados con la dieta C, probablemente debido a una menor ingesta de las dietas de GE y a su mayor contenido de fibra fermentable. Los bajos niveles de ingesta encontrados para las dietas a base de arroz entero se tradujeron en una baja ingesta de Ca, que independientemente de su tasa de absorción, impactó en la salud ósea negativamente. De la comparación entre las dietas de GE, la dieta G resultó la mejor, ya que los animales que consumieron dicha dieta tuvieron valores de contenido y densidad mineral ósea más cercanos al control. No hubo cambios en el contenido de IgA cecal, pero la actividad de la enzima β-glucosidasa se redujo significativamente en los animales alimentados con la dieta I. En relación con el perfil lipídico y el contenido de MDA, los TG del suero y el contenido de MDA hepático se redujeron significativamente en todos los animales que consumieron las dietas de GE de arroz; sin cambios en el contenido de colesterol sérico y hepático. Los animales que consumieron la dieta I presentaron igual actividad de CAT y de GR, e igual contenido de GSH, en relación a la dieta C. Además, presentaron baja actividad de GPx y bajo contenido de GSSG. Luego, la relación GSH/GSSG aumentada indicaría un mayor estado reductor que los animales que consumieron la dieta C, lo que se traduce en un

menor nivel de MDA hepático. En cuanto a los animales que consumieron la dieta R, presentaron igual actividad de las enzimas GR y GPx hepáticas, en relación a los de la dieta C. Además, el contenido de GSH y GSSG fue igual, y por lo tanto la relación GSH/GSSG similar a la encontrada para la dieta C. Los menores niveles de actividad de CAT serían indicativos de que se estaría produciendo menos H₂O₂, lo cual podría ser confirmado por el menor contenido de MDA hepático. Por último, los animales alimentados con la dieta G presentaron igual actividad de GPx e igual contenido de GSH en relación a los animales de la dieta C. El menor contenido de GSSG en relación a la dieta C, se traduciría en una mayor relación GSH/GSSG, lo que indicaría que esta dieta provoca un mayor estado reductor. Los menores niveles de actividad de CAT y la mayor actividad de GR serían indicativos de que se estaría produciendo menos H₂O₂, y que la vía utilizada para degradarlo sería el sistema antioxidante conformado por GPx/GR. Esto sería reafirmado por el menor contenido de MDA hepático de los animales que consumieron la dieta G. Por lo tanto, la dieta a base de GE germinado ejercería un mayor efecto reductor en el estado redox general.

En conclusión, los procesos realizados con arroz entero redujeron significativamente el contenido de ácido fítico y mejoraron algunas características nutricionales, tales como la bioaccesibilidad de Fe y Zn, la capacidad antioxidante, y el contenido de compuestos fenólicos. Asimismo, estos procesos produjeron cambios en las propiedades físicas como la solubilidad y absorción de agua de los productos. Los estudios *in vivo* permitieron observar un menor consumo de dieta a base de GE concomitante con un menor consumo de Ca, lo que se tradujo en una menor biodisponibilidad del Ca de estas dietas. Por otra parte, los efectos positivos del consumo de estos productos de GE de arroz a nivel cecal, en el perfil lipídico y en el estado oxidativo, confirman algunos efectos beneficiosos para el organismo.

ABSTRACT

Rice is the main staple food for more than half of the world's population. The product is the seed of *Oryza sativa L.* The fruit is an elliptic caryopsis, or grain, surrounded by scaly bracts forming a dry husk around the seed. Argentina production in worldwide is less than 1% (about 1.5 million tons). It represents the third most-produced cereal for human consumption in Argentina's, before corn and wheat. In recent years, recommendations on whole grain consumption have been added to the overall dietary guidelines of many countries. WGs are linked to reduced risk of obesity or weight gain; reduced risk of cardiovascular disease (CVD), including coronary heart disease (CHD), hypertension, and stroke; improved gut health and decreased risk of cancers of the upper gut; perhaps reduced risk of colorectal cancer; and lower mortality rate. However, WGs contain phytates, the primary storage form of both phosphate and inositol in plant seeds, which form complexes with dietary minerals, especially iron and zinc, and causes mineral-related deficiency in humans. They also negatively impact on protein and lipid utilization. Processing techniques, such as soaking, germination, malting, fermentation and extrusion, reduce phytate content by increasing activity of naturally present phytase, by leaching into the media or by hydrolysis.

The overall objective of the thesis was to obtain products and ingredients based on whole grain rice using soaking, germination and extrusion processes; and study the effect of their consumption in experimental animals.

To evaluate the effects of acid soaking process on phytates and nutrient content (Fe, Zn, and proteins) from **brown rice** grain, a surface response methodology with a 3² factorial experimental design was used. The independent variables were time (24, 36 and 48 h) and temperature (35, 45 and 55 °C) of soaking. The results showed that soaking decreased total phosphorus (TP) in the range of 35 - 92.4 mg/100 g compared to 255 mg/100 g in brown rice. The losses of phytates in the grains were between 86 and 91%, the remnant phytic acid phosphorus in the grains being between 15.1 and 24 mg/100 g. The most effective treatment was soaking at 45 °C for 48 h. The losses of the different nutrients were high in all of the different soaking treatments, reaching 50% for Fe, more than 64% for Zn, and around 45% for proteins. Although protein digestibility and mineral dialyzability were improved, acid soaking of brown rice would not be suggested as a useful process to reduce phytates from whole rice grains, if the production of a staple food or ingredient is the main objective.

Then, a combination of soaking and extrusion processes of **rough rice** was studied. The effects of temperature (35 - 55°C) and time (24 - 48 h) of soaking treatment on phytic acid (PA), protein, and ashes losses using a factorial design were evaluated. Soaking rough rice 24 h at 45°C allow obtaining 36% reduction in PA content and low losses of proteins (5%). Then, soaked rice grits were extruded using a Brabender single screw extruder. Effects of extrusion temperature (160-190 °C) and moisture content (14-19g/100g) on product characteristics were evaluated using surface response methodology. Values corresponding to the different responses were: Expansion (1.64-3.28), Specific Volume (5.68-11.06 cm³/g), Water absorption (3.41-4.43 mL/g) and Solubility (45.44-66.20 g/100g). Total soluble phenolics and antioxidant capacity were affected according the treatment. Taking into account physicochemical properties, sensorial hardness and flavor, extrusion conditions at 160 °C-16.5% moisture were selected to obtain the extruded-soaked rice product at pilot plant scale. The content of PA was reduced from 740.09 to 163.47 mg/100g (around 80%) after both processes, resulting in a higher mineral bioaccessibility, and 8.5% decrease of protein digestibility. Both treatments were important to obtain a nutritionally improved whole rice grain product.

In order to reduce the amount of PA of whole rice grains and produce other kind of WGs ingredients, another combination of processes was studied. Germinated whole rice was produced and the effects of extrusion conditions on phytic acid (PA) content and physicochemical properties of extruded products were determined. Germination conditions were 24 h at 35 °C, with a previous soaking process at room temperature during 24 h. This process produced a 75% germination rate and germinated rice with 35% less of PA content. A surface response experimental design for studying the extrusion of germinated whole rice was applied. Specific Mechanical Energy Consumption (SMEC), Expansion (E), Sensorial Hardness (SH), Specific Volume (SV), Solubility (S), Water Absorption (WA), Free Phenolic Content (FPC) and Total Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) were evaluated. Results of physicochemical properties, like expansion, sensorial and mechanical hardness showed that 175 °C and 14% of moisture were the most appropriate conditions to obtain expanded products and precooked flours based on germinated whole rice. The final extruded germinated product has around 38% less of PA content, higher Fe bioaccessibility, higher amount of Free (46%) and Bound Phenolic (28%) content and almost 50% increase in antioxidant capacity compared with whole rice without treatments. Germination-extrusion process could be a potential method to obtain expanded products or flours based on whole rice with beneficial health properties.

A comparison among the products with different treatments, regarding composition, physicochemical properties and structural characteristics was made. Proteins electrophoresis, available lysine, proteins digestibility, total starch, dietary fiber, extractable lipids, inositol phosphates, antioxidant capacity and polyphenol content were evaluated. Hydration properties (water absorption -WA and water solubility -WS), crystallinity, adsorption isotherms and glass transition temperature (T_g) of the samples were also determined. Composition changed significantly during the processes. Protein content decreased by leaching during soaking processes. Eter extracted lipids (by complexes formed with starch matrix) and total dietary fiber were reduced by extrusion processes. WA and WS were enhanced by extrusion process related to the non extruded ones (5.81-7.47 mL/g vs. 2.47-3.05 and 24.1-53.76 vs. 3.17-4.98 g/100g, respectively), but crystallinity was decreased (30-33 vs. 4-16 %). Adsorption isotherms (fitted by BET and GAB models) showed that extruded samples exhibited higher equilibrium moisture content as compared with their corresponding non extruded samples (5.0-19 vs. 4.0-16 g water/g solids). There were no changes in T_g values in the studied moisture range (3.8 - 16 g/100g). These results contribute to the understanding of the physicochemical properties of WGs rice based products and provide information for the incorporation of whole rice flours with different treatments in foods.

In vivo studies were performed in order to evaluate the effects of consumption of whole grain rice products with different treatments on cecal changes, Ca bioavailability, lipid profile, and oxidative state using a growing animal model. Thirty-two male Wistar rats were fed with control (C), extruded whole rice (B), extruded soaked whole rice (S) and extruded germinated whole rice (G) diets for 60 days (T_f). The rats were weighed weekly and diet consumption evaluated every two or three days in order to achieve efficiency and Ca intake. Also feces produced by animals were weighed every 15 days and fecal Ca excretion was determined in order to achieve apparent Ca absorption (%Ca Abs). At T_f, animals were sacrificed, the cecum was removed, empty cecum was weight and cecal content pH was measured. Total bone mineral content (tBMC), total bone mineral density (tBMD), femur (F), spine (S) and tibia (T) bone mineral density (BMD) and right femur composition (ashes, organic content, Ca and P) were evaluated. Moreover, the content of TG and cholesterol in serum and liver, and MDA content in liver were analyzed. Also, catalase, glutation peroxidase and glutation reductase activities and, GSH and GSSG content were analyzed in liver. Results showed that efficiency of C and G were higher than that of B and S diets (0.24±0.01 for B and S diets vs. 0.27 and 0.29±0.01 for C and G

respectively; $p < 0.0001$). There was not cecal enlargement, but whole rice grain diets produced a significant acidification of the cecal content. The average production of feces along experience was the same for animals feeding with G, S and B diets, but significantly lower than C ones, probably due to the lower intake of WG diets and their higher content of fermentable fiber. Low levels of intake of WG diets resulted in a low intake of calcium, which negatively impacted on bone health. G diet was the best in comparison with the other WG diets because bones from animals consuming G diet had mineral content and density close to those consuming C diet. There were no changes on cecal IgA content, but β -glucosidase activity was significantly reduced in B diet. Regarding to lipid profile and MDA content, serum TG and hepatic MDA content were reduced by all the whole rice diets. In regards of animals fed with B diet, CAT and GR activities, and GSH content were the same as in the C ones. GPx activity and GSSG content showed lower values than C. The higher GSH/GSSG ratio than C diet would indicate a reduced state, which resulted in lower levels of hepatic MDA. In case of animals fed with S diet, GR and GPx activities in liver were the same than C diet. Also, GSH and GSSG contents were the same, so GSH/GSSG ratio did not change respect to C. Lower levels of CAT activity would be indicative that H_2O_2 production was lower, which could be confirmed by the lower MDA content in liver. Finally, animals fed with G diet showed the same GPx activity and GSH content than C. The lowest GSSG content would increase GSH/GSSG ratio, indicating that there were a reduced state. Also, lower CAT activity and higher GR activity were found, which would indicate that H_2O_2 production was lower and then, GPx/GR antioxidant system was the way for degrading it. These would be confirmed by the lower MDA found in liver of animals fed with the G diet. Therefore, the whole grain diet based on germinated rice would exert a greater reducing effect on overall redox state.

In conclusion, processes performed with whole rice significantly reduced phytic acid content and improved some nutritional characteristics, such as Fe and Zn bioavailability, antioxidant capacity and phenolic content. Also, these processes produced changes in physical properties such as solubility and water absorption of the products. *In vivo* studies allowed observing a lower consumption of WGs diet, concomitant with lower consumption of Ca, which resulted in a lower Ca bioavailability of these diets. Otherwise, positive effects on cecum, lipid profile and oxidative status confirm some beneficial effects of consumption of these whole grain rice products.

I. INTRODUCCIÓN

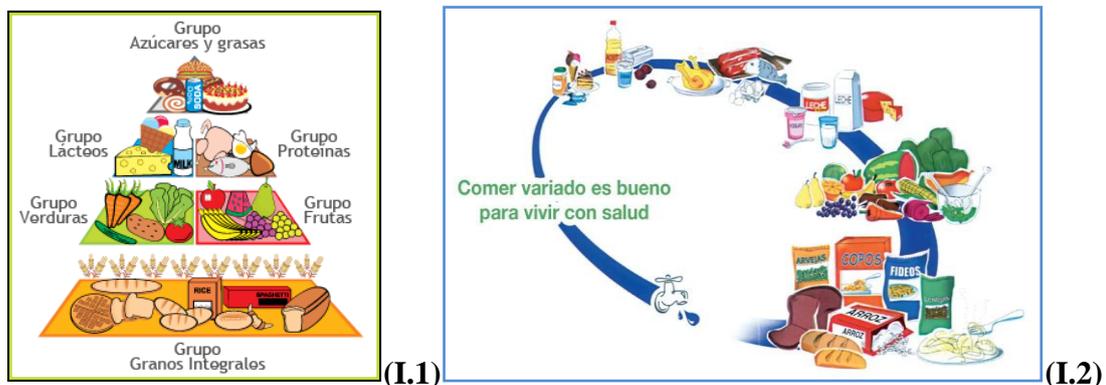
I. 1. GRANOS ENTEROS (GE)

I.1.1 Aspectos Generales, Definición y Recomendaciones

El rol principal de la dieta es suministrar los nutrientes para cumplir los requerimientos metabólicos de cada individuo, y asimismo brindar satisfacción y bienestar al consumidor a través de la alimentación diaria. En la actualidad, existen suficientes evidencias científicas para sustentar la hipótesis de que la dieta puede tener efectos fisiológicos más allá de los beneficios nutricionales aceptados (Navarro y col., 2010).

La pirámide (**Figura I.1**) y el óvalo (**Figura I.2**) representan los diferentes GRUPOS de alimentos y las CANTIDADES recomendadas para consumir diariamente. La más conocida a nivel mundial es la pirámide nutricional, de origen norteamericano.

En nuestro país se diseñó la “Gráfica de la Alimentación Saludable” (óvalo nutricional) (**Figura I.2**), la cual fue resultado de una evaluación realizada a personas de diferentes grupos etarios y profesionales, incluyendo nutricionistas. A través de la misma, la mayoría de las personas eligieron esta gráfica porque transmitía la idea de “alimentación completa, variada y proporcionada” de manera “llamativa”, “original” y “atractiva”. Según las “Guías alimentarias para la población argentina” (Guías Alimentarias para la Población Argentina, 2003), la gráfica promueve la idea de que la alimentación diaria puede ser planificada adecuadamente sin ser esquemática.



Figuras I.1 Pirámide Alimentaria y **I.2** Óvalo nutricional.

Existen determinados alimentos, dentro de los cuales se incluyen las frutas, los vegetales, los cereales enteros y la leche, que han demostrado contener componentes fisiológicamente activos que tienen propiedades promotoras de la salud y ayudan a reducir el riesgo de ciertas enfermedades crónicas como el cáncer, la diabetes, las enfermedades cardiovasculares, la obesidad, etc. (Liu, 2004).

Los **granos enteros** (GE) se definen según la “*American Association of Cereal Chemist*” (AACC, 2001) y la “*Food and Drug Administration*” (FDA) como: “las cariopsis intactas, molidas, quebradas o laminadas, cuyos componentes anatómicos principales (almidón del endospermo, germen y salvado) están en las mismas proporciones relativas a como estaban en la cariopsis intacta” (Slavin y col., 2013).

La capa de salvado exterior de los GE se compone de hidratos de carbono no digeribles, principalmente insolubles y poco fermentables (tales como celulosa, hemicelulosa, arabinosilanos, polifenoles, y otros fitonutrientes), mientras que el interior, el germen y el endospermo almidonoso, contienen proteínas, almidón, fibras solubles viscosas, oligosacáridos fermentables, almidones resistentes, ligninas, vitaminas, minerales, polifenoles, aceites y otros fitonutrientes, los cuales en su conjunto cumplen un rol en la prevención de enfermedades cardiovasculares, diabetes, algunos tipos de cáncer, y la obesidad (Jones y col., 2002; Jones, 2010; Fardet 2010; Bjorck y col., 2012; Slavin y col., 2013).

Las **recomendaciones** nutricionales constituyen las cantidades medias diarias de nutrientes esenciales (nutriente/per cápita/día), ajustadas de manera suficientemente elevada como para satisfacer las necesidades fisiológicas de casi todas las personas sanas por grupos de edad y sexo. Están destinadas a profesionales de la nutrición/salud, como patrones de referencia para diversos usos (Guías Alimentarias para la Población Argentina, 2013).

Los cereales constituyen la base de la Pirámide o Gráfica de la Alimentación Saludable (**Figuras I.1 y I.2**), y se recomienda el consumo mínimo de 6 porciones diarias (a partir de los 9 años en adelante). En 2005 el organismo internacional “*United States Department of Health and Human Services*” (USDA, 2005) estableció recomendaciones más específicas, de inclusión de 3 porciones de GE por día, dentro del consumo recomendado de 6 porciones diarias (Jones y col., 2002).

Las recomendaciones y definiciones de GE varían ampliamente de un país a otro, hasta incluso entre los organismos y las organizaciones de un mismo país. Algunos especifican sobre el consumo de cereales de tipo GE y otros no. En el caso de países de Centro y Sudamérica, como Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Ecuador, Guatemala, Panamá, El Salvador y Venezuela, no poseen este tipo de recomendaciones específicas sobre el consumo de cereales de tipo GE.

Según la FDA un alimento es categorizado a base de GE, si contiene un 51% o más de algún tipo de GE como ingrediente, sobre la base de la cantidad de referencia

consumida habitualmente (*Reference Amount Customarily Consumed, RACC*). Asimismo, aquellos alimentos que contienen como mínimo 16 g de GE/RACC son considerados con importancia nutricional debido a que aportan beneficios para la salud (Richardson, 2003).

I.1.2 GE: composición

Los GE son fuente de vitaminas, minerales, fibra dietaria, lignanos, β -glucanos, inulina, numerosos fitoquímicos, fitosterol, ácido fítico y esfingolípidos. El salvado es la multicapa protectora del germen y endospermo y contiene compuestos fenólicos, vitaminas, minerales y fibra. El endospermo, en el interior, es el componente mayoritario de los granos y contiene carbohidratos (almidón), proteínas, vitaminas y minerales. Su funcionalidad es la de proveer alimento al germen y energía al resto de la planta. Por último, el germen es el embrión del cual se forma la nueva planta y contiene vitaminas, algunas proteínas, minerales y lípidos (Slavin, 2013).

Los beneficios para la salud que presentan los GE están asociados a los compuestos denominados fitoquímicos, que constituyen un grupo de compuestos bioactivos (no nutricionales) de origen vegetal, presentes principalmente en el germen y el salvado (Butsat y Siriamornpun, 2010). A su vez, se relaciona el efecto beneficioso de estos compuestos con la complementación con otros compuestos bioactivos presentes en frutas y verduras de la dieta (Adom y Liu, 2002; Adom y col., 2005).

Los grupos más importantes de compuestos bioactivos en los GE son los compuestos fenólicos, carotenoides, vitamina E (tocotrienoles y tocoferoles), γ -oryzanol, fibra, lignina, β -glucanos, almidón resistente, inulina y otros polisacáridos, ácido fítico, etc.

Los **compuestos fenólicos** poseen acción antioxidante, como actividad más conocida y estudiada, ya que son dadores de átomos de hidrógeno y reaccionan con los radicales libres; además poseen la capacidad de quelar diversos metales y actividad antiinflamatoria. Forman parte de un grupo muy heterogéneo que comprende desde moléculas como el ácido fenólico, hasta compuestos muy polimerizados, como los taninos. En general, son productos secundarios del metabolismo de las plantas y suelen ser, en parte, los responsables del color, el aroma y el sabor de los alimentos que los contienen (Quezada, y col., 2010).

Tienen en su estructura uno o más anillos aromáticos (C_6), con uno o más grupos hidroxilos, y generalmente se los categoriza de acuerdo a su estructura química básica como ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, cumarinas, ligninas y taninos. Los más comúnmente encontrados en los GE son los ácidos fenólicos y los flavonoides. Los **ácidos**

fenólicos pueden dividirse en dos sub-grupos, los ácidos *hidroxibenzoicos* (ácido gálico, protocatequico, vanílico y siríngico), comúnmente presentes en forma ligada, formando parte de estructuras complejas como las ligninas y los taninos hidrolizables. Además, pueden encontrarse en forma de derivados de azúcares y ácidos orgánicos; los ácidos *hidroxicinámicos* (o-cumárico, p-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico) también se encuentran en forma ligada, pero ligados a componentes estructurales de la pared celular como la celulosa, la lignina y las proteínas mediante enlaces ester.

Los **GE** son ricos en ácido ferúlico, compuesto que se encuentra en gran cantidad en la capa aleurona, el pericarpio y la pared celular del embrión. Los procesos tecnológicos, como por ejemplo procesamientos térmicos, fermentación y congelamiento contribuyen a la liberación de estos ácidos fenólicos (Dewanto y col., 2002).

Los **carotenoides** presentes en los GE cumplen un rol importante en las funciones de fotosíntesis y foto protección de los tejidos de las plantas. Esta foto protección está además asociada con su actividad antioxidante en la salud (Liu, 2004). Actúan como antioxidantes en medios lipídicos de algunos sistemas biológicos, ya que tienen la habilidad de reaccionar con los radicales libres y formar productos menos reactivos. Son los responsables del color de las harinas. Los que se encuentran comúnmente en los **GE** son la luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, α y β -caroteno. Estos se encuentran distribuidos en el grano, con mayor concentración en el endospermo, a diferencia de los demás micronutrientes como minerales, elementos traza y polifenoles que se encuentran principalmente en el germen y el salvado (Fardet, 2008). En el caso del arroz integral, más precisamente en las capas externas del pericarpio, se encuentran los β -carotenos, luteína y/o licopenos (Tan y col., 2005; Lamberts y Delcour, 2008).

Vitamina E es un término general que se utiliza para describir antioxidantes liposolubles que poseen dos tipos de estructuras, los tocoferoles y los tocotrienoles. En los GE estos compuestos se encuentran principalmente en el germen del grano (Fardet, 2008). Su función más importante es la actividad antioxidante y el mantenimiento de la cubierta integral de los granos enteros.

El **γ -oryzanol** es una mezcla de compuestos formada por el ácido ferúlico y fitoesteroles. Es específicamente extraído del salvado de arroz y constituye un potente inhibidor de la formación de radicales libres catalizada por minerales (Fardet, 2008).

La **Fibra** constituye las partes y compuestos de los granos que son resistentes a la digestión en el intestino delgado y que pueden ser parcial o completamente fermentados en el intestino grueso (AACC, 2001). Los componentes principales de la fibra dietaria son la

lignina, la hemicelulosa, la celulosa y los β -glucanos. Estos compuestos, entre otros, están asociados a los efectos beneficiosos en la salud.

I.1.3 GE en la dieta: efectos beneficiosos en la Salud

En el año 2010, las Guías Alimentarias de EE.UU (*Dietary Guidelines Advisory Committee*, 2010) realizaron una revisión de la evidencia existente sobre el efecto del consumo de GE en la salud y determinaron que existen **pruebas moderadas** de que el consumo de GE puede asociarse con un riesgo menor de enfermedad cardiovascular y peso corporal más bajo; y **pruebas limitadas** de que puede asociarse a un riesgo menor de diabetes tipo 2.

A su vez, en el año 2012, la sociedad Alemana de Nutrición presentó evidencias del efecto beneficioso del consumo de GE en la salud. Determinó que existen: **pruebas convincentes** de que el consumo de GE reduce el colesterol total y LDL, **probable evidencia** de que reduce el riesgo a la diabetes tipo 2, y **posible evidencia** de que reduce el riesgo de obesidad en adultos. Sin embargo, no encontraron pruebas suficientes de que reduce el riesgo de síndrome metabólico (Hauner y col., 2012).

En los últimos años, numerosos estudios establecieron una relación inversa entre el consumo de GE y las **enfermedades cardiovasculares** por efecto de la reducción del colesterol total y LDL y de la presión sanguínea (Jacob y col., 1998; Anderson, 2003; Seal, 2006; Flight y Clifton, 2006; Fardet, 2010). Mellen y col. (2008) estimaron alrededor de un 21 % menos de riesgo cardiovascular debido al aumento del consumo de GE desde 0,2 a 2,5 porciones/día. Flint y col. (2009) también encontraron una asociación inversa entre el consumo de GE y la hipertensión en hombres, lo que contribuye a la prevención de enfermedades cardiovasculares. Tighe y col. (2010) encontraron beneficioso el consumo de 3 porciones de alimentos a base de GE de trigo y avena diariamente durante 12 semanas, en relación a la presión sanguínea, disminuyendo alrededor del 15 y 25 % la incidencia de ACV e infartos, respectivamente.

En relación al **peso corporal**, estudios epidemiológicos indican que el consumo de GE puede contribuir a conseguir y mantener un peso saludable (Giacco y col., 2011; Ye y col., 2012). Katcher y col. (2008) también encontraron que la dieta a base de GE promueve una reducción en la grasa abdominal. Una dieta de alto consumo de GE (alrededor de 3 porciones diarias) se asoció con un bajo índice de masa corporal, un menor diámetro de cintura, menor relación cintura/cadera, y menor volumen de tejido adiposo a nivel abdominal, subcutáneo y visceral. Se atribuyeron estos efectos a que los alimentos a base

de GE poseen una menor densidad energética, menor carga glicémica, reducen la secreción de insulina, producen aumento de la señal de saciedad, en comparación con cereales y alimentos a base de cereales refinados (Ye y col., 2012).

Estudios sobre la **diabetes** indicaron que el consumo de GE está asociado con una disminución de la incidencia de la diabetes tipo 2 (Ye y col., 2012). Un mayor consumo de GE puede mejorar los marcadores de riesgo de diabetes, como las medidas de insulina y glucosa en ayuno y postprandiales.

En relación al **cáncer**, estudios epidemiológicos demostraron que existe una relación inversa entre el consumo de GE y los riesgos de padecer ciertos tipos de cáncer (Hass y col., 2009). Esto se debe a que los GE contienen una amplia variedad de compuestos antioxidantes (fitoquímicos), tales como los compuestos fenólicos y carotenoides, que pueden ayudar a proteger los sistemas celulares del daño oxidativo y también pueden reducir el riesgo de enfermedades crónicas. El consumo de GE ayuda a la prevención del cáncer de colon mediante un efecto sinérgico de varios compuestos anti-mutagénicos y anti-carcinogénicos que contienen, y a través de la acción de los ácidos de cadena corta producidos por la fermentación a nivel colónico (Liu, 2004; Fardet, 2010). El cáncer de colon constituye a nivel mundial, el tercer y segundo tipo de cáncer más frecuente dentro de la población masculina y femenina, respectivamente.

Algunos estudios indicaron un efecto del consumo de GE sobre los niveles de colesterol sérico. Así, Leinonen y col. (2000) informaron que el consumo de pan de grano entero de centeno disminuyó el contenido de colesterol total y LDL en comparación con una dieta con pan de harina de trigo refinada.

La **Figura I.3** muestra los mecanismos aceptados actualmente por los que los GE protegen frente a las principales enfermedades (Fardet, 2010).

I.2. ARROZ

I.2.1. Generalidades

El arroz es el alimento básico principal de más de la mitad de la población del mundo. El producto es la semilla de *Oryza sativa L.*, un cereal de grano de la familia de las gramíneas. Es una hierba que alcanza una altura de 1-2 m cuyo fruto es una carióspside elíptica, o grano, rodeado por capas escamosas que constituyen una cáscara seca alrededor de la semilla (Burlando y Cornara, 2014).

Oryza sativa L. tiene diferentes subespecies y variedades. Su origen geográfico y el tiempo de domesticación son permanentemente discutidos. Un análisis de los

polimorfismos de los nucleótidos del ADN ha sugerido que el sur de China podría ser la principal región de domesticación (Wei y col., 2012). El cultivo puede realizarse en medios diversos, aunque se desarrolla rápidamente y con mayor vigor en un medio cálido y húmedo.

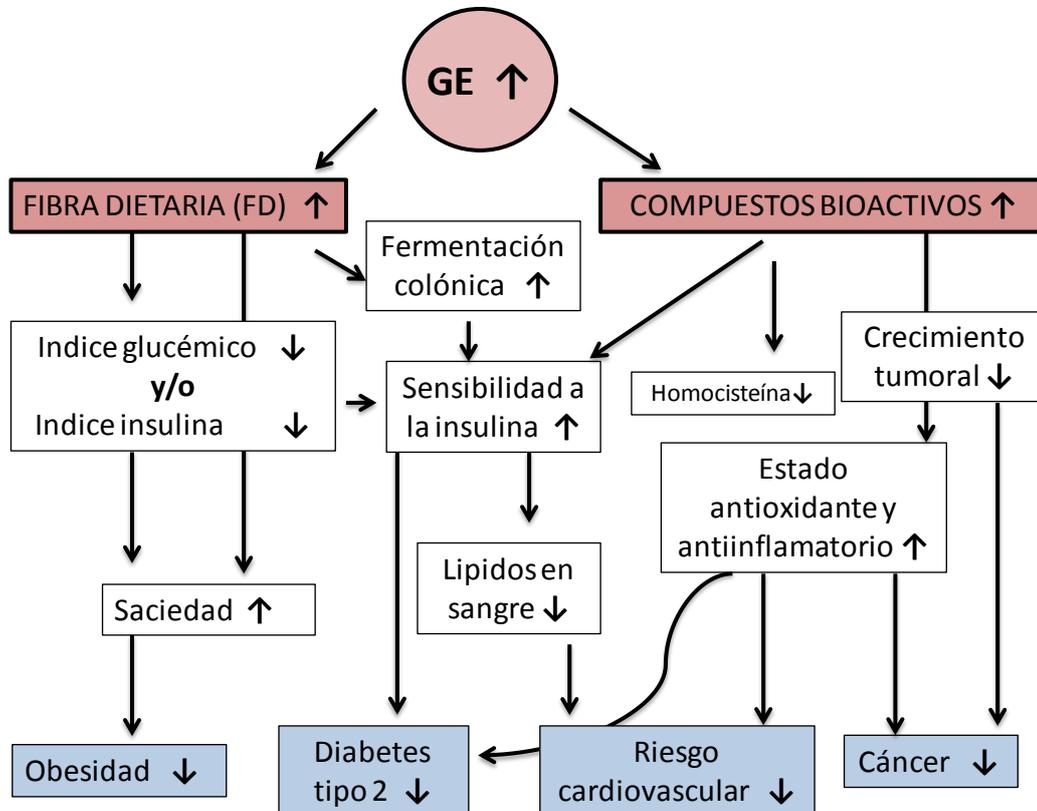


Figura I.3 Mecanismos de acción del consumo de GE en enfermedades crónicas

(Fuente: Fardet, 2010; adaptado al español)

El arroz y sus productos derivados se encuentran definidos en el Capítulo IX del Código Alimentario Argentino (CAA) “Alimentos farináceos - cereales, harinas y derivados”. El Art 647 - (Res 1547, 12.09.90) enuncia: "Se entiende por Arroz entero o Arroz integral el grano de *Oryza sativa L.* descascarado, con pericarpio, duro, seco, libre de impurezas y parásitos.

Su nutriente principal son los hidratos de carbono, contiene alrededor de un 7% de proteínas, dentro de las cuales no se encuentran las prolaminas tóxicas relacionadas con la enfermedad celíaca, y posee vitaminas y minerales que se suelen perder en gran proporción con los procesos de refinado y pulido. El arroz proporciona mayor contenido calórico y de proteínas por hectárea que el trigo y el maíz (Smith, 1998).

Es un cereal que se cosecha con cáscara y que se descascara para su consumo. A su vez, existen 3 variantes de arroz para consumo, el grano blanco o pulido, el grano blanco “parbolizado” y el grano integral. La **Figura I.4** muestra la secuencia del proceso de descascarado y pulido que se lleva a cabo para poder obtener el arroz blanco, que constituye la forma en la que tradicionalmente se consume el arroz a nivel mundial.

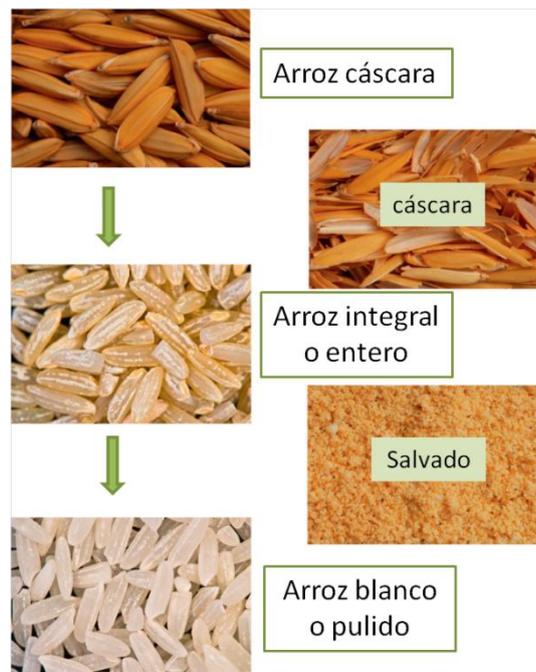


Figura I.4 Proceso de descascarado y pulido para el arroz.

Según información de la FAO a través de su base de datos *FAOSTAT* (FAO, 2014), la producción mundial de arroz cáscara durante el año 2012 (último año de actualización de los datos) fue alrededor de 719 mil millones de toneladas. El 90% de la producción se concentró en el continente asiático, siendo China el principal productor, con un 29% del volumen de arroz producido. La producción de India se encontró alrededor del 26%, a pesar de ser el país con mayor superficie de arroz sembrada en el mundo. América es el segundo continente más importante en relación a la producción mundial de arroz, con una participación de alrededor del 4% del total producido. La producción principalmente tuvo lugar en América del Sur, cuyo principal productor fue Brasil (33%), quedando Estados Unidos en segundo lugar.

El arroz es el tercer cereal más producido en la Argentina para el consumo humano, luego del maíz y del trigo. A nivel mundial, la producción de Argentina es menor al 1% (alrededor de 1,5 millones de toneladas) y está concentrada en la región del litoral,

principalmente en las provincias de Entre Ríos y Corrientes (**Figura I.5**), las cuales producen alrededor del 57 y el 33% del total producido, respectivamente; el 10% restante de la producción se reparte entre las provincias de Santa Fe, Chaco y Formosa.

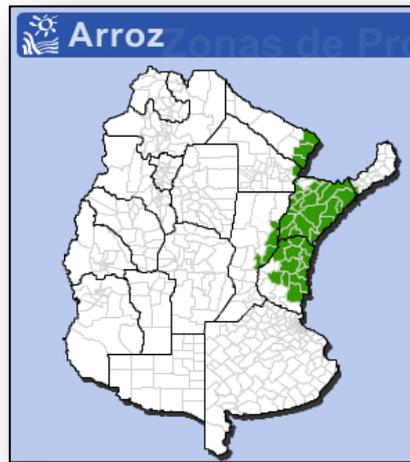


Figura I.5 Principales zonas de producción de arroz en la Argentina

I.2.2 Estructura del grano de arroz y valor nutricional

El arroz consta de la **cáscara**, formada por varias capas; el **embrión** o **germen**, situado en el lado ventral de la semilla y el **endospermo almidonoso**, que provee alimento al embrión durante la germinación (**Figura I.6**).

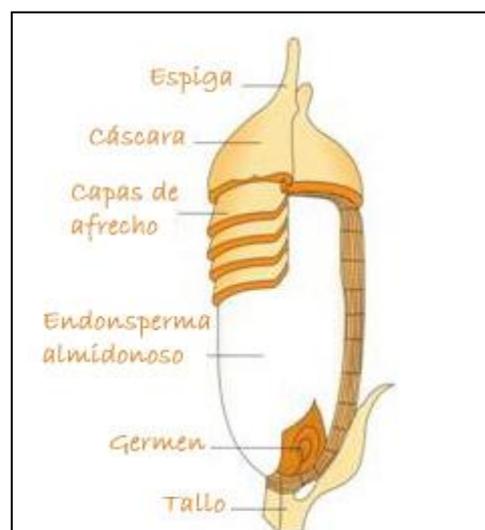


Figura I.6 Estructura del grano de arroz.

El **arroz integral** constituye el grano de arroz sin pulir, desprovisto únicamente de su cáscara protectora y conservando el salvado que rodea al grano. Es de color marrón rojizo o púrpura. En el endospermo se almacena el almidón, que en la mayoría de los

arroz comunes está constituido por amilosa (que le proporciona cohesión a los granos) y amilopectina.

La composición del arroz depende del proceso o tratamiento llevado a cabo; especialmente en lo relativo al contenido de fibra dietaria, lípidos, vitaminas y minerales. El almidón, como en el resto de los cereales, es el principal componente del arroz (70-80 %). El contenido de proteínas es algo más bajo que en el resto de los cereales (7 %), pero la lisina está presente en mayor concentración (Juliano, 1985). La digestibilidad y el valor biológico de las proteínas del arroz son mayores, y por lo tanto, la utilización neta proteica es la más alta de todos los cereales (~74%), por lo que la calidad de la proteína del arroz es superior a la de los demás cereales. El arroz se caracteriza por su contenido en vitaminas del grupo B, especialmente la B₁, pero la eliminación de las cubiertas externas produce una pérdida de alrededor del 80%. Tiene bajo contenido en sodio (5 mg/100g) y elevado contenido de potasio (100 mg/100g), por lo que se recomienda en dietas para hipertensos. El arroz, junto con el maíz, el mijo y el sorgo son cereales recomendados para la dieta de enfermos celíacos (García-Villanova Ruíz y Guerra Hernández, 2010).

I.2.3. Clasificación del arroz

En el mundo existen más de 120.000 variedades diferentes de arroz. Estas variedades se pueden dividir por tipo: arroz largo, medio y corto en función del tamaño del grano.

El Art. 649 - (Res 1547, 12.09.90) del CAA enuncia: "El arroz se clasificará de acuerdo con sus características morfológicas en los siguientes tipos:

- Tipo Largo Ancho (Doble Carolina): Corresponde a los granos de arroz cuya relación largo ancho es mayor a 2:1 y menor a 3:1, cuya longitud media es igual o mayor a 7 mm (similares a la variedad Fortuna).
- Tipo Largo Fino: Corresponde a los granos de arroz cuya relación largo ancho es mayor o igual a 3:1 y cuya longitud media es mayor o igual a 6,5 mm (similares a la variedad Blue Bonnet).
- Tipo Mediano (Mediano Carolina): Corresponde a los granos de arroz cuya relación largo ancho es mayor a 2:1 y menor a 3:1 y cuya longitud media es igual o mayor a 6,0 mm y menor a 7,0 mm (similares a la variedad Blue Rose).

- Tipo Corto (Japonés): Corresponde a los granos de arroz cuya relación largo ancho es igual o menor a 2:1 y cuya longitud media es menor a 6,9 mm (similares a la variedad Yamaní).

A su vez, teniendo en cuenta la relación amilosa/amilopectina se puede encontrar variedades con alto contenido de amilosa (mayor de 25%), medio, bajo y waxy (donde la cantidad de amilosa es prácticamente nula).

I.3. ENFERMEDAD CELÍACA

I.3.1. Definición

Puede ser definida como una enfermedad inflamatoria del intestino delgado superior (duodeno, yeyuno) en individuos susceptibles genéticamente, provocada por la ingestión de trigo, centeno, cebada, y avena, y/o los productos derivados de estos cereales. Los factores desencadenantes son las proteínas de almacenamiento de estos cereales (particularmente las prolaminas), en general denominadas proteínas del “gluten”. La teoría actualmente aceptada de esta patogénesis se basa en una respuesta primaria inmune a las proteínas del gluten como antígenos y a la transglutaminasa tisular, que ha sido identificada como un auto-antígeno. Básicamente, los pacientes con enfermedad celíaca desarrollan una mucosa intestinal plana, con ausencia de vellosidades normales, un infiltrado celular de la lámina propia y un aumento en el número de linfocitos intra-epiteliales, después de la ingestión del gluten (Wieser y Koehler, 2008).

Las características de la enfermedad y los síntomas varían de paciente en paciente, dependiendo de su severidad y alcance. Se asocia a muchos síntomas diferentes, que se pueden dividir en funciones intestinales, tales como: diarrea crónica, esteatorrea, vómitos y distensión abdominal, y en resultados de mala absorción, tales como: deficiencias de vitaminas y minerales, retraso del crecimiento y pérdida de peso. Los pacientes no tratados tienen un mayor riesgo de anemia, edema, osteoporosis, infertilidad, linfoma de células T, y otros tumores malignos.

Su detección se realiza mediante análisis de sangre no invasivos, que miden anticuerpos al gluten y transglutaminasa, pero la biopsia duodenal y la histología del tejido son los que confirman la patología (Wieser y Koehler, 2008).

Luego del diagnóstico, la abstinencia estricta de por vida de gluten es el tratamiento básico para la celiaquía. Esto significa que los productos que contienen trigo, centeno, cebada y/o avena no están permitidos. Además, la ingesta diaria de gluten no debe exceder los 20 mg. En primer lugar, se les permite ingerir una amplia gama de productos comunes

como la carne, el pescado, la leche, las frutas, y verduras. En alimentos compuestos, sin embargo, deben tener en cuenta que es difícil reconocer si están libres de gluten o no. Por otra parte, los pacientes celíacos deben ser conscientes de que numerosos alimentos contienen fuentes ocultas de gluten, como salsas, sopas, budines, o salchichas. En segundo lugar, los pacientes deben consumir alimentos dietéticos que son libres de gluten (Wieser y Koehler, 2008).

I.3.2. Alimentos libres de gluten

En el año 2004, se incorporó al CAA la definición de alimentos “libres de gluten”. **Art. 1382bis - (Res Conj. SPyRS y SAGPyA N°120 y N° 516, 19.11.03)** la cual enunciaba: “Se entiende por "alimento libre de gluten" el que está preparado únicamente con ingredientes que por su origen natural y por la aplicación de buenas prácticas de elaboración — que impidan la contaminación cruzada— no contiene prolaminas procedentes del trigo, de todas las especies de *Triticum*, como la escaña común (*Triticum spelta* L.), kamut (*Triticum polonicum* L.), de trigo duro, centeno, cebada, avena ni de sus variedades cruzadas”.

Para comprobar la condición libre de gluten, deberán utilizarse aquellas técnicas que la Autoridad Sanitaria Nacional evalúe y acepte.

Estos productos se rotulan con la denominación del producto que se trate seguido de la indicación "libre de gluten", debiendo incluir además la leyenda "Sin TACC" en las proximidades de la denominación del producto, de buen tamaño y visibilidad.

El arroz, junto con otros cereales, constituye un cereal apto para el consumo por parte de la población celíaca.

I.4. BIODISPONIBILIDAD DE MINERALES

I.4.1 Definición

La cantidad de un nutriente (proteínas, minerales, lípidos, etc.) que se encuentra en un alimento no refleja la cantidad que está disponible para la absorción y utilización en el organismo, ya que sólo una proporción del mismo es biodisponible. El término “biodisponibilidad” se utiliza para describir la proporción de un nutriente en los alimentos que puede ser utilizada para las funciones corporales normales (Parada y Aguilera, 2007).

Aunque en la mayoría de los casos la cuantificación sigue siendo dificultosa, la biodisponibilidad de un nutriente puede subdividirse en tres fases constituyentes (Watzke, 1998):

- (1) la disponibilidad de la luz intestinal para la absorción (también llamada bioaccesibilidad);
- (2) la absorción y/o la retención en el cuerpo;
- (3) utilización por el cuerpo.

I.4.2 Hierro (Fe)

I.4.2.1 Funciones del hierro en el organismo. Deficiencias

El **Hierro** es el cuarto elemento y el segundo metal más abundante de la corteza terrestre. Este elemento presenta 3 estados de oxidación: Fe^0 (hierro metálico), Fe^{+2} (ferroso) y Fe^{3+} (férrico). Pertenece a los elementos de transición, ya que tiene la capacidad de aceptar y donar electrones fácilmente, intercambiándose entre las formas férricas y ferrosas. Estos estados redox le permiten ser cofactor de enzimas, pero también le proporcionan características tóxicas cuando se encuentra en exceso. El hierro libre puede generar radicales libres a través de la reacción de Fenton, los que dañan componentes biológicos esenciales, como lípidos, proteínas y ADN (Ziegler y Filer, 1990).

En el organismo, el hierro se encuentra formando parte de dos compartimientos: uno funcional y otro de depósito. Aunque se lo requiere en muy pequeñas cantidades (miligramos), el hierro participa formando parte de la estructura de proteínas y enzimas que actúan en múltiples procesos biológicos indispensables para el funcionamiento de un organismo vivo. El 70% del hierro se encuentra en la hemoglobina, proteína que transporta el oxígeno desde los pulmones hacia los tejidos y también el dióxido de carbono, que es el producto de desecho del proceso de producción de energía en los tejidos, llevándolo a los pulmones desde donde es exhalado al aire (Martín de Portela, 1993).

La deficiencia de hierro es la carencia nutricional más importante a nivel mundial y la principal causa de anemia. Habitualmente se produce en individuos o grupos poblacionales que consumen una dieta con bajo contenido y/o pobre biodisponibilidad de hierro y que tienen un aumento de los requerimientos, debido al crecimiento, las pérdidas menstruales o el embarazo. Con menor frecuencia, la carencia de hierro es secundaria a trastornos que disminuyen la absorción de hierro o llevan a un aumento de las pérdidas de este mineral, como por ejemplo las enfermedades parasitarias. (Olivares Grohnert y col., 2010a)

El hierro está presente en los alimentos, tanto en forma inorgánica como orgánica. Durante la digestión, el hierro dietario se distribuye en dos pozos. El pozo cuantitativamente más importante es el del hierro no hemínico que comprende el hierro

presente en vegetales (cereales, hortalizas, frutas, etc.), el hierro inorgánico soluble, el hierro presente en productos lácteos y huevos y el hierro de tejidos animales que no está como hierro hemínico. El otro pozo, con diferente conducta absortiva es el correspondiente al hierro hemínico, que incluye la hemoglobina y mioglobina de las carnes rojas, de pescados y aves (Cook, 1983). Las excepciones a este modelo de pozos es el hierro dietario en la forma de ferritina, hemosiderina, óxido férrico e hidróxidos y el hierro de contaminación (por ejemplo el derivado de la molienda o el proveniente de los recipientes utilizados en la preparación de alimentos). Estas formas de hierro pueden ser significativamente menos solubles que el pozo común de hierro no hemínico y sólo la parte soluble participaría del mismo (Benito y Miller, 1998).

Se sabe que la biodisponibilidad del hierro dietario es más importante que la cantidad de hierro ingerido. En los países en vías de desarrollo, el consumo de hierro hemínico es bajo, por lo que la suficiencia del aporte de hierro dependerá del balance entre inhibidores y promotores de la absorción de hierro no hemínico.

La forma ideal de prevenir la carencia de hierro es mediante una dieta que tenga un contenido y biodisponibilidad de hierro adecuados, lo que no siempre es posible de lograr por limitaciones económicas o hábitos en el consumo muy arraigados. (Olivares Grohnert y col., 2010a).

I.4.2.2 Inhibidores de la absorción de Fe

Entre los inhibidores de la absorción de Fe se encuentra el **ácido fítico** (mio-inositol hexafosfato). La relación molar de este compuesto con el Fe puede ser usada para estimar su efecto sobre la absorción. La relación debe ser 1:1 o preferiblemente 0,4:1, a fines de mejorar significativamente la absorción del Fe en los cereales o en comidas a base de leguminosas que no contienen ningún promotor de la absorción de Fe; o una relación 6:1 en las comidas compuestas con ciertos vegetales que contienen ácido ascórbico y carne como promotores (Hurrell, 2004).

La pérdida de los grupos fosfato del mio-Inositol hexafosfato genera los derivados mio-inositol pentafofosfato, tetrafofosfato, trifosfato, difosfato y monofosfato, lo cual favorece la absorción del Fe no hemínico, debido a que se ha comprobado que los compuestos con menos de 5 grupos fosfato tienen una capacidad muy reducida para interferir con la biodisponibilidad de los minerales. Esta hidrólisis puede ser catalizada por fitasas (leudado del pan, germinación, remojo, fermentación de granos) o producida por las temperaturas de cocción de los alimentos u otros procesos (molienda, extrusión) (Hurrell y col., 2003).

Los **polifenoles y taninos** inhiben la absorción del Fe no hemínico debido a que en la luz intestinal forman complejos insolubles, es decir actúan como quelantes impidiendo que el Fe se encuentre biológicamente disponible para ser absorbido (Reddy y col., 2000; Brune y col., 1989; Uauy y col., 2002)

Algunas **proteínas**, tanto de origen animal (proteínas lácteas, albúmina bovina, proteína de huevo) como de origen vegetal (proteína de soja), ejercen un efecto inhibitorio. La industria alimentaria utiliza los aislados de proteínas de soja en la manufactura de numerosos productos, ya que se trata de una proteína de buena calidad, abundante, de bajo costo y con buena funcionalidad. Sin embargo, estas proteínas reducen marcadamente la biodisponibilidad del Fe, no sólo debido al efecto de la misma proteína, sino por el contenido de ácido fítico presente en los aislados proteicos (Hurrell y Egli, 2010).

El contenido de **calcio** de la dieta puede afectar la absorción de zinc, si la misma contiene fitatos. Esto se debe a que el calcio forma complejos con los fitatos y el zinc que son insolubles y consecuentemente no pueden ser absorbidos. Sin embargo, si la relación molar calcio: fitatos es elevada, la absorción de zinc se incrementa, como consecuencia de la competencia del calcio con el zinc por los fitatos (Lönnerdal, 2000).

I.4.2.3 Promotores de la absorción de Fe

Entre los promotores de la absorción del Fe se destaca el **ácido ascórbico**. Su efecto se atribuye a la capacidad que tiene para reducir el Fe no hemínico y mantener su solubilidad a pH neutro, aumentando la cantidad de Fe^{+2} soluble en el lumen duodenal. Otros **ácidos orgánicos** como cítrico, málico, tartárico y láctico aumentan la absorción de Fe y su presencia en diversos alimentos aumentaría la biodisponibilidad del Fe (Teucher y col., 2004).

El efecto promotor de las **proteínas musculares** (carnes rojas, pescado, cerdo, aves) en la absorción de Fe es bien conocido. Las proteínas de estos alimentos incrementan la absorción de Fe, fundamentalmente del no hemínico. Su mecanismo de acción no es claro y se lo denomina “factor cárnico”. Podría involucrar la liberación de cisteína con grupos tioles, estables en el tracto gastrointestinal, que actuarían como complejantes y reductores. También se ha postulado que otros productos peptídicos de digestión de las principales proteínas miofibrilares, o la interacción del Fe no hemínico con grupos carboxilo de los aminoácidos, que unen el Fe inorgánico incrementando su solubilidad, podrían participar en el efecto promotor de las proteínas musculares (Harvey, 2001).

Es usual que las deficiencias de **vitamina A** y de Fe coexistan en los países en vías de desarrollo y está claramente establecido que las estrategias para mejorar el estado nutricional del Fe tengan mayor efectividad cuando se realiza complementación del metal y de vitamina A. El mecanismo mediante el cual estos dos micronutrientes interaccionan no está dilucidado, sin embargo se ha postulado que esta vitamina es necesaria para la movilización de las reservas de Fe y para la reutilización del mismo durante la hematopoyesis (Bloem, 1995). Resultados experimentales de solubilidad, así como estudios de absorción en humanos muestran un papel importante de la **vitamina A** y el **β -caroteno** en la mejora de la absorción de Fe, especialmente de alimentos con un alto contenido de inhibidores, tales como los cereales, que son los alimentos básicos utilizados en los programas de fortificación para la prevención de la deficiencia de Fe (García-Casal y col., 1998).

I.4.3. Zinc (Zn)

I.4.3.1 Funciones del Zn en el organismo. Deficiencias

El **Zn** es un elemento traza importante para el ser humano, es indispensable para la actividad de numerosas enzimas y funciones corporales. Presenta dos estados de oxidación: Zn^0 (metálico) y Zn^{+2} . Este último es un fuerte aceptor de electrones y, por consiguiente, es capaz de unirse fuertemente a compuestos donantes de electrones. Por otra parte, este elemento no presenta propiedades redox, por lo que a diferencia del Fe, no es capaz de generar radicales libres (Romaña y col., 2010).

La mayor proporción del Zn corporal está contenida en el músculo esquelético (50-60%), siendo apreciable también su contenido en el hueso (25-30%, que puede llegar a 40% en el recién nacido a término) (Martín de Portela, 1993).

La esencialidad del Zn reside en sus funciones insustituibles relacionadas principalmente con sistemas enzimáticos de los procesos de división y multiplicación celular y con los sistemas metabólico-hormonales de regulación metabólica y de crecimiento. Además, está ampliamente demostrado que la deficiencia nutricional de Zn puede llevar a signos clínicos de enfermedad, los cuales mejoran al normalizarse la nutrición de este elemento (Olivares Grohnert y col., 2010b).

Las principales causas de las carencias de Zn son los depósitos reducidos al nacer (prematuridad, bajo peso de nacimiento), aportes inadecuados (deficiencia y/o baja disponibilidad), aumento de los requerimientos (crecimiento, embarazo) y pérdidas aumentadas (diarreas, parasitosis) (Gibson y col., 2008).

Las modificaciones y/o diversificaciones de la dieta, la fortificación de alimentos y la suplementación son las principales estrategias utilizadas para prevenir las deficiencias de micronutrientes.

I.4.3.2 Inhibidores y promotores de la absorción de Zn

Al igual que para el Fe, uno de los principales **inhibidores de la absorción** son los **fitatos** (O'Dell, 1969). La relación molar fitatos:Zn puede ser usada para estimar la cantidad absorbible de Zn de la dieta.

El contenido de **calcio** de la dieta puede afectar la absorción de Zn, si la misma contiene fitatos. Esto se debe a que el calcio forma complejos con los fitatos y el Zn que son insolubles y consecuentemente no pueden ser absorbidos. Sin embargo, si la relación molar calcio:fitatos es elevada, la absorción de Zn se incrementa, como consecuencia de la competencia del calcio con el Zn por los fitatos (Lönnerdal, 2000).

El **hierro** puede afectar la absorción del Zn, lo que se debería a la competición de los dos iones químicamente similares por una vía absorbiva común (Viadel y col., 2006).

Otros componentes que ejercen un efecto inhibitorio son los **oxalatos y polifenoles**, presentes en infusiones de uso común como té, café y mate (Lönnerdal, 2000).

El **tipo de proteína** y su **cantidad** tienen un efecto en la absorción de Zn. A mayor cantidad de proteína ingerida, mayor absorción de Zn. Respecto al tipo de proteína, la de origen cárnico promueve la absorción de Zn (Sandstrom y Cederblad, 1980), mientras que se ha observado que la caseína la inhibe (Lönnerdal y col., 1984).

El **procesamiento** de los alimentos influye de modo similar que con el hierro. Los procesos que tiendan a disminuir el contenido de fitatos (molienda, leudado del pan, germinación, remojo, fermentación de granos) aumentan la bioaccesibilidad del Zn.

I.5. ACIDO FITICO

I.5.1 Estructura

El **ácido fítico (AF)** (ácido myo inositol hexafosfato, IP6) (**Figura I.7**) presente en granos y semillas de cereales, legumbres, semillas oleaginosas y nueces, se forma por la esterificación del alcohol inositol cíclico con un máximo de seis grupos de ácido fosfórico, myo-inositol-cíclico-hexafosfato. Representa una reserva de fósforo y de glúcidos que son utilizados por la planta durante la germinación. Como fue mencionado más arriba, la hidrólisis del AF libera fosfatos e inositoles (IP5, IP4, IP3, IP2), siendo la enzima responsable una fosfatasa ácida denominada **fitasa**.

En el arroz, la biosíntesis de fitatos tiene lugar solamente en la capa aleurona (salvado) y en el embrión (Tanaka y col, 1976). Hayakawa (1977) observó que los inositoles polifosfatos del salvado y del embrión maduro del arroz integral se encuentran en un 91,1 % como hexafosfato (IP6), 1% como pentafosfato (IP5), y 0,9% como tetrafosfato (IP4), lo que pone de manifiesto el efecto de la hidrólisis durante la maduración, ya que sólo el fósforo inorgánico y los hexafosfatos (IP6) están presentes en el grano de arroz en desarrollo (Juliano, 1985).

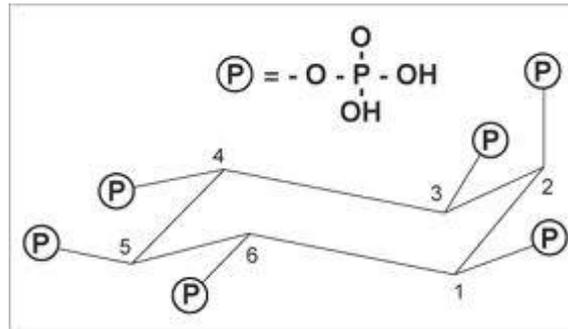


Figura I.7 Estructura del Acido fítico

Asada y col. (1969) demostraron que la cantidad de AF formado en el grano de arroz está directamente afectada por la cantidad de fósforo disponible de la planta, y postularon que el exceso de fósforo podría haber sido almacenado en forma de AF, por lo que una fortificación excesiva con fosfatos resultaría en altos niveles de fitatos (Juliano, 1985).

En cereales, el ácido fítico constituye el 64-85% del fósforo total (Ravindran y col., 1994). Los niveles de AF (g/100g) encontrados en el arroz entero (*Oryza sativa*) oscilan entre 0,86-0,99%, localizándose el 80% del fitato en la capa externa del salvado. Para el trigo (*Triticum aestivum*), la localización es similar a la del arroz, pero posee mayor contenido (1,13%). En el maíz (*Zea mays*), el AF representa del 0,77 al 0,99% y se encuentra presente casi en su totalidad en el germen (más del 90%). En el sorgo (*Sorghum vulgare*), se han encontrado valores de 0,82-0,96%, siendo mayores estos niveles de AF en las variedades coloreadas. En la cebada (*Hordeum vulgare*) y en la avena (*Avena sativa*), los niveles de AF son del 0,99% y 0,77%, respectivamente (Cheryan, 1980).

En los alimentos, el AF se encuentra cargado negativamente y tiene la capacidad de unir cationes u otros grupos funcionales de moléculas cargados positivamente. Debido a esto, los complejos que se forman no son absorbidos por el tracto gastrointestinal del

hombre, con lo cual se reduce notablemente la bio-accesibilidad de los minerales y elementos traza de la dieta.

I.5.2 Fitasas

Las Fitasas (myo-inositol (1, 2, 3, 4, 5, 6) hexaquisfosfato fosfohidrolasas) pertenecen a un grupo especial de fosfatasas capaces de hidrolizar los fitatos. Esto resulta en la formación por etapas de pentakis-myoinositol, tetrakis-, tris, bis, y monofosfatos y en la liberación de ortofosfato. Las fitasas están ampliamente distribuidas en la naturaleza: en las plantas, en ciertos tejidos animales, en microorganismos y particularmente, en hongos (Frontela y col., 2008).

Existen diferentes criterios para la clasificación de las fitasas. Basándose en su pH óptimo, las fitasas se pueden clasificar en fitasas ácidas y alcalinas. Además, si se tiene en cuenta la posición del carbono del anillo de myo-inositol en la molécula de fitato por el que la fitasa comienza el proceso de defosforilación, se clasifican en 3-fitasa, 6-fitasa y 5-fitasa (Greiner y Konietzny, 2006). No obstante, el criterio más importante para clasificar las fitasas es por su origen: vegetal, animal o microbiano.

La actividad fitasa se mide en unidades fitasa (UF), que se definen como la cantidad de fitasa que libera 1 μmol de fosfato inorgánico a partir de una disolución 1 mM de fitato de sodio por minuto a un pH de 5.5 y temperatura de 37°C.

La actividad fitásica de diferentes cereales es alta para el trigo (2078 UF/kg), centeno (5453 UF/kg) y triticale (1100 UF/kg); mediana para la cebada (925 UF/kg) y más baja para el arroz (120 UF/kg), maíz (12 UF/kg), sorgo (24 U/kg), soja (31 UF/kg) y avena (42 UF/kg) (Zimmermann y col., 2002).

La mayoría de las fitasas procedentes de cereales presentan un pH óptimo de actividad entre 4.5-5.6, mientras que las procedentes de leguminosas, presentan un pH óptimo en valores de 7 o superiores (Sandberg y Andlid, 2002).

I.5.3 Efectos de los fitatos en la biodisponibilidad de los minerales

Los fitatos en las dietas tienen un efecto negativo sobre la biodisponibilidad de algunos minerales como Fe, Zn, Ca, Mg, Mn y Cu, ya que forman complejos con ellos y hacen que no puedan ser absorbidos a través del tracto gastrointestinal. Por otra parte, el intestino carece de las enzimas fitasas y de la población microbiana (Iqbal y col., 1994).

Algunos estudios en humanos demostraron el efecto inhibitorio muy marcado de los fitatos sobre la absorción del Fe no hemínico, e incluso se demostró un efecto menor en la

absorción del Ca^{2+} (Brune y col., 1992). Además, los grupos fosfatos del inositol penta y hexafosfato pueden formar fuertes complejos de baja solubilidad con el Zn, mientras que las formas tetra y tri-fosfato no influyen significativamente (Ma y col., 2007).

Persson y col. (1998) establecieron que la capacidad de los cationes minerales para formar complejos con los fitatos *in vitro* en un rango de pH de 3-7 fue $\text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Cd}^{2+}$. La estabilidad de los complejos formados entre los minerales y los fitatos depende del pH del medio, del catión, de la relación molar fitato/catión y de la presencia de otros componentes en la solución.

I.5.4 Efectos de los fitatos sobre la digestibilidad de las proteínas

Los fitatos forman fuertes complejos con algunas proteínas que las hacen resistentes a la proteólisis. En general, las interacciones de los fitatos con las proteínas son pH dependientes (Cheryan, 1980). A valores de pH por debajo del punto isoeléctrico de la proteína los grupos fosfatos se unen con los grupos catiónicos de los aminoácidos básicos, tales como arginina, histidina, lisina, y forman complejos insolubles fitato-proteína que se solubilizan a pH por debajo de 3,5 (Cosgrove, 1966). Estos complejos pueden afectar las estructuras de las proteínas de tal forma que cambian la solubilidad proteica, obstaculizan la actividad enzimática, y afectan su digestibilidad

Estudios *in vitro* demuestran que las interacciones fitato-proteínas están gobernadas por factores como el pH, la fuente y solubilidad proteicas y los niveles de calcio y magnesio de la dieta (Kempe y col., 1999; Hill y Tyler, 1954).

Existen resultados discordantes en los experimentos *in vivo* en lo referente a ingesta de fitato y digestibilidad proteica (Anderson, 1985). La causa de estas discrepancias puede ser la diferente naturaleza de la fuente de proteínas (Carnovale y col., 1988). Otros investigadores han atribuido el efecto negativo de los fitatos en el metabolismo proteico más que a la formación de un complejo fitato-proteína a la capacidad de inhibir enzimas digestivas (Deshpande y Damodaran, 1989) (Martínez Domínguez y col., 2002).

Ensayos *in vivo* en animales de experimentación, como cerdos y aves de corral, han proporcionado información de complejos entre los fitatos y las proteínas, los cuales disminuyen la digestibilidad de las proteínas del alimento destinado para su consumo (Selle y col., 2000).

I.5.5 Efectos de los fitatos sobre la biodisponibilidad de los carbohidratos

Las dietas con fitatos reducen la respuesta de glucosa en sangre (índice glucémico o glicémico) (Lee y col., 2006). Esto se debe posiblemente a que los fitatos forman complejos con los carbohidratos de los alimentos, disminuyendo su solubilidad y digestibilidad y por lo tanto, la absorción de glucosa. Además, se ha encontrado que los complejos de fitatos con Ca^{2+} inhiben la actividad de las amilasas (Selle y col., 2000).

I.6. PROCESOS PARA MEJORAR LA BIOACCESIBILIDAD DE NUTRIENTES

A pesar del gran interés y promoción del consumo de alimentos de tipo GE, la incorporación de este tipo de alimentos en la dieta de la población se ve reducida por la falta de hábitos, sumados al inconveniente de los mayores tiempos de cocción y a la escasa variedad de productos elaborados con ellos. Incluso, muchas veces es posible encontrar algunos productos en el mercado que, tendiendo a incrementar el contenido de fibra o salvado en un alimento, descuidan su aspecto organoléptico y resultan desagradables para el consumidor (Drago y col., 2010).

La defosforilación de los fitatos es un pre-requisito para mejorar el valor nutricional de los alimentos que los contienen, ya que la remoción de los grupos fosfatos del inositol disminuye la fuerza de unión de los minerales a estos compuestos. Esto resulta en un aumento de la bioaccesibilidad de nutrientes de la dieta.

La hidrólisis de los fitatos durante el procesamiento de alimentos y preparación (como por ejemplo la germinación, el remojo, fermentación y cocción) es el resultado de la degradación por medio de la actividad de las fitasas, las cuales se encuentran naturalmente presentes en plantas y microorganismos. Sin embargo, la capacidad de eliminar los grupos fosfatos a partir de los fitatos difiere en forma significativa entre las plantas y las especies microbianas debido a diferencias en sus actividades intrínsecas (Yoshida y col., 1975).

Estudios realizados proponen que los procesos tecnológicos húmedos, como el remojo, la germinación y la fermentación son útiles para mejorar la bioaccesibilidad de los nutrientes de cereales y legumbres (Watzke, 1998; Liang y col., 2008; Kumar y col., 2010). Por lo tanto, estos procesos podrían resultar como una herramienta para la elaboración de alimentos mejorados nutricionalmente, o de ingredientes para desarrollar productos para infantes, tales como los alimentos complementarios.

I.6.1. REMOJO

En el caso de los cereales, el objetivo principal del remojo es conseguir una mayor hidratación para que se produzca la germinación. Así se consigue que se ablande la capa externa de la semilla y, al mismo tiempo, se disuelvan y se eliminen una serie de sustancias que inhiben el proceso de germinación (Doria, 2010).

Como se mencionó anteriormente, el remojo puede utilizarse como método para disminuir el contenido de ácido fítico de los granos, ya que los cereales y las legumbres contienen actividad fitásica que se activa durante el mismo, ayudando a la remoción del ácido fítico. Cereales como el centeno, trigo y cebada tienen actividades enzimáticas de las fitasas altas (1,8 a 6,9 UF (unidades fitasa)/g b.s.); mientras que el maíz, mijo, avena, arroz y sorgo contienen actividad fitásica más baja (0,1 a 0,4 UF/g b.s). Sin embargo, a diferencia de las leguminosas, durante el remojo de cereales y pseudocereales la actividad de las fitasas disminuye, lo que puede explicarse por el efecto de la lixiviación. Esto ocurre debido a la diferencia que existe en la distribución de las fitasas dentro de las legumbres y los cereales. En el caso de las legumbres, las fitasas se encuentran en el cotiledón junto con el AF, por el contrario en los cereales, se distribuyen junto con el AF en la capa de aleurona. Es por esto que se pueden esperar menores contenidos luego del remojo de cereales (Egli y col., 2002).

I.6.1.1 Condiciones de remojo

En la **Tabla I.1** se presentan diferentes metodologías de remojo utilizadas para el arroz.

I.6.1.2 Efectos del remojo en los componentes de los granos

Egli y col. (2002) demostraron pérdidas de la actividad fitasa por el remojo de varios cereales, incluyendo al arroz, lo que explicaron a través del fenómeno de lixiviación que ocurre durante el remojo. Los valores de actividad fitásica disminuyeron desde 0,19 UF/g b.s hasta 0,12 UF/g b.s. Por otra parte, las pérdidas de AF fueron alrededor del 71% del valor inicial.

Tabla I.1 Metodologías de remojo de arroz.

Referencia	Muestra	Medio de remojo	T°	pH	Tiempo
Egli y col. (2002)	100 g (arroz cáscara)	500 ml agua	25 °C	-	16 hs
Lestienne y col. (2005)	100 g de arroz cáscara (Remojo de 15 min en 300 ml de una solución de blanqueo al 1%)	300 ml agua destilada	30 °C	-	24 hs
Liang y col. (2008)	Arroz integral c/ precalentamiento seco (30 min a 100 °C)	Agua destilada 1:5 (p/v)	10 °C	5,9	7 días
		Acido (HCl 5 N)		3,5	
	Arroz integral c/ precalentamiento húmedo (1:1 (p/v) con agua desmineralizada y autoclave 10 min a 115 °C)	Agua destilada 1:5 (p/v)	10 °C	5,9	1 día
		Acido (HCl 5 N)		3,5	
Liang y col. (2009)	Arroz blanco, Arroz integral y Salvado de arroz (pre-calentamiento seco 30 min a 100 °C)	Agua destilada	10 °C	5,95	172 hs
		Buffer ácido (HAc-NaAc 1M)	10 °C	3,5	(granos) 24 hs (harina y salvado)
		Solución de Fitasa (500 U/L)	50 °C	5,5	30 min

Lestienne y col. (2005) evaluaron el contenido de Fe, Zn y AF luego del remojo. En relación al Fe y Zn obtuvieron pérdidas alrededor del 60% y del 30%, respectivamente. Los autores atribuyeron estas pérdidas al fenómeno de lixiviación, y la diferente magnitud, al hecho de que estos minerales se encuentran localizados en diferentes lugares dentro del grano y vinculados a diferentes moléculas. Por otra parte, el AF disminuyó el 17% del valor inicial luego del tratamiento.

Liang y col. (2008), cuyos estudios fueron en arroz integral, informaron una disminución del contenido de AF de alrededor del 44%, utilizando un pre-calentamiento húmedo del grano de arroz. Atribuyeron a este tratamiento previo al remojo, la mayor reducción obtenida en los niveles AF. En este estudio, la retención y solubilidad de los minerales también fue afectada por las condiciones del proceso. Las pérdidas de Zn fueron más importantes en comparación con el tratamiento de pre-calentamiento en seco. Los autores sugirieron que cuando se utiliza un pre-calentamiento seco, los granos sufren menores daños físicos, como fisuras (ó roturas); al contrario de lo que ocurre con el pre-calentamiento húmedo, el cual produce hinchamiento del grano y gelatinización. Como consecuencia, el grano hinchado permite una mejor difusión y suponen que ésta sea la principal razón de la mayor pérdida de Zn y materia seca.

Liang y col. (2009) propusieron diferenciar los efectos de las fitasas endógenas de los correspondientes a la actividad de una solución de fitasas agregada, por lo que realizaron un pre-calentamiento a fines de inactivar las fitasas endógenas. Como resultado de los tratamientos evaluados, las muestras presentaron diferentes pérdidas de materia seca, minerales y de AF. En el **arroz blanco**, el AF fue removido por todos los tratamientos de remojo por debajo del nivel de detección. Las pérdidas de materia seca variaron de 2-20%, siendo mayores en el caso del remojo con soluciones de buffer ácido, e informaron pérdidas altas de Ca (12-63%) y de Fe (9-43%), y menores pérdidas de Zn (0-38%). En el **salvado de arroz**, se removió un 92% del AF mediante remojo con solución de fitasa. El remojo en solución de buffer ácido también logró una remoción importante (50%). Las pérdidas de materia seca fueron las más altas (7-30%), en comparación con las del arroz blanco e integral. Los minerales del salvado, fracción con mayor contenido de Ca (671 mg/g), Fe (95 mg/g) y Zn (57 mg/g), dieron como resultado pérdidas 50-70% por lixiviación en el medio de remojo mediante el tratamiento con fitasas. En el **arroz integral**, se alcanzó un 75% de pérdidas de AF por remojo con solución de buffer ácido. Las pérdidas de materia seca fueron del 0,1-31%, con el máximo en el caso del remojo con solución de buffer ácido. El arroz integral presentaba un contenido dos veces más alto que

el arroz blanco en cuanto a Ca, Fe y Zn. Sin embargo los autores obtuvieron pérdidas similares a las del arroz blanco para Ca, Fe y Zn (22–62%, 31–60% y 8–50%, respectivamente) luego del remojo. A través de este estudio, los autores afirmaron que el tratamiento de remojo con fitasa fue el método más efectivo para lograr la mayor remoción del AF, ya que a su vez minimiza las pérdidas de materia seca y los minerales del grano. Asimismo, el remojo con pH ácido resultó más efectivo para la remoción del AF que la utilización de agua desmineralizada, debido a la mayor solubilidad de los fitatos en condiciones ácidas. Los investigadores atribuyeron al salvado del arroz integral las menores pérdidas de materia seca del grano integral al ser remojado en agua desmineralizada. Al contrario de lo que ocurre en el remojo con buffer ácido, en el cual las pérdidas fueron mayores, debido probablemente a la modificación de la capa más externa del salvado por las condiciones ácidas.

I.6.2. GERMINACION

La germinación es otro de los procesos comúnmente utilizados para lograr la remoción del AF de los cereales, por activación de las fitasas endógenas. Es un proceso que comienza con la captación de agua de la semilla seca, a través de un proceso llamado imbibición, y se completa cuando una parte del embrión, usualmente la radícula, se extiende para penetrar la estructura que la rodea (Doria, 2010).

En la mayoría de las semillas, el agua penetra inicialmente por el micrópilo (pequeño poro en las semillas) y la primera manifestación de la germinación exitosa es la emergencia de la radícula. Comprende tres etapas sucesivas que se superponen parcialmente:

Hidratación: la absorción de agua es el primer paso para la germinación, sin el cual el proceso no ocurre. Durante esta fase se produce una intensa absorción de agua por parte de los distintos tejidos que forman la semilla. Dicho incremento va acompañado de un aumento proporcional en la actividad respiratoria. El agua causa el hinchamiento del grano y la ruptura final de la testa.

Germinación: representa el verdadero proceso en el que se producen las transformaciones metabólicas necesarias para el completo desarrollo de la plántula. En esta fase la absorción de agua se reduce considerablemente, llegando incluso a detenerse. Se inicia la actividad enzimática y el metabolismo respiratorio, la translocación y asimilación de las reservas alimenticias en las regiones en crecimiento del embrión;

Crecimiento: es la última fase de la germinación. El crecimiento y la división celular provocan un cambio morfológico visible: la emergencia de la radícula (primera raíz durante la germinación de las semillas), y posteriormente de la plúmula (yema apical de la semilla recubierta por una hoja modificada o escama). Esta fase se caracteriza porque la absorción de agua vuelve a aumentar, así como la actividad respiratoria.

La duración de cada una de estas fases depende de ciertas propiedades de las semillas, como su contenido de compuestos hidratables y la permeabilidad de las cubiertas al agua y oxígeno. Estas fases también están afectadas por las condiciones del medio, tales como el nivel de humedad, las características y composición del sustrato, la temperatura, entre otros. Otro aspecto importante es la relación de estas fases con el metabolismo de la semilla (Doria, 2010).

I.6.2.1 Condiciones de germinación

La **Tabla I.2** muestra diferentes condiciones de germinación propuestas para arroz integral y arroz cáscara.

Tabla I.2 Metodologías de germinación de arroz.

Referencia	Muestra	Remojo	Tiempo de germinación	Condiciones de Germinación
Liang y col. (2008)	Arroz integral	24 horas (25°C)	12 h 24 h 36 h 72 h	30°C
Moongngarm y Saetung (2010)	Arroz integral	12 horas (28-30 °C)	24 horas	28-30 °C 90-95% HR
	Arroz cáscara	48 horas (T° ambiente)	48 horas	
Moongngarm y Khomphiphatkul (2011)	Arroz cáscara	2 días (T° ambiente y pH 6.6)	1-4 días	28-30 °C 90-95 % HR
Kim y col. (2012)	Arroz cáscara	15°C	3 días	-

I.6.2.2 Efectos de la germinación en los componentes de los granos

Durante el proceso de germinación la composición química del arroz cambia drásticamente ya que la actividad bioquímica produce compuestos esenciales y energía destinada a la formación de la planta. Se activan enzimas que descomponen compuestos de alto peso molecular como el almidón, polisacáridos y proteínas en compuestos tales como azúcares simples, péptidos y aminoácidos (Moongngarm y Khomphiphatkul, 2011). También se destaca el aumento de la bioaccesibilidad de nutrientes, ya que se reduce el contenido de fitatos presentes en los GE, por activación de sus fitasas endógenas. Asimismo, la actividad bioquímica que ocurre durante la germinación puede generar compuestos que poseen capacidad antioxidante, como los tocoferoles, tocotrienoles y compuestos fenólicos, lo que resulta en un aumento de esta capacidad (Moongngarm y Saetung, 2010; Moongngarm y Khomphiphatkul, 2011).

Liang y col. (2008) estudiaron el efecto de varios tratamientos (remojo, germinación y fermentación) del arroz integral sobre el contenido de Zn y AF. El remojo previo a la germinación durante 24 horas, permitió la remoción del 33% del AF. Además, la germinación fue evaluada a diferentes tiempos (12, 24, 36, 48, 72 h), resultando aquella llevada a cabo durante 72 horas a 30 °C, como la más efectiva para la disminución del AF, ya que produjo la remoción de más del 50 % del AF, sin pérdidas de Zn.

Moongngarm y Saetung (2010) realizaron germinación de arroz integral y cáscara, analizando el efecto del tratamiento sobre la composición, el contenido de compuestos bioactivos, AF, etc. Observaron una disminución de alrededor del 30 y 13% del AF para arroz cáscara e integral, respectivamente. El contenido de polifenoles aumentó por la germinación entre el 40 y 20 % para arroz cáscara e integral, respectivamente.

Moongngarm y Khomphiphatkul (2011) investigaron el tiempo de germinación, encontrando que son necesarios al menos 2 días de germinación, luego del remojo, para disminuir el AF y aumentar el contenido de compuestos bioactivos del arroz cáscara. El AF disminuyó un 7% en el proceso previo de remojo y 13,8% luego de 24 horas de germinación, llegando a un máximo de remoción de 66% tras 4 días de tratamiento. Los polifenoles aumentaron entre 40 y 66 %, luego de 2 y 4 días de germinación, respectivamente.

Kim y col. (2012) analizaron el arroz integral, cáscara y germinado, obteniendo como resultado una pérdida de AF del 40% en el arroz germinado y un aumento de compuestos bioactivos en el arroz cáscara germinado.

I.6.3. EXTRUSION

La extrusión es otro proceso que permite la degradación de compuestos no nutricionales como los fitatos. La tecnología de extrusión se destaca en la industria de alimentos como un proceso eficiente, utilizándose en el procesamiento de cereales y proteínas, tanto para alimentación humana y animal.

Inicialmente esta tecnología se desarrolló para el transporte y formado de materiales, tales como masas y pastas (Harper, 1989). Actualmente se dispone de diseños muy sofisticados desarrollados en las últimas décadas.

Una característica importante del proceso de extrusión es que es continuo y opera en un estado de equilibrio dinámico estacionario, donde las variables de entrada están equilibradas con las de salida. La cocción por extrusión ha ganado popularidad debido a distintas razones, entre las cuales se pueden mencionar (Kokini, 1992):

- Versatilidad: se pueden elaborar una amplia gama de productos, mediante la combinación de distintos ingredientes y condiciones operativas, que difícilmente puedan generarse por otros procesos.
- Realiza simultáneamente operaciones de mezclado, cocción, texturización y secado parcial, requiere de poca mano de obra y espacio para su instalación.
- Eficiente utilización de la energía, ya que el sistema opera a una humedad relativamente baja, al mismo tiempo que el producto se cocina. La baja humedad reduce la cantidad de calor requerido para cocinar y para deshidratar el producto después de la cocción.
- Desarrollo de múltiples características texturales.
- Alta calidad nutricional del producto: ya que es un proceso de alta temperatura y corto tiempo (HTST) que evita daños innecesarios en componentes sensibles como aminoácidos (AA) y permite la inactivación de ciertos factores no nutricionales, aumentando así la digestibilidad de los nutrientes.
- Ambientalmente favorable: el proceso se lleva a cabo a baja humedad, no genera efluentes que deban ser tratados.

I.6.3.1 Proceso de extrusión

La extrusión puede definirse como un proceso que involucra el transporte de un material, bajo ciertas condiciones controladas, forzándolo a pasar por una boquilla de una dada geometría. Durante este transporte se produce la cocción parcial o total de los

componentes de la mezcla. La **Figura I.8** representa el esquema que muestra las diferentes partes de un extrusor monotornillo. Este equipo permite elaborar mezclas de cereales y leguminosas pre-cocidas, aptas para formular una amplia variedad de productos (sopas cremas, papillas, snacks y texturizados de proteínas vegetales) (González y col., 2002a).

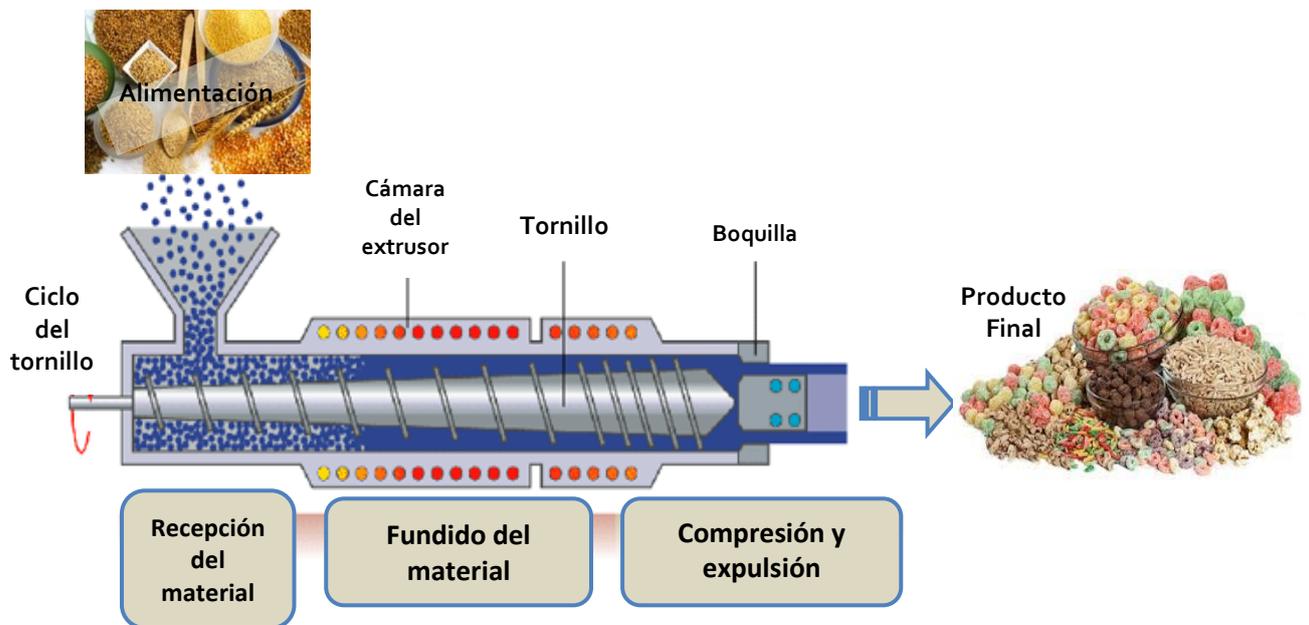


Figura I.8 Esquema de un extrusor monotornillo.

El material que es transportado dentro del extrusor puede recibir energía térmica por medio de 3 mecanismos (González y col., 1986):

- Transferencia de calor a través de las paredes del cilindro con un fluido calefactor.
- Aplicación de vapor directamente al interior del cilindro.
- Disipación de energía mecánica por fricción interna del material.

I.6.3.2 Tipos de extrusores

Existe una variedad de diseños de extrusores, pero básicamente pueden clasificarse en dos grandes tipos: monotornillo (“single screw extruder”) y doble tornillo (“twin screw extruder”). El extrusor monotornillo es el más utilizado en la industria alimentaria, pero el uso de extrusores de doble tornillo está creciendo debido a la gran flexibilidad en el control de los parámetros del proceso y las características del producto extrudido.

Los extrusores monotornillo presentan inestabilidad, ya que es un proceso manejado por fricción, mientras que los de doble tornillo son más útiles para procesos por

pasos (amasado, mezclado, etc.) y para trabajar con almidones modificados (González y col., 2002a).

Los principales factores que influyen en el proceso de extrusión son la humedad, el tamaño de partícula del material de alimentación, aceite y emulsificantes presente en el material. Las variables operativas y de diseño involucradas son: la geometría del tornillo, la velocidad del tornillo, la temperatura del cilindro, y el diámetro de la boquilla (Kokini y col., 1992).

I.6.3.3 Transformaciones del material durante la extrusión

Antes del proceso de extrusión, se lleva a cabo la humectación de las harinas que tiene por objetivo humectar el almidón para facilitar su posterior gelificación. Posteriormente, durante el proceso de extrusión, el material introducido es transportado a lo largo del extrusor y en segundos, se convierte en un fluido viscoelástico. Este fluido al salir por la boquilla se transforma en un sólido expandido. La combinación de esfuerzos de corte, temperatura y presión provoca cambios estructurales, más o menos intensos, según sean las condiciones de extrusión (Mitchell y Areas, 1992). Es importante destacar que la transformación del flujo sólido en flujo viscoso es necesaria para que se produzcan estos cambios estructurales, particularmente en el almidón. La expansión que se produce al salir por la boquilla es consecuencia de la evaporación casi instantánea del agua contenida en el material, la cual se encuentra en estado líquido a pesar de la alta temperatura ($^{\circ}\text{C}$), ya que la presión es suficientemente alta ($> 50 \text{ Kg/cm}$). El cambio de presión a la salida (presión atmosférica), ocasiona que el agua (a $T \gg$ de $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$) se vaporice (“flashing”) provocando el “arrastre” (expansión) del material viscoelástico. Las propiedades mecánicas del producto expandido, dependerán de la distribución y tamaño de los alvéolos y del espesor de su pared.

En el proceso de extrusión de cereales, el almidón es el componente que juega el papel más importante, ya que los cambios que sufre afectan la expansión y textura final del producto extrudido (Lay y Kokini, 1991). El estado final (o grado de cocción) alcanzado por el almidón, como consecuencia de las transformaciones estructurales (fusión, fragmentación y dextrinización), es muy dependiente de las condiciones de extrusión y del tipo de material empleado (tamaño y dureza de las partículas de sémola, cereal con el cual se obtuvo la sémola, etc.). Por último, según cómo se lleve a cabo la extrusión, pueden obtenerse diferentes productos. Si el proceso de extrusión se lleva a cabo a baja humedad se obtienen productos de expansión directa como los “snacks”. Mientras que si la extrusión

se realiza a alta humedad se obtienen productos tales como cereales para desayuno (González y col., 2002b).

I.6.3.4 Efectos de la extrusión en algunos componentes de los cereales

El **almidón**, como componente principal de los cereales, sufre modificaciones físico-químicas de los gránulos y sus componentes. Esto conduce a cambios reológicos y texturales y a un aumento de la digestibilidad y la disponibilidad como fuente de energía. Dependiendo de las condiciones del proceso y la composición de los alimentos, la cocción por extrusión provoca hinchamiento y ruptura de los gránulos de almidón, junto con la dextrinización de las macromoléculas que lo conforman. Además, se produce la modificación de los espectros de cristalinidad y de las endotermas (DSC), solubilidad en agua fría y reducción de la viscosidad del almidón (Cheftel, 1986).

Las **proteínas** son generalmente las más sensibles al calor y el cizallamiento, además de que pueden reaccionar con diversos componentes de los alimentos o aditivos. Estas modificaciones físico-químicas hacen que aumente su digestibilidad, ya que se produce un despliegue y/o agregación estructural cuando son sometidas a calor húmedo o cizallamiento. Esto a menudo conduce a la insolubilización y a la inactivación, cuando las moléculas nativas poseen una actividad biológica (Camire y col., 1990; Cheftel, 1986).

Asimismo, la extrusión-cocción generalmente provoca la inactivación completa de enzimas (Linko y col., 1981). Esto contribuye a la estabilidad de los alimentos extrudidos, y puede ayudar a retardar la oxidación del ácido ascórbico y de los ácidos grasos insaturados.

Dentro de los cambios químicos, la extrusión produce la disminución de la lisina disponible por la reacción de Maillard cuando se extruden cereales, dependiendo de las condiciones de temperatura y cizallamiento (Camire y col., 1990).

En relación a la **fibra dietaria**, la extrusión produce la modificación del tamaño de partícula, la solubilidad y cambios en la estructura química de los componentes de la fibra. Esto produce cambios de la degradación bacteriana en el intestino y en las propiedades fisiológicas (Cheftel, 1986).

Los **lípidos** se ven afectados en su valor nutricional durante la extrusión ya que pueden ocurrir fenómenos de oxidación, hidrogenación, isomerización o polimerización durante el proceso (Camire y col., 1990).

I.6.4 CARACTERIZACIÓN DE PROPIEDADES FÍSICAS

Para explicar el comportamiento de los componentes de los alimentos durante el procesamiento y almacenamiento, el alimento debe ser considerado como un sistema natural plastificado por el agua (Matveev y col., 2000). Esta interpretación proporciona una manera de caracterizar físicamente el sistema y poder determinar las condiciones de almacenamiento seguras para cada alimento.

Las transiciones de fase de los materiales conllevan variaciones importantes en las propiedades físicas (térmicas, mecánicas, etc.) del sistema y en la cinética de los posibles fenómenos (reacciones, transporte, etc.) ocurridos en el mismo, como consecuencia de los cambios en la movilidad molecular asociados a la transición. Los estados vítreos y gomosos son estados de no equilibrio, lo que significa que pueden evolucionar con el tiempo; por lo que se pudo observar que la máxima estabilidad se refiere a que ciertas reacciones de deterioro de los alimentos ocurran de manera lenta, y esto se logra manteniendo el producto por debajo de su temperatura de transición vítrea (T_g) (Huang, 1999).

El concepto de transición vítrea apareció como una herramienta poderosa para la comprensión de los mecanismos de los procesos que controlan la vida útil de los alimentos. Por lo tanto, la temperatura de transición vítrea (T_g) podría ser tomada como una temperatura de referencia, por lo que, a la temperatura de almacenamiento (T_s) menor que la T_g , la movilidad molecular está restringida y el alimento es estable y en T_s más altas que la T_g , la inestabilidad del proceso (físico, biológico y químico) estaría controlada por la diferencia ($T_s - T_g$) (Le Meste y col., 2002).

Las isothermas de sorción de agua son otra herramienta útil para predecir el comportamiento de los alimentos durante su almacenamiento, ya que consiste en una forma de analizar el grado de interacción del agua con el alimento. Se relaciona, a una temperatura constante, el contenido de humedad de equilibrio con la actividad termodinámica del agua. Puede dividirse en tres intervalos en función de la a_w : agua fuertemente ligada correspondiente a una a_w de 0,2-0,3 o inferior, agua moderadamente ligada ($a_w = 0,3-0,7$) y agua poco ligada correspondiente a una a_w de 0,7-0,8 y superior (Martínez-Navarrete y col., 1998).

I.7 ESTUDIO DEL EFECTO DEL CONSUMO DE GRANO ENTERO EN ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Como se mencionó anteriormente, el consumo de una dieta que incluya GE puede prevenir ciertas enfermedades crónicas. Este efecto se atribuye principalmente a la fibra, micronutrientes y fitoquímicos que se encuentran en los GE (Raninen y col., 2011).

I.7.1 Fibra

En el año 2001, la *American Association of Cereal Chemist* (AACC) difundió el concepto de fibra dietaria: “La fibra dietaria es la parte comestible de las plantas o carbohidratos análogos que son resistentes a la digestión y absorción en el intestino delgado, con completa o parcial fermentación en el intestino grueso. La fibra dietaria incluye polisacáridos, oligosacáridos, lignina, y sustancias asociadas (polifenoles, cutina, suberina, etc.). La fibra promueve efectos fisiológicos, tales como laxante, atenúa los niveles del colesterol en sangre y ayuda a controlar la glucemia” (AACC *Dietary Fiber Technical Committe*, 2001).

El CAA hace la siguiente definición “Se entiende por Fibra Alimentaria a cualquier material comestible que no sea hidrolizado por las enzimas endógenas del tracto digestivo humano. Incluye polisacáridos no almidón, pectinas, almidón resistente, inulina, oligofruktosa, polidextrosa, maltodextrinas resistentes, fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS), transgalactooligosacáridos (TOS), y todos los que en el futuro incorpore la Autoridad Sanitaria Nacional” (CAA Artículo 1385 - Resolución Conjunta SPReI N°95/2008 y SAGPyA N° 358/2008).

Las fibras se suelen clasificar en función de sus propiedades, que son responsables de la mayoría de sus beneficios fisiológicos: capacidad de fermentabilidad y comportamiento en contacto con el agua.

Respecto a la **fermentabilidad**, la fibra llega al intestino grueso de forma inalterada. Las bacterias del colon, con sus numerosas enzimas de gran actividad metabólica, pueden digerir en mayor o menor medida la fibra, dependiendo de su composición química y su estructura.

El ciego es un receptáculo donde se almacenan las heces durante un cierto tiempo y donde las bacterias intestinales degradan la fibra consumida, así como los carbohidratos solubles mal absorbidos en el intestino delgado y los carbohidratos endógenos, como las

mucinas y las glucoproteínas del intestino grueso. Estas reacciones son tan intensas que el valor del pH desciende bruscamente de 7-7,5 a 6-6,5 y la temperatura sube aproximadamente 0,7 °C (Redondo, 2002). Las moléculas complejas son desdobladas a hexosas, pentosas y alcoholes que ya no pueden ser absorbidos en el intestino grueso, sirviendo de sustrato a otras colonias bacterianas que la degradan a hidrógeno, metano y dióxido de carbono, responsables de cierto grado de flatulencia, ácido láctico y especialmente, ácidos grasos de cadena corta (AGCC) (Cummings y Branch, 1986). En estos procesos se produce una gran cantidad de energía que es aprovechada por las bacterias que realizan esta fermentación. Es importante tener en cuenta que la degradación parcial o total de la fibra en el colon no sólo depende del tipo de ésta, sino también de la velocidad con que se realiza el tránsito a lo largo del mismo; en el caso de un tránsito rápido, la cuota de degradación es más pequeña que si acontece de forma lenta (El Oufir y col., 2000).

En relación a la **solubilidad**, el comportamiento de las distintas fibras en relación con el agua es muy diverso y depende de muchos factores (Mateu, 2004), entre los que se pueden señalar la prevalencia de grupos hidroxilo y carboxilo, y la estructura tridimensional. Los grupos hidroxilo presentes en la fibra establecen puentes de hidrógenos con las moléculas de agua; los grupos carboxílicos, a través de interacciones iónicas más fuertes, se unen con iones metálicos y éstos a su vez con el agua. Esta unión además favorecerá la orientación de las moléculas de agua. En tercer lugar, la presencia de la estructura tridimensional de los polímeros, lineal o ramificada, permite la acumulación de agua en la matriz de la fibra.

Las fibras solubles (FS) en contacto con el agua forman un retículo donde ésta queda atrapada, originando soluciones de gran viscosidad. Son fibras con elevada capacidad para retener agua. La capacidad gelificante es la responsables de muchos de los efectos fisiológicos de la fibra, como la disminución de la glucemia postprandial y de los niveles plasmáticos de colesterol (Mateu, 2004). Las fibras insolubles (FI) se caracterizan por su escasa capacidad para formar soluciones viscosas. Estas fibras pueden retener agua, aunque esta capacidad es siempre menor que en el caso de las FS.

I.7.2 GE y la Fibra

La fibra proveniente de cereales es químicamente heterogénea, tiene fracciones insolubles (FI) y solubles (FS). Por un lado, la FS (arabinoxilanos solubles y β -glucanos) puede reducir el colesterol plasmático y la respuesta glucémica postprandial. La FI

(celulosa y arabinosilanos) puede aumentar la velocidad del tránsito intestinal y el volumen de las heces, disminuyendo el contacto entre los carcinógenos y las células epiteliales de colon (Raninen y col., 2011).

La fermentación de la fibra por otro lado, también puede producir cantidades significativas de butirato (AGCC), que protege a las células epiteliales contra la carcinogénesis (Fardet y col., 2007; Fardet, 2008; Topping y Clifton, 2001). A su vez, dicha fermentación disminuye el pH colónico por los ácidos orgánicos generados, efecto asociado a un aumento de la absorción del calcio (Roberfroid, 2005).

I.7.3 Efecto del consumo de fibra en la salud

Se han descrito numerosas funciones beneficiosas del consumo de fibra, como el control de la obesidad, el metabolismo lipídico y glucídico. En este caso, se describirán aquellas funciones beneficiosas que se atribuyen al consumo de alimentos de GE.

I.7.3.1 Efecto sobre la glucosa y lípidos en sangre

Las fibras pueden modificar el metabolismo de la glucosa al disminuir la carga glucémica de un alimento, o interfiriendo en la liberación y absorción de la glucosa en el intestino delgado. La FS está especialmente relacionada con una absorción atenuada de glucosa (Dikeman y Fahey 2006), pero a su vez también se encontró que la FI de los cereales mejora la sensibilidad a la insulina (Weickert y col, 2006).

Las FS ejercen un efecto en el metabolismo de los lípidos, de tipo hipocolesterolémico. Esto fue comprobado por Jenkins y col. (2000), que realizaron un estudio en sujetos con hipercolesterolemia y obtuvieron como resultado una reducción del colesterol sérico de alrededor del 5-10% con una dosis de 5-10 g de FS. Por otro lado, la FI en este mismo estudio no demostró efecto alguno en el metabolismo lipídico.

I.7.3.2 Efectos sobre la función intestinal

La fibra dietaria influye en la función intestinal aumentando el volumen y el peso fecal (“bulking effect”), mejorando la consistencia de las heces, disminuyendo el tiempo de tránsito, y aumentando la frecuencia de excreción de las heces. Todo esto contribuye a una correcta excreción y a la prevención de trastornos gastrointestinales (Van Loo y col., 2002).

El efecto del aumento del volumen de las heces se debe principalmente a la fibra no fermentable. Asimismo, la fibra fermentable puede aumentar la masa bacteriana, y por

consiguiente aumentar la frecuencia y el peso de las heces. Esto fue demostrado en estudios realizados en humanos que consumieron 11-20 g/día de fibra proveniente de GE durante 4 semanas y lograron disminuir el tiempo de tránsito intestinal, aumentar la frecuencia de excreción y el peso de las heces, e incluso mejorar la consistencia de las heces. Además, no se observaron desórdenes del tracto gastrointestinal (Bird y col., 2008; McIntosh y col., 2003).

I.7.3.3 Fermentabilidad de la fibra y efectos sobre la microbiota

La fermentación de la fibra por la microbiota presente, en condiciones anaeróbicas, conduce a la producción de AGCC (como acetato, propionato y butirato). La fibra proveniente de los cereales se fermenta a lo largo de todo el intestino, y su lenta tasa de fermentación también contribuye a una liberación continua de compuestos antioxidantes asociados en el torrente sanguíneo, tales como el ácido ferúlico (Vitaglione y col., 2008).

Los metabolitos derivados de la fermentación microbiana, como los ácidos orgánicos mencionados anteriormente y secreciones del huésped, afectan el pH en el intestino grueso, lo que resulta en un cambio hacia un pH más ácido, inhibiendo de este modo el crecimiento de bacterias patógenas (Paturi y col., 2012).

La microflora intestinal comprende un complejo ecosistema con una gran variedad de bacterias. Esta flora compleja puede producir tanto efectos negativos, como positivos en el huésped, mejorando su salud (Cumming y MacFarlane, 1991; Cumming, 1997). Muchos factores como el medio ambiente, la dieta y el pH del medio intestinal son los responsables del tipo de población bacteriana y de la actividad metabólica en el tracto gastrointestinal (Gorbach y Goldin, 1990). La microflora colónica demostró que posee un rango amplio de actividad metabólica, y como consecuencia, produce sustancias carcinogénicas, genotóxicas, promotoras de tumores y con actividad anticancerígena en el intestino grueso (Goldin, 1986; Goldin 1990; Marteau y col., 1990).

Por otra parte, existen evidencias de que la producción de enzimas bacterianas con importancia toxicológica, como la β -glucosidasa, β -glucuronidasa, azorreductasa, y nitrorreductasa, puede estar influenciada por el consumo de diferentes tipos de fibra dietaria (Mallet y col., 1986). La importancia de las actividades de la β -glucosidasa y β -glucuronidasa radica en su función para desconjugar compuestos endógenos o exógenos (fármacos no polares, nutrientes, contaminantes, etc.). La actividad de la β -glucuronidasa antagoniza con el metabolismo hepático hidrolizando conjugados biliares, y retrasando su excreción. Además, en estudios experimentales, se asociaron una incrementada incidencia

de tumores colo-rectales con altos niveles de actividad β -glucuronidasa. (Brady y col., 2000).

I.7.3.4 GE y Estrés oxidativo

En el transcurso del metabolismo celular y durante la respiración celular se forman radicales libres o especies de oxígeno reactivas (ROS). Los radicales libres tienen alta reactividad y tendencia a donar oxígeno a otras sustancias blanco, por lo que son considerados oxidantes. También se originan a partir de fuentes exógenas como los contaminantes del aire, gases (ozono), radiaciones ionizantes y no ionizantes, químicos, drogas y toxinas, bacterias y virus. Si los radicales libres no son inactivados, pueden dañar a macromoléculas celulares como el ADN, las proteínas y los ácidos grasos poliinsaturados presentes en las membranas plasmáticas y organelas (Martínez-Sánchez, 2005; Cayuela, 2010).

El término **antioxidante** ha sido definido como cualquier sustancia que retrasa o inhibe el daño oxidativo en una molécula blanco. Los antioxidantes neutralizan los radicales libres al donarles electrones. El balance que debe existir en el organismo entre los pro-oxidantes y antioxidantes tiene importancia para la salud, ya que el estrés oxidativo o la pérdida de este balance se correlaciona con muchas enfermedades, como la aterosclerosis, neoplasias, diabetes, Parkinson, enfermedad de Alzheimer, cataratas, enfermedades inflamatorias crónicas del tracto gastrointestinal, asma, etc. (Nelina, 2005).

La actividad antioxidante de los GE se asocia principalmente a los polifenoles (PF), y en particular a los ácido fenólicos, la mayoría de los cuales se encuentran asociados a la fibra dietaria (FD) a través de enlaces ester, constituyendo lo que se denomina complejo “fibra dietaria-polifenoles” (FD-PF). Existen estudios que comprueban esta afirmación, indicando que los efectos son producidos por una liberación lenta y continua en el torrente sanguíneo de los compuestos fenólicos asociados a la fibra (Saura-Calixto y col., 2007; Vitaglione y col., 2008).

Los beneficios para la salud de la FD-PF dependen de su biodisponibilidad y esto depende principalmente de la actividad intestinal. El intestino delgado es el primer sitio de absorción de los PF después de la escisión del enlace ester por las esterases intestinales; también puede producirse la glucuronidación de los PF a nivel de la mucosa intestinal. La parte de FD-PF que llega al colon se convierte en el sustrato de hidrolasas bacterianas de polisacáridos (xilanasas, β -glucanasas, etc). Las bifidobacterias y los lactobacilos son particularmente eficientes en la degradación de polisacáridos solubles, lo que justifica el

efecto prebiótico de esta fracción. Mientras que la microbiota intestinal utiliza la fibra fermentable, los oligosacáridos con ácido ferúlico producidos por su acción se convierten en un buen sustrato para las esterasas bacterianas, que provocan la liberación lenta y continua de los PF. Una vez libres en la luz intestinal, los PF pueden pasar a la mucosa del colon, ser absorbidos y pasar al torrente sanguíneo. A través de la vena porta, los PF llegan al hígado donde se metabolizan principalmente como PF-glucurónidos, y en menor medida, como compuestos sulfatados y metilados. Los metabolitos de los PF se recuperan también en la LDL, reduciendo potencialmente su oxidabilidad *in vivo*. De esta manera, los PF (libres o metabolizados) lenta y continuamente presentes en el torrente sanguíneo pueden llegar a todos los tejidos y órganos. Por todo esto, el destino metabólico de la FD-PF a partir del consumo regular de cereales de tipo GE en la dieta, permite una protección continua frente a las enfermedades cardiovasculares y todas aquellas patologías cuya etiología y progresión se rige principalmente por el estado redox desequilibrado (Vitaglione y col., 2008).

I.7.3.4.1 Sistemas de defensa antioxidante: primarios y secundarios

Para contrarrestar el efecto perjudicial de los radicales libres de oxígeno, los sistemas biológicos poseen una gran diversidad de sustancias, de naturaleza enzimática y no enzimática, que constituyen los denominados sistemas de defensa antioxidante. Estos sistemas de defensa antioxidante funcionan muy eficientemente de forma coordinada y su misión es proteger la homeostasis celular frente a la alteración oxidativa causada por los radicales libres y otras especies reactivas originadas durante el metabolismo del oxígeno.

Entre los sistemas de defensa antioxidante se distinguen los sistemas de defensa antioxidante primarios o preventivos, y los sistemas de defensa secundarios o rompedores de cadena. Las defensas primarias interactúan con los radicales libres generados directamente del O₂, y de esta manera, disminuyen la velocidad inicial de las reacciones de los radicales libres. Por su parte, las defensas secundarias atrapan los radicales propagados, deteniendo su efecto nocivo en las etapas iniciales (Cayuela, 2010).

Sistemas de defensa antioxidante primarios

A. Enzimas

Existen diversas enzimas cuya función primaria es disminuir las concentraciones intracelulares e intercelulares de las especies reactivas de oxígeno. Entre ellas se encuentran las superóxido dismutasas, la catalasa, la glutatión peroxidasa, la glutatión

reductasa, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, etc. La **Figura I.9** resume la acción de estas enzimas intracelulares.

Superoxido dismutasas (SOD)

Las superoxido dismutasas son una familia de metaloenzimas que catalizan la dismutación del $O_2^{\bullet-}$ para producir H_2O_2 y O_2 . Estas enzimas tienen una variedad de grupos prostéticos y se clasifican en función de éstos.

La actividad de las SOD varía entre los tejidos. En general, se han encontrado los niveles más altos en hígado, glándulas suprarrenales, riñón y bazo. Estas enzimas se regulan en función de la oxigenación de los tejidos en los que se encuentran, la cual afecta a la síntesis de la proteína. La inducción de las SOD también ocurre cuando hay una sobreproducción de $O_2^{\bullet-}$.

Un exceso de SOD no acompañado por la actividad de la Catalasa puede ser perjudicial para el organismo, puesto que el peróxido de hidrógeno se acumula.

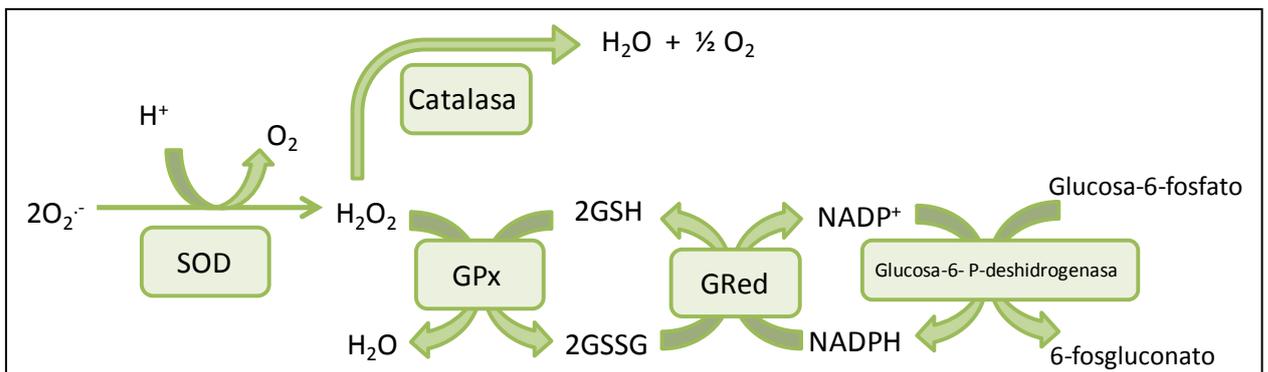


Figura I.9 Sistemas enzimáticos de defensa antioxidante. GSH: glutatión; GSSG: glutatión oxidado; NADP: nicotinamida adeninucleótido-fosfato; NADPH: nicotinamida adeninucleótido-fosfato reducido; SOD: superoxido dismutasa. Fuente: Cayuela, 2010.

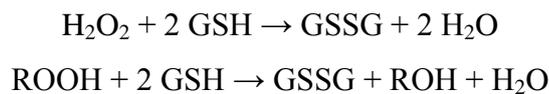
Catalasa (CAT)

La catalasa es una hemoproteína que cataliza la reducción del H_2O_2 a H_2O y O_2 ($2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O$ y O_2). Esta enzima tiene constantes de velocidad relativamente elevadas, pero su afinidad es baja; de ahí que su papel resulte fundamental en condiciones de elevadas concentraciones de peróxido de hidrógeno. La mayoría de las células contienen catalasa, aunque en animales abunda en el hígado, el riñón y en los eritrocitos. En cuanto a su localización sub-celular, la actividad catalasa de las células eucarióticas se localiza

fundamentalmente en los peroxisomas, orgánulos que contienen muchas de las enzimas generadoras de H₂O₂ de las células aerobias.

Glutación peroxidasa dependiente de Se (SeGSHpx)

La enzima glutación peroxidasa dependiente de Selenio (SeGSHpx) pertenece a la familia de las peroxidases que cataliza la reducción del H₂O₂ y de hidroperóxidos orgánicos empleando el glutación (GSH) como co-sustrato, el cual se oxida pasando a glutación oxidado (GSSG).



La SeGSHpx es una proteína tetramérica de peso molecular 85 kD que contiene cuatro átomos de Se unidos como selenocisteína, los cuales le confieren actividad catalítica. A diferencia de la catalasa, la SeGSHpx tiene una elevada afinidad por su sustrato, pero baja actividad catalítica. Esta enzima está localizada fundamentalmente en el citosol de las células eucarióticas, aunque también puede encontrarse en las mitocondrias.

En cuanto a su distribución en los tejidos humanos, hay una gran heterogeneidad, aunque la actividad más alta se encuentra en hígado. Esta enzima se regula por una variedad de estímulos ambientales, especialmente el suplemento de Se en la dieta.

Glutación reductasa (GR)

La SeGSHpx tiene un requerimiento absoluto de GSH para funcionar. La principal enzima responsable de mantener elevada la relación GSH/GSSG es la glutación reductasa (GR). Esta enzima cataliza la reducción del glutación oxidado utilizando equivalente redox en forma de NADPH (GSSG + NADPH + H⁺ → 2 GSH + NADP⁺).

Esta proteína enzimática de peso molecular 120 kD contiene dos subunidades, cada una de ellas con un grupo FAD en su centro activo. Su localización es citosólica y mitocondrial.

La distribución tisular de la glutación reductasa es similar a la de la SeGSHpx.

Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

Las actividades de la SeGSHpx y de la GR están acopladas a la producción de NADPH por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en la vía de las pentosas-fosfato (metabolismo de los Hidratos de Carbono)



La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa humana de los eritrocitos está en equilibrio entre el tetrámero de 210 kK y el dímero de 105 kD. Esta enzima se inhibe en presencia de quelantes de metales.

B. Secuestradores no enzimáticos

Además de las enzimas descritas anteriormente, existe otra línea de defensa antioxidante que funciona sin intervención enzimática, secuestrando los radicales libres que escapan de las enzimas antioxidantes. Dentro de este grupo de secuestradores no enzimáticos se encuentran diversas proteínas y moléculas de bajo peso molecular como el glutatión, la vitamina C, el ácido úrico o la taurina.

Glutatión

El tripéptido glutatión (GSH), γ -glutamilcisteinilglicina, constituye el tiol de bajo peso molecular más abundante de las células de mamíferos, pudiendo alcanzar concentraciones de hasta 10 mM. La acumulación de esta molécula, en parte, es debida al enlace peptídico γ -glutamilo que es insensible a la mayoría de las peptidasas normales. Los fluidos corporales, como la bilis, el filtrado glomerular, el plasma sanguíneo y la cubierta de células epiteliales también contienen GSH.

El glutatión puede reaccionar con los radicales libres de oxígeno de diferentes maneras. Primero, mediante la acción de la glutatión peroxidasa puede reducir especies como el H_2O_2 u otros peróxidos orgánicos, oxidándose a GSSG. Segundo, puede reaccionar directamente con radicales libres como $O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} y RO^{\bullet} , donando un átomo de hidrógeno y formando un radical tiilo, que posteriormente se puede transformar en GSSG. Tercero, puede reaccionar con electrófilos para formar aductos covalentes mediante reacciones catalizadas por las glutatión transferasas.

Al igual que ocurre con otras defensas antioxidantes, los niveles de GSH fluctúan en diversas condiciones fisiológicas. Se ha comprobado que la concentración de GSH disminuye con la edad. Las causas pueden ser un incremento de su tasa de oxidación o una disminución en el recambio de GSH debido a una mayor utilización o degradación y/o a una menor biosíntesis. La pérdida de GSH y de otros tioles celulares favorece la peroxidación lipídica y la lesión celular. Por ello, muchos investigadores proponen que un elevado cociente GSH/GSSG puede prevenir los efectos nocivos del agotamiento de glutatión.

La inhibición de la peroxidación lipídica por el GSH parece estar relacionada con la regeneración de la vitamina E. En la reacción se produce un radical tiolo que se puede combinar con otro radical (GS•) para formar GSSG, el cual se puede reducir hasta GSH por la glutatión reductasa.

Además del GSH, otros tioles con propiedades antioxidantes han sido utilizados en terapia y medicina preventiva para proteger las células del daño oxidativo. Entre éstos se encuentran el dihidrolipoato, la N-acetilcisteína, la mercaptopopionilglicina, la penicilamina y el captoprilo.

Sistemas de defensa secundarios

A. Enzimas

Los sistemas de defensa antioxidante primarios no siempre son efectivos y los componentes intracelulares sufren daño oxidativo. Las células disponen de otra serie de enzimas que son capaces de reparar y/o eliminar los productos que resultan del daño a proteínas, lípidos y DNA. Dentro de las mismas se encuentran las oxidorreductasas específicas de proteínas, proteasas, glutatión peroxidasa no dependiente de Se, fosfolipasas, etc.

B. Secuestradores no enzimáticos

Existen diversas moléculas pequeñas que son capaces de reaccionar no enzimáticamente con intermediarios radicales libres. Entre esas moléculas se encuentran la vitamina E, distintos carotenoides, el ubiquinol o la bilirrubina.

I.7.3.5 GE y Metabolismo del Calcio (Ca)

El Ca es el principal mineral que participa en la formación y el mantenimiento de los huesos y los dientes (Coxam y Horcajada 2004, Michaelsen y col., 1994), pero además, es esencial en numerosos procesos metabólicos que ocurren en todas las células del organismo. Es esencial para la transmisión del impulso nervioso, la excitabilidad neuronal y la formación de neurotransmisores; para el adecuado funcionamiento del músculo esquelético y la contracción del músculo liso. También es necesario en procesos de coagulación sanguínea.

La absorción de Ca promedio es sólo del 30% en los adultos y la mayor parte de la absorción Ca se produce en el intestino delgado. Sin embargo, si el mineral continúa ionizado y en solución, alrededor de un 5% se absorbe en el colon (Sánchez y col., 2002).

Existe un complejo y preciso sistema de regulación que controla la concentración del Ca en un margen muy estrecho, tanto en el medio extracelular (calcemia) como en el intracelular. Esta precisa regulación llevada a cabo por el sistema endocrino permite el equilibrio dinámico del catión entre los distintos compartimentos corporales, de forma que el calcio disuelto del medio extracelular y parte del que se encuentra en el hueso son intercambiables. De tal manera, unos 500 mg de calcio entran y salen de los huesos diariamente (Pérez-Llamas y col., 2010).

Varios factores dietéticos podrían mejorar la absorción de Ca. En este sentido, la solubilización de sales de Ca en el intestino grueso a través de la fermentación microbiana se ha propuesto como uno de los mecanismos responsables del aumento de la absorción de Ca observado luego de la ingestión de alimentos no digeribles y altamente fermentables (Hara y col., 2000). Los oligosacáridos no digeribles pueden modificar la microbiota colónica mediante el aumento de la proliferación y la actividad de la flora beneficiosa (Roberfroid, 2002), los cuales inducen cambios en la actividad enzimática y producen compuestos que mejoran la absorción paracelular y transcelular del Ca (Cummings y Macfarlane, 2002).

En el caso de los GE, el ácido fítico inhibe la absorción de Ca y otros minerales. Sin embargo, los procesos tecnológicos antes mencionados (remojo, germinación y extrusión) pueden reducir el contenido de ácido fítico y mejorar la bio-accesibilidad del Ca.

I.7.4 Modelos animales

Investigaciones en modelos animales indican que existe evidencia de que la ingesta de GE puede reducir el riesgo de diversas enfermedades crónicas no transmisibles.

Adam y col. (2001) realizaron ensayos con diferentes dietas de grano entero de trigo (dos variedades diferentes de trigo, Valoris (Wv) y Soissons (Ws), y la variedad Carnac triticales (Tc) en ratas Wistar y analizaron el efecto a nivel cecal, específicamente de los AGCC y en el metabolismo lipídico. Los resultados indicaron que las dietas de grano entero produjeron alargamiento del ciego con ligera acidificación. Las dietas de Wv y Tc disminuyeron el colesterol plasmático y los triglicéridos de todos los animales alimentados a base de grano entero. Además, también encontraron una disminución significativa del colesterol hepático comparando las dietas a base de grano entero con el control. En un nuevo estudio usando ratas Wistar, Adam y col. (2003) analizaron el efecto de las diferentes fracciones de la molienda de trigo (harina refinada, harina entera y salvado de trigo) en la fermentación a nivel del tracto gastrointestinal y el metabolismo lipídico. Los

resultados indicaron que sólo las harinas refinadas y enteras produjeron un aumento significativo del ciego y una fermentación ácida (pH ~ 6,2), y que el salvado fue menos efectivo. Sólo la harina entera disminuyó el colesterol en forma significativa. Indicaron que es necesario el consumo de gran entero para ejercer algún efecto en las propiedades hipocolesterolemicas e hipotrigliceridémicas, y que varios componentes de los GE, a través de mecanismos sinérgicos, permiten una significativa reducción de los lípidos séricos.

Fardet y col. (2007) estudiaron el efecto de las dietas a base de harinas de grano de trigo refinado y entero, sobre el estrés oxidativo y el estatus lipídico (triglicéridos y colesterol en plasma e hígado) en ratas Wistar. Los resultados indicaron que no existieron diferencias significativas para ambos grupos en ninguno de los parámetros evaluados. La falta de efectos antioxidantes de la dieta de grano entero fue atribuida a la baja concentración de harina de grano entero de trigo en la dieta, y asimismo, a la falta de un estado pro-oxidativo de los animales para que el efecto sea significativo.

Roohinejad y col. (2009) estudiaron el efecto de arroz integral pre-germinado (24 y 48 h) en los niveles de triglicéridos y colesterol de ratas Sprague-Dawley hipercolesterolemicas (alto contenido de colesterol total y LDL). Los resultados demostraron que la alimentación con arroz integral y arroz integral germinado mejoraron el estado de hipercolesterolemia de los animales. Las dietas de arroz germinado durante 24 y 48 h disminuyeron significativamente el contenido de colesterol total, mientras que la dieta de arroz germinado 48 h fue la única que disminuyó el contenido de triglicéridos en forma significativa. Este efecto fue atribuido a la mayor concentración de diferentes compuestos bioactivos, como los antioxidantes, GABA, γ -oryzanol, etc. provenientes de la germinación del arroz integral.

Youn y col. (2012) realizaron un estudio sobre el efecto del consumo de grano entero en la diabetes tipo 2, utilizando un modelo de ratas con diabetes tipo 2 (Goto-Kakasaki). Los resultados indicaron que el consumo de alimentos a base harinas de grano entero de trigo, avena, cebada y maíz no mostró efectos beneficiosos en el control de la glucosa, la resistencia a la insulina, ni los marcadores de estrés oxidativo al término de 5 meses de estudio. Sin embargo, hallaron una menor concentración de glucosa plasmática con la dieta de trigo, cebada y avena después de dos meses de alimentación, por lo que los investigadores indicaron un efecto beneficioso al principio del transcurso de la diabetes. Además, se encontró que el consumo de cebada y avena como GE también que puede retrasar la progresión de la diabetes tipo 2 en una etapa temprana, al mejorar la respuesta a la insulina.

II. OBJETIVOS

II.1 Objetivos generales

Obtención de productos e ingredientes a base de grano entero de arroz utilizando tratamientos de remojo, germinación y extrusión. Estudio del efecto de su consumo en animales de experimentación.

II.2 Objetivos específicos

- Estudiar el efecto de los procesos de remojo y germinación en el contenido de fitatos y en la calidad nutricional de arroz entero a través de la evaluación de diferentes nutrientes.
- Seleccionar las condiciones del proceso de remojo que maximicen la degradación de los fitatos con la menor pérdida de otros nutrientes y las condiciones de germinación.
- Estudiar el efecto de las variables de extrusión sobre las características fisicoquímicas de los extrudidos de arroz integral con tratamientos previos.
- Seleccionar condiciones de extrusión que permitan obtener productos a base de grano entero de arroz con tratamientos de remojo y germinación con propiedades adecuadas correspondientes a productos expandidos y harinas pre-cocidas.
- Evaluar el contenido de fitatos y otros nutrientes, como así también la calidad nutricional de extrudidos a base de arroz integral en las condiciones seleccionadas a través de técnicas *in vitro* (disponibilidad de lisina, digestibilidad proteica, contenido y disponibilidad de minerales intrínsecos (hierro y zinc), capacidad antioxidante).
- Estudiar propiedades de hidratación y físicas de los productos obtenidos a través del estudio de las isotermas de adsorción y su modelado, determinación de temperatura de transición vítrea (Tg), cristalinidad (Rayos X) y absorción y solubilidad en agua.
- Evaluar la calidad nutricional de extrudidos a base de arroz integral, remojado y germinado obtenidos en las condiciones seleccionadas, a través de técnicas *in vivo* utilizando un modelo de ratas Wistar en crecimiento (absorción y biodisponibilidad de Ca, actividad de enzimas del colon, metabolismo lipídico, estrés oxidativo e IgA secretoria).

III.MATERIALES Y METODOS

III. 1. MATERIALES

III.1.1 Materia prima

Para los ensayos se utilizaron diferentes partidas de arroz integral y arroz cáscara (*Oryza sativa*) variedad largo ancho (Fortuna) provenientes del Molino Los Cerillos, Trimacer (Santa Fe, Argentina).

III.1.2 Clasificación del Arroz

Se procedió a la limpieza y clasificación del arroz por tamaño, utilizando un equipo Labofix® (Brabender, Duisburg, Alemania), con el objetivo de eliminar la suciedad proveniente de la cosecha y separar los granos quebrados. Se realizó primero una clasificación utilizando una malla circular de 2 mm y tambor 9, y luego una segunda clasificación con un malla de 1,75 mm y tambor de 4^{1/4}.

III.2. METODOLOGÍA

III.2.1 Estudio del proceso de remojo de Arroz: Integral y Cáscara

III.2.1.1 Remojo a escala laboratorio

Para estudiar el proceso de remojo, tanto en arroz integral como en arroz cáscara, se analizó el efecto del tiempo (24, 36 y 48 horas) y de la temperatura (35, 45 y 55 °C) sobre diferentes respuestas, a través un diseño experimental de superficie de respuesta de tipo factorial 3², con adición de ácido láctico como controlador del crecimiento microbiano.

Para ello, aproximadamente 50 g de arroz (integral o cáscara) fueron remojados en una solución de ácido láctico (5,5 g/L) en relación 1:2 (g: mL), a diferentes temperaturas y tiempos. Luego, los granos fueron filtrados y secados a 40°C en estufa (Bioelec®, Santa Fe, Argentina) hasta una humedad de alrededor del 13%, recuperándose el agua de remojo para su posterior análisis.

Posteriormente, el arroz cáscara seco, se descascaró utilizando un equipo descascarador/pulidor para granos de arroz (Gallicet, San Salvador, Argentina).

Las respuestas analizadas para el **diseño de arroz integral** fueron: el contenido de fósforo libre y fósforo del AF (P-AF) en el agua de remojo, el contenido de P-AF remanente en el grano, el contenido de fósforo total remanente en el grano (FT), las pérdidas de sólidos y proteínas, y la retención de minerales (Fe y Zn) del grano. Los diferentes análisis se describen en el punto **III.3**.

Las pérdidas se calcularon de acuerdo a la ecuación (1)

$$\% \text{ pérdidas} = (\text{contenido inicial} - \text{contenido final}) / (\text{contenido inicial}) \times 100 \quad (1)$$

El porcentaje de retención (% Ret.) de los minerales (Fe y Zn) fue calculado mediante la ecuación (2):

$$\% \text{ Ret Zn o Fe} = (\text{mg Zn ó Fe final} / \text{mg Zn ó Fe inicial}) \times 100 \quad (2)$$

Para el **diseño de remojo de arroz cáscara** se analizaron las siguientes respuestas: el contenido de fósforo libre y P-AF en el agua de remojo, los porcentajes de pérdidas de P-AF, de sólidos, cenizas y proteínas del grano, como se explicó anteriormente.

III.2.1.2 Remojo a escala piloto

Aproximadamente 4 kg de arroz fueron remojados en un recipiente de acero inoxidable, en las condiciones establecidas a partir del diseño de remojo a escala de laboratorio. Para ello, los granos fueron lavados durante 15 minutos con NaClO (dosaje: 120 ppm de cloro activo) y enjuagados con agua corriente. Luego de calentar el agua con el agregado de ácido láctico a una concentración 5,5 g/L hasta $47 \pm 2^\circ\text{C}$, mediante el uso de un calefactor sumergible (Lutz Ferrando y Cía., Argentina), se remojó el arroz durante 24 horas. Finalizado el tiempo de remojo, los granos fueron enjuagados con agua destilada, secados hasta 13 % de humedad en estufa a 40°C , descascarados y molidos tal como se indica en el punto **III.2.3**.

III.2.2 Estudio del proceso de germinación de Arroz Cáscara

III.2.2.1 Absorción de agua y germinación a escala laboratorio

Se realizó un ensayo de absorción de agua del arroz cáscara, con el objetivo de definir las condiciones de temperatura y tiempo, para que los granos alcancen el óptimo de humedad (30-35 g de agua/100g de granos) para poder germinar.

Para ello, aproximadamente 1 Kg de arroz cáscara fueron lavados durante 15 minutos con NaClO (dosaje: 120 ppm de cloro activo), enjuagados con agua corriente y fraccionados en alícuotas de 100 g. A cada alícuota se agregó agua destilada en relación 1:2 (p/v). Las diferentes alícuotas fueron incubadas a diferentes temperaturas de remojo: T° ambiente ($18-20^\circ\text{C}$); 35°C , 45°C y 55°C , durante 24 horas, tomando muestras a

diferentes tiempos (0,5; 1; 2; 3; 5; 7; 9; 12 y 24 horas) para determinar el contenido de humedad.

En base a los resultados, se seleccionó la condición de remojo de 24 horas a temperatura ambiente (~18-20 °C), previo a la germinación.

Para el estudio de la germinación a escala laboratorio, se procedió al remojo previo de los granos en las condiciones definidas anteriormente, se filtraron y se colocaron en bandejas de aluminio con un lecho de algodón y papel de filtro embebidos con agua, para brindar la humedad adecuada para la germinación, con una profundidad de semillas de 2 cm. Se le colocó papel de filtro humedecido por encima.

Se evaluó la germinación a 35 °C, en estufa con humedad controlada (95% HR) (Bioelec®, Santa Fe, Argentina), durante 24, 36 y 48 horas. Al cumplirse cada uno de los tiempos, se evaluó el porcentaje de germinación, cuantificando la cantidad de semillas germinadas en una muestra de 100 semillas tomadas al azar por triplicado. Un grano se consideró germinado cuando la radícula fue visible y no superó el largo del grano.

El porcentaje de germinación se tomó como una estimación de la viabilidad de las semillas (Cáceres, 2014) y se calculó a partir de la siguiente ecuación (3):

$$\% \text{ de germinación} = (GG/\text{total G}) \times 100 \quad (3)$$

Donde, GG: granos germinados y G: granos evaluados (100 granos)

III.2.2.2 Germinación a escala piloto

Aproximadamente 6 kg de arroz fueron lavados durante 15 minutos con NaClO (dosaje: 120 ppm de cloro activo), se enjuagaron con agua corriente y fueron remojados en las condiciones establecidas a partir del ensayo a escala de laboratorio (18-20 °C – 24 h). Luego, se drenaron y se colocaron formando una capa de 2 cm de granos, en bandejas con un lecho de algodón y papel de filtro humedecido. Por encima se colocó otro papel de filtro humedecido para mantener la humedad adecuada para el proceso de germinación. Las bandejas se colocaron en estufa (Bioelec®, Santa Fe, Argentina) con control de temperatura y humedad (35 °C – 95% HR) durante 24 horas.

III.2.3 Secado, descascarado y molienda

Tanto los granos remojados obtenidos en el punto **III.2.1.2**, como los germinados obtenidos en el punto **III.2.2.2** a escala piloto, fueron secados en estufa (Bioelec®, Santa

Fe, Argentina) mediante el uso de bandejas cribadas, a una temperatura de 40 °C (humedad de 10%) y hasta alcanzar una humedad del grano alrededor del 13%.

Posteriormente, los granos se descascararon y molieron utilizando un esquema de molienda/descascarado descrito a continuación:

1º: se molió la muestra en un molino de rolos (Buhler-Miag, Alemania) con apertura de 1,2 mm;

2º: se pasó por un separador neumático (tipo Alpine) con disco para el flujo de aire n° 6;

3º: la fracción pesada se volvió a moler en molino de rolos y la fracción liviana se tamizó mediante el uso de los tamices (Retsch, Alemania) en el orden de 2>0,84>0,59>0,42 mm;

4º: se separó la cáscara de los grits por tamizado;

5º: la fracción proveniente del molino se clasificó con el uso de la misma secuencia de tamices.

La molienda permitió obtener grits de tamaño de partículas entre 1190 - 420 µm, apropiados para la extrusión.

También se realizó la molienda del arroz integral con el objetivo de obtener grits de tamaño de partículas entre 1190 - 420 µm, apropiados para la extrusión.

A su vez, alícuotas de las materias primas y de los productos obtenidos fueron molidos con molino Ciclotec (Ciclotec, USA) con malla de 1 mm para su posterior análisis.

III.3. ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES NUTRICIONALES DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS POR REMOJO Y GERMINACIÓN

III.3.1 Estudio de la composición centesimal

La determinación de la composición centesimal (proteínas, humedad, extracto etéreo y cenizas) de la materia prima y de los productos obtenidos con los procesos fue realizada siguiendo las técnicas de la A.O.A.C. (1995).

III.3.2 Mineralización por vía seca

Se pesaron 2 g de muestra previamente molida en Ciclotec, se calcinaron en una platina calefactora y se llevaron a mufla durante 3 h a 550 °C. Luego se les agregaron 2

gotas de ácido nítrico y se colocó en mufla nuevamente durante 1 h más, hasta obtener cenizas blancas A.O.A.C. (1995).

III.3.3 Determinación del contenido de minerales (Fe y Zn)

Las cenizas obtenidas de acuerdo al punto **III.3.2**, se disolvieron con 10 mL de una solución de HCl 1,2 mol/L y el contenido el Fe y Zn se determinaron por absorción atómica utilizando un equipo Perkin Elmer IL 551, Instrumentation Laboratory (Norwood, Massachusetts, USA). La expresión de los resultados de los minerales fue en mg/Kg de muestra.

III.3.4 Determinación del fósforo libre (P-libre) y fósforo del AF (P-AF) del agua de remojo

El P-libre y el P-AF del agua filtrada, resultante de los diseños de remojo, fueron analizados utilizando una resina de intercambio aniónico (Resina AG 1-X4 de intercambio iónico, Cl⁻, Bio-Rad®, USA). El P-Libre se eluyó con una solución de NaCl 0,1 M y posteriormente el P-AF, con una solución de NaCl 0,7 M. Luego de una mineralización por vía seca (punto **III.3.2**) de ambas fracciones, se determinó fósforo mediante el método colorimétrico de AOAC 931.01 (AOAC 1993) que utiliza la reacción del fósforo libre con molibdato de amonio en medio ácido.

III.3.5 Determinación de fósforo del AF (P-AF) del grano

La extracción del AF de las muestras molidas se realizó de acuerdo a la técnica de la AOAC 986.11 (AOAC 1995). El AF se extrajo con una solución de HCl 2,4 g/ 100 mL durante 3 h. A una alícuota del sobrenadante se le agregó igual volumen de una solución de Na₂EDTA 0,11 M en NaOH 0,75 M, se enrasó a 25 mL y se pasó a través de una columna de intercambio aniónico (Resina AG 1-X4 de intercambio iónico, Cl⁻, Bio-Rad®, USA). Se procedió a continuación como indica la técnica del punto **III.3.4**.

III.3.6 Determinación del contenido de Fósforo Total (FT)

El contenido de fósforo total se determinó a partir de la muestra mineralizada por vía seca como se indicó en el punto **III.3.2**, utilizando la técnica colorimétrica mencionada en el punto **III.3.4** (AOAC 1993).

III.3.7 Determinación del contenido de polifenoles Libres (PF Lib)

Una alícuota de 0,05 g de muestra y se extrajo con una solución de metanol/agua (50:50) en agitador vortex (Decalab Eternity, Argentina) durante 30 minutos y se centrifugó a 10000xg durante 10 minutos en centrífuga eppendorf (Hermle Z160M, Alemania). Al sobrenadante obtenido se le determinó el contenido de polifenoles siguiendo la técnica descrita por Singleton y col. (1999), que utiliza el reactivo de Folin-Ciocalteu y utilizando como patrón una solución de ácido gálico de 100 mg/L (ICN Biomedicals Inc., USA). El resultado se expresó como mg ácido gálico/g muestra b.s.

III.3.8 Evaluación de la capacidad antioxidante (CAO)

Se utilizó el ensayo de decoloración del radical catión ABTS+• propuesto por Cian y col. (2014). En una primera etapa se generó el radical haciendo reaccionar 10 mL de ácido ABTS (2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, Sigma Aldrich, 98%) 2 mM con 40 μ L de persulfato de potasio 70 mM. Luego se dejó reposar a temperatura ambiente y en oscuridad durante 16 - 17 h. Posteriormente, se realizó una dilución del reactivo con PBS 0,01M pH 7,4 de tal manera que la absorbancia fuera de $0,800 \pm 0,030$ y se llevó a cabo la reacción redox entre el ABTS+• y el agente reductor (muestra o estándar). Al reducirse, el radical catión de color azul-verdoso (ABTS+•) se decolora. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 734 nm, empleando para ello un lector de placas (Biochrom Asys UVM340 Microplate Reader, Cambridge, UK). Para estimar la Capacidad Antioxidante Equivalente al Trolox (CAO) se utilizó como estándar al Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, Sigma Aldrich, 97%), construyéndose una curva de Inhibición vs. Concentración de Trolox (mM), en el rango de 0-3,5 mM. Los valores fueron registrados a los 6 minutos de iniciada la reacción redox.

III.3.9 Bioaccesibilidad de minerales (BM)

La bioaccesibilidad de Fe y Zn se evaluó utilizando la técnica de dializabilidad de Miller y col. (1981) modificada por Drago y col. (2005). La muestra se preparó al 10% (p/v). Se llevó a pH 2,0 con HCl (4,5 mol/L), se agregaron 0,8 ml de una solución de pepsina al 16% en HCl (0,1 mol/L) y se incubaron durante 2 horas a 37°C. Para aumentar gradualmente el pH, se agregó una bolsita de diálisis de 24 cm de longitud con un diámetro de poro de 6 a 8 kDa (Spectra/Pore), conteniendo una solución de buffer PIPES (piperazine-N, N'-bis [2-ethanesulfonic acid]), cuyo pH se calculó de manera de llevar el pH del sistema a un valor final de $6,5 \pm 0,2$, luego de la doble digestión. Luego de 50

minutos se agregaron 6,25 ml de una solución de bilis-pancreatina (2,5% de bilis y 0,4% de pancreatina en NaHCO_3 0,1 mol/L) y nuevamente se incubó durante 2 horas a 37°C. Al finalizar la digestión, se retiraron las bolsitas, se enjuagaron con agua destilada y el dializado se trasvasó a un tubo de ensayo y se registró su peso. Posteriormente, se midió el contenido de Fe y Zn por absorción atómica. Tanto las enzimas como el buffer PIPES fueron adquiridos a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

La bio-accesibilidad de cada mineral se calculó como la cantidad del mineral dializado expresado como porcentaje del contenido del mineral total en la muestra (ecuación 4).

$$\text{DM (\%)} = [(\text{mg MD}) / (\text{mg MM})] \times 100 \quad (4)$$

Dónde, DM (%): Porcentaje del mineral dializado; mg MD: mg del mineral dializado y mg MM: mg del mineral total en la muestra.

III.3.10 Determinación del contenido de Nitrógeno no proteico (NNP)

Se realizó una dispersión de la muestra de 0,5 g en 5 ml de agua destilada y luego las proteínas se precipitaron con igual volumen de ácido tricloroacético (TCA) 20 g/100 ml, se dejó reposar 30 min a 4°C. Posteriormente, se centrifugó a 10.000 xg durante 20 min, se determinó y se determinó el NNP por semi-micro Kjeldahl en la fracción soluble de acuerdo con Donovan y Lönnerdal (1989).

III.3.11 Digestibilidad proteica (DP)

La digestibilidad proteica se midió siguiendo el método de Rudlof y Lönnerdal (1992). Para ello, 2,3 g de muestra se disolvieron en 10 ml de agua destilada. Se llevó a pH 4,5 con HCl (1 mol/L), y se añadieron 11 mg de pepsina de modo tal que la relación enzima/sustrato fue de 1/20. La cantidad adicionada de enzima estuvo en función del contenido proteico de la muestra de arroz. La dispersión obtenida se agitó a 37°C durante 30 min. Luego, se aumentó el pH con NaHCO_3 1 M, hasta llegar a 7,0. Posteriormente, se añadieron 2,5 mL de una solución de pancreatina (0,4 g/100 mL de NaHCO_3 0,1 M), y se incubó durante 1 h a 37°C con agitación. Las enzimas empleadas fueron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Se inactivaron las enzimas mediante el agregado de 5 mL de ácido tricloroacético 20 g/100mL a una alícuota de 5 mL del digerido, se dejó reposar 30 min a 4°C y se centrifugó durante 30 min a 3000 xg (Rolco, Argentina). En el sobrenadante se

midió el contenido de NNP utilizando el método de semimicro-Kjeldahl. La digestibilidad proteica se definió como el aumento del NNP al finalizar la digestión enzimática en relación con el nitrógeno total (NT) medido por semimicro-Kjeldahl (A.O.A.C., 1995) (ecuación 5).

$$DP (\%) = 100 \times \Delta NNP / (NT - NNP) \quad (5)$$

Donde, DP (%): Digestibilidad proteica, NNP: Nitrógeno no proteico, NT: Nitrógeno total.

III.4. ESTUDIO DEL EFECTO DE LAS VARIABLES DE EXTRUSIÓN SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DE LOS EXTRUDIDOS DE ARROZ INTEGRAL CON TRATAMIENTOS DE REMOJO Y GERMINACIÓN

III.4.1 Condiciones del proceso de extrusión

Para estudiar los efectos de la extrusión en las propiedades físico-químicas de productos expandidos de arroz integral remojado y germinados obtenidos en el punto **III.2.3**, se utilizaron diseños experimentales de tipo factorial (3^2), siendo las variables independientes la temperatura de extrusión (160°C, 175°C y 190°C) y la humedad de alimentación (14; 16,5 y 19 g de agua/100g), con un punto central triplicado (175°C - 16,5 g de agua/100g). Los grits fueron acondicionados a la humedad correspondiente al menos una hora antes de cada extrusión.

Se usó un extrusor mono-tornillo Brabender 20 DN (Brabender®, Duisburg, Alemania), relación largo-diámetro igual a 20, con un tornillo de relación de compresión 4:1, una velocidad del tornillo de 150 rpm, una boquilla de salida de 3 mm de diámetro y 20 mm de largo. La alimentación del extrusor se realizó de manera de llenar totalmente los canales del tornillo en la sección de alimentación (“full-capacity”). Las muestras fueron obtenidas una vez alcanzado el régimen estacionario del equipo (torque y caudal constantes). Durante el proceso, se registro el torque (en el momento de tomar la muestra para el caudal) y el caudal de salida para cada muestra.

Todos los productos expandidos fueron conservados en bolsas plásticas cerradas herméticamente hasta su evaluación.

Una vez seleccionadas las condiciones de extrusión para la obtención de productos expandidos con características físicoquímicas deseadas, se realizó la obtención de 6 kg de productos expandidos como se detalla a continuación.

III.4.1.1 Extrusión de granos integrales

La extrusión de los grits de arroz integral proveniente de la molienda (punto III.2.3), se realizó en las condiciones de 160 °C y 14 % de humedad, basadas en el estudio previo realizado por González y col. (2013).

III.4.1.2 Extrusión de granos remojados

La extrusión de los grits de arroz remojado se realizó en las condiciones de 160°C y 16,5% de humedad, elegidas a partir del estudio del diseño de superficie de respuesta del punto III.4.1.

III.4.1.3 Extrusión de granos germinados

La extrusión de los grits de arroz germinado se realizó a 175 °C y 14 % de humedad, condición elegida del estudio realizado según se indicó en el punto III.4.1.

III.4.2 Molienda

Parte de los productos provenientes de la extrusión se molieron con un molino de laboratorio Cyclotec (Cyclotec, USA), con una malla de 1 mm, a fin de poder realizar las determinaciones físico-químicas correspondientes.

La **Figura III.1** resume los procesos tecnológicos que se utilizaron para la obtención de los diferentes productos de grano entero de arroz.

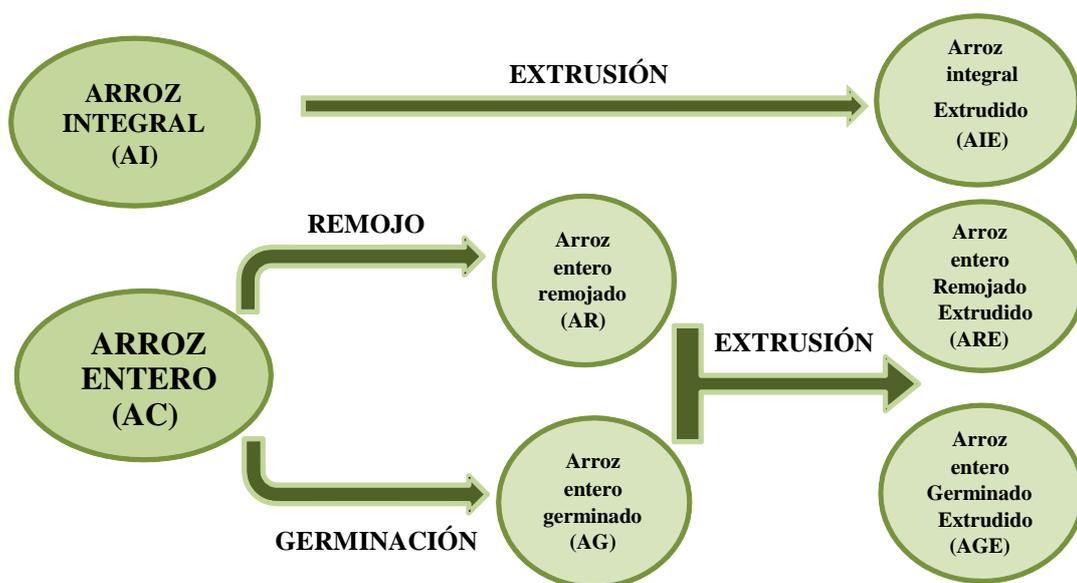


Figura III.1 Resumen de los procesos tecnológicos y productos finales obtenidos.

III.4.3 Evaluación de las propiedades fisicoquímicas de los productos expandidos obtenidos por extrusión

III.4.3.1 Consumo Específico de Energía Mecánica (CEEM)

Con los datos de torque (T), caudal de salida (Qs) del extrusor, y la velocidad de rotación del tornillo (N) se calculó el CEEM, según la ecuación (6):

$$\text{CEEM (J/g)} = (\text{K} \times \text{T} \times \text{N}) / \text{Qa} \quad (6)$$

Donde, K: $61,3 \cdot 10^3$; T: momento torsor (Unidades Brabender); N: velocidad de rotación del tornillo (rpm) y Qa: caudal de alimentación (g/min).

III.4.3.2 Expansión (E)

Se realizó de acuerdo a González y col. (2002a), midiéndose el diámetro de los trozos de extrudidos con un calibre manual (Vernier 0-150 mm, Stronger Argentina) en zonas distintas escogidas al azar. La expansión se calculó como la relación entre el diámetro medio del extrudido y el diámetro de la boquilla (ecuación 7).

$$\text{Expansión} = D / d \quad (7)$$

Donde, D: Diámetro promedio del material extrudido (cm) y d: diámetro de la boquilla del extrusor (cm).

III.4.3.3 Volumen Específico (VE)

El VE de las muestras expandidas se determinó según González y col. (2002a), utilizando piezas de aproximadamente 10 cm de longitud y la siguiente ecuación (8).

$$\text{VE} = V / P = (A \times L) / P = [(d^2 \times \pi) / 4] \times (L / P) \quad (8)$$

Donde, V: es el volumen (cm^3); P: es el peso (g); A: es el área (cm^2); d: es el diámetro (cm); y L: es la longitud del expandido.

Los resultados se expresaron en cm^3/g de producto y fueron obtenidos con el promedio de 10 determinaciones.

III.4.3.4 Evaluación sensorial de la dureza (DS)

Para realizar estas determinaciones, se tomaron alícuotas de cada muestra extrudida (en trozos de aproximadamente de 5 cm) y se secaron en estufa a 105 °C (Dalvo, Santa Fe, Argentina), hasta un contenido de humedad de 6 g de agua/100g, el cual se considera adecuado para evaluar un producto expandido (González y col. 2004).

El estudio se llevó a cabo con la participación de un panel conformado por tres evaluadores expertos con más de 10 años de experiencia en evaluación sensorial de expandidos (Caballero y col., 2012). Se analizó el atributo dureza, utilizando una escala anclada en los extremos comprendida entre 1 y 9. Los extremos de la escala de dureza fueron establecidos utilizando la muestra más blanda (la más cocida) a la que se asignó el valor 1 y la más dura (la menos cocida), a la que se le asignó el valor 9. Además, se evaluó sabor a tostado utilizando una escala de 1 (apenas perceptible) a 3 (muy perceptible) y presencia o no de sabor extraño. Se otorgó la puntuación a cada muestra por consenso de los evaluadores (Pérez y col., 2008).

III.4.3.5 Evaluación mecánica de la textura: dureza mecánica (DM)

A los efectos de comparar los valores de dureza sensorial obtenidos por el panel con una medida instrumental, se realizó la determinación de la resistencia a la compresión de un trozo de 5 cm de longitud, utilizando una texturómetro Instron modelo 4411, con una carga de 1000 N y a una velocidad de compresión de 10 mm/s (cerca de la velocidad de masticación), de acuerdo con Park y col. (1993). Cada determinación se realizó al menos por quintuplicado.

III.4.3.6 Solubilidad en agua (S)

A las muestras previamente molidas en molino Ciclotec (Ciclotec, USA) con malla de 1 mm se les evaluó la solubilidad mediante el método de Anderson y col. (1969) modificado por González y col. (2002a). La técnica consistió en suspender 1,25 g de muestra molida en 25 mL de agua, en tubos de centrifuga, a temperatura ambiente. Se agitó durante 30 minutos y se centrifugó a 2000 xg durante 30 min (25 °C) en centrífuga de mesa (Rolco, Argentina). Se obtuvo un sobrenadante y un residuo o gel insoluble. En el sobrenadante, se determinó el contenido de sólidos solubles por evaporación en estufa a 105°C y se expresó en g de sólidos solubles/100 g de muestra (ecuación 9):

$$S \text{ (g sólidos solubles/100 g)} = \text{g sólidos solubles/100 g muestra b.s.} \times 100 \quad (9)$$

III.4.3.7 Absorción de agua (AA)

Se determinó según el método de Torgensen y Toledo (1977) modificado por González y col. (1995). Se usó un equipo diseñado como se esquematiza en la **Figura III.2**.

Para ello se pesó 0,050 g de muestra y se midió la cantidad de agua absorbida en función del tiempo. La absorción de agua fue expresada al punto de equilibrio (25-30 minutos).

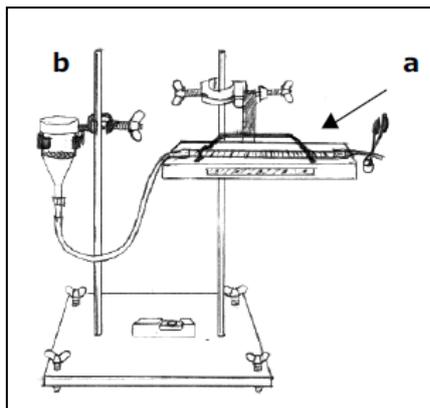


Figura III.2 Esquema del equipo utilizado en la determinación de AA.

a) pipeta graduada, b) embudo Büchner con papel de filtro.

III.5 CARACTERIZACIÓN DE LAS HARINAS EXTRUDIDAS DE ARROZ REMOJADO Y GERMINADO

III.5.1. Estudio de la composición y propiedades fisicoquímicas y nutricionales *in vitro*

III.5.1.1 Contenido de proteínas y nitrógeno no proteico NNP

Se determinaron de acuerdo a lo explicado en los puntos **III.3.1** y **III.3.10**, respectivamente.

III.5.1.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE - SDS)

La electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS se realizó de acuerdo a Laemmli (1970), en un sistema discontinuo de 4% (gel de apilamiento) y 12% (gel de separación). Se utilizó un equipo Mini-Protean II (Electrophoresis cell-Bio-Rad) con una fuente Modelo 200/2.0 (Bio-Rad). Las placas de gel se fijaron y tiñeron con una solución de 0,125% de Coomassie Blue R-250, 50% metanol y 10% ácido acético en agua. Los pesos moleculares de las fracciones fueron estimados mediante el uso de un kit de calibración cuyos pesos

moleculares proteicos fueron: 97,4 kDa (fosforilasa b), 66,2 kDa (albúmina), 45 kDa (ovoalbúmina), 31 kDa (anhidrasa carbónica), 21,5 kDa (inhibidor de tripsina) y 14,4 kDa (lisozima) (Bio-Rad catálogo N°161-0304). Las muestras fueron diluidas con el buffer de muestra (0,125 M tris-Cl pH 6,8; 4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoetanol y 0,5% Azul de bromofenol), y calentadas en baño de agua a 100°C durante 90 segundos. Posteriormente, se sembraron 15 µl en cada vial.

III.5.1.3 Determinación de Lisina disponible (LD)

Para el análisis de LD se utilizó el método de Carpenter (1960) modificado por Booth (1971), que involucra la reacción de Sanger en la que se emplea Flúor-2,4-dinitro-benceno (FDNB) para la obtención de derivados coloreados de aminoácidos que se miden en espectrofotómetro a una longitud de onda de 435 nm.

Para ello, se pesó una cantidad de muestra que contuviera 1,4 mg de N, se agregaron 0,32 mL de una solución de NaHCO₃ de 8 g/100 mL, se homogeneizó y se adicionaron 0,492 mL de Flúor-2,4-dinitro-benceno (12 mL de etanol puro + 0,3 mL de FDNB, Sigma-Aldrich). Luego se agitó durante 2 h al abrigo de la luz a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se dejó destapado y en oscuridad durante 24 h para que se evapore el etanol. Luego se agregó de a poco 8 mL de HCl 8 N y se autoclavó durante 1 h a 1 atmósfera. A continuación, se filtró el hidrolizado y se enrasó a 10 mL con agua destilada. Se colocó 2 mL de cada muestra en 2 tubos diferentes (tubo A y B).

Los tubos A se extrajeron 3 veces con 5 mL éter sulfúrico (Cicarelli, Argentina), se descartó el éter residual, se evaporó el remanente de éter en baño a 80 °C y se enrasó a 10 mL con HCl 1 N. Los tubos B se extrajeron 1 vez con 5 mL éter sulfúrico, se descartó el éter residual por evaporación en baño a 80 °C, se agregó unas gotas de fenolftaleína y una solución de NaOH de 12 g/100 mL hasta neutralizar (pH=7), se agregó 2 mL de buffer carbonato (1 M, pH=8,5) y 5 gotas de metilcloroformiato (Sigma-Aldrich, Argentina). Se agitó, se dejó reposar 8 min y se agregaron 0,75 mL de HCl concentrado. La mezcla se extrajo 4 veces con 5 mL éter sulfúrico, se descartó el éter residual, se evaporó el remanente de éter en baño a 80 °C y se enrasó a 10 mL con agua destilada. Las muestras se midieron en espectrofotómetro UV-visible Milton Roy Genesys 5 (Ivyland, USA) a una longitud de onda de 435 nm. Las lecturas A-B es la absorbancia neta atribuible a la DFN-Lis. La curva de calibrado fue realizada con un patrón de EDNP-Lis-CIH Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) en el rango de 5 – 40 mg/L.

III.5.1.4 Digestibilidad proteica in vitro (DP)

La digestibilidad proteica se midió siguiendo el método descrito en el punto **III.3.11**

III.5.1.5 Determinación de Almidón Total

La determinación de Almidón Total (%) se realizó por la técnica de Tovar y col. (1990). Se utilizó un kit de Glucosa oxidasa/peroxidase (Wiener Lab, Rosario, Argentina) para la determinación colorimétrica de glucosa, y su concentración fue medida a 505 nm utilizando un espectrofotómetro Milton Roy Genesys 5 (Ivyland, USA).

III.5.1.6 Fibra Total, Soluble e Insoluble

El contenido de fibra dietaria total (%FD) se determinó en muestras secas y desgrasadas. Se utilizó la metodología AOAC 985.29 (AOAC, 2000) adoptada por el kit comercial de Megazyme[®]. El método implicó una serie de tres digestiones enzimáticas en baño termostático con agitación: α -amilasa termoestable (30 min, 100°C, pH 6), proteasa (30 min, 60°C, pH 7,5 \pm 0,1) y amiloglucosidasa (20 min, 60°C, pH 4,5 \pm 0,2). Se utilizó como medio de incubación buffer fosfatos pH 6,0. Se reguló el pH en la 2^{da} y 3^{era} incubación utilizando soluciones de NaOH 0,275 N y HCl 0,325 N, respectivamente. Finalizada la última digestión, se precipitó la fibra soluble con 4 veces el volumen de etanol 95°. Se dejó decantar al menos durante 1 hora a temperatura ambiente. El residuo se filtró al vacío en un filtro Duran-Schott[®] n° 3 con celite[®], previamente tarado. El residuo se lavó con etanol 78°, etanol 95° y acetona. Los residuos se secaron hasta peso constante en estufa a 100°C y se pesaron. Para obtener el %FDT se corrigió el peso del residuo seco restando el porcentaje correspondiente al peso de proteína y cenizas de dicho residuo.

III.5.1.7 Lípidos (extracto etéreo) y Perfil de ácidos grasos

Se analizó el contenido de lípidos extraíbles con éter etílico mediante la técnica de AOAC (1995).

Para los ácidos grasos, se realizó una extracción previa de la materia grasa mediante el método de Folch y col. (1957). A partir de esto, el perfil de ácidos grasos fue determinado por cromatografía en fase gaseosa, previa derivatización según la Norma IRAM 5650 Parte II, empleando cromatógrafo Perkin modelo Elmer Claurus 500 con detector de ionización de llama (FID) a 280 °C. Los ácidos grasos fueron separados en columna capilar SUPELCO SP 2560 (100 m x 0,25 mm x 0,20 μ m) e identificados contra

patrones SUPELCO F.A.M.E. Mix NHI-C y F.A.M.E. Mix C14-C22 empleando nitrógeno como gas transportador. Condiciones de corrida: temperatura de horno 150 °C y rampa hasta 210 °C. Temperatura de inyector 240 °C.

III.5.1.8 Determinación del perfil de inositoles fosfatos (IP)

Se utilizó una metodología por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para separar y cuantificar los inositoles fosfato (IP), basándose en los trabajos de Ellis y Morris (1986), Sandberg y Ahderinne (1986), Nappi y col. (2006) y AOAC 986.11 (2000). Para la separación de los inositoles hexa, penta, tetra y tri fosfato (IP6, IP5, IP4 e IP3) se utilizaron las condiciones según se detallan en la Tabla 1.

Tabla III.1 Condiciones cromatográficas para determinación de perfiles de IP

Columna	XBridge [®] ; C18; 5 µm; 4,6 x 150 mm; Waters.
Fase móvil	Metanol : solución acuosa* (51:49) de pH = 4,30 *La solución acuosa contuvo cada 100 mL: 89,6 mL de ácido fórmico 0,05 M; 4,5 mL de Na ₂ EDTA 0,05 M; 5,7 mL de hidróxido de tetrabutil amonio 20%; 0,2 mL de ácido fítico 0,6 g/100 mL (hidrolizado en autoclave durante 40 min a 121°C y 1 atm)
Flujo	0,9 mL / min
Temperatura	30°C
Detector	Índice de Refracción
Volumen de inyección	50 µL

Para la extracción de los IP se utilizaron 0,5 g de muestra y 20 mL de una solución de HCl 0,5 M durante 2 horas con agitación constante y a temperatura ambiente. Luego se centrifugó durante 20 min a 2000 rpm. Se filtró el sobrenadante utilizando una membrana de nylon de 0,22 µm. Se evaporó a sequedad el filtrado en rotavapor y se reconstituyó el residuo con 15 mL de HCl 25 mM. Se hizo una purificación y concentración de los IP utilizando una columna de 0,70 g de resina de intercambio aniónico (AG[®] 1-X4, 100-200 mesh, forma cloruro, marca BIO-RAD[®]). Se eluyeron los IP con 15 mL de HCl 2 M y se evaporó el eluido a sequedad en rotavapor. Se reconstituyó la muestra en 1 mL de agua calidad HPLC y se inyectaron 50 µL en el sistema cromatográfico.

III. 5.1.9 Evaluación de actividad antioxidante (CAO)

Se utilizó el ensayo de decoloración del radical catión ABTS+• descrito anteriormente en el punto III.3.8

III. 5.1.10 Contenido de polifenoles Totales, Libres y Ligados (PF Lib y PF Lig)

Los polifenoles se extrajeron según Qiu et al. (2010) con modificaciones. Se realizaron dos extracciones con metanol al 80%, se recolectaron los extractos y sobre esta fracción se determinó PF Lib por Singleton y col. (1999). Para los PF Lig, se tomó el residuo proveniente de las extracciones anteriores y se realizó una hidrólisis alcalina con NaOH 2M (T° ambiente) con el objetivo de liberar los polifenoles enlazados. Luego se realizaron 3 extracciones con hexano para eliminar los lípidos, se extrajeron los polifenoles liberados con acetato de etilo, se evaporó hasta sequedad el solvente y se re-disolvieron los PF Lig en metanol al 50% para luego determinarlos por Singleton y col. (1999).

III.5.2 Propiedades físicas de las harinas

III.5.2.1 Determinación del grado de cristalinidad por difracción de Rayos X

Se evaluó la estructura del almidón mediante Rayos X, utilizando un Difractómetro de Rayos X (DRX) Shimadzu XD-D1 (Shimadzu, Tokio, Japón). Se analizaron todas las muestras entre $2\theta = 10^\circ - 30^\circ$ utilizando radiación $K\alpha\text{Cu}$, voltaje de 30 kV, corriente de 40 mA y velocidad de barrido de 0,5 %/min. El porcentaje de cristalinidad (%) se determinó por deconvolución de los picos identificados por Colonna y col. (1987) utilizando el software Origin versión 7.5, y se expresó como la relación de la suma de las áreas correspondientes a los picos identificados sobre el área total.

III.5.2.2 Isotermas de Adsorción

Se utilizó el método gravimétrico, basado en la determinación del contenido de humedad luego de que la muestra alcanzó el equilibrio (Spiess y Wolf, 1983). Se procedió secando las muestras en estufa de vacío (Selecta, Barcelona, España) hasta un contenido mínimo de humedad (4 días a 65°C, 1 bar). Luego se colocaron en cámaras herméticamente cerradas (24 °C) con sales saturadas y a_w conocida (LiCl: 0.113, CH₃COOK: 0.230, MgCl₂: 0.330, K₂CO₃: 0.430, Mg (NO₃)₂: 0.520, CuCl₂: 0.680, de NaCl: 0,755) (Greenspan, 1977). Los pesos de las muestras fueron controlados hasta un valor constante (Δ peso $\leq \pm 0,0005$ g), en el que se supone que se alcanzó el equilibrio. El

contenido de humedad de equilibrio se determinó en estufa a $105\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ durante 24 h. Se ajustaron los datos experimentales de las isothermas mediante los modelos linealizados de Brunauer-Emmett-Teller (BET) (ecuación 10) (Brunauer y col., 1938 y Brunauer y col., 1940), y Guggenheim-Andersen-de Boer (GAB) (ecuación 11) (Van den Berg y col., 1981).

$$\frac{a_w}{(1-a_w) \cdot w_e} = \frac{1}{w_o \cdot C} + \frac{C-1}{w_o \cdot C} \cdot a_w \quad (10)$$

Donde, w_e : humedad en el equilibrio (g agua/g sólidos secos); a_w : actividad de agua; w_o : humedad del producto correspondiente a la capa monomolecular de agua absorbida (g agua/g sólidos secos); C , constante relacionada con el calor desprendido en el proceso de sorción.

$$\frac{a_w}{w_e} = \frac{1}{w_o \cdot C \cdot K} + \frac{C-2}{w_o \cdot C} \cdot a_w + \frac{K(1-C)}{w_o \cdot C} \cdot a_w^2 \quad (11)$$

Donde, w_e : humedad en el equilibrio (g agua/g sólidos secos); a_w : actividad de agua; w_o : humedad del producto correspondiente a la situación en que los puntos de adsorción primarios están saturados por moléculas de agua (g agua/g sólidos secos); C : constante de Guggenheim característica del producto y relacionada con el calor de adsorción de la monocapa; K : factor de corrección relacionado con el calor de sorción de la multicapa.

III.5.2.3 Temperaturas de transición vítrea (T_g)

A fin de estimar los efectos de la humedad sobre la estabilidad estructural de los productos envasados durante el almacenamiento (antes de su consumo) se estudiaron las T_g del AI y del AIE a diferentes humedades.

Para determinar la temperatura de transición vítrea de las muestras se utilizó un calorímetro diferencial de barrido DSC1 STAR^e System (Mettler Toledo, Suiza). Aproximadamente 10-20 mg de cada muestra equilibrada previamente (punto III.5.22) correspondiente a isothermas de adsorción), se colocó en cápsulas de aluminio (DSC ME-000267631, Mettler Toledo, Suiza), se selló herméticamente y se analizó cada muestra por triplicado. La velocidad de calentamiento fue 20 °C/min y el intervalo de temperatura entre 0 a 95 °C .

III.6. EVALUACIONES NUTRICIONALES *IN VIVO* CON ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

III.6.1 Modelo de experimentación

III.6.1.1 Dietas

Las dietas a base de grano entero fueron elaboradas con las harinas precocidas de arroz integral extrudido (I), arroz remojado extrudido (R) y arroz germinado extrudido (G) obtenidas en los puntos **III.4.1.1**, **III.4.1.2** y **III.4.1.3**, respectivamente. Teniendo en cuenta la composición centesimal y el contenido de fibra de cada una de las muestras a evaluar, se elaboraron las dietas agregando la cantidad de arroz necesaria para alcanzar una concentración de fibra del 5%.

Se utilizó como base la dieta control (C) según AIN 93 (American Institute of Nutrition) (Reeves y col. 1993) para un modelo de ratas en crecimiento y, de manera de cubrir los requerimientos estipulados en dicho documento, se procedió a compensar los nutrientes teniendo en cuenta la composición centesimal de cada muestra (**Tabla III.2**).

Tabla III.2 Composición de las dietas control y de grano entero de arroz extrudidas: Control (C), Integral (I), Remojado (R) y Germinado (G).

Ingredientes	C	I	R	G
Caseína (g/Kg dieta)	170,00	122,4	124,7	124,2
Mix Mineral (AIN-93M-MX) (g/ Kg dieta)	35,00	26,5	25,5	26,4
Mix Vitamínico (AIN-93-VX) (g/ Kg dieta)	10,00	10,0	10,0	10,00
L-Cistina (g/Kg dieta)	3,00	3,0	3,0	3,00
Vitamina A (mL)	1,00	1,0	1,0	1,00
Aceite de soja (g/Kg dieta)	69,00	66,8	65,0	68,5
Colina bitartrato (mL)	7,1	7,1	7,1	7,1
Celulosa (g/Kg dieta)	50,00	-	-	-
ARROZ GRANO ENTERO (I, R, G) (g/Kg dieta)	-	1000,0	1000,0	1000,0
Dextrina (g/Kg dieta)	624,9	-	-	-

III.6.1.2 Animales

Para los ensayos *in vivo* del efecto del consumo de las dietas descriptas en el punto **III.6.1.1** se utilizaron 32 ratas macho de la cepa Wistar (n total=32) (peso 52.4±5.5 g) del bioterio de la Cátedra de Nutrición de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA). Los

animales fueron destetados a los 21 días de vida, se pesaron y se distribuyeron al azar en 4 grupos de 8 ratas cada uno ($n=8$ por grupo). Durante toda la experiencia, se mantuvieron alojados en forma individual en jaulas de acero inoxidable bajo condiciones controladas de temperatura (21 ± 1 °C) y humedad (60 ± 10 %), con un ciclo de 12 horas de luz-oscuridad.

Durante 60 días (Tf) se alimentaron con la dieta C, I, R y G, con libre acceso al alimento y agua desionizada durante toda la experiencia.

Los animales fueron pesados cada 15 días y se evaluaron los consumos de cada dieta cada dos o tres días.

Días previos al final de la experiencia, los animales fueron anestesiados con inyección intraperitoneal de 0,1 mg/100 g de peso corporal de clorhidrato de ketamina + 0,1 mg/100 g de maleato acepromazina, a fin de realizar las densitometrías que se describen a continuación. Luego los animales fueron devueltos a sus jaulas, hasta el final de la experiencia.

Al tiempo final de la experiencia (60 días) los animales fueron anestesiados nuevamente bajo las mismas condiciones descriptas. Se realizó una incisión abdominal; se extrajo sangre de la aorta abdominal y se centrifugó la misma a 3000 xg durante 20 min a 4°C para separar el suero. Las muestras de suero obtenidas fueron conservadas a -80 °C hasta ser examinadas.

Se extrajeron los hígados de los animales, se pesaron y se dividieron en porciones de lóbulos los cuales fueron prensados entre placas de aluminio enfriadas con nieve carbónica; se conservaron a -80 °C para los posteriores análisis.

Se removió el ciego, se pesó (Mettler Toledo, Argentina) y posteriormente se midió el pH del contenido cecal (IQ Scientific Instruments). Se colectó el contenido cecal en tubos falcon de 15 mL registrando su peso. Posteriormente, se hizo una dilución 1/4 con buffer PBS 0,01 mol/L (pH 7,3); se agitó en vortex y se centrifugó a 3000 xg durante 20 min. En estas muestras se analizaron enzimas cecales. A una alícuota del sobrenadante obtenido se adicionaron 4 μ L de inhibidor de proteasas para el posterior análisis de IgA. Estas muestras de contenido cecal diluido fueron almacenadas en freezer a -80°C para su posterior análisis.

Se extrajeron los fémures derechos para su análisis, como se describe más adelante.

III.6.2 Determinaciones relacionadas al metabolismo óseo y mineral

III.6.2.1 Absorción aparente de Ca

La concentración de Ca de la dieta, las heces y los huesos se determinó utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin Elmer Corp., 1971). Se añadió cloruro de lantano (6.500 mg/L en la solución final) para evitar interferencias. La concentración de P se midió de acuerdo con el método de Gomori (Gomori, 1942).

La ingesta de alimentos y las heces registradas durante los últimos tres días de la experiencia se utilizaron para calcular la absorción de Ca aparente (% Abs_{ap} Ca) (ecuación 12):

$$\% \text{ Abs}_{\text{ap}} \text{ Ca} = [(\text{ICa} - \text{FCa}) / \text{ICa}] \times 100 \quad (12)$$

Donde, ICa: Ingesta de Ca, FCa: Ca excretado en las heces.

III.6.2.2 Contenido y densidad mineral ósea

Se realizaron densitometrías de los animales siguiendo la técnica de Zeni y col. (2002). Se utilizó un escáner total corporal por absorciometría dual de rayos X (DXA) provisto de un software diseñado específicamente para pequeños animales (DPX Alpha Small Animal Software, Lunar Radiación Corp. Madison WI). Todas las ratas fueron escaneadas utilizando el mismo procedimiento de digitalización. La precisión se evaluó mediante la medición de una rata cinco veces con el reposicionamiento entre las exploraciones del mismo día y en días diferentes. El coeficiente de variación (CV) fue 0,9% para la DMO (densidad mineral ósea) del esqueleto total y 3,0% para CMO (contenido mineral óseo). El análisis de las distintas sub-áreas se llevó a cabo sobre la imagen del animal en la pantalla, usando un retorno de la inversión para cada segmento. El CV DMO fue 2,2% para el fémur. Para reducir al mínimo las variaciones del observador todos los análisis se llevaron a cabo por el mismo técnico.

III.6.2.3 Estudio de la composición ósea en el Fémur Derecho

Los fémures se limpiaron de tejido blando adherente, se secaron a 100 °C durante 72 h, y se extrajo la grasa por inmersión durante 15 días en una mezcla cloroformo: metanol (3:1), el cual se renovó cada tres días. Por último, los huesos se secaron durante 48 h a 100 °C, fueron pesados y se realizó la determinación de cenizas a 700 °C hasta color

blanco y cristalino. A partir de entonces, se disolvieron en HCl y se diluyeron para el análisis de Ca y P. Los contenidos de Ca y P fueron calculados como el contenido total y el porcentaje contenido en el tejido seco libre de grasa, y además se calculó la relación Ca/P para el fémur.

III.6.3 Determinaciones sobre el ciego y contenido cecal

III.6.3.1 Determinación de IgA

El contenido de IgA secretoria en el contenido cecal se determinó mediante el ensayo de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, del inglés) (BD, Biosciences). Se tomó un placa multi-pocillos y se adicionaron 100 μ L de anticuerpo de captura de ratón Balb/c anti-IgA de rata (BD Biosciences; 553913), diluido 1/125 con buffer carbonato-bicarbonato pH 9,6. Luego se incubó a 37°C durante 1 h y posteriormente se dejó reposar “overnight” a 4°C. Se lavó 3 veces la placa con buffer de lavado (PBS 0,01 mol/L pH 7,3; 0,05% Tween 20) y luego se bloqueó con 200 μ L de buffer de bloqueo (PBS 0,01 mol/L pH 7,3; 1% albumina sérica bovina), a temperatura ambiente durante 1 h. Luego, se lavó 3 veces con buffer de lavado y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente con 100 μ L de estándar (0 - 10 μ g/L de IgA κ de rata; BD Biosciences; 553945) o muestra diluida oportunamente con buffer de bloqueo (1/100 – 1/5000). La placa bloqueada se lavó 3 veces con buffer de lavado y se adicionó el anticuerpo biotinilado de ratón Balb/c anti-IgA de rata diluido 1/125 con buffer de bloqueo (BD Biosciences; 553912). Se incubó durante 1 h y posteriormente se lavó 6 veces con buffer de lavado. Luego se adicionaron 100 μ L del anticuerpo Streptavidin-Horseradish Peroxidase diluido 1/1000 con buffer de bloqueo (BD Biosciences; 554066) y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Posteriormente, se agregaron 100 μ L de una mezcla reactiva (6 mL A + 6 mL B, BD Biosciences 555214) y se incubó durante 30 min en oscuridad a temperatura ambiente. La reacción de color fue detenida con el agregado de 50 μ L de H₂SO₄ 2 mol/L y la absorbancia se registró a 450 nm con un lector de placas ASYS UVM 340. Los resultados se expresaron en μ g/g contenido cecal.

III.6.3.2 Determinación de enzimas cecales

Se determinaron las actividades de las enzimas cecales β -glucosidasa y β -glucuronidasa mediante la técnica de Gudiel-Urbano y Goñi (2002) con modificaciones. La misma se basa en la determinación colorimétrica del p-nitrofenol, liberado por acción catalítica de estas enzimas a partir de la utilización del sustrato p-nitrofenil- β -D-

glucopiranosido y del p-nitrofenil- β -D-glucuronido, para la β -glucosidasa y β -glucuronidasa, respectivamente. La reacción consistió en la incubación de una alícuota de 35 μ l del contenido cecal y 23 μ l de buffer fosfato 0,1 M (pH 7), con 12 μ l de una solución 5 mM del sustrato (p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido y p-nitrofenil- β -D-glucuronido, según corresponda), a 37°C durante 10 min (en oscuridad). La reacción se detuvo mediante el agregado de 180 μ l de Na₂CO₃ 0,25 M y se leyó la placa a 400 nm en lector de placas (ASYS UVM 340). Se calculó la actividad de la enzima mediante el uso de una curva de calibrado con p-nitrofenol como estándar y se expresó el resultado en μ mol p-nitrofenol/g contenido cecal/h.

III.6.4 Determinaciones relacionadas con el metabolismo lipídico

Se determinaron el contenido de triglicéridos y colesterol en suero e hígado utilizando kits enzimáticos “TG Color” y “Colestat enzimático”, respectivamente (Wiener Lab, Rosario, Argentina).

Para **suero**, se tomaron 10 μ l y se analizó el contenido de triglicéridos o colesterol mediante el uso del kit correspondiente.

Para la determinación de triglicéridos y colesterol en **hígado** previamente se realizó una extracción del tejido por el método de Folch (1957). Para ello, se pesaron 0,25 g del tejido y se agregaron 5 mL de la mezcla Cloroformo: Metanol (2:1), se extrajo durante 1 min a 10000-15000 rpm con homogeneizador (PRO250-Homogenizer, PRO SCIENTIFIC, USA). Luego se centrifugó durante 30 min a 3000 xg en centrífuga de mesa (Rolco, Argentina). Para el análisis de triglicéridos, se tomó una alícuota de 10 μ l del sobrenadante que fue analizada con el correspondiente del kit. Para el análisis de colesterol, se tomó una alícuota de 100 μ l del sobrenadante, se evaporó, se reconstituyó con 10 μ l de agua destilada y se analizó utilizando el kit correspondiente.

Los resultados de triglicéridos se expresaron en g/L de suero y μ mol/g tejido hepático; y para colesterol en g/L de suero y mg/g tejido hepático.

III.6.5 Determinaciones relacionadas con el estrés oxidativo

III.6.5.1 Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

Se analizó en suero e hígado la concentración de **malondialdehído** (MDA) basándose en los métodos de Buege & Aust (1978) y Yagi (1976), con modificaciones.

Para el análisis en **hígado**, se pesaron 0,5 g y se agregaron 5 mL de buffer fosfato 30 mM (pH 7,4). Se homogeneizó utilizando un homogeneizador (PRO250-Homogenizer,

PRO SCIENTIFIC, USA) durante 1 minuto a 10000-15000 rpm, en baño de hielo. Luego se centrifugaron a 8000 xg utilizando una centrífuga eppendorf (Hermle Z160M, Alemania). Se tomó un alícuota de 900 μ l del sobrenadante, se agregaron 10 μ l de una solución de butilhidroxitolueno de 4 g/100mL (BHT) y 900 μ l de una solución de TCA de 20 g/100mL. Se agitó con vortex y se centrifugó durante 5 min en tubos eppendorf. Del sobrenadante se tomó una alícuota de 900 μ l a la que se agregaron 900 μ l de una solución de ácido tiobarbitúrico de 0,7 g/100mL (TBA). Se incubó de 1 h en baño termostático a ebullición, luego se enfrió en hielo y se midió la formación de las sustancias reactivas al TBA a 535 nm en espectrofotómetro Milton Roy Genesys 5 (Ivyland, EEUU).

En el caso de la determinación del contenido MDA en el **suero** se procedió siguiendo la misma técnica y utilizando 900 μ L de suero.

El contenido de MDA se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar ($156 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). El resultado se expresó como nmol/100 g proteína.

III.6.5.2 Determinación de Catalasa

Se determinó la actividad de la enzima catalasa por el método de Aebi (1984). Se preparó un homogenato del hígado en baño de hielo, pesando 0,5 g del tejido, agregando 5 mL de buffer fosfato 50 mM (pH 7-7,4), y utilizando un homogeneizador (PRO250-Homogenizer, PRO SCIENTIFIC, USA) a 10000-15000 rpm durante 1 minuto. Se centrifugó durante 5 minutos a 8000 xg en centrífuga eppendorf (Hermle Z160M, Alemania) y se tomó una alícuota del sobrenadante que fue diluida 1/400 con buffer fosfato. En una cubeta de cuarzo se agregaron 2 mL de la dilución de la muestra y 1 mL de una solución de H_2O_2 30 mM, se agitó rápidamente invirtiendo, y se midió durante 1 minuto la disminución de la absorbancia a 240 nm en espectro Milton Roy Genesys 5 (Ivyland, EEUU) debida a la descomposición del H_2O_2 en H_2O y O_2 . Se construyó la curva de la absorbancia vs. tiempo (segundos) en escala logarítmica ($\log 10$) y se calculó la actividad de la catalasa teniendo en cuenta la pendiente de la recta y la absortividad molar del H_2O_2 ($0,0394 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Los resultados de la actividad se expresaron en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteínas.

III.6.5.3 Determinación de la actividad de Glutación reductasa (GR)

Se analizó la actividad de la enzima Glutación reductasa en hígado siguiendo la técnica de Horn (1982), con modificaciones.

Para ello, se preparó un homogenato del hígado en baño de hielo. Se pesaron 0,5 g de hígado, se agregaron 5 mL de buffer fosfato 30 mM (pH 7,4) con EDTA 1 mM y DTT 4 mM y se homogeneizó (PRO250-Homogenizer, PRO SCIENTIFIC, USA) durante 1 minuto a 10000-15000 rpm. Se centrifugó durante 5 min a 10000 xg en centrífuga eppendorf (Hermle Z160M, Alemania). Posteriormente, en una placa multi-pocillos, se colocaron 100 µl de buffer (KH₂PO₄ 100 mM/EDTA 3,4 mM; pH= 7,6) al que se agregaron 20 µl de GSSG 30 mM, una alícuota de 20 µl de la una dilución previa de la muestra (1/10) y 50 µl de NADPH 0,08 mM. Se midió la reducción del GSSG a GSH por acción de la enzima GR durante 5 minutos, cada 30 segundos, a 340 nm en lector de placas (ASYS UVM 340). El cálculo de la actividad enzimática se realizó utilizando la pendiente de la curva, la absorptividad molar del NADPH (3,732 nmol/ml para un volumen final de 190 µl de reacción en placa de 0,6 cm) y el contenido de proteínas del homogenato. Los resultados se expresaron en nmol NADPH/min/mg proteínas.

III.6.5.4 Determinación de la actividad de Glutacion peroxidasa (GPx)

Se analizó la actividad de la enzima Glutación peroxidasa en hígado mediante la técnica de Paglia y Valentine (1967) con modificaciones.

El ensayo se realizó sobre el mismo homogenato de la determinación de la enzima glutación reductasa previamente descrita. Se tomó un alícuota de una dilución de la muestra (1/100), se agregaron 100 µl de buffer (KH₂PO₄ 0,0828 M/ EDTA 0,0083 M; pH= 7), luego 20 µl de NADPH 0,0028 M, 10 µl de glutación reductasa (451 U/ml, diluida 1/25 previamente) (Sigma Aldrich, St.Louis, MO, EEUU), 10 µl de NaN₃ 0,075 M y por último 20 µl de GSH 0,05 M. Posteriormente, se dejó equilibrar a 20 °C durante 5 min a 340 nm y la reacción se comenzó con el agregado de 20 µl del sustrato H₂O₂ 0,0007 M. Se leyó la absorbancia durante 5 minutos a 340nm, cada 30 segundos). El cálculo de la actividad enzimática se determinó utilizando la pendiente de la curva, la absorptividad molar del NADPH (4,354 nmol/mL para placa con un volumen final de 200 µl de reacción) y el contenido de proteínas del homogenato. Los resultados se expresaron en nmol NADPH/min/mg proteínas.

III.6.5.5 Determinación de los contenidos de GSH y GSSG

Los contenidos de GSH y GSSG en hígados fueron analizados utilizando la técnica fluorométrica de Hissin y Hilf (1976), con modificaciones.

Se preparó un homogenato en baño de hielo. Para ello, se pesaron 0,25 g de hígado y se agregaron 3,75 mL de buffer fosfato (Na_2HPO_4 0,1 M/EDTA 0,005M; pH=8) y 1 mL de una solución de 25 g/100 mL de HPO_3 . Se homogeneizó durante 1 min en baño de hielo a una velocidad de 10000-15000 rpm. Se centrifugó durante 10 min a 10000 xg y se utilizó el sobrenadante para determinar GSH y GSSG como se describe a continuación.

Para GSH se colocó en eppendorf una alícuota de 100 μL del sobrenadante, se agregaron 1,8 mL del buffer fosfato y 100 μL del o-ftalaldehído 1mg/mL (preparada en el momento). Se dejó reaccionar durante 15 min a temperatura ambiente y se leyó la fluorescencia en cubeta de cuarzo a las longitudes de onda 350 nm (excitación) y 420 nm (emisión).

Para GSSG se colocaron en eppendorf una alícuota de 0,1 mL del sobrenadante, se agregaron 0,04 mL de N-etilmaleimida (NEM) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) que bloquea el GSH de la muestra, y se incubó durante 20 min. Luego se agregaron 0,86 mL de NaOH 0,1 N, se agitó; y se tomaron 200/400 μL , dependiendo de la muestra, para hacer reaccionar con 1,7/1,5 mL de NaOH 0,1 N y la solución de o-ftalaldehído de 1mg/mL. Se incubó a temperatura ambiente durante 15 min y se midió la fluorescencia bajo las mismas condiciones que GSH.

Para el cálculo de la concentración de GSH y GSSG ($\mu\text{g/g}$ tejido) se realizó una curva de calibrado con los estándares de GSH y GSSG (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Los resultados se expresaron como $\mu\text{g/g}$ tejido.

III.6.6 Determinación del contenido de proteínas

La determinación del contenido de **proteínas** tanto del suero como de los homogenatos utilizados en cada ensayo fue realizada por la técnica de Lowry y col. (1951).

III.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Todas las muestras se evaluaron al menos por triplicado, con la excepción de algunos ensayos donde el número de replicas fue mayor.

Se realizó el test de ANOVA para determinar diferencias significativas entre muestras ($p < 0,05$) y test de LSD (*Least Significant Difference*) para comparación de a pares al 95% de confianza, utilizando el Software Statgraphics Plus 3.0.

Para la construcción y los análisis de los diseños experimentales de superficie de respuesta de tipo factorial se utilizó el Software Statgraphics Plus 3. Las respuestas se modelaron con la siguiente función polinómica de segundo grado (ecuación 13):

$$R = b_0 + b_1 A + b_2 B + b_3 A^2 + b_4 A.B + b_5 B^2 \quad (13)$$

Donde, b_0 representa la intersección y b_1 , b_2 , b_3 , b_4 , y b_5 son los coeficientes para el término lineal de A, el término lineal de B, el término cuadrático de A, la interacción de A.B, y el término cuadrático de B, respectivamente.

Para la optimización de los diseños de superficie de respuesta se utilizó el programa Design-Expert® versión 7.0.0.

Se utilizaron las herramientas proporcionadas por Microsoft Office 2007 y OriginPro 8 para la realización de las gráficas, particularmente Excel para obtener los parámetros de la correlación simple entre las variables.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 ESTUDIO DEL PROCESO DE REMOJO DEL ARROZ INTEGRAL

IV.1.1 Composición de la materia prima

La **Tabla IV.1** muestra la composición centesimal del arroz integral (Tipo Largo Ancho) utilizado para el estudio del proceso de remojo. Los resultados se encuentran dentro de los rangos publicados para el arroz integral por Juliano (1985) y Pomeranz y Ory (1982).

El contenido de proteínas se encuentra ligeramente por debajo de lo informado por estos investigadores, lo que puede atribuirse a las diferentes formas y suelos en los que se realizó el cultivo del arroz (Juliano, 1985).

Tabla IV.1 Composición centesimal del arroz integral.

Componentes	Arroz integral
Proteínas (N x 5,95) (g/100 g b.s)	6,97±0,15
Grasa (extracto etéreo) (g/100 g b.s)	1,88±0,01
Cenizas (g/ 100 g b.s)	0,90±0,02
Carbohidratos Disponibles* (g/100 g b.s)	84,54
Almidón Total (g/100 g b.s)	77,74±1,13
Fibra Dietaria Total (g/100 g b.s)	5,20±0,60
P-Acido Fólico (mg/100g)	174,9±1,22
Hierro (mg/kg)	7,51±0,75
Zinc (mg/kg)	16,06±0,32

Media ± DE; b.s: base seca; *Carbohidratos disponibles por diferencia

IV.1.2 Estudio del proceso de remojo del arroz integral

En la **Tabla IV.2** se muestran los parámetros evaluados: tiempo (t) y temperatura (T), y las respuestas del diseño experimental correspondientes al proceso de remojo de arroz integral.

El análisis de varianza (ANOVA) para las respuestas se muestra en la **Tabla IV.3**. Los altos valores de los coeficientes de determinación (R^2) y la falta de ajuste no significativa sugieren que los modelos ajustaron adecuadamente a los datos de las distintas respuestas para un nivel de confianza del 95%.

Tabla IV.2 Variables independientes y respuestas evaluadas para el remojo de arroz integral.

Condiciones de remojo	P libre Agua (mg/100 g b.s)	P-AF Agua (mg/100 g b.s)	P-AF Grano (mg/100 g b.s)	P total (mg/100 g b.s)	Pérdida sólidos (%)	Pérdida proteínas (%)	Ret. Fe (%)	Ret. Zn (%)
35 °C-24h	47,8	41,5	20,9	92,4	11,8	33,2	49,2	36,0
35 °C-36h	51,9	18,4	18,5	65,0	14,9	37,4	39,2	26,6
35 °C-48h	71,5	14,5	17,9	75,0	15,5	37,0	36,0	26,0
45 °C-24h	45,8	21,0	19,1	85,0	12,3	36,9	41,2	32,0
	66,2	20,5	17,0	66,0	14,9	45,2	33,8	23,0
45 °C-36h	63,5	26,0	18,0	71,0	14,7	45,4	31,2	21,5
	68,4	22,0	19,0	57,0	14,4	44,0	33,4	25,0
45 °C-48h	66,0	19,9	15,1	35,0	15,3	44,9	34,0	28,0
55 °C-24h	27,4	57,7	24,0	81,3	12,5	36,9	40,7	30,8
55 °C-36h	32,6	35,2	20,2	65,0	13,8	36,8	39,0	22,0
55 °C-48h	47,5	67,7	20,9	65,0	13,1	38,9	35,0	26,6

P: fósforo; AF: ácido fítico; Ret.: retención

Tabla IV.3 ANOVA para las respuestas analizadas del diseño experimental correspondiente al proceso de remojo de arroz integral.

Respuesta Fuente de variación	P libre agua	P-AF agua	P-AF grano	P total	Pérdida sólidos	Pérdida proteínas	Ret. Fe	Ret. Zn
tiempo (t)	0,0087	0,1209	0,0541	0,0405	0,0056	0,0182	0,0168	0,0516
Temperatura (T)	0,0088	0,0064	0,0861	0,3486	0,0324	0,1176	0,1046	0,1658
t ²	0,4364	0,0403	0,5873	0,3898	0,0190	0,0447	0,0825	0,0306
txT	0,5462	0,0227	0,9647	0,9453	0,0204	0,3787	0,1151	0,2404
T ²	0,0102	0,0138	0,0512	0,1576	0,0832	0,0065	0,0382	0,7184
Falta de Ajuste	0,0949	0,0571	0,4082	0,2047	0,3655	0,0859	0,2651	0,6534
R ²	0,9155	0,8630	0,8770	0,6977	0,9775	0,8907	0,9181	0,9385

Los coeficientes de regresión de la ecuación utilizada para ajustar los datos se muestran en la **Tabla IV.4**.

Tabla IV.4 Coeficientes de regresión de la ecuación polinómica de segundo orden para las respuestas evaluadas para el remojo de arroz integral

Coef.*	P libre agua	P-AF agua	P-AF grano	P total	Pérdida sólidos	Pérdida proteínas	Ret. Fe	Ret. Zn
b₀	-253,45	469,45	73,68	365,51	-15,67	-114,333	193,60	123,705
b₁	1,96	-8,03	-0,33	-3,69	0,90	1,48	-2,502	-3,875
b₂	12,83	-14,856	-2,25	-9,30	0,59	5,62	-4,66	-1,00
b₃	-0,01	0,059	0,003	0,034	-0,007	-0,015	0,020	0,043
b₄	-0,007	0,077	-0,0002	0,002	-0,006	-0,004	0,016	0,012
b₅	-0,15	0,15	0,027	0,098	-0,005	-0,059	0,043	0,005

*Coef.: Coeficientes; b_0 representa la intersección y b_1 , b_2 , b_3 , b_4 , y b_5 son los coeficientes para el término lineal del **tiempo**, el término lineal de la **Temperatura**, el término cuadrático del tiempo, la interacción del tiempo y Temperatura, y el término cuadrático de la Temperatura, respectivamente.

IV.1.2.1 Fósforo libre en el agua de remojo (P libre agua)

La superficie de respuesta (**Figura IV.1**) muestra el efecto del tiempo y la T de remojo en el contenido de fósforo inorgánico liberado en el agua de remojo. El ANOVA indicó que las variables significativas fueron el t, la T y la T^2 de remojo. Se observó un máximo de fósforo libre a 35 °C y 48 h de remojo, llegando hasta un valor de 71,5 mg de P liberados en el agua por cada 100 g (b.s) de muestra remojada.

El fósforo en los cereales puede estar presente como fósforo del AF o unido a otros componentes (proteínas, lípidos, etc.), por lo que su liberación en el agua de remojo se puede relacionar con dos procesos diferentes. Por un lado, puede liberarse mediante el fenómeno de difusión en el agua de remojo, debido a que el medio ácido puede promover la remoción del fósforo soluble (Liang y col., 2009). Asimismo, puede producirse la hidrólisis del AF, por acción de las fitasas endógenas presentes en los cereales, las cuales se activan durante el remojo de los granos bajo determinadas condiciones.

Las condiciones ácidas del medio (pH~3,5), debidas al agregado de ácido láctico y la temperatura de 45 °C favorecen la hidrólisis del AF a inositoles fosfatos de menor peso molecular. Las fitasas endógenas de los cereales tienen un pH óptimo de acción en un

rango de temperaturas de 40-50°C y pH~4, según Yoshida y col. (1975) y Hayakawa y col. (1989) que aislaron y estudiaron las fitasas endógenas del salvado de arroz. Asimismo, Tijskens y col. (2000) estudiaron el comportamiento de las fitasas en función de la temperatura y el pH, y establecieron que la mayor actividad estaba alrededor de pH 4,5, y que por debajo de 2 y por encima de 7, su actividad desaparecía. Por otra parte, en relación a la temperatura indicaron que las fitasas aumentaban su actividad desde 10°C y hasta 55 °C, y que temperaturas mayores provocaban una disminución de su actividad.

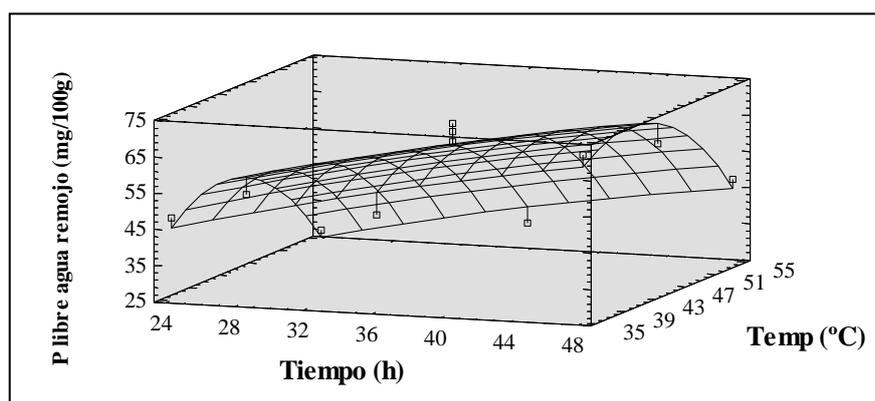


Figura IV.1 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y el tiempo en el contenido de P libre en el agua de remojo (P libre agua) del arroz integral.

IV.1.2.2 Fósforo del AF en el agua de remojo (P-AF agua)

El ANOVA mostró que fueron significativos la T en su término lineal ($p 0,0064$), los términos cuadráticos de ambas variables: t y T ($p 0,0403$ y $0,0138$, respectivamente) y la interacción de las mismas: txT ($p 0,0227$).

En el gráfico de superficie respuesta (**Figura IV.2**) se observó una mayor liberación de AF al agua de remojo en las condiciones de mayor T (55°C).

En el caso del AF, la lixiviación en el medio de remojo sería importante por su solubilidad en el agua acidificada. Al respecto, Liang y col. (2009) estudiaron diferentes tipos de remojo: con agua, buffer ácido y con solución de fitasa, encontrando que el remojo en medio ácido fue el más efectivo para la pérdida de AF, como consecuencia de la alta solubilidad de los compuestos de AF en soluciones ácidas, lo que acelera su difusión al medio de remojo.

Por otra parte, no podría descartarse que el AF lixiviado en el agua de remojo sea hidrolizado por la fitasas, lo cual explicaría su disminución con el tiempo de remojo.

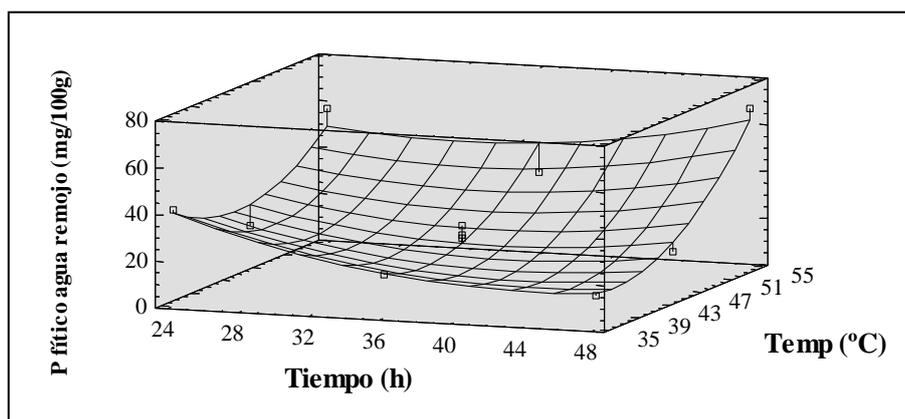


Figura IV.2 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y el tiempo en el contenido de P del AF en el agua de remojo (P-AF agua) del arroz integral.

IV.1.2.3 Fósforo del AF del grano (P-AF grano)

Los resultados se expresaron en relación al fósforo del AF remanente en los granos remojados. El ANOVA mostró que el t y la T no fueron significativos (p 0,0541 y 0,0861, respectivamente) al 95% de confianza. Sin embargo, se observó una tendencia de disminución del AF con el tiempo de remojo, lo cual se evidencia por el valor de p correspondiente al efecto del tiempo, cercano al nivel de significación adoptado. La **Figura IV.3** muestra esta tendencia, observándose un mínimo en el contenido de AF del grano a 45°C.

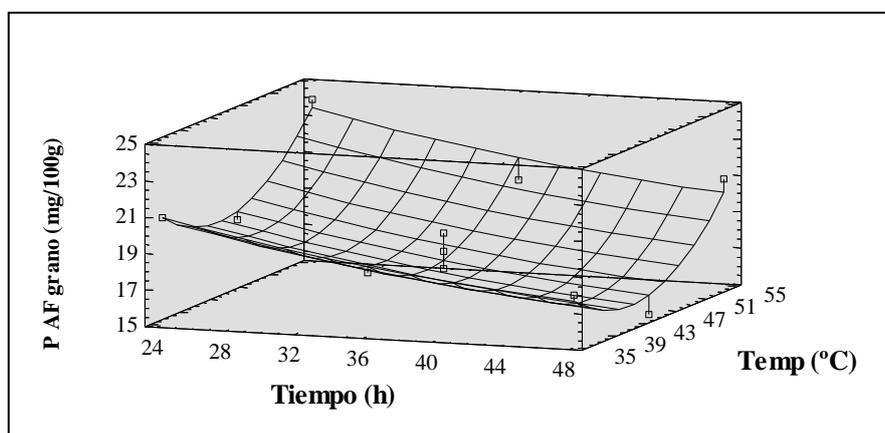


Figura IV.3: Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y el tiempo de remojo en el contenido del P del AF remanente en el grano (P-AF grano) de arroz integral.

Los valores más bajos, alcanzados con el remojo a una temperatura de 45 °C, coinciden con las mayores pérdidas de P libre encontradas en el agua de remojo (**Figura IV.1**). Como se mencionó, esto estaría relacionado con la acción de las fitasas que actúan

en forma más eficaz a esta temperatura de remojo, hidrolizando los enlaces fosfatos del AF y liberando fósforo inorgánico e inositol fosfatos (mono, di, tri, etc).

Por otra parte, el AF del grano también disminuiría por difusión en el agua de remojo, como fue explicado al analizar el AF lixiviado.

Para las condiciones aplicadas en el diseño, las pérdidas de AF se encontraron en un rango de 86-91%, en relación al contenido de AF del arroz integral (174,9 mg/100 g b.s) presentado en la **Tabla IV.1**

IV.1.2.4 Fósforo total del grano (P total)

El ANOVA mostró que el tiempo de remojo fue la única variable significativa del diseño experimental que afectó la remoción del P total del grano.

La superficie de respuesta para el P total remanente en el grano (**Figura IV.4**) mostró claramente su disminución, con pérdidas que oscilaron entre 64-86,3 % en relación al fósforo total del arroz integral sin tratamiento (255 mg/ 100 g b.s.).

Como se mencionó previamente, las pérdidas de P total estarían relacionadas con la lixiviación de P, del AF y del P liberado por la hidrólisis por parte de las fitasas.

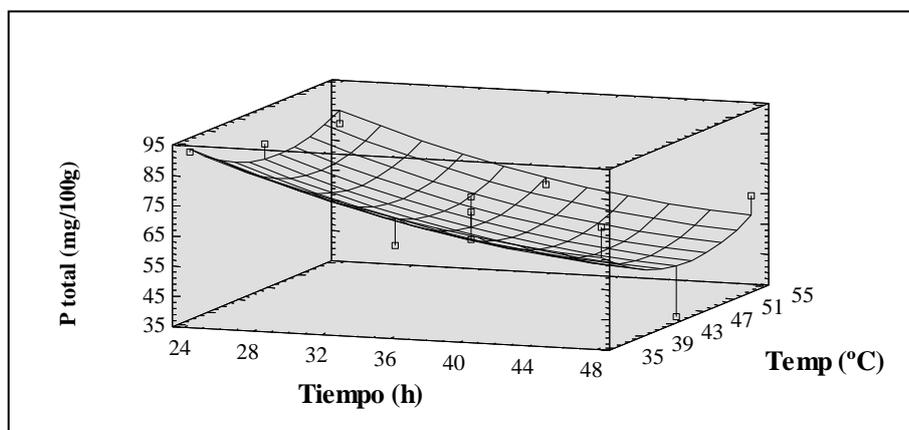


Figura IV.4 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y el tiempo de remojo en el contenido de P total remanente en el arroz integral remojado.

IV.1.2.5 Pérdida de sólidos

Para la pérdida de sólidos, el ANOVA mostró que ambas variables, t y T, fueron significativas en todos sus términos, excepto para T^2 .

La pérdida de sólidos tuvo un máximo a la temperatura intermedia (45 °C), y aumentó a mayor tiempo de tratamiento (**Figura IV.5**). La lixiviación de los sólidos en el agua de remojo puede justificarse por la modificación que producen las condiciones ácidas

sobre la capa externa del salvado del grano, que hace que sea más permeable a la pérdida de compuestos (Liang y col., 2009).

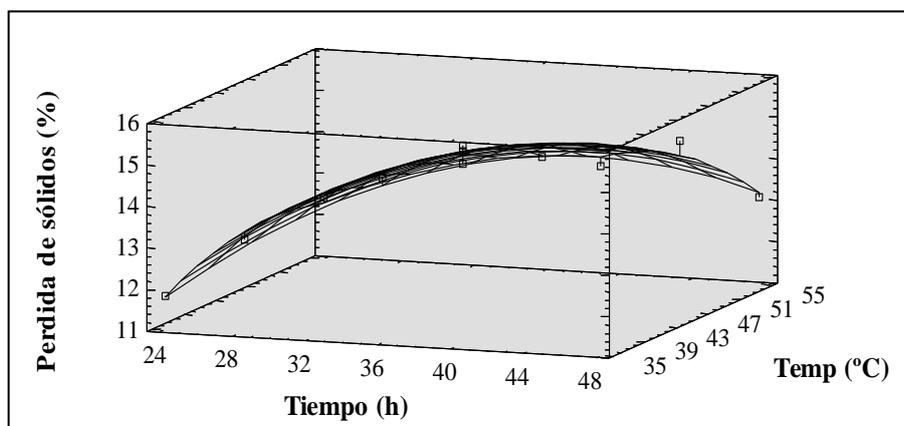


Figura IV.5 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y el tiempo de remojo en la pérdida de sólidos del arroz integral.

IV.1.2.6 Pérdida de proteínas

Para las pérdidas de proteínas en el tratamiento de remojo, el ANOVA mostró que el t en su término lineal y cuadrático y la T^2 fueron las variables significativas.

En la **Figura IV.6** se muestra la superficie de respuesta para la pérdida de proteínas.

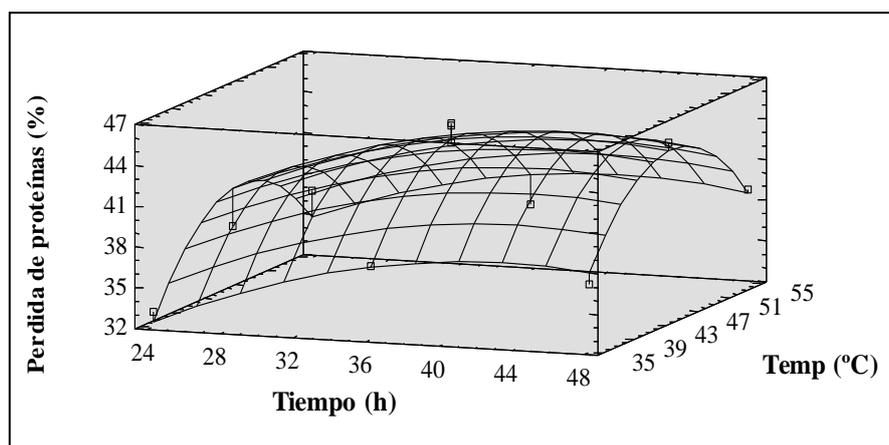


Figura IV.6 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y el tiempo de remojo en la pérdida de proteínas del arroz integral.

Puede observarse un máximo de pérdidas (45,4%) a 45 °C y podrían deberse a la solubilización de albúminas y globulinas presentes en las capas más externas del grano y facilitadas por el pH ácido del agua de remojo, debido al agregado de ácido láctico. Al respecto, Ohishi y col. (2003) estudiaron el comportamiento de las proteínas de arroz en

soluciones acidas o alcalinas, e indicaron que la principal forma de almacenamiento de las proteínas de cereales (glutelinas) son solubles en soluciones diluidas de ácidos o álcalis, por lo que no se debería descartar la solubilización de estas proteínas de reserva.

IV.1.2.7 Retención de Fe y Zn (Ret. de Fe y Zn)

El ANOVA para la retención de Fe en el grano mostró que las variables que resultaron significativas fueron t y T^2 (p : 0,0168 y 0,0382, respectivamente).

En la **Figura IV.7** se puede observar que luego del tratamiento de remojo, el contenido de Fe remanente fue del 31,2-49,2 % con respecto al valor inicial del arroz integral sin tratamiento.

En el caso del porcentaje de retención de Zn, el ANOVA indicó que el tiempo en su término cuadrático fue la única variable significativa, pero t en su término lineal se encontró cercano al nivel de significación adoptado (p 0,0516), con lo cual la tendencia fue semejante a la encontrada para la retención del Fe (**Figura IV.8**). Luego del remojo, el contenido de Zn retenido en el grano fue del 21.5-36 % respecto del valor inicial.

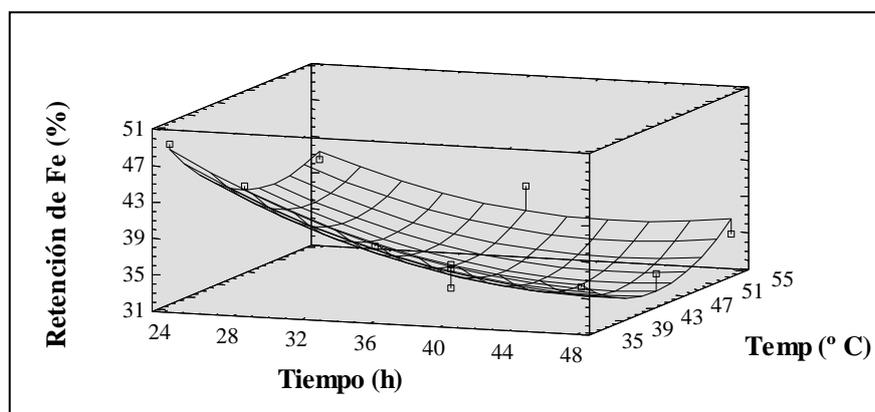


Figura IV.7 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y el tiempo de remojo en la retención de Fe del arroz integral.

Para ambos minerales, las superficies de respuesta muestran una disminución del contenido mineral a medida que se aumenta el tiempo de tratamiento. Esto se atribuye al fenómeno de lixiviación que se produce en el medio de remojo.

Las pérdidas más altas en el caso del Fe pueden justificarse debido a que ambos minerales se encuentran localizados en diferentes partes dentro del grano e incluso vinculados a diferentes moléculas. Según Lestienne y col. (2005), el Zn se encuentra formando parte de una gran cantidad de enzimas y otras proteínas, donde cumple un rol

estructural muy importante, y podría estar más ligado que el Fe. Estos investigadores estudiaron el remojo de arroz integral, y observaron que luego de 24 h de remojo a 30 °C, las pérdidas fueron mayores para el caso del Fe (60%) en comparación con las pérdidas que alcanzó el Zn (30 %), bajo las mismas condiciones. Las pérdidas de dichos minerales fueron atribuidas a su solubilización en el agua de remojo, y fueron mucho mayores que las observadas en el presente trabajo.

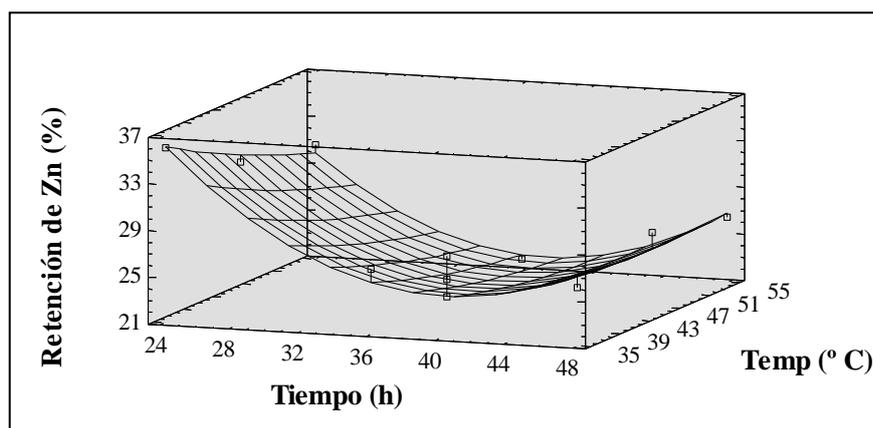


Figura IV.8 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y el tiempo de remojo en la retención de Zn del arroz integral.

Liang y col. (2009) estudiaron diferentes tipos de remojo del arroz integral y observaron que un remojo ligeramente ácido (HAc-NaAc 1 M; pH 3,5) provocó pérdidas de 45 y 23 % para Fe y Zn, respectivamente. En este caso, las pérdidas informadas coincidieron con las obtenidas para el remojo ácido propuesto en esta tesis.

IV.1.3 Optimización del diseño experimental correspondiente al proceso de remojo de arroz integral

Para la optimización del diseño se empleó la función deseabilidad (Reyes y col., 2008). El método consiste en estandarizar cada respuesta “y” en una función d_n cuyo valor varía de 0 (fuera del rango deseado) a 1 (en el rango deseado). Derringer y Suich (1980) usaron la siguiente función deseada:

$$d_n = \begin{cases} 0 & \text{si } y_n < a \\ \left(\frac{y_n - a}{b - a} \right)^s & \text{si } a \leq y_n \leq b \\ 1 & \text{si } y_n \geq b \end{cases} \quad (14)$$

Donde, a y b son valores constantes correspondientes a las restricciones de la respuesta.

Para todas las funciones deseadas de las diferentes respuestas, se define una función total D (deseabilidad) ($0 \leq D \leq 1$) como:

$$D = F(d_1, d_2, \dots, d_n) \quad (15)$$

Igual al promedio geométrico de las n funciones deseadas individuales:

$$D = (d_1, d_2, \dots, d_n)^{\frac{1}{n}} \quad (16)$$

Un valor alto de D indica las mejores funciones del sistema, lo cual se considera como las soluciones óptimas.

La **Figura IV.9** muestra la optimización del diseño de remojo del arroz integral teniendo en cuenta la máxima liberación del fósforo del AF en el agua de remojo (P-AF agua), un mínimo contenido de AF en el grano, y la menor pérdida de sólidos y proteínas del arroz integral. Se puede observar que la condición más adecuada correspondió al remojo a 35 °C durante 24 h, dando como resultado para una Temperatura de 35.5 °C y un tiempo de 24 h las siguientes respuestas: P-AF agua: 38,8 mg/100 g; P-AF grano: 20,7 mg/100 g; Pérdida de sólidos: 11,8%; Pérdidas de proteínas: 33,0% y una deseabilidad (D) de 0,641 (en una escala de 0-1). Estos resultados llevaron a la elección de las condiciones de remojo de 35 °C y 24 h como apropiadas para obtener un producto con AF reducido y menores pérdidas de nutrientes (en las condiciones estudiadas).

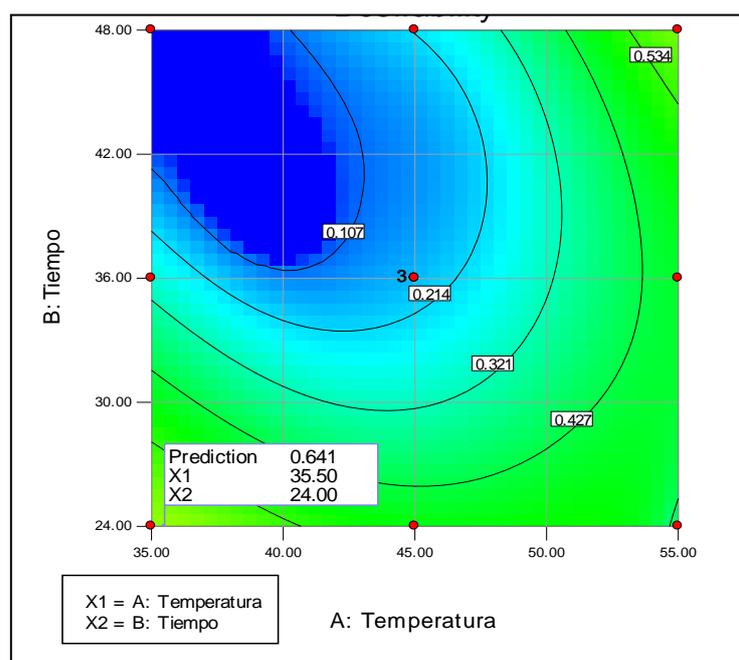


Figura IV.9 Optimización del diseño experimental del remojo de arroz integral.

IV.1.4 Digestibilidad proteica y bio-accesibilidad de minerales

Con el objetivo de establecer el impacto nutricional del proceso de remojo en el arroz integral, y para las condiciones ensayadas, se analizaron las muestras de arroz integral sin tratamiento, la muestra tratada a 35 °C-24 h (condición óptima según el análisis del punto IV.1.3) y aquella remojada a 45 °C-48 h, la cual correspondió a la combinación de t y T que significó las mayores pérdidas de AF. Los resultados se presentan en la **Tabla IV.5**.

Se observó que la condición de remojo a 35°C durante 24 h mostró un aumento de la digestibilidad proteica y la bio-accesibilidad del Fe y Zn luego del remojo, en comparación con el arroz integral sin tratamiento. Por otra parte, el remojo que llevó a la mayor pérdida de AF (45 °C-48 h), no mejoró la digestibilidad proteica ni tampoco la bioaccesibilidad del Fe, en comparación con el remojo a 35 °C durante 24 h, aunque sí fue significativamente mayor el valor de bioaccesibilidad del Zn para este tratamiento de remojo.

Tabla IV.5 Digestibilidad proteica y bio-accesibilidad de Fe y Zn

Muestra	Digestibilidad Proteica (%)	Bioaccesibilidad Mineral (%)	
		Zn	Fe
Arroz Integral	74,9 ± 0,19 ^a	9,89 ± 1,42 ^c	ND
35 °C- 24 h	83,6 ± 2,23 ^b	26,16 ± 1,36 ^b	27,45 ± 0,6 ^a
45 °C- 48 h	86,3 ± 0,18 ^b	35,97 ± 3,25 ^a	30,36 ± 2,05 ^a

Media ± DE; ND: Fe no detectado en el dializado.

Letras diferentes indican diferencia significativa entre las muestras ($p < 0.05$)

Estos resultados confirman la selección del tratamiento de remojo a 35°C durante 24 h para el arroz integral, ya que permitió obtener una importante pérdida de AF con menores pérdidas de sólidos y proteínas, y por otra parte, el tratamiento fue suficiente para lograr una mejor digestibilidad proteica y bioaccesibilidad mineral de Fe y Zn.

IV.1.5 Conclusiones parciales

- El remojo del arroz integral a 45°C-48 h permitió una remoción aproximada del 90% del AF del grano en presencia de ácido láctico.

- La reducción del AF se debe a dos fenómenos diferentes: la activación de las fitasas endógenas del cereal, conjuntamente con la lixiviación del AF en el agua de remojo facilitadas por el medio ácido.
- El remojo del arroz integral a 35°C-24 h permitió una remoción aproximada del 88% del AF del grano con pérdidas del 33,2% de proteínas y 11,8% de sólidos.
- A pesar de que se vieron mejoradas la digestibilidad proteica y la bio-accesibilidad mineral, el proceso de remojo produjo pérdidas significativas de minerales y proteínas. Por lo tanto, el remojo ácido de arroz integral no se sugiere como un proceso útil para reducir el contenido de AF del arroz integral, si se tiene como objetivo la producción de un alimento o ingrediente sin fortificar o un alimento de consumo masivo.
- El remojo ácido de arroz podría ser útil en la producción de un ingrediente amiláceo con bajo contenido de AF, el cual podría ser utilizado en preparados alimenticios con bajo contenido de inhibidores de la absorción de minerales, por ejemplo en productos fortificados destinados a personas celíacas con necesidades nutricionales especiales.

IV.2 ESTUDIO DEL PROCESO DE REMOJO DEL ARROZ CASCARA Y DEL PROCESO DE EXTRUSIÓN DE HARINAS DE ARROZ DE GRANO ENTERO REMOJADO

Los resultados obtenidos a partir del diseño de remojo de arroz integral mostraron que, si bien la remoción del AF fue importante, las pérdidas de nutrientes también eran considerables. Por ello se decidió realizar el mismo diseño de remojo ácido utilizando como materia prima arroz cáscara, siguiendo con el objetivo de lograr la remoción del AF, pero a su vez, minimizando las pérdidas de nutrientes.

IV.2.1 Composición de la materia prima

La **Tabla IV.6** presenta la composición centesimal del arroz cáscara (Tipo Largo Ancho) utilizado para el estudio del remojo y descascarado en la planta piloto del ITA-FIQ a los fines del análisis. Los resultados se encuentran dentro de los rangos publicados para arroz integral por Juliano (1985) y Pomeranz y Ory (1982). En esta partida de arroz descascarado, el contenido de proteínas se encontró dentro de los valores hallados en la bibliografía.

Tabla IV.6 Composición centesimal del arroz integral (proveniente de arroz cáscara).

Componentes	Arroz integral (descascarado en P.P)
Proteínas (N x 5,95) (g/100 g b.s)	7,37±0,15
Grasa (extracto etéreo) (g/100 g b.s)	2,27±0,19
Cenizas (g/100 g b.s)	1,11±0,01
Carbohidratos Disponibles* (g/100 g b.s)	84,06
Almidón Total (g/100 g b.s)	77,20±0,94
Fibra Dietaria Total (g/100 g b.s)	5,47±0,60
P-Acido Fólico (mg/100g)	208,39±0,50
Hierro (Fe) (mg/kg)	8,06±0,20
Zinc (Zn) (mg/kg)	16,84±0,90

Media ± DE; P.P: Planta Piloto; b.s: base seca;

*Carbohidratos disponibles por diferencia

IV.2.2 Estudio del proceso de remojo del arroz cáscara

Los resultados de las respuestas evaluadas para las diferentes condiciones de Temperatura (T) y tiempo (t) utilizados en este diseño experimental se muestran en la **Tabla IV.7**.

Tabla IV.7 Variables independientes y respuestas evaluadas para el remojo de arroz cáscara.

Condiciones de remojo	Pérdida					
	P libre agua (mg/100g b.s)	P-AF agua (mg/100g b.s)	AF Grano (%)	Pérdida sólidos (%)	Pérdida cenizas (%)	Pérdida Proteínas (%)
35 °C-24h	8,5	2,2	23,73	1,15	5,35	1,07
35 °C-36h	9,86	2,38	26,10	1,27	6,04	3,14
35 °C-48h	13,16	3,23	27,08	1,77	6,09	5,00
45 °C-24h	13,64	4,71	36,68	1,56	8,41	5,78
45 °C-36h	28,97	6,87	39,72	1,75	9,19	6,59
	28,45	7,67	42,87	1,70	9,96	6,05
	29,75	5,81	38,28	1,78	11,11	6,44
45 °C-48h	31,55	11,46	46,99	2,18	14,26	6,73
55 °C-24h	41,03	19,73	51,08	2,55	20,16	9,90
55 °C-36h	48,87	23,75	54,64	2,71	28,69	11,89
55 °C-48h	53,67	31,85	54,12	2,94	31,94	11,96

La **Tabla IV.8** presenta los ANOVA correspondientes a todas las respuestas evaluadas.

Se puede observar que en cada caso, la falta de ajuste no fue significativa ($p > 0,05$), lo que significa que el modelo de regresión fue adecuado para explicar el efecto de las variables independientes (T y t) sobre las respuestas estudiadas.

Por otro lado la **Tabla IV.9** presenta los coeficientes de regresión para la ecuación que se han utilizado para ajustar los datos correspondientes a cada respuesta.

Tabla IV.8 ANOVA para las respuestas analizadas del diseño experimental correspondiente al proceso de remojo de arroz cáscara.

Respuesta	P libre	P-AF	Pérdida	Pérdida	Pérdida	Pérdida
Fuente de variación	agua	agua	AF grano	sólidos	cenizas	proteínas
tiempo (t)	0,0063	0,0129	0,1009	0,0037	0,0162	0,0095
Temperatura (T)	0,0006	0,0011	0,0048	0,0006	0,0014	0,0008
t ²	0,0510	0,1685	0,9942	0,0425	0,7843	0,2002
txT	0,0731	0,0272	0,9534	0,1045	0,0294	0,0337
T ²	0,0354	0,0088	0,4284	0,0111	0,0107	0,0785
Falta de ajuste	0,0703	0,7824	0,4461	0,2933	0,3140	0,1196
R²	0,9772	0,9972	0,9725	0,9953	0,9901	0,9832

Tabla IV.9 Coeficientes de regresión de la ecuación polinómica de segundo orden para las respuestas evaluadas para el remojo de arroz cáscara.

Coefficientes*	P libre	P-AF	Pérdida	Pérdida	Pérdida	Pérdida
	agua	agua	AF grano	sólidos	cenizas	proteínas
b₀	0,5125	120,794	-56,43	2,585	107,816	-5,873
b₁	1,27	-1,38	0,518	-0,0067	-0,68	0,4367
b₂	-2,01	-5,305	2,32	-0,1155	-5,029	-0,287
b₃	-0,02	0,008	-0,0036	0,0007	-0,001	-0,0023
b₄	0,016	0,023	-0,0006	-0,0004	0,0229	-0,0039
b₅	0,037	0,062	-0,0098	0,0022	0,0584	0,0093

*b₀ representa la intersección y b₁, b₂, b₃, b₄, y b₅ son los coeficientes para el término lineal del **tiempo**, el término lineal de la **Temperatura**, el término cuadrático del tiempo, la interacción del tiempo y Temperatura, y el término cuadrático de la Temperatura, respectivamente.

IV.2.2.1 Fósforo libre y del AF en el agua de remojo (P libre y P-AF agua)

De acuerdo al ANOVA, el efecto del t y la T para el P libre y P-AF en el agua de remojo fueron significativos en los términos lineales para t y T; también fueron significativos: T² para el caso del P libre y T² y TxT para el P-AF en el agua de remojo.

La **Figura IV.10** muestra el efecto del t y la T en el contenido de P libre del agua de remojo. Puede observarse que las pérdidas se deben principalmente al efecto de la T . A diferencia de lo que ocurrió al remojar el arroz integral, el remojo del arroz cáscara a 55°C durante 48 h produjo la mayor liberación de P libre al agua acidificada (53,67 mg P/100 g b.s). Tal como se mencionó en el capítulo **IV.1**, el fósforo puede estar presente en el grano como ácido fítico (AF) y/o unido a otros componentes, por lo tanto su liberación en el medio de remojo puede estar relacionada con su difusión en el agua y/o la hidrólisis enzimática del AF.

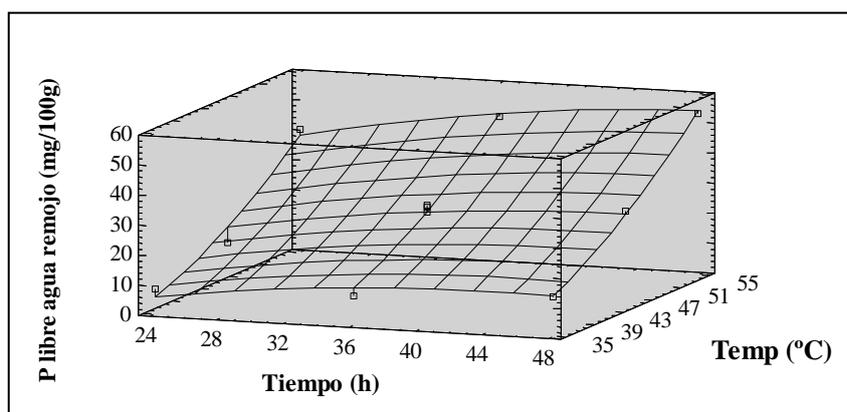


Figura IV.10 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y el tiempo de remojo en el contenido de P libre en el agua de remojo para arroz cáscara.

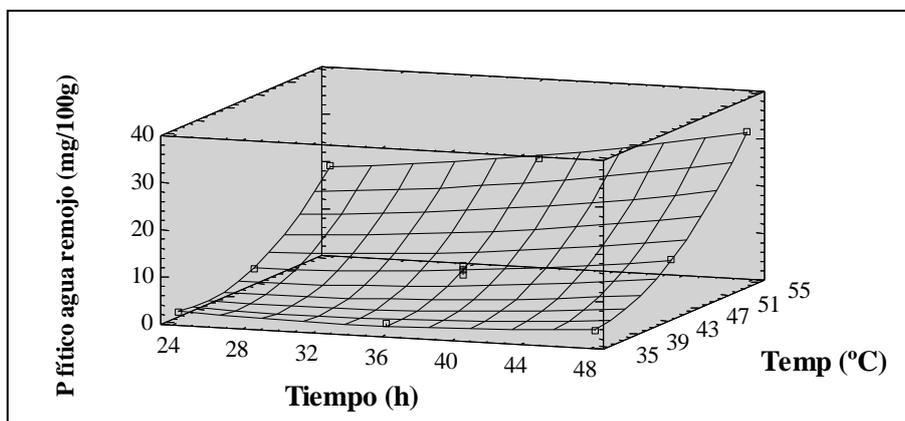


Figura IV.11 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y el tiempo de remojo de arroz cáscara en el contenido de P-AF en el agua de remojo.

La **Figura IV.11** muestra el contenido de P-AF en el agua de remojo. El máximo de liberación correspondió a los 55°C luego de 48 h de remojo (31,85 mg P/100 g b.s), lo cual coincidió con el mayor contenido de AF liberado al medio de remojo al realizar el remojo del arroz integral, aunque en el caso del arroz cáscara los valores fueron inferiores.

Esto indicaría que la temperatura favoreció la difusión del AF, que se solubilizó en el medio ácido.

IV.2.2.2 Pérdida de fósforo del AF del grano (Pérdida P-AF grano)

De acuerdo al ANOVA, sólo la T en su término lineal resultó significativa.

Los porcentajes de pérdida variaron entre 23,73 - 54,64 %, y fueron menores que los obtenidos en el remojo del arroz integral.

La **Figura IV.12** muestra la superficie de respuesta de las pérdidas de AF del grano. Las pérdidas más altas se obtuvieron a 55 °C, lo que se relaciona con los altos valores de P libre y P-AF encontrados en el agua de remojo.

Como se mencionó en el **Capítulo IV.1**, la hidrólisis del AF podría atribuirse principalmente a la acción de las fitasas endógenas, cuya actividad máxima se encuentra alrededor de los 40-50 °C. Existen varios estudios sobre las condiciones óptimas de acción de estas enzimas en varios tipos de cereales. Yoshida y col. (1975) informaron que las condiciones ácidas del medio de remojo (ácido láctico) favorecerían la hidrólisis debido a que las fitasas endógenas aisladas de los granos de arroz tenían un pH óptimo alrededor de 4. En el caso del grano entero de centeno, 5,5 y 48 °C constituyen las condiciones de pH y temperatura óptimas para la actividad de sus fitasas (Tijskens y col., 1997). Por otro lado, Peers (1953) informo un pH de 5,15 y una temperatura ligeramente superior a 55 °C, para el caso particular del grano entero de trigo; y Egli y col. (2003) condiciones óptimas de pH 5 y 55 °C de temperatura, para las fitasas del trigo sarraceno.

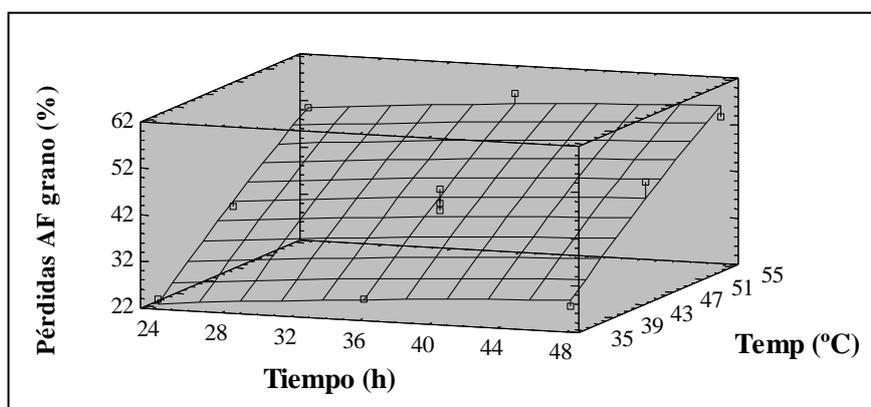


Figura IV.12 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y el tiempo de remojo de arroz cáscara en las pérdidas de AF del grano.

IV.2.2.3 Pérdidas de sólidos

Las pérdidas de sólidos para el arroz cáscara se encontraron en el rango de 1-2,94%. Estos valores se consideran mínimos y aceptables, teniendo en cuenta las altas pérdidas observadas (de hasta el 30%) durante el estudio del remojo de arroz integral (Albarracín y col., 2013). Esto indica que la cáscara cumple un rol fundamental en el remojo de los granos de arroz, evitando la difusión de los nutrientes hacia el medio de remojo.

De acuerdo al ANOVA, ambas variables de t y T en sus términos lineales y cuadráticos (t^2 y T^2) fueron significativas. En la **Figura IV.13** se puede observar la superficie de respuesta para las pérdidas de sólidos. A diferencia del diseño de remojo para arroz integral, el máximo de pérdidas se encontró a 55 °C.

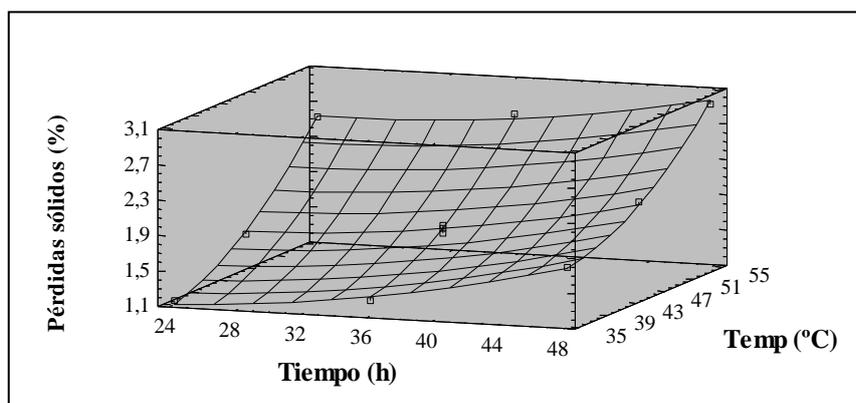


Figura IV.13 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y el tiempo de remojo de arroz cáscara en las pérdidas de sólidos de los granos.

IV.2.2.4 Pérdidas de cenizas y proteínas

Las pérdidas de cenizas fueron de 5,35-31,94% y de proteínas, de 1,07-11,96%. El ANOVA indicó que ambas variables: t y T tuvieron un efecto significativo en las pérdidas de proteínas y cenizas del arroz cáscara.

Las **Figuras IV.14** y **IV.15** muestran las superficies de respuesta para las pérdidas de cenizas y proteínas en el diseño de remojo de arroz cáscara, respectivamente.

Las pérdidas de proteínas fueron menores en el remojo de arroz cáscara que en del arroz integral.

De los sólidos perdidos durante el remojo, las proteínas, cenizas y AF constituyeron el 33%, el 6% y el 37%, respectivamente.

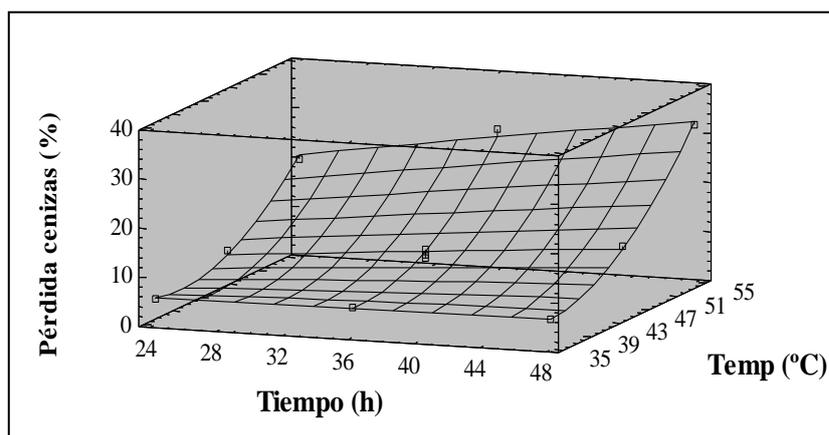


Figura IV.14 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y el tiempo de remojo de arroz cáscara en las pérdidas de cenizas.

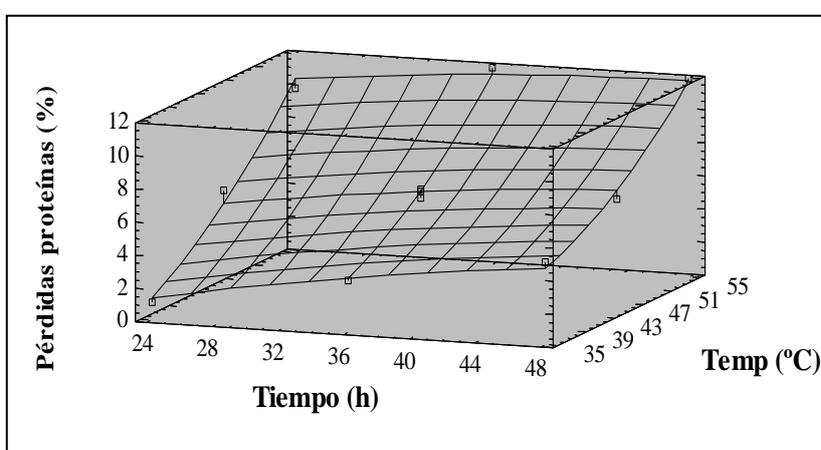


Figura IV.15 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y el tiempo de remojo de arroz cáscara en las pérdidas de proteínas.

IV.2.3 Optimización del diseño experimental correspondiente al proceso de remojo de arroz cáscara

Tal como se describió en el punto **IV.1.3** se realizó la optimización del diseño correspondiente al remojo de arroz cáscara.

La **Figura IV.16** muestra la optimización del diseño de remojo de arroz cáscara teniendo en cuenta la máxima liberación de AF en el agua de remojo, la máxima pérdida de AF del grano y las menores pérdidas de sólidos, cenizas y proteínas del arroz cáscara.

Puede observarse que la condición más adecuada según este análisis, corresponde a una Temperatura de 49 °C y un tiempo de 24 h, donde las respuestas son las siguientes: P-AF agua: 9,17 mg/100 g; Pérdida de AF grano: 43,5%; Pérdida de sólidos: 1,9%; Pérdida de cenizas: 11,5%; Pérdida de proteínas: 6,9% y una deseabilidad global de 0,496.

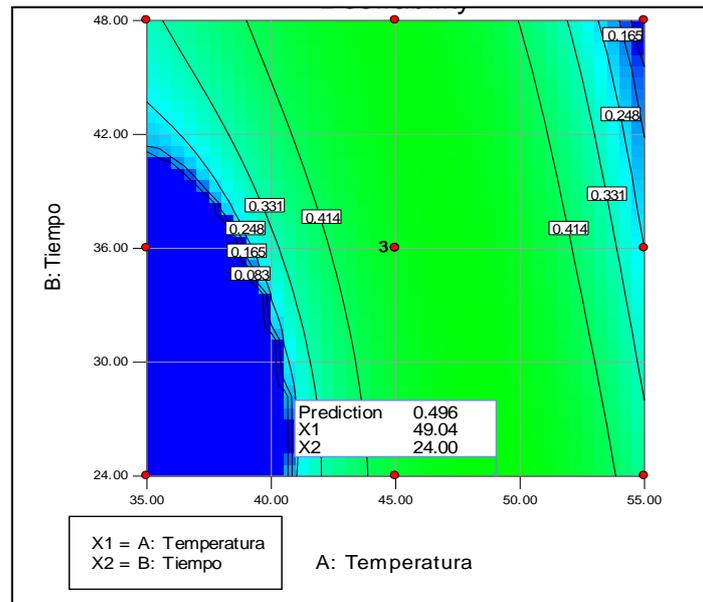


Figura IV.16 Optimización del diseño experimental del remojo de arroz cáscara.

IV.2.4 Estudio del proceso de extrusión de harinas de arroz de grano entero remojado

Con el objetivo de obtener los grits de arroz de grano entero remojado en cantidad suficiente para estudiar el proceso de extrusión, se procedió al remojo del arroz cáscara en escala piloto a 47 °C durante 24 h. Se seleccionó esta temperatura porque se encuentra en el rango óptimo de acuerdo a la predicción (**Figura IV.16**), y el equipo utilizado para calentar el agua a escala piloto tenía una variación de ± 2 °C. Esto nos permitió alcanzar una temperatura apropiada con menor costo energético respecto a 49°C.

La harina obtenida (grits) fue extrudida en diferentes condiciones de humedad y temperatura de extrusión, de acuerdo al diseño experimental descrito en el punto **III.4.1.2**.

La **Figura IV.17** muestra los productos obtenidos por extrusión del arroz cáscara previamente remojado. Puede observarse la diferencia en la expansión de los productos obtenidos, de acuerdo a las condiciones de cocción de T y H ensayadas.

La **Tabla IV.10** muestra los resultados de la evaluación fisicoquímica de los productos extrudidos en las diferentes condiciones de proceso y la **Tabla IV.11**, el ANOVA para cada una de las respuestas analizadas del diseño de extrusión de arroz cáscara remojado.

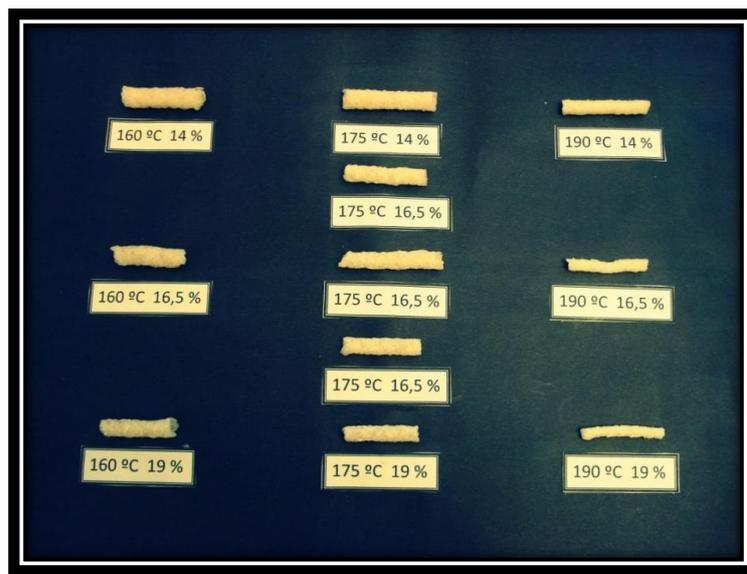


Figura IV.17 Productos obtenidos por extrusión de la harina de arroz cáscara remojado en diferentes condiciones de humedad y temperatura.

Tabla IV.10 Evaluación físico-química de los productos provenientes de la extrusión de arroz cáscara remojado.

Extrusión (T - H)	CEEM (J/g)	E	VE (cm ³ /g)	DS	AA (mL/g)	S (g/100g)	PF Libres (mg AG 100g)	CAO (μmol trolox/g)
160 °C-14%	452,93	3,28	8,42	7	3,75	59,31	23,41	34,42
160 °C-16,5%	469,07	2,92	6,72	6	4,05	55,48	17,73	29,21
160 °C-19%	433,99	2,67	5,68	9	4,35	45,44	16,61	27,68
175 °C-14%	433,41	3,04	9,86	5	3,66	65,31	29,60	35,20
175 °C-16,5%	481,28	2,69	8,45	3	4,04	64,49	25,27	36,05
	464,08	2,65	8,83	4	3,77	66,20	23,77	34,48
	469,70	2,63	8,91	4	3,51	58,88	22,95	32,81
175 °C-19%	348,43	2,33	7,60	4	3,69	56,20	21,32	32,35
190 °C-14%	315,59	2,07	10,99	1	3,41	61,28	36,77	39,95
190 °C-16,5%	349,44	1,82	11,06	2	3,58	65,14	36,27	39,57
190 °C-19%	318,84	1,64	8,20	2	4,43	61,14	32,07	38,22

CEEM: Consumo Específico de Energía Mecánica; E: expansión; VE: volumen específico; DS: Dureza Sensorial; AA: Absorción de Agua; S: solubilidad; PF Libres: Polifenoles Libres; AG: ácido gálico; CAO: Capacidad Antioxidante.

Tabla IV.11 ANOVA para las respuestas analizadas del diseño de extrusión de arroz cáscara remojado.

Respuesta	CEEM	E	VE	DS	AA	S	PF Libres	CAO
Temperatura (T)	0,0033	0,0006	0,0040	0,0068	0,3776	0,1003	0,0037	0,0217
Humedad (H)	0,0426	0,0021	0,0058	0,2929	0,1262	0,1326	0,0203	0,1037
T ²	0,0237	0,0053	0,4606	0,5086	0,3866	0,2877	0,0878	0,5875
TxH	0,3333	0,1170	0,9241	0,4778	0,5112	0,2149	0,4665	0,2612
H ²	0,0105	0,2026	0,1868	0,1615	0,8208	0,3381	0,3788	0,9711
Falta de ajuste	0,0593	0,2188	0,1181	0,1994	0,4500	0,9786	0,3279	0,7407
R ²	0,9097	0,9946	0,9449	0,9139	0,6190	0,9129	0,9749	0,9428

La **Tabla IV.12** muestra los coeficientes de regresión de la ecuación polinómica de segundo orden para las respuestas evaluadas en el diseño experimental de extrusión.

Tabla IV.12 Coeficientes de regresión de la ecuación polinómica de segundo orden para las respuestas evaluadas para la extrusión del arroz cáscara remojado.

Coef.*	CEEM	E	VE	DS	AA	S	PF Libres	CAO
b₀	-5390,6	-22,05	-33,94	89,08	38,169	-300,75	346,29	182,212
b₁	48,09	0,379	-0,326	-0,529	-0,339	4,164	-3,315	-1,271
b₂	249,76	-0,523	1,137	-2,868	-0,606	-1,696	-8,131	-6,827
b₃	-0,156	-0,001	-0,0006	0,001	0,001	-0,015	0,0103	0,0029
b₄	0,148	0,001	-0,0003	-0,007	0,003	0,092	0,0139	0,0334
b₅	-8,556	0,006	-0,0483	0,126	0,007	-0,485	0,132	0,0066

*Coef.: coeficientes; **b₀** representa la intersección y **b₁**, **b₂**, **b₃**, **b₄**, y **b₅** son los coeficientes para el término lineal del **Temperatura**, el término lineal de la Humedad, el término cuadrático de la temperatura, la interacción de la Temperatura y Humedad, y el término cuadrático de la Humedad, respectivamente.

Antes de analizar el efecto de las variables sobre las distintas respuestas (CEEM, E, VE, AA, S, etc.) conviene destacar que para los productos extrudidos de materiales amiláceos el concepto de cocción va más allá de la tradicional “gelatinización”, ya que ésta solo implica la destrucción de la estructura cristalina del gránulo. Sin embargo, como la extrusión es un proceso termo-mecánico es importante tener en cuenta que durante la cocción por extrusión no sólo se pierde la estructura cristalina, sino que también se produce una destrucción parcial o total de la estructura granular del almidón. Es decir, en los productos extrudidos se pueden encontrar una amplia gama de “estados” del almidón que va desde gránulos enteros gelatinizados, gránulos parcialmente destruidos y gránulos totalmente destruidos. Debido a esto se utiliza el término genérico “grado de cocción” (GC) el cual está directamente relacionado con algunas de las respuestas, como por ejemplo el VE y la S (González y col., 2002a). Es decir, el término GC está directamente relacionado a la proporción de gránulos de almidón con pérdida de estructura cristalina y pérdida de estructura granular (González y col., 2014).

IV.2.4.1 Consumo Específico de Energía Mecánica (CEEM)

El ANOVA indicó que ambos factores (T y H) en sus términos lineales fueron significativos. Además, H^2 también resultó significativo, lo que explica la curvatura de la superficie de respuesta para CEEM (**Figura IV.18**). Si bien el CEEM es una buena respuesta del proceso, sólo resulta apto para evaluar grados de cocción (GC) en los casos donde se estudia la influencia de la humedad, donde a mayor CEEM le corresponde mayor GC; y no cuando se analizan variaciones de temperatura, cuyos efectos sobre el CEEM y el GC son opuestos (González y col., 1986). Es por esto que en este caso, el CEEM no es indicativo de un GC en forma directa.

El rango de CEEM, para la producción de productos extrudidos de arroz integral remojado de la variedad Fortuna, resultó menor al obtenido en la extrusión de arroz integral sin tratamiento (481-315 vs. 703-409, respectivamente) (González y col., 2013). Estos valores son comparables debido a que el arroz utilizado para la presente tesis, de Tipo Largo Ancho, y la variedad Fortuna utilizada por González y col. (2013) se encuentran dentro de la misma clasificación según el Código Alimentario Argentino (Art. **649-Res 1547, 12.09.90**).

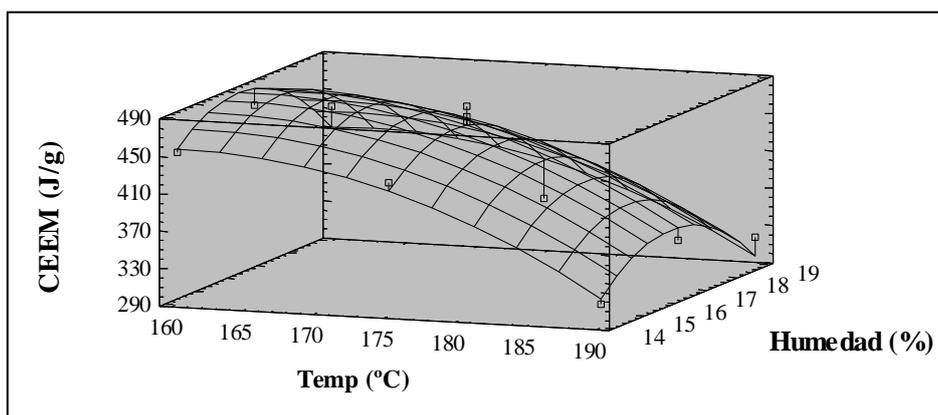


Figura IV.18 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y la humedad en el consumo específico de energía mecánica (CEEM) del proceso de extrusión de arroz cáscara remojado.

Este menor rango de CEEM probablemente podría ser a causa del remojo ácido previo, el cual le confiere un comportamiento diferente al momento de extrusión.

IV.2.4.2 Expansión (E)

La E es una característica importante de los productos de tipo snacks. Está directamente relacionada con la elasticidad de la masa y describe el grado de inflamamiento experimentado por la muestra al salir de la boquilla del extrusor (González y col., 2002a).

Los resultados de E de los extruidos oscilaron entre 1,64-3,28; y el valor más alto de E se obtuvo bajo la condición de 160 °C y 14% H. Esta condición coincide con la máxima E obtenida en el estudio de González y col. (2013) para la extrusión de arroz integral sin tratamiento. El ANOVA indicó que los efectos de T y H en sus términos lineales y en el término cuadrático de T fueron significativos. En la **Figura IV.19** se muestra la superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y la humedad en E.

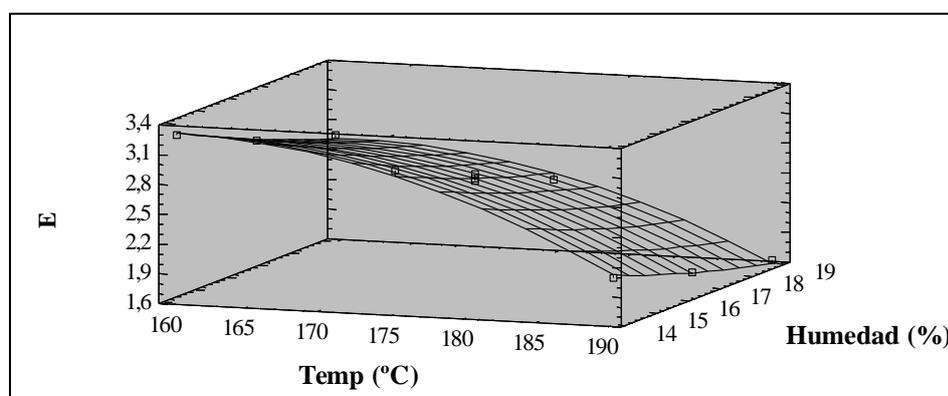


Figura IV.19 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y la humedad en la Expansión (E) de arroz cáscara remojado extrudido.

Puede observarse que la E disminuyó con el aumento de la T y de la H.

IV.2.4.3 Volumen específico (VE)

El VE ha sido propuesto como un buen indicador del GC para los productos extrudidos de cereales, y está directamente relacionado con la destrucción de la estructura del gránulo de almidón como se describe más abajo (González y col., 2002a).

El VE se encontró en un rango de 11,06-5,68 cm³/g, valores que corresponden al mayor y menor GC alcanzado por el producto.

Los resultados del ANOVA mostraron que sólo los términos lineales de T y H fueron significativos. En la **Figura IV.20** se observa que el VE está relacionado en forma inversa con la H. A medida que H aumenta, el nivel de fricción dentro del extrusor disminuye y, como consecuencia de esto, es menor la destrucción de los gránulos, por ende el producto alcanza un menor GC y un menor VE.

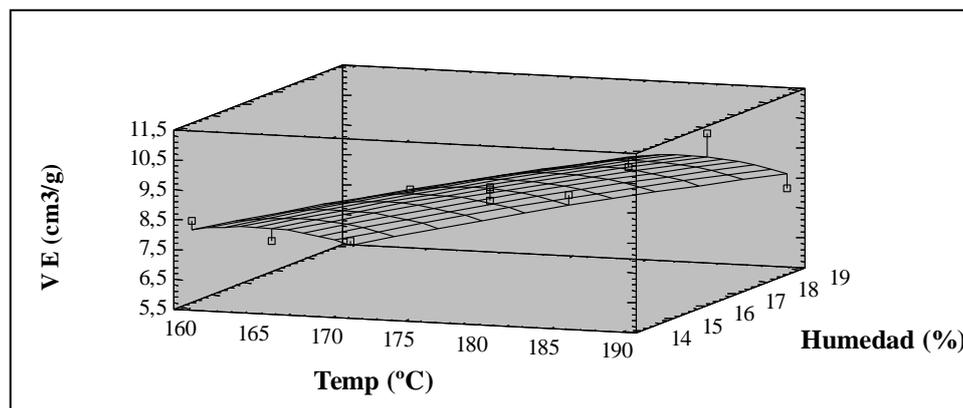


Figura IV.20 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y la humedad en el Volumen específico (VE) de arroz cáscara remojado extrudido.

IV.2.4.4 Evaluación de la Dureza Sensorial (DS) y Dureza Mecánica (DM)

En los productos extrudidos, el grado de destrucción de las estructuras cristalina y granular del almidón (o grado de cocción), determina la textura. Así, un alto grado de cocción, es decir alta solubilidad en agua, genera productos muy porosos, blandos y pegajosos, mientras que un grado de cocción intermedio, genera productos más crocantes. La dureza es mayor cuanto menor es el grado de cocción (González y col., 2002a).

El ANOVA correspondiente a la DS indicó que la T en su término lineal fue significativa para esta respuesta del diseño.

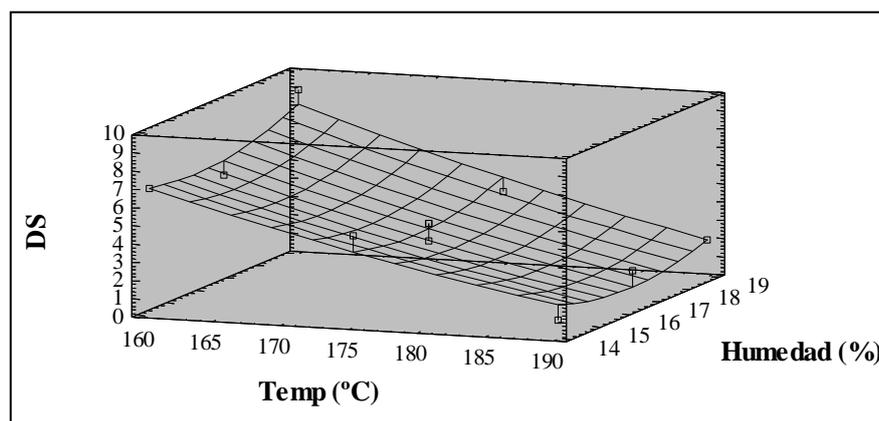


Figura IV.21 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y la humedad en la Dureza Sensorial (DS) de arroz cáscara remojado extrudido.

La **Figura IV.21** muestra el comportamiento de la DS en función de las condiciones de T y H de la extrusión. Se pudo observar una relación inversa entre la DS y la T, es decir a medida que aumentó la T, disminuyó la DS del producto.

El valor más alto de DS correspondió a la muestra extrudida a 160 °C-19 % H (DS = 9), el cual coincide con el menor GC, y por lo tanto menor VE (VE=5,68). Por otra parte, la muestra más blanda (DS=1) fue aquella extrudida a 190 °C-14% H, correspondiéndose con uno de los mayores GC alcanzados por los productos elaborados en las condiciones del diseño, con alto VE (VE=10,99). Esto también fue observado por otros investigadores que realizaron extrusión de cereales (Pérez y col., 2008; Llopart y col., 2014), los cuales indicaron que la DS está relacionada de forma inversa con el GC. Es decir que, a medida que aumenta el GC, el espesor de la pared de los poros se vuelve más delgado, y como consecuencia se obtienen estructuras más débiles y blandas en los productos.

En relación a los datos de DM, se encontró un rango de fuerza máxima de 16,6-26,5 N, para estas muestras extrudidas, correspondiendo el menor valor con la mayor temperatura de cocción (190 °C) y los mayores, con las temperaturas de 160 °C.

En la **Figura IV.22** se muestra la relación encontrada entre la DS y la DM de las muestras obtenidas por extrusión del arroz cáscara remojado. Se observó una buena correlación entre estas respuestas ($R^2= 0,823$), que siguen la misma tendencia en su comportamiento frente a la T, es decir, DS y DM disminuyen a medida que la T aumenta.

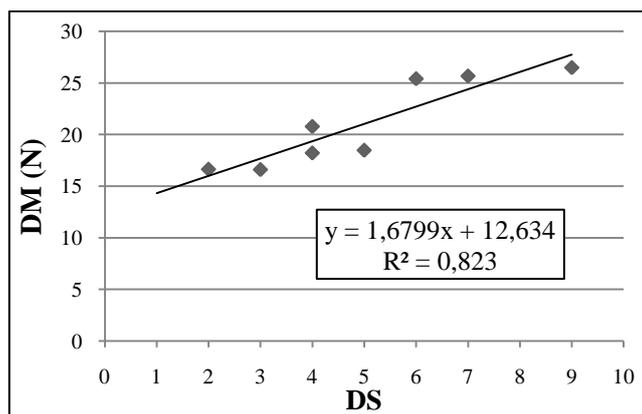


Figura IV.22 Correlación entre la dureza sensorial (DS) y la dureza mecánica (DM) de productos extrudidos de arroz cáscara remojado.

En relación al sabor, según el panel de expertos, algunas muestras (particularmente las de bajo GC, alta humedad y baja temperatura de extrusión) presentaron un ligero sabor ácido residual proveniente del remojo, que la extrusión no logró enmascarar. Sin embargo, las muestras extrudidas bajo las condiciones de 160 °C-14 y 16,5% H presentaron un sabor agradable, sin sabor a tostado.

IV.2.4.5 Absorción de Agua (AA) y Solubilidad (S)

Los valores de absorción de agua (AA) y solubilidad (S) variaron desde 3,41 a 4,43 mL/g b.s, y 45,44-66,20 g/100 g, respectivamente.

El ANOVA de ambas respuestas mostró que ninguno de los términos del modelo fue significativo.

La AA es una propiedad que está relacionada con la capacidad de hinchamiento de los gránulos de almidón, la cual irá aumentando a medida que el GC aumente, y mientras se mantenga la morfología de los mismos. Cuando el tratamiento de extrusión altera suficientemente la integridad de los gránulos, los valores de AA comenzarán a disminuir (González y col., 1986).

El menor valor de AA se observó en la condición de 190 °C- 14% H (AA=3,41), lo que permite confirmar los resultados anteriores, que indican que la destrucción de los gránulos de almidón fue mayor en esta condición de extrusión, y como consecuencia, afirmar que a mayor GC le correspondería menor absorción de agua.

Los valores de S de productos extrudidos pueden ser utilizados como un indicador de la degradación del almidón o del GC de los cereales producido durante la extrusión (González y col., 2002a).

La S se relacionó de forma inversa con la H a 160 y 175 °C, y de forma directa con la T para 16,5 y 19% H.

Se observó una buena correlación entre la S y VE ($S = 2,89 VE + 35$; $R^2 = 0,612$), indicando que la S aumentó a medida que aumentó el GC. Estos resultados concuerdan con lo publicado previamente en extrusión de granos enteros de maíz y arroz (González y col., 2002a; Pastor-Cavada y col., 2014), donde se informó que también para grano entero, la S está directamente relacionada con el GC del producto.

Se realizó la comparación de los resultados de la extrusión del arroz entero remojado, con los provenientes de la extrusión de arroz integral sin tratamiento realizada por González y col. (2014). Teniendo en cuenta los valores de: E: 2,46-3,6; VE: 3,47-8,64 cm³/g; AA: 5,1-7,7 mL/g y S: 21-33 g/100 g de los productos de arroz integral extrudidos, se podría señalar que los valores más altos de VE: 5,68-11,06 cm³/g y S: 45,44-66,20 g/100 g) encontrados en el arroz remojado extrudido indican un mayor GC alcanzado, que aquellos extrudidos de arroz integral sin tratamiento previo. Esto indicaría que el tratamiento previo de remojo produce cambios, de tal manera que favorecen la cocción en el extrusor del arroz integral.

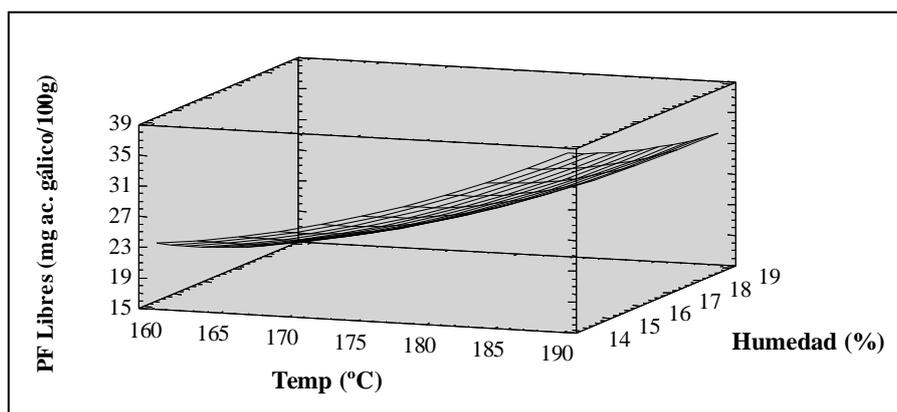
IV.2.4.6 Polifenoles Libres (PF Libres) y Capacidad Antioxidante (CAO)

Los valores encontrados para el contenido de PF Libres y la CAO variaron de 16,61-36,77 mg Ac. Gálico/100g (b.s) y 27,68 -39,95 μmol Trolox/g (b.s), respectivamente.

El ANOVA mostró que la T y la H en sus términos lineales y la T en su término lineal resultaron significativos para PF libres y CAO, respectivamente.

La **Figura IV.23** muestra la superficie de respuesta para los PF Libres de las muestras extrudidas en función de las condiciones del diseño.

Teniendo en cuenta el contenido inicial de PF Libres del arroz cáscara sin tratamiento ($34,63 \pm 2,12$ mg ác. gálico/100 g), la combinación de los procesos de remojo y extrusión, en algunas condiciones (extrusión a las temperaturas de 160 y 175 °C), redujo los PF Libres hasta el 52%, pero en otras, no produjo cambios en su contenido (temperatura de extrusión de 190°C).

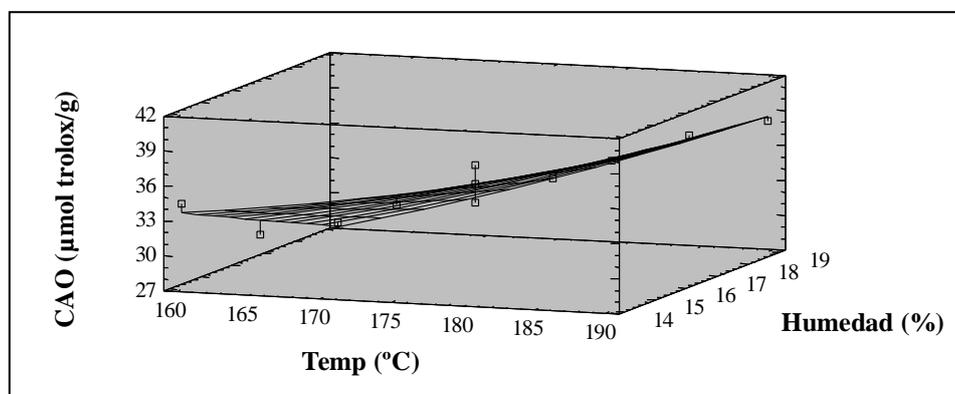


Figuras IV.23 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y la humedad en el contenido de polifenoles libres (PF Libres) de arroz cáscara remojado extrudido.

En los cereales, los polifenoles pueden encontrarse en forma libre y mayoritariamente en forma ligada (Adom y Liu, 2002). Estos compuestos pueden sufrir decarboxilación debido a las altas temperaturas y humedades de la extrusión (Brennan y col., 2011; Respo-Carrasco-Valencia y col., 2009), y alteración de su estructura molecular (Altan y col., 2009). Esto indicaría que, en función de las diferentes condiciones de T-H ensayadas, se pueden producir pérdidas de estos compuestos, o incluso una menor extracción mediante la técnica analítica utilizada para su determinación.

Asimismo, cabe destacar que muchas veces el proceso de extrusión contribuye a liberar algunos compuestos fenólicos ligados a la matriz. Por esto, el contenido de PF libres estaría determinado por un balance entre las pérdidas y la liberación de los mismos por el proceso (Rochín-Medina y col., 2012).

La **Figura IV.24** muestra la superficie de respuesta para la CAO de los productos extrudidos en las diferentes condiciones del diseño experimental.



Figuras IV.24 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y la humedad en la capacidad antioxidante (CAO) de los productos extrudidos de arroz cáscara remojado.

Tal como se mencionó en la introducción, la capacidad antioxidante se debe principalmente a la presencia de compuestos bioactivos, incluyendo a los polifenoles, γ -orizanol y tocoferoles, que se encuentran principalmente en las capas externas de los granos de arroz (Butsat y Siriamornpun, 2010).

Teniendo en cuenta la CAO inicial del arroz de partida ($13,39 \pm 0,16 \mu\text{mol Trolox/g}$), la combinación de remojo-extrusión aumentó en todas las condiciones la actividad antioxidante.

Se observó una buena correlación entre la CAO, determinada por el método de ABTS y el contenido de PF libres ($R^2 = 0,8996$) determinados en este trabajo (**Figura IV.25**). Numerosos investigadores indicaron que el contenido de compuestos fenólicos y la CAO se correlacionan. Shen y col. (2009) y Choi y col. (2007) encontraron una correlación entre la actividad antioxidante (con el mismo método de determinación - ABTS) y el contenido de polifenoles en muestras de arroz entero, con valores de $R^2=0,962$ y $R^2=0,9973$, respectivamente. Asimismo, Fardet y col. (2008) hicieron una revisión de la capacidad antioxidante publicada en otros cereales y comprobaron la existencia de estudios que indicaban correlación entre los niveles de PF y la CAO por ABTS para otros cereales enteros además del arroz, como el trigo, la avena, la cebada y el centeno. Esta correlación podría indicar que los PF serían unos de los principales compuestos responsables de la CAO en el arroz entero.

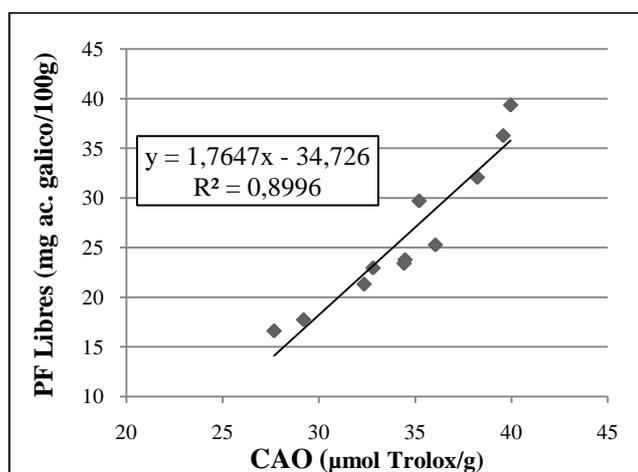


Figura IV.25 Relación entre los polifenoles libres (PF Libres) y la capacidad antioxidante (CAO) de los productos extrudidos de arroz cáscara remojado.

IV.2.5 Optimización del diseño experimental de extrusión del arroz cáscara remojado

Tal como se describió en el punto IV.1.3 se realizó la optimización del diseño correspondiente a la extrusión del arroz cáscara remojado.

La **Figura IV.26** muestra la optimización del diseño experimental correspondiente a la extrusión del arroz cáscara remojado, teniendo en cuenta la máxima E y el máximo VE como parámetros de mayor interés para los productos de tipo snacks. Se puede observar que la condición más adecuada correspondió a 173,73 °C y 14 % de humedad, con un valor de E: 3,03, VE: 9,71 cm³/g y una deseabilidad de 0,80.

Sin embargo, los productos obtenidos en condiciones de extrusión cercanas a ésta, presentaron sabor extraño. Por este motivo, teniendo en cuenta el análisis de Dureza Sensorial (**punto IV.2.4.4**) y el sabor, se seleccionó como mejor condición de extrusión aquella de 160 °C-16,5 % H, para la producción a escala piloto del producto arroz cáscara remojado extrudido.

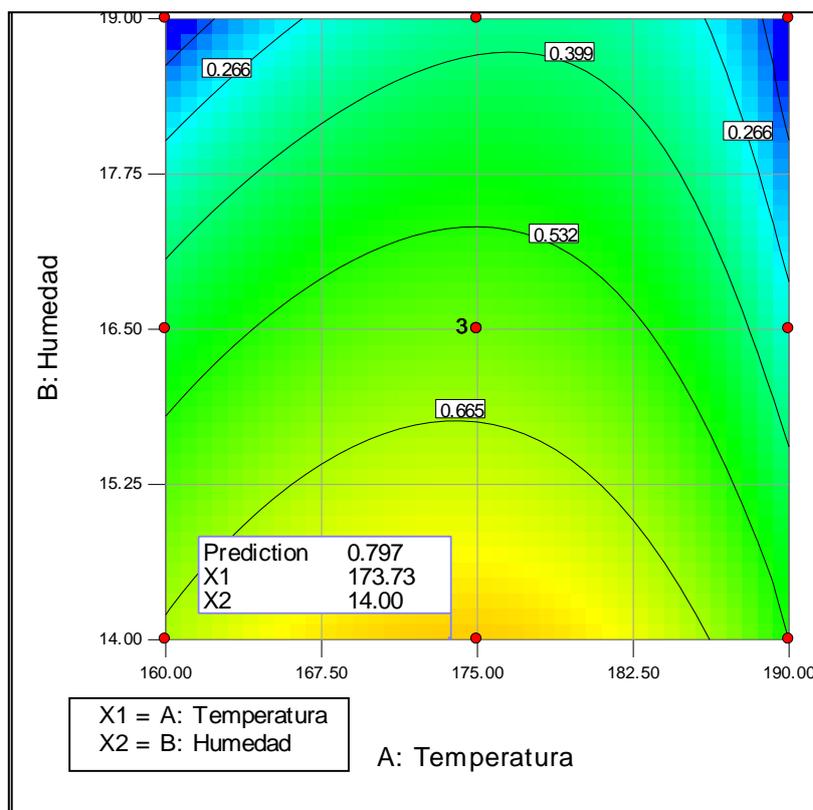


Figura IV.26 Optimización del diseño experimental correspondiente a la extrusión del arroz cáscara remojado.

IV.2.6 Evaluación del producto de arroz cáscara remojado extrudido elaborado a escala piloto

Se realizó el proceso de extrusión a escala piloto en las condiciones de 160 °C y 16,5% H, utilizando los grits de arroz cáscara previamente remojado, obtenidos según se detalló en el punto III.2.1.2.

La **Tabla IV.13** muestra el análisis de los parámetros más importantes medidos para el arroz integral sin tratamiento y descascarado en la planta piloto del ITA, y para el arroz remojado y arroz remojado-extrudido, ambos elaborados a escala piloto bajo las condiciones previamente establecidas.

Los resultados indicaron que el contenido de **AF** de los granos fue reducido un 52% en el proceso de remojo a 45 °C durante 24 h. Estas pérdidas fueron mayores a las encontradas al realizar el estudio de remojo a escala de laboratorio, mediante el diseño experimental. Esto podría ser atribuido a diferencias de temperatura en el medio de remojo, ya que la masa de granos remojados fue mucho mayor, y podrían generarse puntos con diferencias de temperaturas que podrían producir mayor lixiviación e hidrólisis del AF en los granos.

Tabla IV.13 Contenido de AF, digestibilidad de proteínas y bio-accesibilidad de Fe y Zn del arroz integral descascarado en Planta Piloto (P.P), el arroz cáscara remojado y arroz cáscara remojado-extrudido.

Productos	AF (mg/100g)	Digestibilidad de Proteínas (%)	Bio-accesibilidad mineral (%)	
			Zn	Fe
Arroz integral (Desc. en PP)	740,09±10,32 ^a	82,85±2,56 ^a	11,46±0,52 ^c	11,21±1,15 ^c
Arroz cáscara remojado (45 °C-24 h)	352,19±2,14 ^b	81,63±2,36 ^a	16,24±0,82 ^a	17,13±0,82 ^a
Arroz cáscara remojado-extruido (160 °C- 16.5% H)	163,47±7,86 ^c	74,71±0,78 ^b	14,60±0,73 ^b	14,50±0,38 ^b
<i>Valor de p</i>	<0,0001	0,0163	<0,0001	<0,0001

*Media ± desviación estándar; Letras diferentes indican diferencia significativa entre las muestras (p<0.05)

Luego al combinar ambos procesos, el remojo y la extrusión se alcanzó una mayor remoción del AF de los granos, de alrededor del 77% en relación al contenido inicial. Por lo que en este sentido, ambos procesos combinados son más eficientes para promover las pérdidas del AF del grano.

El proceso de remojo, por sí solo, no produjo cambios en la **digestibilidad de las proteínas** del arroz. Por el contrario, la combinación del remojo con la extrusión redujo la digestibilidad proteica en comparación con la del arroz integral de partida sin tratamiento.

En general, los tratamientos térmicos mejoran la digestibilidad de las proteínas por la inactivación de inhibidores de enzimas y por la desnaturalización de las proteínas, lo que hace que se expongan nuevos sitios para el ataque enzimático (Camire, 1990). Por el contrario, la producción de una red reticulada de isopéptidos podría interferir con la acción de las proteasas, y lograr una reducción de la digestibilidad (Phillips, 1989).

En relación a la **bioaccesibilidad de Fe y Zn**, generalmente es baja en los cereales y en leguminosas, ya que estos micro-elementos pueden formar complejos insolubles con la fibra dietaria, el AF o las proteínas. Las muestras mostraron un aumento de la bioaccesibilidad luego del proceso de remojo, lo que se atribuyó principalmente a la importante remoción del AF del grano alcanzada en este proceso (alrededor del 50%).

Aunque la extrusión disminuyó aún más el contenido de AF que el remojo por sí solo, lo cual podría mejorar la bio-accesibilidad de minerales, las muestras extrudidas presentaron una ligera disminución de la bio-accesibilidad de Fe y Zn, probablemente debido a que las condiciones del proceso generaron una matriz menos digerible.

Cabe destacar que Pastor Cavada y col. (2011) informaron valores de bioaccesibilidad de Fe y Zn (medidos con la misma metodología) de $7,4 \pm 0,0$ y $10,0 \pm 1,3$, respectivamente, para una variedad comercial de arroz Fortuna (provista por el Molino Zacanini, Entre Ríos, Argentina) extrudido en el mismo extrusor monotornillo. Esto indicaría que el producto final remojado-extruido tiene una mejor bio-accesibilidad de Fe y Zn que el arroz integral sin tratamiento y arroz integral extrudido.

IV.2.7 Conclusiones parciales

- La remoción del AF, lograda a través de las diferentes condiciones experimentales evaluadas en el diseño de remojo de arroz cáscara, se encontró en un rango de 23,7-54,6 % y fue debida a los fenómenos de lixiviación del AF y la hidrólisis por parte de las fitasas endógenas presentes en los granos.

- Las pérdidas de proteínas y sólidos fueron significativamente más bajas que las producidas por el remojo de granos de arroz integral.
- Los parámetros físico-químicos evaluados en las muestras extrudidas en las condiciones del diseño experimental mostraron que se logró un mayor GC cuando se realizó un remojo de los granos de arroz previo al proceso de extrusión, en comparación con la extrusión de arroz integral sin tratamiento.
- El proceso a escala piloto dio como resultado una reducción del contenido de AF de alrededor del 50% por remojo y 77% por el tratamiento combinado de remojo-extrusión.
- El proceso de remojo no produjo cambios en la digestibilidad de proteínas, pero la combinación de los procesos de remojo-extrusión la disminuyó.
- La bioaccesibilidad del Fe y Zn se mejoró de manera significativa por el proceso de remojo del arroz cáscara, probablemente debido a la degradación del AF. Por el contrario, la combinación de los procesos de remojo-extrusión disminuyó la bioaccesibilidad. Sin embargo, los productos obtenidos por remojo-extrusión tuvieron una mayor bio-accesibilidad de Fe y Zn que el arroz de partida.
- El remojo-extrusión de arroz cáscara podría ser un proceso útil para la producción de snacks o ingredientes amiláceos (harinas precocidas) con bajo contenido de AF. Esto convierte a estos productos en una matriz apta para la fortificación con minerales, como podrían ser los alimentos complementarios o formulaciones especiales.

IV.3 ESTUDIO DEL PROCESO DE GERMINACIÓN DEL ARROZ CASCARA Y DEL PROCESO DE EXTRUSIÓN DE HARINAS DE ARROZ DE GRANO ENTERO GERMINADO

IV.3.1 Composición de la materia prima

La composición centesimal del arroz cáscara Tipo Largo Ancho utilizado para el estudio del proceso de germinación, y descascarado en la planta piloto del ITA-FIQ corresponde a la del arroz cáscara presentado en la **Tabla IV.6**.

IV.3.2 Ensayos de Germinación

IV.3.2.1 Absorción de agua de los granos

La **Figura IV.27** muestra el comportamiento de la absorción de agua del arroz cáscara remojado a diferentes temperaturas en función del tiempo de remojo. Se puede observar que los granos de arroz con cáscara alcanzaron el nivel óptimo de humedad a las 24 h de remojo en todas las temperaturas ensayadas (ambiente, 35, 45 y 55 °C). Por esto, se estableció el remojo previo a la germinación a temperatura ambiente (18°C-20°C) durante 24 h como proceso más simple para que los granos alcancen el óptimo de humedad y se favorezca el proceso de germinación posterior.

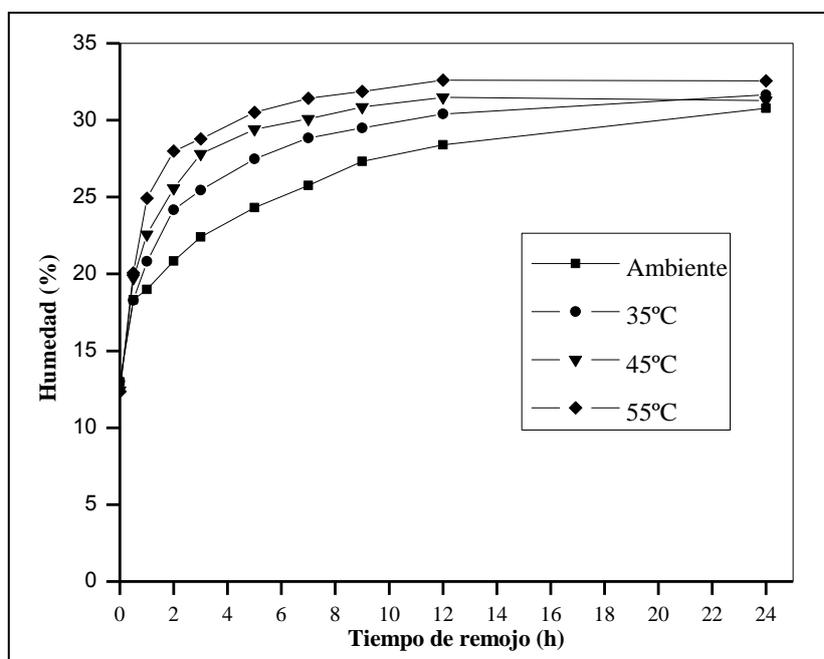


Figura IV.27 Absorción de agua del arroz cáscara a diferentes temperaturas de remojo.

3.2.2 Germinación a escala laboratorio

La temperatura es un factor decisivo en el proceso de germinación, ya que influye sobre las enzimas que regulan la velocidad de las reacciones bioquímicas que ocurren en la semilla después de la rehidratación. La actividad de cada enzima tiene lugar entre un máximo y un mínimo de temperatura, existiendo un óptimo intermedio. La temperatura óptima, intermedia entre ambas, puede definirse como la más adecuada para conseguir el mayor porcentaje de germinación en el menor tiempo posible (Doria, 2010).

De acuerdo a la revisión bibliográfica, las condiciones óptimas de germinación para el arroz cáscara estarían comprendidas en un rango de temperaturas de 30-40 °C. Por esto, se realizaron ensayos de germinación a la temperatura de 35 °C y durante diferentes tiempos (24, 36, 48 y 72 h). Para la selección del tiempo de germinación se estudió el porcentaje de germinación de los granos y su contenido remanente de AF.

En la **Figura IV.28** se pueden observar las diferencias entre un grano de arroz remojado y uno germinado durante 24 h a 35°C.



Figura IV.28 a: Arroz remojado 24 h a T ambiente y **b:** arroz germinado 24 h- 35 °C

A 35 °C se observaron porcentajes de germinación de 75, 73 y 68 \pm 5 % de granos germinados, correspondientes a los tiempos de 24, 36 y 48 horas, respectivamente. Cabe destacar que a 72 h se observó enmohecimiento de los granos, por lo que este tiempo de germinación fue descartado. Por otra parte, el porcentaje de germinación disminuyó con el tiempo, dado que al superar la radícula el tamaño del grano, se considera brote.

La **Figura IV.29** muestra el contenido de AF del arroz integral y el remanente en los granos de arroz luego del remojo para la germinación (24 h a T° ambiente) y de los diferentes tiempos de germinación (24, 36 y 48 h). El AF se redujo alrededor del 30 %

luego de las 24 h de remojo, teniendo en cuenta un contenido inicial de AF de arroz integral (descascarado en planta piloto) de 821.69 mg AF/100 g de muestra. El menor contenido de AF se observó a las 36 h de germinación (487,37 mg/ 100 g). Esto indicó que las pérdidas oscilaron en un rango de 30-40% y que mayores tiempos de germinación no condujeron a mayores pérdidas.

A partir de estos resultados, se estableció que el remojo previo (24 h a T° ambiente) y la germinación del arroz a 35 °C durante 24 h fueron suficientes para activar las fitasas endógenas de los granos y que se produzca la hidrólisis del AF.

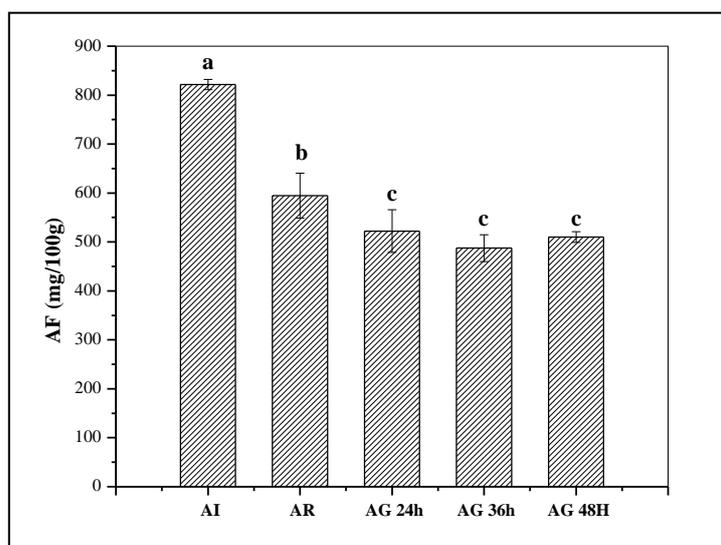


Figura IV.29 Contenido de AF de los granos luego de diferentes tiempos de germinación. (AI: Arroz integral; AR: Arroz remojado; AG24h, 36h y 48h: Arroz germinado 24, 36 y 48 h, respectivamente).

Moongngarm y Saetung (2010) estudiaron la germinación del arroz cáscara durante 48 h a 28-30 °C, previo remojo de 48 h en agua destilada a temperatura ambiente, y lograron la misma remoción del AF (alrededor del 30 %), lo cual coincide con los valores obtenidos en este estudio, utilizando un remojo de 24 h a temperatura ambiente y una germinación de 24 h. Estos investigadores encontraron que la germinación del arroz cáscara resultó mucho más eficaz que la del arroz integral, si se desea mejorar la concentración de nutrientes y compuestos bioactivos, debido a que el proceso de descascarado produce ruptura de los granos y como consecuencia una tasa de germinación mucho menor. Además, establecieron que los granos rotos sufren el ataque de enzimas y microorganismos en el remojo previo. En el grano con cáscara, el embrión del arroz se encontraría protegido por la cáscara.

IV.3.3 Germinación y Extrusión a escala piloto

Se procedió a la germinación del arroz cáscara a escala piloto (III.2.1) y posterior extrusión en las condiciones definidas por el diseño experimental (III.2.2.2).

La **Figura IV.30** muestra los productos obtenidos por extrusión del arroz cáscara previamente germinado. Puede observarse la diferencia en la expansión de los productos obtenidos, de acuerdo a las condiciones de cocción de T y H ensayadas.



Figura IV.30 Productos obtenidos por extrusión de la harina de arroz cáscara germinado, en diferentes condiciones de humedad y temperatura.

La **Tabla IV.14** muestra los resultados de la evaluación fisicoquímica de los productos de arroz germinado, extrudidos en las diferentes condiciones de proceso.

La **Tabla IV.15** presenta los ANOVA correspondientes a todas las respuestas evaluadas. Se puede observar que en cada caso, la falta de ajuste no fue significativa ($p > 0,05$), lo que significa que el modelo de regresión fue adecuado para explicar el efecto de las variables independientes (T y t) sobre las respuestas estudiadas.

Por otro lado, la **Tabla IV.16** presenta los coeficientes de regresión de la ecuación polinómica de segundo orden utilizada para modelar los efectos de la temperatura y la humedad de extrusión en cada una de las respuestas evaluadas en la extrusión del arroz cáscara germinado.

Tabla IV.14 Evaluación físico-química de los productos extrudidos de arroz germinado

Extrusión (T - H)	CEEM (J/g)	E	VE (cm ³ /g)	DS	AA (mL/g)	S (g/100g)	PF	
							Libres (mg AG /100g)	CAO (μmol trolox/g)
160 °C - 14%	502,07	3,26	6,05	7	5,43	42,31	43,49	25,79
160 °C - 16,5%	496,92	3,21	5,75	9	5,05	39,83	39,35	21,32
160 °C - 19%	457,01	2,83	4,90	8	5,48	33,11	26,23	17,37
175 °C - 14%	460,01	3,16	6,64	6	5,92	38,93	47,73	25,66
175 °C - 16,5%	385,95	2,75	7,76	5	5,40	39,21	60,05	23,81
	382,75	2,73	7,50	4	5,55	41,00	62,71	23,90
	363,99	2,77	7,36	4	5,55	43,57	64,58	23,44
175 °C - 19%	361,43	2,62	7,43	4	6,18	35,48	63,30	21,32
190°C - 14%	365,99	2,64	10,28	2	5,43	41,36	72,06	26,65
190°C - 16,5%	354,35	2,43	9,41	3	6,05	40,93	74,24	30,34
190°C - 19%	325,04	2,06	7,70	4	6,65	33,27	72,51	27,13

CEEM: Consumo Específico de Energía Mecánica; E: expansión; VE: volumen específico; DS: Dureza Sensorial; AA: Absorción de Agua; S: solubilidad; PF Libres: Polifenoles Libres; AG: ácido gálico; CAO: Capacidad Antioxidante.

Tabla IV.15 ANOVA para las respuestas analizadas del diseño de extrusión de arroz cáscara germinado.

Respuesta	CEEM	E	VE	DS	AA	S	PF	
Fuente de variación							Libres	CAO
Temperatura (T)	0,0005	0,0083	0,0026	0,0088	0,0094	0,9040	0,0026	0,0492
Humedad (H)	0,0239	0,0121	0,0333	0,5528	0,0187	0,0118	0,8443	0,1193
T ²	0,0861	0,5095	0,4959	0,1264	0,1304	0,7368	0,1227	0,9936
TxH	0,8784	0,4095	0,0863	0,4778	0,0212	0,6105	0,0602	0,1853
H ²	0,3589	0,6196	0,0937	0,8479	0,0216	0,0369	0,0736	0,9653
Falta de Ajuste	0,1530	0,2413	0,0606	0,1441	0,1116	0,2163	0,0721	0,8029
R ²	0,9303	0,9383	0,8966	0,8557	0,9038	0,8921	0,9124	0,9076

Tabla IV.16 Coeficientes de regresión de la ecuación polinómica de segundo orden para las respuestas evaluadas para la extrusión del arroz cáscara germinado.

Coef.*	CEEM	E	VE	DS	AA	S	PF Libres	CAO
b₀	5080,66	1,596	-40,36	173,875	19,624	-14,088	-529,56	137,91
b₁	-41,92	0,055	0,095	-1,709	0,106	-0,469	5,0235	-0,584
b₂	-63,59	-0,088	3,734	-0,683	-3,187	12,898	5,539	-9,227
b₃	0,105	-0,0002	0,0005	0,004	-0,0006	0,001	-0,016	-0,00005
b₄	0,027	-0,001	-0,009	0,006	0,0078	0,007	0,118	-0,0498
b₅	1,408	0,005	-0,068	-0,012	0,0583	-0,472	-0,796	-0,009

*Coef.: coeficientes; b_0 representa la intersección y b_1 , b_2 , b_3 , b_4 , y b_5 son los coeficientes para el término lineal del **Temperatura**, el término lineal de la **Humedad**, el término cuadrático de la temperatura, la interacción de la Temperatura y Humedad, y el término cuadrático de la Humedad, respectivamente.

IV.3.3.1 Consumo Específico de Energía Mecánica (CEEM)

Los valores del CEEM correspondientes a la extrusión de arroz germinado se encontraron en el rango de 502,07-325,04 J/g. Éstos son ligeramente mayores que los obtenidos en la extrusión del arroz remojado, pero menores que los encontrados por González y col. (2013) para la extrusión de arroz integral sin tratamiento, lo cual indicaría que la modificación previa por germinación produce cambios en los componentes de los granos de arroz que hace que sea más fácil su cocción por extrusión.

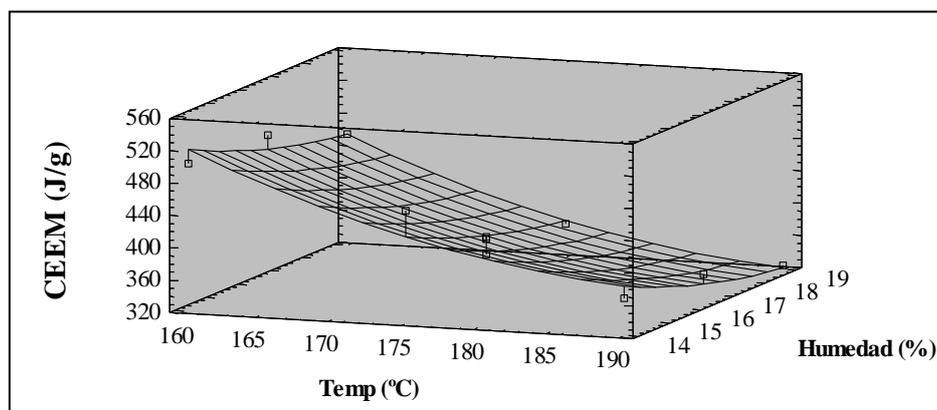


Figura IV.31 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y la humedad en el consumo específico de energía mecánica (CEEM) del proceso de extrusión de arroz cáscara germinado.

El ANOVA indicó que, a diferencia de la extrusión de arroz remojado, sólo fueron significativas las variables T y H en sus términos lineales, por lo que la superficie de respuesta fue un plano (**Figura IV.31**). A medida que aumentó la T y la H, disminuyó el CEEM.

IV.3.3.2 Expansión (E)

Los valores de E estuvieron comprendidos en un rango de 2,06-3,26, siendo el valor más alto el que correspondió a la muestra obtenida a 160 °C y 14% H (E=3,26), tal como ocurrió en el caso de la extrusión del arroz remojado.

El ANOVA indicó que sólo T y H fueron significativos en sus términos lineales. En la **Figura IV.32** se muestra la superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y la humedad en E. Se pudo observar una relación inversa de E con T y H, lo que significa que al aumentar T y H, disminuye la expansión del producto extrudido.

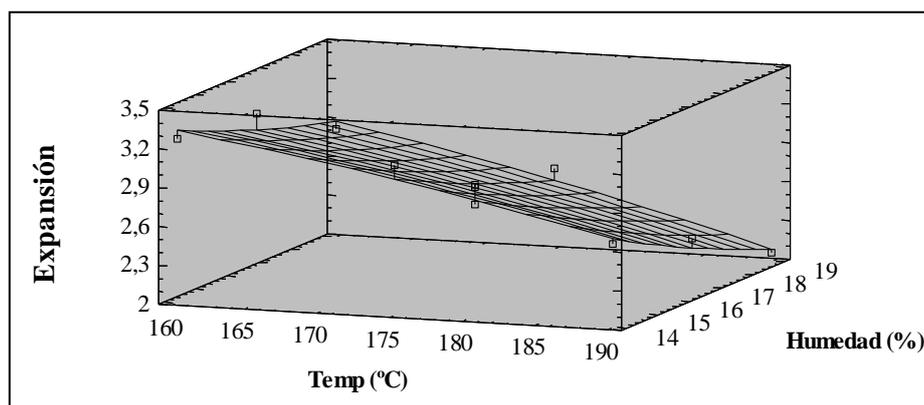


Figura IV 32 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y la humedad de extrusión en la Expansión (E) de productos de arroz cáscara germinado.

IV.3.3.3 Volumen específico (VE)

En relación al VE (buen indicador del GC), el ANOVA indicó que sólo los términos lineales de T y H fueron significativos. La ligera curvatura de la superficie de respuesta (**Figura IV.33**) se atribuye a que el valor de p correspondiente a la interacción de las variables TxH se encontró cercano al límite de significación (p 0,0863).

Las muestras de menor VE fueron las obtenidas a 160 °C y 19 % H (VE=4,90 cm^3/g) y las de mayor VE (10,28 cm^3/g), a 190 °C-14 % H. Estas condiciones coinciden con aquellas encontradas en la extrusión del arroz remojado, y con las del arroz integral Fortuna sin tratamiento previo reportado por González y col. (2013).

En la **Figura IV.33** se observa que el efecto de la T en el VE fue mucho más marcado que en el diseño experimental de la extrusión del arroz remojado.

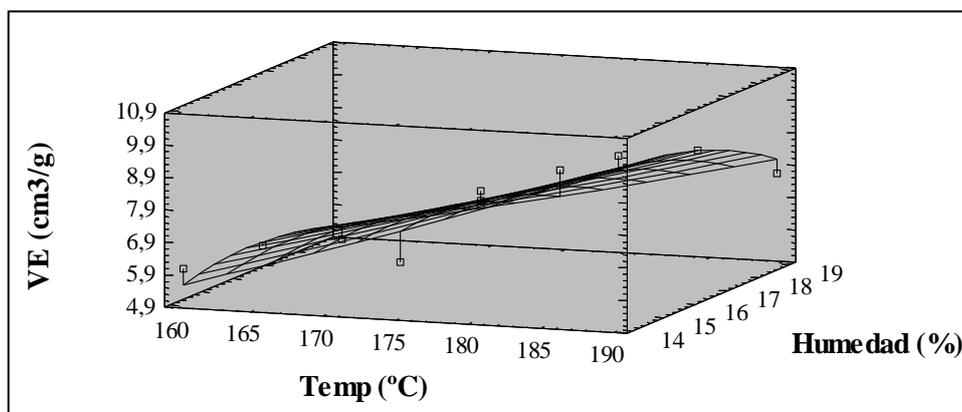


Figura IV.33 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y la humedad en el Volumen específico (VE) de arroz cáscara germinado extrudido.

IV.3.3.4 Evaluación de la Dureza Sensorial (DS) y Dureza Mecánica (DM)

La **Figura IV.34** muestra el comportamiento de la DS en función de la T y la H de extrusión. Si bien en la superficie de respuesta para la DS de las muestras se observa una cierta curvatura, la tendencia puede considerarse planar, debido a que sólo la variable T fue significativa en su término lineal (**Tabla IV.15**).

El mayor valor de DS correspondió a la muestra obtenida a 160 °C-16,5 %H (DS=9) y la muestra más blanda fue la obtenida a 190 °C -14 %H (DS=2).

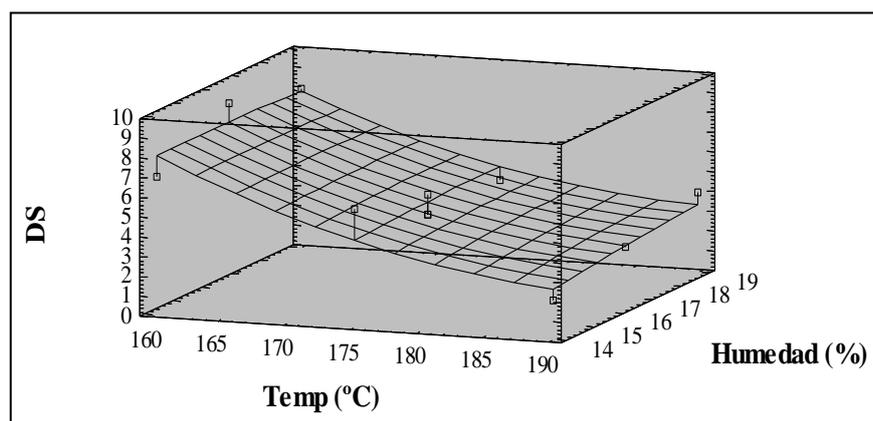


Figura IV.34 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y la humedad en la Dureza Sensorial (DS) de arroz cáscara germinado extrudido.

En cuanto a la DM, se encontraron rangos de fuerza máxima de 26,2-34,6 N, siendo los valores más bajos correspondientes a las muestras obtenidas a 190 °C y los más altos a

160 °C. Por otra parte, estos valores fueron mayores que los hallados para las muestras del diseño experimental correspondiente a la extrusión de arroz remojado.

La **Figura IV.35** muestra la relación entre la DS y la DM. Se pudo observar que existe una buena correlación entre ambas respuestas ($R^2 = 0,8273$). Tal como se indicó en el capítulo anterior, la DS y la DM están relacionadas con el GC y disminuyen a medida que aumenta la T.

Además, se encontró que la muestra extrudida a 160 °C-19% presentó uno de los valores más altos de DS (DS=8) y el menor VE (4,9 cm³/g), por lo que en función de estos parámetros, tendría el menor GC.

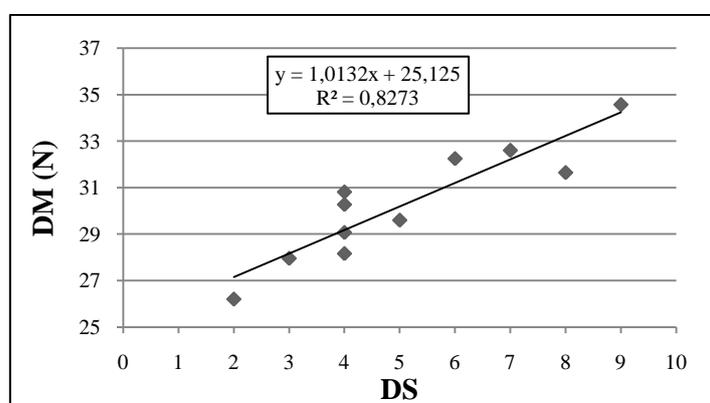


Figura IV.35 Correlación entre la dureza sensorial (DS) y la dureza mecánica (DM) de productos extrudidos de arroz cáscara germinado.

IV.3.3.5 Absorción de Agua (AA) y Solubilidad (S)

En lo que respecta a las propiedades de hidratación de los extrudidos, los cambios de viscosidad en frío del producto está relacionado con la AA (Colonna y col., 1989), y la S está relacionada con la cantidad de almidón dispersado y posible dextrinización provocada por la extrusión, es decir, es un indicador de la conversión del almidón durante la extrusión (Ding y col., 2005).

De acuerdo a la **Tabla IV.14**, se obtuvieron valores en los rangos de 5,05-6,65 mL agua/g muestra para la AA, y de 33,11 - 43,57 g/100 g muestra para la S.

La **Figura IV.36** muestra la superficie de respuesta correspondiente a la AA. El ANOVA indicó que tanto los términos lineales de T y H, como la interacción de TxH y la H^2 fueron significativos.

El valor más alto de AA correspondió a la muestra obtenida en las condiciones de mayor T y H: 190 °C-19% H (6,65 mL de agua/g de muestra). En condiciones de extrusión en las cuales se produce una completa transformación del flujo sólido a flujo viscoso, es

decir, se consigue una completa eliminación de la estructura cristalina, la AA disminuye al aumentar la T (González y col. 2002a). En este caso ocurre lo contrario (a alta humedad, la AA aumenta con la temperatura), lo cual indicaría que la cocción de la muestra de GE es incompleta.

El ANOVA indicó que la H, en sus términos lineal y cuadrático fueron significativos, lo cual se reflejó en la curvatura de la superficie (Figura IV.37). La S se relacionó de forma inversa con la H. En condiciones de baja humedad los efectos mecánicos (nivel de fricción) son más importantes para la cocción, pero a mayor H predominarían los efectos térmicos dentro del extrusor (González y col., 2013).

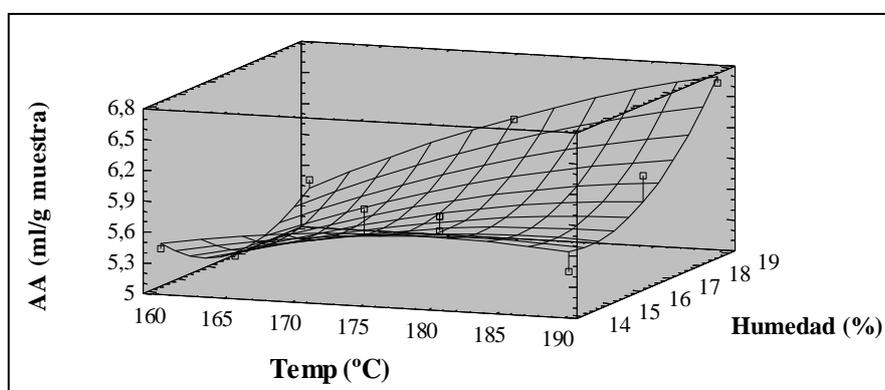


Figura IV.36 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y la humedad en la Absorción de Agua (AA) de arroz cáscara germinado extrudido.

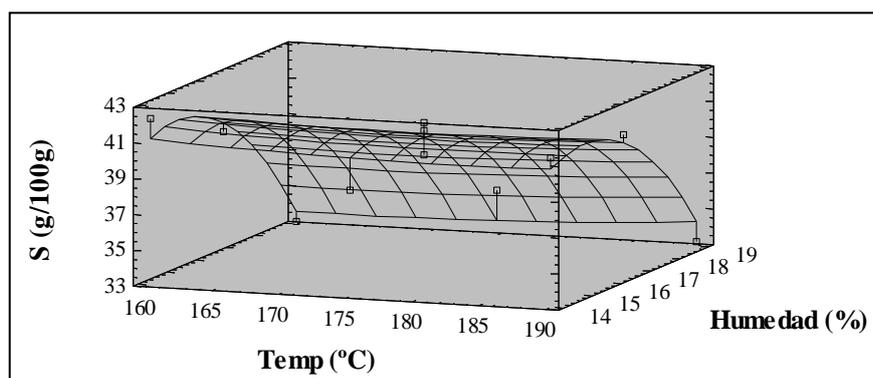


Figura IV.37 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y la humedad en la Solubilidad (S) de arroz cáscara germinado extrudido.

A pesar de que los diseños describen de manera adecuada el efecto de las variables sobre la AA y la S, en este caso los rangos de valores encontrados para la AA y la S fueron demasiado estrechos como para ser considerados buenos indicadores de los cambios producidos por el proceso de extrusión, tal como el GC de las muestras.

González y col., (2002a) consideraron la S como buen indicador del GC, debido a que encontraron rangos mucho mayores al extrudir (en diferentes condiciones de H y T) maíz o arroz refinados. Estos resultados indican que se obtiene un menor GC cuando se utiliza sémola de granos enteros en comparación con los procedentes de granos refinados. Es decir, cuando se utilizan harinas con partículas de salvado y de germen, no se alcanza un proceso completo de cocción de los gránulos de almidón. El salvado y el germen generan una perturbación en el transporte del material dentro del extrusor; no sólo retardando el proceso de cocción causado por la fricción y los efectos térmicos, sino que también aumentando la distribución del tiempo de residencia de las partículas dentro del extrusor (algunas partículas llegarían al final del extrusor muy rápido, sin sufrir muchos cambios y permaneciendo en su estado nativo).

Por otra parte, González y col. (2013) en estudios posteriores evaluaron los efectos de la extrusión sobre las propiedades fisicoquímicas de la harina de arroz integral sin tratamiento previo, utilizando el mismo equipo extrusor y condiciones similares. Al comparar estos resultados de arroz integral extrudidos con aquellos obtenidos para los productos extrudidos de arroz integral germinado, se puede observar que estos últimos presentaron mayores VE (10,28-4,09 vs 8,64 a 4,53 cm³/g de muestra) y S (42,31-33,11 vs 33-21 g muestra /100g), y menores valores de AA (6,65 -5,05 vs 07,07 a 05,01 g agua/g muestra), que los productos de arroz integral. Esto confirma, que el grado de cocción de los productos extrudidos de arroz germinado es mayor que el alcanzado en la extrusión de arroz integral, indicando también que el tratamiento previo de germinación produce cambios en los componentes y/o estructura del grano, lo que facilitaría la cocción en el extrusor.

Por lo tanto, podemos concluir que se consigue un mayor GC que aquel alcanzado con el arroz integral sin tratamiento previo, pero menor que aquel obtenido para maíz o arroz refinados.

IV.3.3.6 Polifenoles Libres (PF Libres) y Capacidad Antioxidante (CAO)

Teniendo en cuenta el valor inicial del contenido de PF Libres del arroz integral (37,04 mg ác. gálico/100 g), las muestras germinadas presentaron un incremento del 33 % en el contenido de PF Libres (49,38 mg ác. gálico/100 g de muestra). Esto se debería a la liberación por hidrólisis enzimática de PF en forma de compuestos libres, debido a que se produce la ruptura de la pared celular durante la germinación (Moongngarm y Khomphiphatkul, 2011).

Los productos extrudidos de arroz germinado presentaron contenidos de PF Libres en un rango de 26,23 - 74,24 mg ác. gálico/ 100 g de muestra. Es decir, dependiendo de las condiciones de T y H ensayadas hubo tanto una disminución, como un aumento del contenido de PF Libres, en relación al contenido del arroz germinado. La disminución podría deberse al tratamiento térmico de extrusión, que reduciría el contenido de PF por la descarboxilación de ácidos fenólicos (Repo-Carrasco-Valencia y col., 2009); asimismo podría producirse la formación de complejos entre los PF Libres y macromoléculas presentes (Chandrasekara y col., 2012), disminuyendo su extracción. Por otro lado, el aumento del contenido de PF Libres (máximo de 74,24 mg Ac. Gálico/100 g) podría ser por la liberación de ácidos fenólicos que se encontraban unidos a la matriz (Brennan y col., 2011; Dewanto y col., 2002).

Los resultados del ANOVA indicaron que la T en su término lineal fue la única variable significativa para ambas respuestas evaluadas.

La **Figura IV.38** muestra la superficie de respuesta correspondiente al efecto de las variables de extrusión del diseño experimental, en el contenido de PF Libres de los productos extrudidos de arroz germinado.

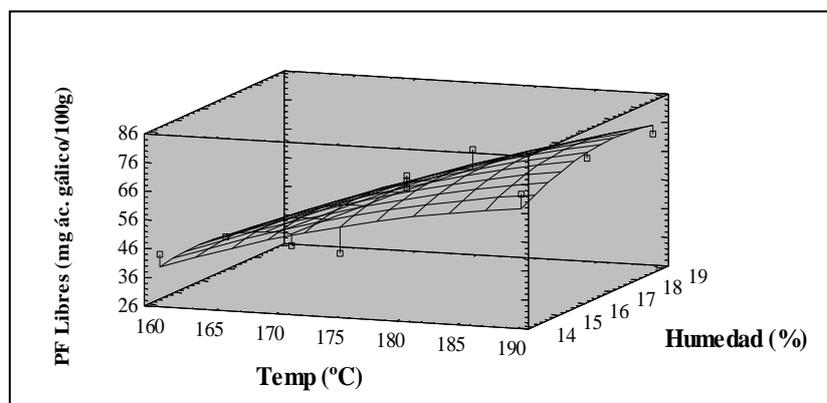


Figura IV.38 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y la humedad en el contenido de polifenoles libres (PF Libres) de arroz cáscara germinado extrudido.

La importancia de estos compuestos fenólicos radica en el hecho de que resisten la digestión en el estómago y el intestino, y llegan al colon produciendo un ambiente antioxidante favorable en el ser humano (Fardet y col., 2008). Por lo tanto, el contenido de compuestos fenólicos obtenidos a partir del arroz germinado, puede ser potencialmente mayor que el del arroz sin germinar, y a su vez estar más disponibles para ser utilizados por el organismo (Moongngarm y Khomphiphatkul, 2011).

La **capacidad antioxidante (CAO)** del arroz integral sin tratamiento previo presentó un valor inicial de 13,39 $\mu\text{mol Trolox/g}$ de muestra, el cual aumentó un 18% luego del proceso de germinación (15,85 $\mu\text{mol Trolox/g}$ de muestra). Esto puede explicarse debido a la actividad de varias enzimas, que durante la germinación degradan macromoléculas y desarrollan nuevos compuestos esenciales para las plántulas. Esto conduce a la liberación, solubilización y acumulación de algunos compuestos con actividad antioxidante (Moongngarm y Khomphiphatkul, 2011).

Luego, los productos extrudidos del arroz germinado presentaron valores de CAO en un rango de 17,37 - 30,34 $\mu\text{mol Trolox/g}$.

La **Figura IV.39** muestra la superficie de respuesta correspondiente a la CAO de los productos obtenidos por extrusión del arroz germinado en las diferentes condiciones del diseño experimental. Según se observa, el contenido de PF Libres (**Figura IV.38**) y la CAO presentaron la misma tendencia.

La mayor CAO de los productos extrudidos podría deberse a que la extrusión produciría la ruptura de compuestos fitoquímicos conjugados y generación de fitoquímicos libres (Dewato y col., 2002), la prevención de la oxidación enzimática (debido a la inactivación térmica de enzimas), y teniendo en cuenta el color más oscuro de los extrudidos, la formación de productos de reacción de Maillard que tienen propiedades antioxidantes (Fares y Menga, 2012).

Los antioxidantes pueden retrasar la oxidación de un sustrato oxidable en una reacción en cadena, por lo que los antioxidantes del arroz germinado extrudido podrían mejorar su estabilidad en el almacenamiento (Aguilar-Garcia y col., 2007).

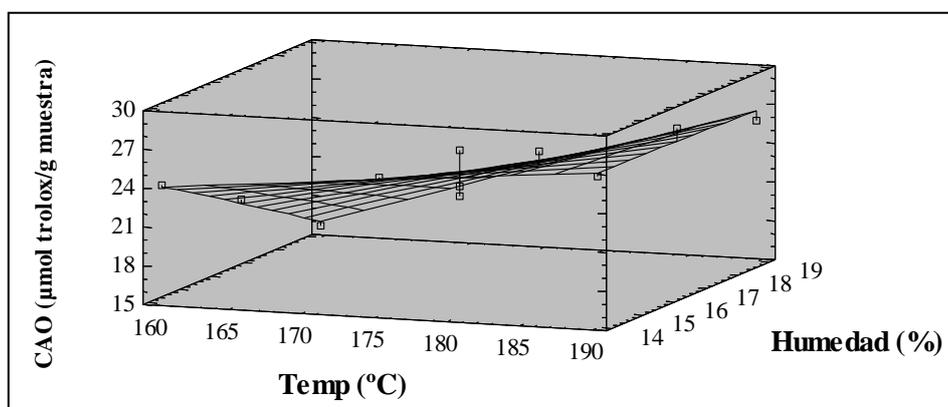


Figura IV.39 Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura y la humedad en la capacidad antioxidante (CAO) de los productos extrudidos de arroz cáscara germinado.

Cabe destacar que la CAO no depende sólo del nivel de compuestos bioactivos, sino que también de la composición de los mismos (Brennan y col., 2011). En este sentido, se observó que la CAO de los productos de arroz germinado no se correlacionó con el contenido de PF Libres, debido a que existen otros compuestos de tipo no fenólicos que actuarían como antioxidantes (Altan y col., 2009; Yang y col., 2014), como fue mencionado anteriormente.

IV.3.4 Optimización del diseño experimental de extrusión del arroz germinado

Tal como se describió en el punto IV.1.3 se realizó la optimización del diseño correspondiente a la extrusión del arroz germinado.

La **Figura IV.40** muestra la optimización del diseño experimental correspondiente a la extrusión del arroz germinado, teniendo en cuenta la máxima E y el máximo VE.

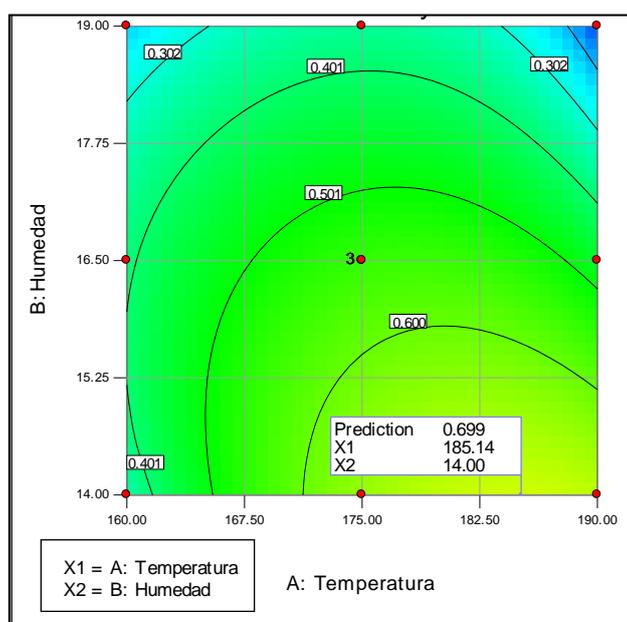


Figura IV.40 Optimización del diseño experimental correspondiente a la extrusión del arroz germinado.

Se puede observar que la condición más adecuada correspondió a aquella con una temperatura de 185.14 °C y una humedad del 14 %, con un valor de E: 2,81; VE: 9,09 cm³/g y deseabilidad: 0,699. Sin embargo, las muestras extrudidas a 190°C presentaron pegajosidad en la evaluación sensorial.

Teniendo en cuenta la optimización anterior, el análisis sensorial descrito en el punto IV.3.2.4, y los demás parámetros evaluados, se consideró la condición de 175 °C y 14 % H, como adecuada para la producción en escala piloto del arroz germinado extrudido.

IV.3.5 Evaluación del producto de arroz germinado extrudido elaborado a escala piloto

La **Tabla IV.17** muestra la composición del arroz integral (descascarado en P.P) y los productos de arroz germinado y germinado-extrudido producidos a escala piloto.

El contenido de **AF** de los productos germinados mostró que se perdió un 15,9% del AF debido el proceso de germinación, en relación al contenido del arroz cáscara. Dicha reducción producida por la germinación a escala piloto fue bastante menor que aquella obtenida en el ensayo de laboratorio previo. Probablemente, esto se debió a que la tasa de germinación alcanzada fue ligeramente menor ($60 \pm 5\%$) en el proceso llevado a cabo en planta piloto.

Tabla IV.17 Composición del arroz integral (desc. P.P), arroz germinado y arroz germinado-extrudido.

Productos		Arroz	Arroz	Arroz
Componentes		Integral	Germinado (35 °C-24 h)	Germinado- Extrudido (175 °C- 14% H)
Ácido Fítico (mg/100g)		821,69±10,3 ^a	695,20±1,6 ^b	506,84±7,19 ^c
Proteínas (g/100g)		7,37±0,1 ^a	6,65±0,1 ^b	6,68±0,4 ^b
Lípidos Extraíbles (g/100g)		2,26±0,19 ^a	1,63±0,05 ^b	0,47±0,03 ^c
Fibra Total (g/100g)		5,47±0,61 ^a	5,68±0,58 ^a	3,23±0,29 ^b
Digestibilidad Proteica (%)		82,85±1,6 ^b	100,9±1,0 ^a	83,6±2,4 ^b
Bioaccesibilidad Minerales (%)	Zn	11,46±0,52 ^c	13,76±0,82 ^a	12,61±0,73 ^b
	Fe	11,21±1,15 ^c	14,47±0,62 ^b	16,24±0,45 ^a

*Media ± desviación estándar; los resultados se expresaron en base seca; Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$)

Sin embargo, la combinación de los procesos de germinación-extrusión condujo a una reducción significativa, de alrededor del 40 %, del contenido inicial de AF en los productos extrudidos de arroz germinado.

Por otra parte, la germinación redujo ligeramente el **contenido de proteínas**. Moongngarm y Khomphiphatkul (2010) y Veluppillai y col. (2009) indicaron pérdidas de proteínas por activación de proteasas endógenas de los cereales durante la germinación. El proceso de extrusión no modificó el contenido de proteínas en comparación con el producto germinado.

La **digestibilidad proteica** mejoró por el proceso de germinación ($p 0,0021$). Esto se atribuye a la hidrólisis de las proteínas almacenadas durante la germinación, que hace que se encuentren más susceptibles al ataque enzimático por parte de las enzimas digestivas (Bhise y col., 1988). Por otra parte, el proceso de extrusión disminuyó la DP% de los granos germinados, llegando a valores similares a los del arroz integral sin tratamiento. Se sabe que la extrusión produce la desnaturalización termo-mecánica y reorienta las proteínas de los alimentos almidonosos, conduciendo a cambios en la digestibilidad y el contenido de los aminoácidos (Bjork y Asp, 1983; Della Valle y col., 1994; Perez-Navarrete y col., 2007). Sin embargo, la magnitud de las transformaciones de las proteínas debido a la extrusión son también dependientes de los pre y post tratamientos realizados, y sus interacciones (Onyango y col., 2004). La mayoría de los trabajos consideran sólo el efecto individual de cada proceso, a diferencia de lo que se plantea en esta tesis, en la cual se evalúa la influencia de la germinación en combinación con extrusión.

Cabe destacar que Pastor Cavada y col. (2011) informaron un valor de digestibilidad proteica de $84,1 \pm 0,5$ g/100g para una variedad comercial de arroz Fortuna extrudido en el mismo extrusor monotornillo. Esto indicaría que el producto final germinado-extrudido tiene la misma digestibilidad que el arroz integral extrudido, que a su vez es mayor que la del arroz remojado-extrudido (capítulo IV.3).

El contenido de **fibra** no se modificó por la germinación. Sin embargo, Banchuen y col. (2009) informaron un aumento en el contenido de fibra dietaria del arroz germinado debido a la formación de una pared celular primaria, con un incremento en las sustancias pécticas en la laminilla media. Por el contrario, el proceso de extrusión del arroz germinado disminuyó el porcentaje de fibra total alrededor del 43%. Durante la extrusión, algunos componentes de la fibra, tales como los polímeros de pectina y celulosa, se degradan, y sus fragmentos, que tienen bajo peso molecular, no pueden ser determinados

en la metodología utilizada para la determinación de fibra dietaria total (Pastor-Cavada y col., 2014).

El contenido de **lípidos** (extracto etéreo) disminuyó alrededor del 28% durante la germinación. Esto se produce debido a que los lípidos almacenados en el grano de arroz se movilizan para proporcionar energía para el crecimiento del embrión, y también debido al aumento de la actividad de las enzimas lipolíticas que hidrolizan las grasas en ácidos grasos libres y glicerol (Chanlat y col., 2011). Luego de la extrusión, las pérdidas fueron mayores (78,6%). Varios autores indican que, además de la degradación de lípidos sufrida por las altas temperaturas alcanzadas en la extrusión, se produce la formación de complejos almidón-lípidos y proteínas-lípidos, los cuales no son extraíbles mediante el uso de solventes no polares utilizados comúnmente en las determinaciones de materia grasa (Ho y Izzo, 1992; Asp y Björck, 1989). Estos resultados coinciden con estudios previos de Pastor-Cavada y col. (2014), los cuales mostraron la misma disminución en el contenido de lípidos extraíbles, luego de la extrusión de arroz integral.

La **bioaccesibilidad** del Zn del arroz germinado mejoró significativamente respecto a aquella del arroz integral. Al combinar la germinación con el proceso de extrusión, se redujo a un valor que aún fue mayor que la del arroz integral. La disminución de la DZn% por extrusión ya ha sido observada en maíz y leguminosas (González y col, 2014).

En caso del Fe, tanto la germinación como la combinación de la germinación-extrusión permitieron alcanzar valores más altos de bioaccesibilidad que en el caso del arroz integral, siendo mejor la bioaccesibilidad del Fe en el producto germinado-extrudido.

Cabe destacar que si se comparan estos resultados con aquellos obtenidos en el estudio antes mencionado de Pastor-Cavada y col. (2011) de arroz integral extrudido, se puede observar que el producto germinado-extrudido mostró valores más altos de bioaccesibilidad para ambos minerales que aquel proveniente de la extrusión sin tratamiento previo (DFe % = $7,4 \pm 0,0$ y DZn% = $10,0 \pm 1,3$).

Hazell y Jonhson (1989) indicaron que los productos de reacción de los procesos de despolimerización, a causa de las altas temperaturas y cizallamiento, pueden cambiar la forma química del Fe y hacer que sea más soluble, lo que explicaría la mayor bioaccesibilidad del Fe en este caso (Watzke, 1998). Además, la mejor DFe% puede deberse a la importante reducción del contenido de AF, potente inhibidor de la bioaccesibilidad del Zn y del Fe.

En relación a los **compuestos bioactivos**, la **Figura IV.41** muestra los **PF Libres** y **PF Ligados**, y la **CAO** de los productos elaborados.

Los granos de cereales contienen compuestos fenólicos libres, que existen en forma libre, y una cantidad significativa de compuestos fenólicos que están ligados, los cuales están unidos a los polisacáridos de la pared celular (Miller y col., 2000).

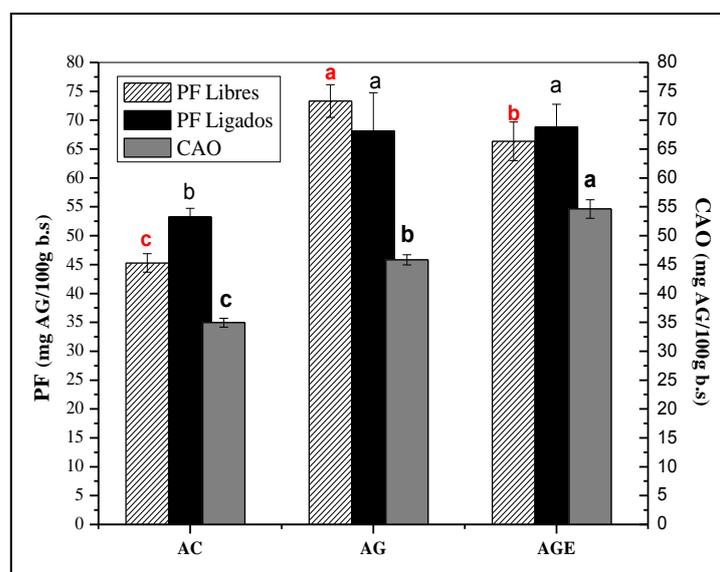


Figura IV.41 Contenido de polifenoles (PF) Libres y Ligados y capacidad antioxidante (CAO) de arroz integral descascarado en planta piloto (AC); arroz germinado 24 h (AG); arroz germinado extruido (AGE)

En el arroz integral, el contenido de PF Ligados fue mayor que el de PF Libres, lo cual coincide con lo informado por Tian (2004). La germinación no sólo aumentó el contenido de PF libres (en un 60%), PF Ligados (en un 28%) y PF totales (un 43%) respecto al arroz integral, sino que también aumentó los PF libres en relación a los ligados. El aumento de los PF libres en el arroz germinado ha sido atribuido a la hidrólisis de la pared celular durante la germinación y liberación de estos compuestos (Tian y col., 2004). Estos mayores valores de PF libres también fueron informados por otros investigadores que estudiaron la germinación del arroz integral y del arroz cáscara (Moongngarm y Saetung, 2010; Donkor y col., 2012). Tian y col. (2004) también encontraron un 30% de aumento en el contenido de PF Ligados en el arroz germinado integral y Moongngarm y Saetung (2010) mostraron un aumento del 40 % en el contenido de PF Totales después del proceso de germinación del arroz cáscara durante 48 h.

La extrusión ligeramente disminuyó el contenido de PF libres en relación al arroz germinado, pero no modificó el de PF ligados. Por esto, los productos obtenidos por los

procesos de germinación-extrusión presentaron un aumento del 46% del contenido de **PF Libres** y un aumento del 28% de los **PF Ligados** respecto al contenido inicial del arroz integral sin tratamiento.

La **capacidad antioxidante (CAO)** de los productos mejoró significativamente en ambos procesos. La germinación por sí sola produjo un aumento del 31%, por las reacciones enzimáticas que ocurren cuando se germinan los granos, mencionadas previamente. Por otro lado, la combinación de germinación-extrusión permitió alcanzar un aumento del 56% de la CAO, en comparación a la CAO del arroz integral de partida.

IV.3.6 Conclusiones parciales

- Se observó que la germinación logró importantes mejoras nutricionales en los productos, reduciendo el contenido de AF, mejorando la digestibilidad proteica y la bioaccesibilidad de minerales, y aumentando el contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante.
- Los resultados obtenidos en relación al consumo de energía en la extrusión de arroz germinado y otras propiedades fisicoquímicas evaluadas en los productos extrudidos, permiten confirmar que la germinación produce cambios en los granos de arroz, que se traducen en un menor gasto energético al realizar su cocción por extrusión y un mayor grado de cocción de los productos, que el que se alcanza con el arroz integral.
- Teniendo en cuenta los resultados de las propiedades físico-químicas y nutricionales, y la evaluación sensorial, la condición más adecuada para la obtención de una harina y expandido de arroz germinado fue de 175 °C y 14 % de humedad.
- Empleando la germinación-extrusión se obtuvo una reducción del 50% del contenido de AF y un aumento del contenido de PF Totales y de la capacidad antioxidante.
- Desde el punto de vista de la seguridad y la higiene de los alimentos, debido a que el arroz integral germinado es rico en componentes nutricionales y por lo tanto, podría ser fácilmente atacado por microorganismos, podrían presentarse algunos problemas durante la elaboración del arroz germinado. Es por esto, que la extrusión podría ser una buena forma de disminuir la población microbiana y evitar el crecimiento de microorganismos, por los bajos valores de a_w que poseen los

expandidos y sus harinas pre-cocidas. Además, la extrusión permite obtener diferentes tipos de productos, como los snacks y harinas pre-cocidas.

- Se demostró que la cocción por extrusión del arroz germinado constituye un buen método de procesamiento para obtener un nuevo ingrediente libre de gluten que permitirá mejorar el consumo de alimentos a base de grano entero.

IV.4 CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS Y NUTRICIONALES DE LAS HARINAS DE GRANO ENTERO DE ARROZ OBTENIDAS POR DIFERENTES PROCESOS

IV.4.1 Características químicas y nutricionales de las harinas de GE de arroz

En la **Tabla IV.18** se resume la composición nutricional (en base seca) de las materias primas y de los productos obtenidos en planta piloto (PP) mediante las tecnologías de remojo y/o germinación, y extrusión estudiadas en los capítulos **IV.1**, **IV.2** y **IV.3**. La humedad de las muestras estuvo comprendida entre 6-7 para aquellas extrudidas y entre 12-13 %, para el caso de las harinas sin extrudir.

IV.4.1.1 Proteínas

En los cereales, las **proteínas** son consideradas el segundo componente nutricional más importante, luego del almidón. En el caso del arroz, el factor utilizado para la conversión de N a proteínas es de 5.95 y está basado en el contenido de N de la fracción de mayor importancia en las proteínas del arroz, que son las glutelinas (16,8%) (Juliano 1985).

En relación al contenido de proteínas, los resultados indicaron que los diferentes procesos lo modificaron en diferente magnitud, dependiendo del tratamiento al cual se sometió el arroz. Se observó una ligera disminución del contenido de proteínas debido a los procesos de remojo y germinación, en comparación al contenido del arroz de cáscara (AC). Esto se debería a la lixiviación durante el remojo de proteínas solubles en medio ácido (Ohishi y col., 2003); y a la activación de proteasas endógenas durante la germinación (Veluppillai y col., 2009; Moongarm y Saetung, 2010), tal como se mencionó en los capítulos anteriores.

La extrusión no produjo cambios en el contenido de las proteínas, ya que no existieron diferencias significativas entre el contenido de proteínas del arroz integral (AI) con el arroz integral extruido (AIE); y a su vez, tampoco al extrudir los productos provenientes del remojo o la germinación (AR o AG) para la obtención de ARE y AGE.

Perfil electroforético (SDS-PAGE) de los diferentes productos de arroz de grano entero

Las proteínas de los cereales se clasifican en 4 fracciones según su solubilidad (Osborne, 1924). Estas son: la fracción soluble en agua (albúminas), la soluble en sales (globulinas), la fracción soluble en alcoholes (prolaminas) y la soluble en ácidos o bases (glutelinas).

Tabla IV.18 Contenido de proteínas, lípidos (extracto etéreo), Fibra Dietaria Total, Cenizas, Almidón y Carbohidratos disponibles. Los valores están expresados en base seca.

Materias Primas/ Productos	Proteínas (g/100 g)	Lípidos (extracto etéreo) (g/100g)	FDT (g/100g)	Cenizas (g/100g)	Almidón (g/100g)	Carbohidratos Disponibles (g/100g)
AI (proveniente del molino)	6,97±0,15 ^b	1,88±0,01 ^b	5,2±0,6 ^a	0,92±0,1 ^b	77,74±1,13 ^b	84,54
AIE (160 °C-14% H)	6,63±0,20 ^b	0,46±0,19 ^c	3,9±0,3 ^b	0,99±0,01 ^b	76,94±0,30 ^b	86,60
AC (descascarado en PP)	7,37±0,15 ^a	2,27±0,19 ^a	5,47±0,61 ^a	1,11±0,03 ^b	75,90±1,13 ^b	83,78
AR (45 °C-24 h)	6,48±0,10 ^b	1,09±0,02 ^b	5,7±0,7 ^a	0,98±0,11 ^b	80,19±0,92 ^a	85,75
ARE (160 °C-16,5 %H)	6,37±0,12 ^b	0,73±0,04 ^c	3,3±0,3 ^b	1,03±0,07 ^b	76,15±0,26 ^b	88,21
AG (24 h-35 °C)	6,65±0,10 ^b	1,63±0,20 ^b	5,7±0,6 ^a	1,23±0,06 ^a	79,37±0,31 ^a	84,79
AGE (175 °C-14 %H)	6,70±0,40 ^b	0,47±0,15 ^c	3,2±0,4 ^b	1,29±0,06 ^a	73,53±0,77 ^c	87,18

*Media ± desviación estándar; en una misma columna, letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras (p<0,05);

* Carbohidratos disponibles: calculados por diferencia

El arroz es el único cereal que posee como principal componente de las proteínas a la fracción de las glutelinas, y como fracción menor, a las prolaminas (Marshall y Wadsworth, 1994; Cagampang y col., 1966; Juliano, 1985). Las glutelinas representan la fracción más insoluble, debido a que poseen puentes disulfuro que forman agregados de alto peso molecular (Juliano, 1985). Las capas más externas de los granos de arroz son ricas en albúminas y globulinas, mientras que el endospermo es rico en glutelinas y posee una pequeña fracción de prolaminas.

En la **Figura IV.42** se muestra el perfil electroforético (SDS-Page) de las materias primas y sus productos.

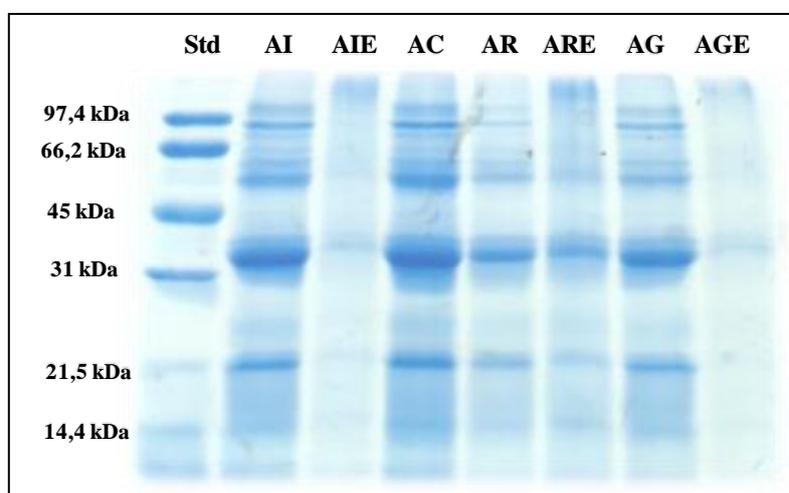


Figura IV.42 SDS-PAGE de los diferentes productos. Std: estándar de proteínas, arroz integral (AI), arroz integral extrudido (AIE), arroz integral descascarado P.P (AC), arroz cáscara remojado (AR), arroz remojado extrudido (ARE), arroz germinado (AG), arroz germinado extrudido (AGE).

En relación a las materias primas AI y AC utilizadas para los tratamientos, se pueden distinguir claramente grupos de polipéptidos característicos de peso molecular alrededor de 14, 22, 31-35 y 50-100 kDa (Juliano, 1985). Ohishi y col. (2003) y Moroni y col. (2010) analizaron los principales polipéptidos del arroz y encontraron que las bandas alrededor de 14 kDa correspondían a una mezcla de albuminas y globulinas, y la banda de 21 kDa, a la fracción de globulinas. En el rango de 31-45 kDa estarían comprendidas las glutelinas, y entre 50-100 kDa, polipéptidos precursores de las glutelinas (pro-glutelinas). Además, encontraron que las prolaminas estarían comprendidas en el rango de 10-16 kDa.

En la **Figura IV.42** se observan las bandas características de las distintas fracciones en las muestras de arroz sin tratamiento (AI y AC) y de manera difusa las prolaminas. En las muestras procesadas mediante remojo y germinación (AR y AG) se observaron las

diferentes bandas encontradas en AI y AC, aunque con menor intensidad, particularmente en AR.

Por otra parte, la extrusión de las muestras, en especial de AIE y AGE, provocó una notable disminución de la intensidad de las bandas características, posible pérdida de algunas bandas y la formación de agregados mayores a 97,4 kDa. Esto puede atribuirse al hecho de que la severidad del tratamiento de extrusión puede producir desnaturalización, agregación y pérdida de la estructura de las proteínas (Cheftel, 1986). También, las moléculas proteicas pueden unirse con los productos de la reacción de Maillard, en forma entrecruzada (Martins y col., 2001).

Por otra parte, en el ARE las bandas debajo de 45 kDa y la intensidad de las mismas fueron muy similares a las obtenidas en el arroz remojado (AR). Esta diferencia con las otras muestras extrudidas puede atribuirse al pH más bajo de esta muestra (pH ~ 5), de manera que el remojo ácido del arroz disminuiría el pH y con ello, la velocidad de la reacción de Maillard durante el proceso de extrusión, lo que provocaría una menor pérdida de la estructura de las proteínas del arroz (Martins y col., 2001).

Lisina disponible

La Lisina es un aminoácido esencial, considerado como buen indicador del valor biológico de la proteína. En el arroz, constituye el primer aminoácido limitante, pero en comparación con otros cereales, es uno de los que posee mayor cantidad junto con la avena (Juliano, 1985).

Sin embargo, el contenido de lisina total no siempre se correlaciona bien con el valor nutricional, debido a que los grupos α y ϵ -NH₂ libres pueden reaccionar con compuestos naturales, tales como los azúcares reductores (reacción de Maillard) o aldehídos producidos a partir de la oxidación de lípidos durante el procesamiento o almacenamiento. Por esta razón, es importante determinar el contenido de lisina disponible (Araújo y Menezes, 2005).

En la **Figura IV.43** se puede observar el contenido de **lisina disponible (LD)** de las materias primas y sus productos de GE. Los resultados indicaron que la extrusión produjo una disminución significativa del contenido de LD de las muestras AIE y AGE, respecto al contenido de las materias primas sin extrudir (AI y AG). Como se mencionó anteriormente, el procesamiento por extrusión favorece la reacción de Maillard, lo que se refleja en la LD. A su vez, el contenido de LD del AR y ARE se mantuvo igual que en su materia prima sin tratamiento (AC). Estos resultados confirmarían el hecho de que el

tratamiento ácido hace que el producto tenga un pH más bajo en relación al resto, lo que disminuye la velocidad de la reacción de Maillard, responsable de la caída del contenido de LD en los productos extrudidos. Esto es así, ya que cuanto menor sea el pH, el grupo ϵ -NH₂ de los residuos de lisina se encontrará protonado y por lo tanto, será menos reactivo con los grupos C~O de los azúcares reductores (Martins y col., 2001; Cheftel 1986).

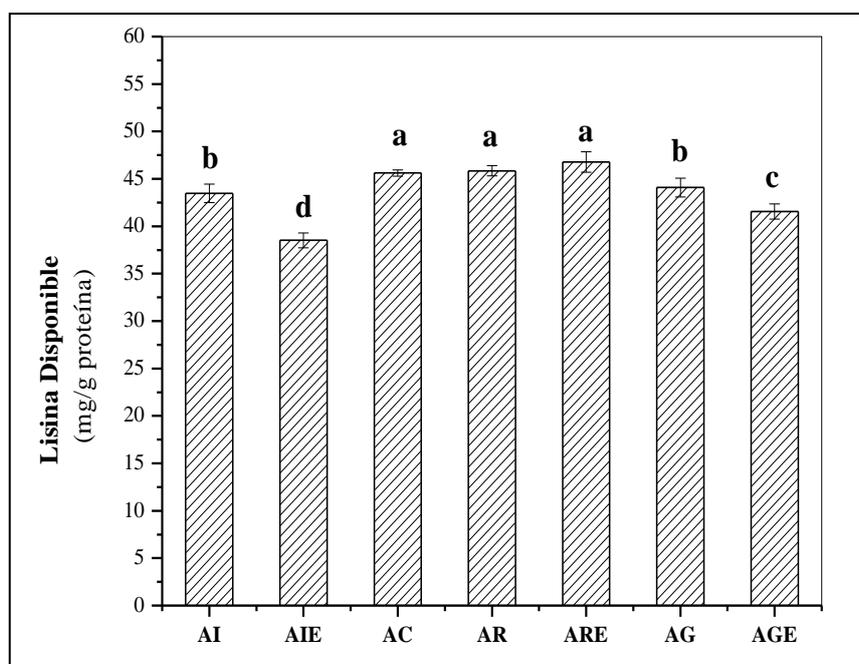


Figura IV.43 Contenido de lisina disponible de las materias primas de grano entero y sus productos. Arroz integral (AI), arroz integral extrudido (AIE), arroz integral descascarado P.P (AC), arroz cáscara remojado (AR), arroz remojado extrudido (ARE), arroz germinado (AG), arroz germinado extrudido (AGE).

Digestibilidad proteica

En la **Tabla IV.19** se observa la digestibilidad proteica de las materias primas y sus productos de GE.

La desnaturalización proteica y la reacción de Maillard serían los responsables de la menor digestibilidad proteica de los productos cocidos por extrusión. Una de las consecuencias negativas más evidentes de la reacción de Maillard en los alimentos es la pérdida del valor nutritivo de proteínas, con pérdidas de calidad y una posible disminución de la seguridad alimentaria. La disminución del valor nutritivo es atribuida a varios factores, ya que la reacción de Maillard puede disminuir la digestibilidad, destruir y/o inactivar biológicamente a los aminoácidos, incluyendo aminoácidos esenciales como la lisina y el triptófano, inhibir enzimas proteolíticas y glicolíticas, etc. (Namiki, 1988; Friedman, 1996).

Tabla IV.19 Digestibilidad proteica de las materias primas y sus productos de GE.

Materias Primas y Productos	Digestibilidad proteica (%)
AI (proveniente del molino)	89,06 ± 2,72 ^b
AIE (160 °C-14% H)	79,32 ± 0,02 ^{cd}
AC (descascarado en PP)	82,85±1,6 ^c
AR (45 °C-24 h)	81,63±2,36 ^c
ARE (160 °C-16,5 %H)	74,71±0,78 ^d
AG (24 h-35 °C)	100,9±1,0 ^a
AGE (175 °C-14 %H)	83,6±2,4 ^{bc}

Arroz integral (AI), arroz integral extrudido (AIE), arroz integral descascarado PP (AC), arroz cáscara remojado (AR), arroz remojado extrudido (ARE), arroz germinado (AG), arroz germinado extrudido (AGE).

IV.4.1.2 Lípidos

El contenido de lípidos del arroz se encuentra principalmente en el salvado (representa el 20 % en b.s del grano) y en el germen. Alrededor del 1,5 – 1,7 % está presente como lípidos que pueden ser extraídos con éter, cloroformo-metanol, etc. (Juliano y Goddard, 1986; Tanaka y col., 1978).

Los ácidos grasos principales de estos lípidos son los ácidos linoleico, oleico y palmítico (Hemavathy y Prabhaker, 1987; Taira y col., 1988).

El contenido de **lípidos** (extracto etéreo) de los productos disminuyó con todos los tratamientos, en relación a las materias primas. El remojo ácido (AR) y la germinación (AG) generan pérdidas de lípidos, que aumentan aún más al extrudir estas muestras (ARE y AGE).

Las pérdidas de lípidos en los granos remojados podrían ser atribuidas a pérdidas de germen durante el descascarado de los granos. El contenido de lípidos extraíbles en AI y

AR no difiere significativamente, pero ambos son diferentes al AC, descascarado en la planta piloto. Esto podría indicar por un lado, que el descascarado industrial podría haber sido más intenso que el descascarado a escala piloto, conduciendo a pérdidas de germen, y por el otro, que el proceso de remojo ácido induce cambios estructurales en los granos que implican mayor separación del germen en el descascarado a escala piloto.

En el proceso de germinación, tal como se mencionó en el capítulo **IV.3**, la pérdida de alrededor del 28% de los lípidos extraíbles puede explicarse por el hecho de que los lípidos se utilizan para producir la energía necesaria para las modificaciones bioquímicas y fisiológicas que ocurren en las semillas durante la germinación (Elmaki y col., 1999).

El proceso de extrusión, tanto en la producción de AIE, como de ARE y AGE, disminuye el contenido de lípidos extraíbles, debido al hecho de que se forman complejos lípidos-amilosa y lípidos-proteínas no extraíbles con éter (Camire, 1990). Además, también puede existir algún tipo de degradación debido a las condiciones de temperatura y humedad utilizadas en el proceso de extrusión, como fue mencionado anteriormente.

Perfil de Ácidos Grasos

La **Tabla IV.20** muestra el **perfil de ácidos grasos** de las materias primas y de los productos, expresados como porcentaje de la grasa total. Las grasas son fuentes eficientes de energía y varios ácidos grasos son conocidos por tener efectos fisiológicos (Kim y col., 2001), además del hecho de que el ácido linoleico y linolénico son esenciales (Closa, 2006).

En general, las materias primas AI y AC presentaron el mismo perfil de ácidos grasos, a excepción de que AI presentó menor contenido de ácido linolénico. Esto podría deberse a diferencias en la composición de distintas partidas de arroz y/o al diferente proceso de descascarado (industrial vs. planta piloto).

Se observó que los ácidos grasos palmítico, oleico y linoleico se encontraron en mayor proporción (>90%) en las materias primas (AI y AC); mientras que los ácidos grasos esteárico, linolénico y mirístico, en menor proporción. Esto coincide con lo informado por Juliano (1985). Esto no se modificó en las muestras procesadas por remojo (AR) y germinación (AG). Sin embargo, los tratamientos de remojo (AR) y germinación (AG) produjeron algunos cambios en el perfil de ácidos grasos, en comparación con aquel de la materia prima (AC).

Tabla IV.20 Contenido de ácidos grasos de las materias primas y de las muestras procesadas por remojo y germinación.

ACIDOS GRASOS (%)		AI	AC	AR	AG
Nombre	Nomenclatura				
Mirístico	(14:0)	0,62	0,57	0,35	0,56
Palmítico	(16:0)	24,41	20,8	17,18	17,72
Palmitoleico	(16:1)	0,17	0,22	0,15	0,32
Esteárico	(18:0)	3,38	2,89	2,27	2,26
Oleico	(18:1) n-9	41,83	41,16	45,65	41,72
Cis-octadecenoico	(18:1)	1,07	1,01	0,89	0,66
Trans linoelaídico	(18:2) Trans	0,66	0,49	-	0,12
Linoleico	(18:2) n-6	25,54	28,39	30,87	33,49
Araquídico	(20:0)	0,77	0,61	0,64	0,47
Gadoelico	(20:1) CIS	0,44	0,44	0,57	0,37
Linolénico	(18:3) n-3	0,62	0,89	0,94	1,42
Behénico	(22:0)	0,32	0,28	0,58	0,13
Total ácidos grasos saturados		29,48^a	25,15^b	21,01^c	21,44^c
Total ácidos grasos monoinsaturados		43,76^b	42,83^b	47,26^a	43,07^b
Total ácidos grasos poliinsaturados		26,16^b	29,28^b	31,81^{ab}	35,08^a

*Media. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$). Arroz integral (AI), arroz integral descascarado P.P (AC), arroz cáscara remojado (AR), arroz germinado (AG).

El AR tuvo un mayor contenido de ácidos oleico, con respecto al AC; y por otra parte, menor contenido de ácido palmítico.

En cuanto al AG, presentó un contenido significativamente mayor de ácidos grasos poliinsaturados en comparación con su muestra de partida (AC), principalmente por el mayor contenido de ácido linolénico (~50% más). También, Kim y col. (2012) observaron un aumento del contenido de ácido linolénico como consecuencia del proceso de germinación durante 3 días de arroz integral, luego de un remojo de 24 h.

IV.4.1.3 Fibra Dietaria Total (FDT)

La fibra, tal como se mencionó en la introducción, constituye uno de los principales componentes de los GE beneficiosos para la salud.

La **Tabla IV.18** muestra el contenido de FDT, de las materias primas y los productos de GE de arroz. Puede observarse que el AC presentó el mismo contenido de FDT que el AI. Se observó que los tratamientos de remojo y germinación no afectaron el contenido de FDT de manera significativa. Sin embargo, al combinar estos tratamientos con la extrusión (ARE y AGE) o extrudir el arroz integral sin tratamiento (AIE), se produjo una disminución de alrededor del 24% para el AIE, y un 40% para ARE y AGE.

En la **Figura IV.44** se pueden observar los componentes de la FDT: fibra dietaria soluble e insoluble (FS y FI, respectivamente). Si bien no hubo diferencias en los contenidos de FDT, las proporciones de FS y FI fueron diferentes para AI y AC. Además, los procesos de remojo y germinación no modificaron esta proporción.

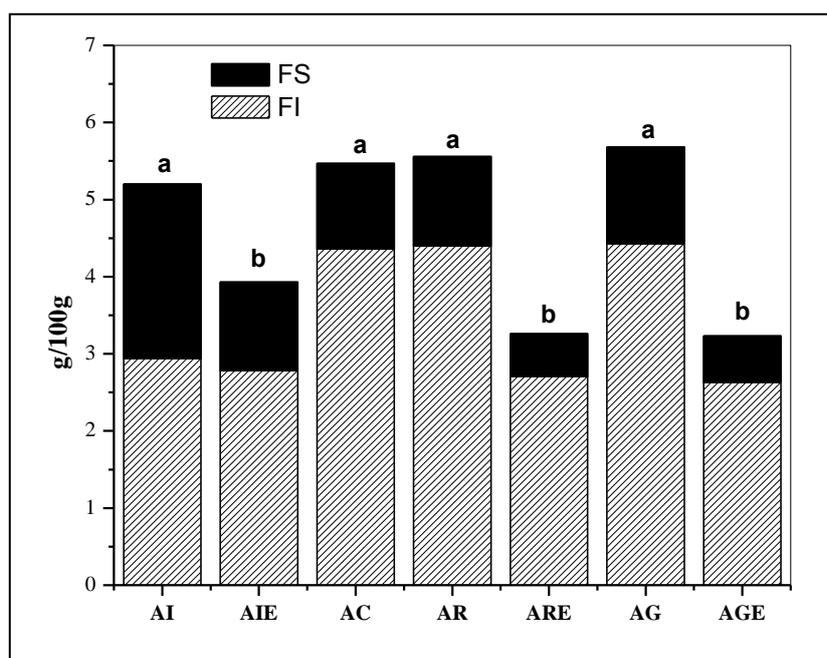


Figura IV.44 Contenido de fibra dietaria soluble (FS) e insoluble (FI) correspondiente a las materias primas y sus productos de grano entero de arroz. Arroz integral (AI), arroz integral extrudido (AIE), arroz integral descascarado P.P (AC), arroz cáscara remojado (AR), arroz remojado extrudido (ARE), arroz germinado (AG), arroz germinado extrudido (AGE). Letras distintas corresponden a diferencias significativas en el contenido de FDT.

Sin embargo, la FS del AI disminuyó un 50% luego de la extrusión (AIE), en relación al contenido de FS inicial del AI, mientras que el contenido de FI se mantuvo constante.

En el caso de ARE y el AGE, el contenido de FS se redujo a la mitad del contenido de sus respectivas muestras de partida (AR y AG), y también disminuyó la FI alrededor del 40% luego de la extrusión. Además, estas muestras presentaron menor contenido de FS pero igual contenido de FI que el AIE.

La FDT durante la extrusión sufre una modificación de su contenido y de su solubilidad (Robin y col., 2012). La disminución en el contenido de FDT después de la extrusión puede ser asociada a un aumento de los componentes de la FS de bajo peso molecular, los cuales no se determinan por no precipitar con alcohol (Gajula y col., 2008). Por otra parte, Ostergard y col., (1989) indicaron que parte del almidón resistente podría transformarse en almidón digerible luego de la extrusión, traducándose esto en una disminución del contenido de FDT. Camire y col. (1990) indicaron que puede ocurrir la formación de complejos entre los polisacáridos y lípidos, los cuales no pueden ser atacados por las enzimas, α -amilasa o amiloglucosidasa, ni extraídos con hexano y que, por lo tanto, pueden medirse como FI.

IV.4.1.4 Contenido de cenizas

El contenido de cenizas de las materias primas y de los productos (**Tabla IV.18**) indicó que sólo el AG y el AGE presentaron un contenido de cenizas significativamente mayor que las demás muestras. Como se mencionó en el caso de los lípidos, estas diferencias podrían explicarse en relación a distintos comportamientos en el proceso de descascarado, de cada muestra en particular, ya que los tratamientos le podrían conferir al grano diferente adherencia del salvado y del germen.

IV.4.1.5 Carbohidratos

Los valores del contenido de **almidón**, principal constituyente del grano de arroz, estuvieron en el rango de 73,53-80,19 g/100 g (b.s), lo cual coincide con los valores de composición reportados por Juliano (1985) y, Pomeranz y Ory (1982).

En relación al contenido de almidón (**Tabla IV.18**), en los productos con tratamientos de remojo (AR) y germinación (AG) se observó un ligero aumento en comparación con la muestra de partida (AC). Como ya se mencionó, esto podría atribuirse a los cambios en las proporciones de otros componentes, como consecuencia de los diferentes procesos, incluido el descascarado.

Por otra parte, salvo en el caso del AIE, la extrusión disminuyó el contenido de almidón. Se conoce que la extrusión, dependiendo de las condiciones del proceso y

composición de la mezcla de alimentos, provoca hinchamiento y ruptura de los gránulos de almidón, modificación de espectros y picos cristalinos por DSC, solubilidad en agua fría y reducción de la viscosidad parcial y/o completa del almidón, liberación de amilosa y amilopectina y dextrinización (Cheftel, 1986). Como fue mencionado en el capítulo **IV.3**, la extrusión del AG y AR permitió alcanzar un mayor grado de cocción que en el caso del AI, lo que se traduce en un menor contenido de almidón en AGE y ARE por dextrinización.

Por otra parte, los carbohidratos disponibles fueron mayores para las muestras extrudidas en todos los casos (AIE, ARE y AGE) debido a la degradación macromolecular que depende de los parámetros de extrusión, tales como la temperatura, la humedad y la velocidad de rotación del tornillo (Mercier, 1993) y como consecuencia de los cambios descriptos en los diferentes constituyentes.

IV.4.1.6 Perfil de Inositoles fosfatos (IP)

Tal como se mencionó en la introducción, uno de los objetivos principales de los tratamientos tecnológicos ensayados fue la remoción del ácido fítico de los GE de arroz. Cabe destacar que se denomina ácido fítico a los inositoles fosfatos que tienen 6 grupos fosfatos en su estructura (IP6). Éstos son los principales responsables de la disminución de la disponibilidad de nutrientes, debido a la formación de complejos con éstos.

La **Figura IV.45** presenta el perfil de IP de las materias primas utilizadas y de las diferentes muestras obtenidas mediante los procesos tecnológicos. Como se observa, los tratamientos resultaron en una importante disminución del contenido de IP6 de los productos, en comparación con sus correspondientes materias primas.

En relación al contenido de IP totales del AI, la extrusión (AIE) produjo un 14% de pérdidas. El contenido de IP6 en particular disminuyó un 34%, y a su vez, se observó el aumento de los IP4 e IP3, que se producen debido a la hidrólisis de los IP6. Todo esto indicaría que la extrusión por sí sola reduce el contenido de AF de productos de GE. Esto coincide con lo encontrado por Zielínski y col. (2001), quienes estudiaron los IP de varios cereales de tipo GE (trigo, avena, cebada y centeno) luego de la extrusión, y observaron disminuciones en un rango de 8-31% en relación a sus contenidos iniciales.

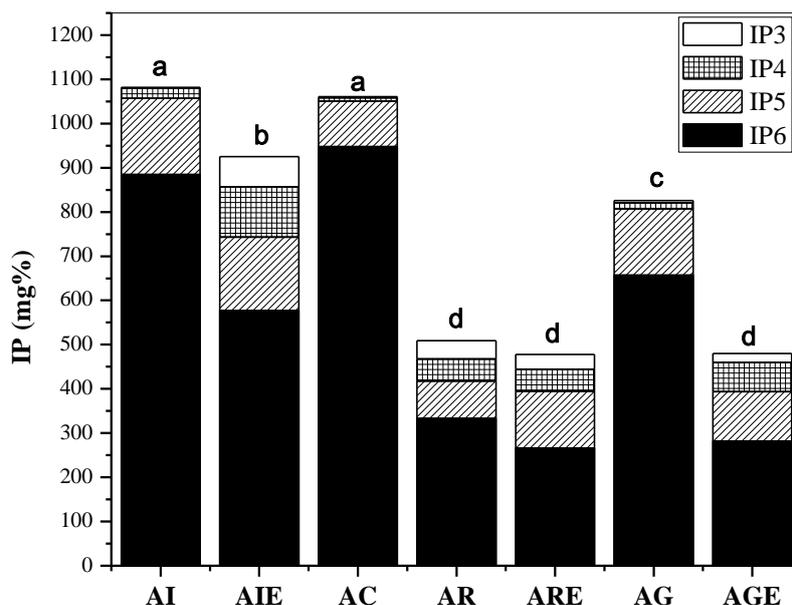


Figura IV.45 Representación del perfil de inositolos fosfatos (IP) de las materias primas y sus productos. Arroz integral (AI), arroz integral extrudido (AIE), arroz integral descascarado P.P (AC), arroz cáscara remojado (AR), arroz remojado extrudido (ARE), arroz germinado (AG), arroz germinado extrudido (AGE).

Respecto a los tratamientos realizados sobre el AC, se observó que el remojo produjo una disminución del 52% de los IP totales, siendo estas pérdidas principalmente representadas por pérdidas de los IP6 (65%). Como se mencionó en los **capítulos IV.1** y **IV.2**, esta reducción producida por el remojo se atribuye a la lixiviación del AF en el medio de remojo, en las condiciones de temperatura, tiempo y pH utilizados (45 °C-24 h, pH ácido); y a la activación de las fitasas endógenas, que degradan el AF a inositolos fosfatos de menor peso molecular, aumentando los contenidos de IP4 e IP3. Luego, la extrusión de la harina de arroz remojado (ARE), disminuye aún más el contenido de IP6 (un 20% en relación al AR). Es decir, el proceso de remojo por sí solo redujo de manera significativa el contenido de AF, siendo más importante que la extrusión para lograr esta reducción.

En el caso de la germinación (AG), se logró una remoción del 30% de los IP6 en relación al AC. Como se mencionó anteriormente, esto se debe a la lixiviación del AF durante el remojo previo y la activación de las fitasas por la germinación. Esto se refleja en los mayores contenidos de IP5 e IP4 (**Figura IV.45**). La combinación de la extrusión con el proceso de germinación (AGE), logró pérdidas de IP6 del orden del 57% en comparación con AG y del 70% en relación a AC, lo que hace que ambos métodos combinados permitieran obtener mayores pérdidas de IP6.

En resumen, los procesos de remojo y germinación permiten disminuir el contenido de AF por sí solos, siendo más efectivo el proceso de remojo. En el caso de la germinación es conveniente la combinación con la extrusión, ya que se obtuvieron mayores pérdidas al utilizar ambos tratamientos consecutivos.

IV.4.1.7 Capacidad antioxidante (CAO)

La CAO del arroz se debe principalmente a la presencia de compuestos bioactivos, incluyendo polifenoles, γ -oryzanol y tocoferoles, encontrados en su mayoría en las capas externas (Butsat y Siriamornpun, 2010).

Según la **Figura IV.46**, todos los tratamientos aumentaron la CAO de las muestras, a excepción del remojo (AR), en el cual se produjo una disminución del 30%, probablemente debido a la solubilización de compuestos con CAO en el medio de remojo, como por ejemplo los polifenoles. Towo y col. (2003) encontraron pérdidas de polifenoles por diferentes tipos de remojo en cereales y legumbres, entre el 30-70 % para sorgo y mijo. Además, sugirieron que algunos de los compuestos fenólicos podrían penetrar en el endospermo con el agua embebida durante los procesos de remojo y podrían formar fuertes complejos con macromoléculas, tales como las proteínas del endospermo, lo que reduciría su extracción.

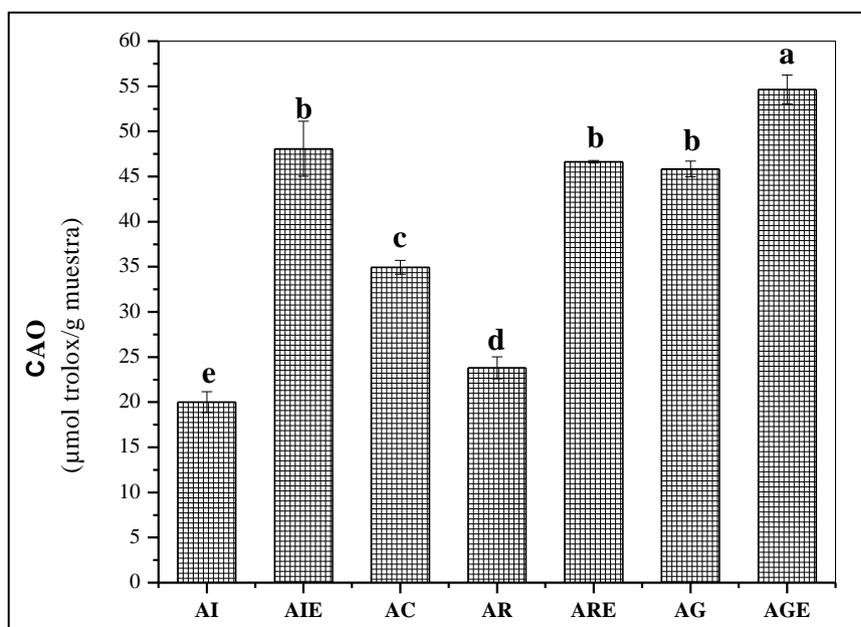


Figura IV.46 Capacidad antioxidante (CAO) de las materias primas y sus productos. Arroz integral (AI), arroz integral extrudido (AIE), arroz integral descascarado P.P (AC), arroz cáscara remojo (AR), arroz remojo extrudido (ARE), arroz germinado (AG), arroz germinado extrudido (AGE).

Por otra parte, la germinación (AG) aumentó la CAO (30%) de los granos, debido a la activación de enzimas, como ya fue mencionado en el **capítulo IV.3**.

La extrusión aumentó la CAO de todas las muestras procesadas (AIE, ARE y AGE). Este aumento correspondió al 100, 33 y 56 % para el AIE, ARE y AGE, respectivamente. La germinación combinada con la extrusión condujo a un producto con la mayor CAO, en comparación con el resto de los productos de GE.

IV.4.1.8 Polifenoles (PF Libres y PF Ligados)

Los efectos beneficiosos para la salud debidos al consumo de GE están determinados en parte por el contenido de PF, los cuales poseen actividad antioxidante para el organismo, tal como se mencionó previamente en la introducción. Los PF se encuentran en las partes comestibles del grano: en el salvado, el germen y el endospermo (Yang y col., 2014).

La **Figura IV.47** muestra la proporción que representan los PF libres y PF ligados en relación al contenido de PF totales.

El contenido de PF libres de las materias primas (AI y AC) representó el 50 y 46% de los PF totales de los granos, y el de PF ligados, el 50 y 54% para AI y AC, respectivamente. Estos resultados están en el rango de los informados por Adom y Liu (2002) para arroz, quienes indicaron valores de 38 y 62 (%) para PF libres y ligados, respectivamente.

El contenido de PF totales de las muestras sometidas al tratamiento de remojo (AR) no cambió en relación al AC de partida, ya que si bien el contenido de PF libres disminuyó, estas pérdidas quedaron compensadas por el aumento del 32% de los PF ligados. La disminución de los PF libres podría atribuirse al remojo en medio ácido. Esto también fue observado por Towo y col. (2003), quienes estudiaron diferentes tipos de remojos en agua, ácidos y álcalis, e indicaron que el contenido de PF disminuía en mayor proporción para el caso del remojo ácido.

El tratamiento de germinación produjo un aumento del contenido de PF totales, por aumento de los PF Libres (en un 60%) y de los PF ligados (en un 28%), contribuyendo al potencial antioxidante de la harina germinada. Como se indicó en el capítulo **IV.3**, la germinación aumenta el contenido de PF debido a la gran actividad enzimática involucrada en el proceso.

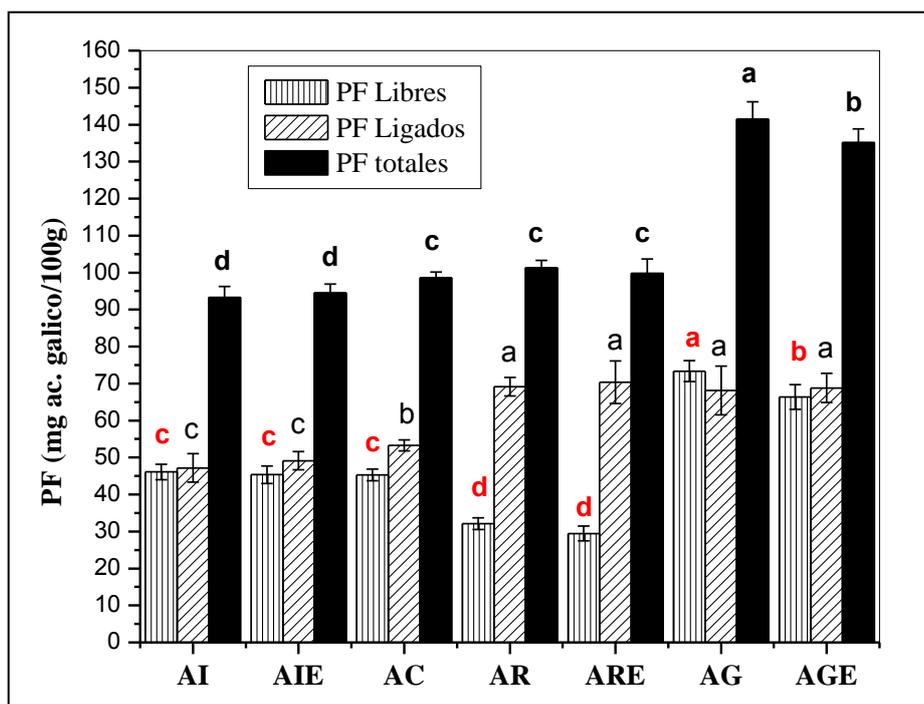


Figura IV.47 Polifenoles (PF) Libres y Ligados de las materias primas y sus productos. Arroz integral (AI), arroz integral extrudido (AIE), arroz integral descascarado P.P (AC), arroz cáscara remojado (AR), arroz remojado extrudido (ARE), arroz germinado (AG), arroz germinado extrudido (AGE).

Los resultados obtenidos indicaron que tanto los PF libres como los ligados no se modificaron en forma significativa por el proceso de extrusión, en ninguno de los casos (AIE, ARE, y AGE). Varios investigadores observaron que no existe una tendencia clara del efecto de las condiciones de extrusión en el contenido de PF. De esta manera, puede no modificarse (Yang y col., 2014), disminuir (Altan y col., 2009; Dlamini y col., 2007) o bien, aumentar el contenido (Zielński y col., 2001), dependiendo del cereal estudiado, de las condiciones de extrusión y del método de análisis propuesto para su determinación.

Cabe destacar que el arroz germinado (AG) y el germinado-extrudido (AGE) son los productos que aumentaron notablemente su contenido de PF, lo cual coincide con el mayor valor de CAO obtenido en estas muestras. Asimismo, es necesario aclarar que no siempre se halló una correlación entre el contenido de PF y la CAO. Tal es el caso de los extrudidos AIE, ARE y AGE en los cuales los contenidos de PF no se modificaron por la extrusión, pero la CAO fue mayor en los extrudidos que en las materias primas. Como se mencionó anteriormente, otros compuestos que no son PF estarían involucrados en la CAO.

IV.4.2 Propiedades físicas de las harinas de grano entero de arroz

La **Tabla IV.21** presenta los valores obtenidos de la evaluación física de las materias primas y los productos del remojo, la germinación y/o extrusión.

Tabla IV.21 Absorción de agua (AA), Solubilidad (S), Intensidad de los picos característicos y Cristalinidad de las harinas de grano entero de arroz.

Parámetros/ Muestras	AA (mL/g)	S (g/100g)	Patrón de Rayos X (2θ e intensidad) (cps ^{10⁻³})	Cristalinidad (%)
AI	2,47±0,1 ^f	3,18±0,1 ^f	15,17° (2,95) 17,70° (11,73) 23,23° (12,79)	27,47±2,0 ^a
AIE (160°C-14%H)	7,04±0,1 ^b	24,10±0,9 ^c	12,30° (14,38) 18,17° (2,11)	16,49±1,7 ^b
AC	2,77±0,15 ^c	3,98±0,1 ^e	15,17° (3,18) 17,65° (9,88) 23,26° (17,13)	30,19±2,1 ^a
AR (45 °C-24 h)	2,90±0,1 ^e	3,17±0,03 ^f	15,06° (3,03) 17,70° (13,88) 23,17° (15,66)	32,58±1,9 ^a
ARE (160°C-16,5%H)	5,81± 0,2 ^c	53,76±2,1 ^a	12,71° (3,10) 18,33° (0,84)	3,95±2,1 ^d
AG (35°C-24h)	3,05±0,2 ^d	4,98±0,29 ^d	15,01° (2,32) 17,73° (9,08) 23,17° (15,99)	29,78±2,3 ^a
AGE (175°C-14%H)	7,47±0,1 ^a	42,83±0,2 ^b	12,81° (3,59) 18,29° (0,82)	4,42±1,5 ^c

*Media ± desviación estándar; letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$). Arroz integral (AI), arroz integral extrudido (AIE), arroz integral descascarado P.P (AC), arroz cáscara remojado (AR), arroz remojado extrudido (ARE), arroz germinado (AG), arroz germinado extrudido (AGE).

IV.4.2.1 Absorción de Agua (AA) y Solubilidad (S)

En relación a las propiedades de hidratación de AA y S, en general se pudo observar que los tratamientos previos de remojo y germinación, y a su vez la posterior extrusión de las muestras, produjeron un aumento de ambas propiedades.

En cuanto a los valores de AA, el orden decreciente para las muestras extrudidas fue: AGE > AIE > ARE; y el de las muestras no extrudidas: AG > AR y AC > AI. Esto indicó que la germinación fue el proceso que más cambios introdujo en la AA del arroz.

Respecto a la S de las muestras, el comportamiento en orden decreciente fue el siguiente: ARE > AGE > AIE para las muestras extrudidas y AG > AC > AR > AI, para las muestras no extrudidas.

Los valores de S para estas muestras producidas en escala piloto, fueron similares a aquellos encontrados en los diseños de remojo (capítulo IV.2) y germinación (capítulo IV.3), 55,48 y 38,93 g/100g, respectivamente. En cambio los valores de AA, difieren ligeramente de aquellos hallados en los diseños de extrusión. Estas diferencias son atribuidas al cambio de escala del procesamiento.

IV.4.2.2 Patrón de rayos X y Cristalinidad (%)

La **Tabla IV.21** muestra los ángulos y la intensidad de los picos asociados a las formas cristalinas del almidón, y el porcentaje de cristalinidad de las muestras. Por otra parte, la **Figura IV.48** muestra los difractogramas de las muestras de partida (AI, AR y AG) y sus respectivas muestras extrudidas (AIE, ARE y AGE).

Según Colona y col., (1989) la cocción por extrusión destruye la estructura cristalina organizada de los cereales, ya sea en forma parcial o completa, dependiendo de las variables de extrusión, de la humedad y cizallamiento. El almidón nativo de arroz tiene una estructura semi-cristalina, ya que la amilopectina está organizada en una red cristalina monoclinica denominada "tipo A" (Hoseney, 1986). En los patrones de rayos X de AI, AR y AG se puede observar la estructura típica de almidón nativo, con los tres picos característicos en torno a 15.2°, 17.4° y 23°.

En relación a la cristalinidad, las muestras extrudidas mostraron la desaparición de la estructura cristalina nativa y la formación de un nuevo cristal con dos picos (2θ: 12° y 18°) conocidos como cristal "tipo E". Según Colonna et al. (1987), esta estructura se corresponde con el reconocido complejo amilosa-lípido formado durante la extrusión.

Cabe destacar que la muestra de AIE mostró un mayor valor de cristalinidad en comparación con las muestras extrudidas provenientes del remojo y germinación previos, probablemente debido a que posee todavía restos de la estructura del almidón en su forma nativa, lo que se confirma con el valor más bajo de S, en comparación con las otras dos muestras extrudidas (ARE y AGE). Esto reafirma los comentarios respecto a que el AIE

presentó menor grado de cocción que el ARE y AGE. González y col. (2014) también encontraron que bajo similares condiciones de extrusión, las muestras extrudidas de arroz integral no estaban completamente cocidas.

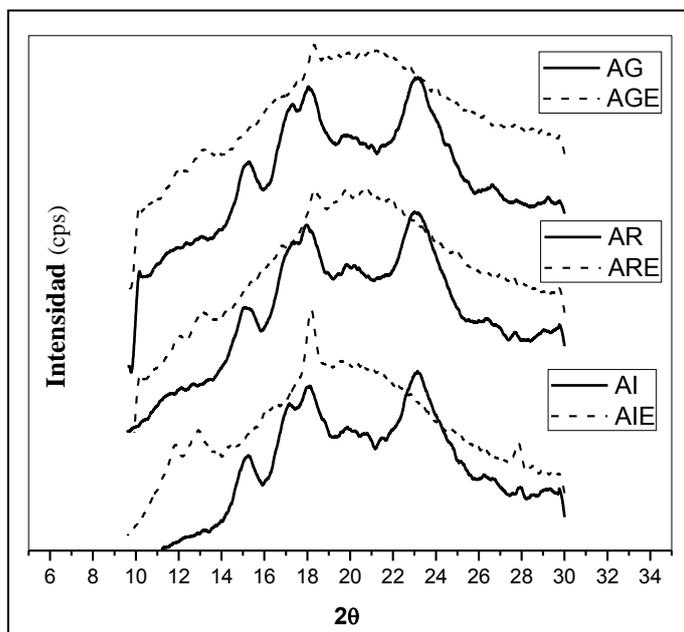


Figura IV.48 Rayos X del arroz integral (AI), arroz cáscara remojado (AR), arroz germinado (AG) (líneas continuas) y arroz integral extrudido (AIE), arroz remojado extrudido (ARE), arroz germinado extrudido (AGE) (líneas de puntos).

Por otra parte, el remojo y la germinación inducirían cambios en la estructura del almidón que implican un comportamiento diferente durante la extrusión, y como consecuencia una menor cristalinidad de los productos obtenidos, asociados a un mayor grado de cocción.

IV.4.2.3 Isotermas de adsorción

La **Figura IV.49** (puntos experimentales) muestra las isotermas obtenidas para el AI y el AIE. Por otro lado, la **Figura IV.50** (puntos experimentales) presenta las isotermas de adsorción del AC utilizado como materia prima y del AR, ARE, AG y AGE.

Las isotermas relacionan el contenido agua en equilibrio, en función de la actividad de agua en cada muestra. Las mismas mostraron el comportamiento de isotermas tipo II, conocida como sigmoide, la cual es característica de productos como los cereales, que presentan una tendencia asintótica conforme la actividad de agua se acerca a la unidad.

La región de adsorción correspondiente a las a_w más bajas representa la monocapa, donde la mayoría de los sitios están cargados o son ricos en grupos polares, tales como

grupos OH. En esta región, las moléculas de agua están fuertemente ligadas en los sitios polares a través de enlaces de hidrógeno (Van den Berg, 1981). Las muestras extrudidas (AIE, ARE y AGE) mostraron mayor contenido de humedad de equilibrio en comparación con las no extrudidas (AI, AC, AR y AG). Esto podría deberse a que la extrusión provoca la disrupción de los componentes de la estructura, principalmente del almidón (amilosa y amilopectina), que se rompe en dextrinas, y también de las proteínas (Donkor y col., 2012). El efecto de la energía mecánica es complejo, ya que tiene al menos dos funciones diferentes. En primer lugar, promueve la desintegración de los gránulos de almidón hidratado, los cuerpos proteicos y los componentes lipídicos, y se mezclan estos fragmentos mecánicamente. En segundo lugar, influye en la velocidad de las reacciones químicas, en particular la ruptura de las cadenas de hidratos de carbono y proteínas (Kokini y col., 1992).

Además, se puede observar que la muestra AG presentó la mayor adsorción de agua entre las muestras no extrudidas y que AGE mostró la mayor adsorción entre de las extrudidas. Esto se debería a que la germinación produciría un aumento en aminos libres y grupos carboxílicos, probablemente debido a la biosíntesis de nuevos compuestos (Davidson, 1992; Kim y col., 2012.).

En la **Figuras IV.49** y **IV.50** se muestra la modelización de los datos a través del modelo de GAB (líneas).

La **Tabla IV.22** muestra los valores de los parámetros de BET y de GAB de las distintas muestras. Los valores R^2 indican que BET ajustó mejor que GAB (valores más altos R^2). El inconveniente es que BET se desvía de la linealidad cuando la a_w es superior a 0.3-0.5. Esto ocurre debido a que a partir de esos niveles de a_w , los fenómenos que describen mayoritariamente las interacciones del agua en el alimento no son de sorción, sino más bien del tipo soluto-disolvente y el agua empieza a estar presente en el sistema movilizandolos solutos en forma de fase líquida (Martínez-Navarrete y col., 1998).

El contenido de agua monocapa (w_0) estimado por GAB fue mayor que el obtenido por BET. Los estudios realizados por Timmermann (2003) atribuyen esta diferencia de valores del agua de la monocapa a la naturaleza física y matemática de los modelos.

El valor de w_0 representa el contenido de humedad en el cual el agua está unida a cada uno de los grupos polares e iónicos. El valor de BET es más aceptado que el de GAB, debido a que el modelo de BET tiene un sentido físico real para bajas a_w (0.3 a 0.5), en relación con la teoría de adsorción. Mientras que el modelo de GAB es más empírico y proporciona una predicción más exacta en un valor de a_w hasta 0,8. En teoría, ambos

métodos deberían proporcionar valores similares de la monocapa. Sin embargo, como el modelo de BET ajusta bien en el rango de actividades de agua de 0 a 0,43, se prefiere el contenido de agua de la monocapa calculado por este modelo, ya que sería el más adecuado para el cálculo de parámetros de w_0 y C en los productos extrudidos.

El C es la constante de energía relacionada con el calor neto de sorción. Su valor está relacionado con la diferencia entre las moléculas que absorben energía de la primera capa y las otras capas restantes (Andrade y col., 2011).

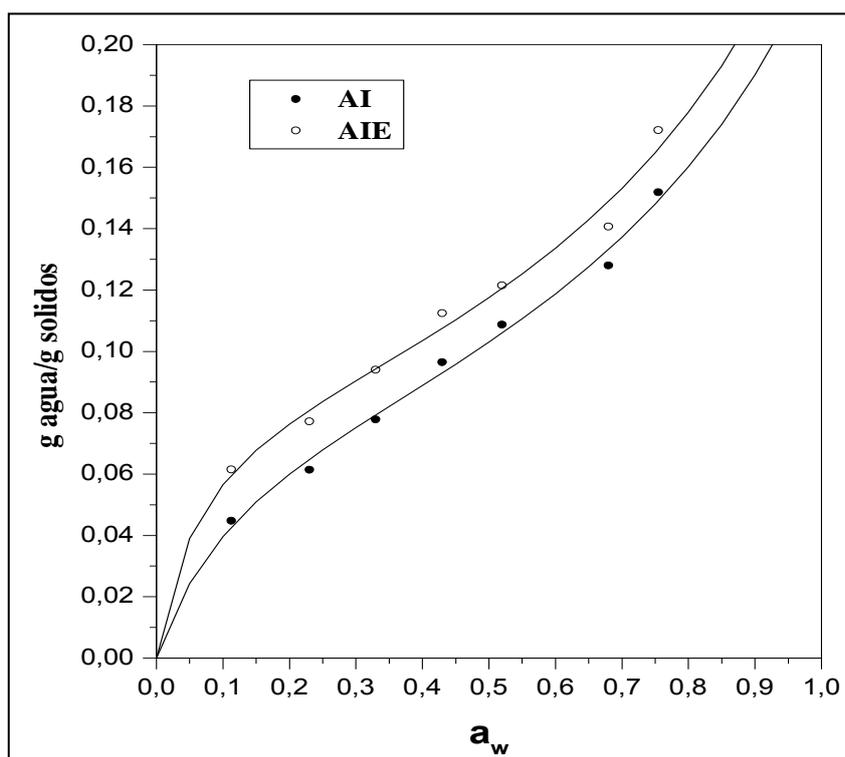


Figura IV.49 Isotermas de adsorción para arroz integral (AI) y arroz integral extrudido (AIE) a 24 °C. Puntos experimentales y GAB (líneas).

De acuerdo con BET, las muestras extrudidas (AIE, ARE y AGE) mostraron mayor w_0 que las muestras sin extrusión (AI y AC). Por otra parte, AG y AGE presentaron los mayores valores de w_0 y C, lo que significa que estas muestras tendrían mayores valores de calor de la interacción con el agua, que otras muestras.

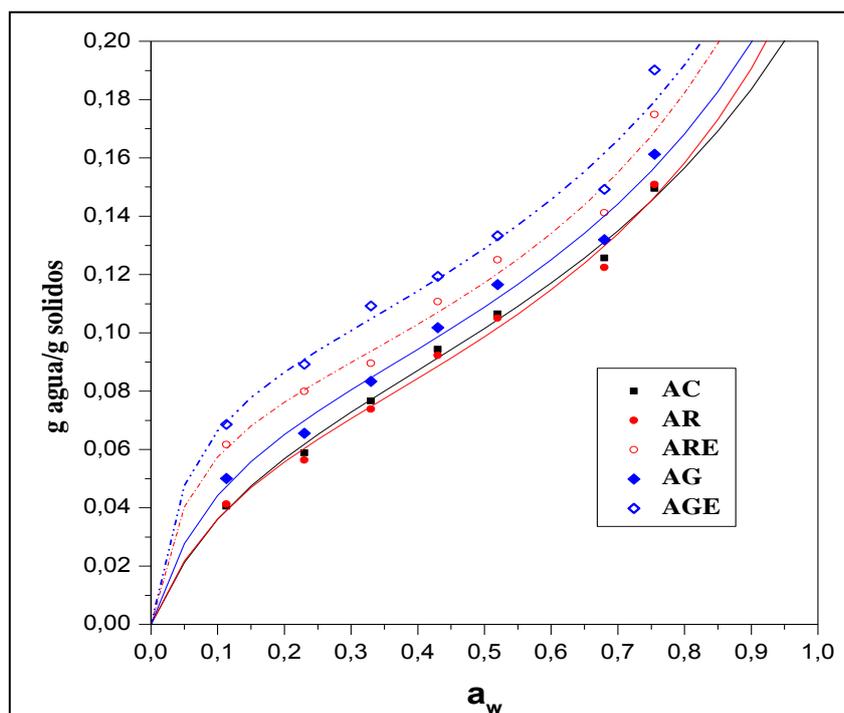


Figura IV.50 Isotermas de adsorción a 24 °C para arroz cáscara (AC), arroz cáscara remojado (AR), arroz remojado extrudido (ARE), arroz germinado (AG) y arroz germinado extrudido (AGE); Puntos experimentales y GAB (líneas).

Tabla IV.22 Parámetros de los modelos (BET y GAB) para las isotermas de adsorción.

Modelos	AI	AIE	AC	AR	ARE	AG	AGE
BET							
w_0 (g agua/g sol secos)	0,0596	0,0666	0,0601	0,0578	0,0642	0,0620	0,0714
C	14,548	32,729	11,238	12,047	47,436	17,721	69,681
R^2	0,9984	0,9995	0,9987	0,9947	0,9974	0,9976	0,9901
GAB							
w_0 (g agua/g sol secos)	0,080	0,084	0,084	0,076	0,081	0,082	0,091
C	12,060	23,042	9,802	10,712	25,154	13,872	29,156
K	0,668	0,680	0,637	0,693	0,710	0,673	0,671
R^2	0,9710	0,9756	0,9686	0,9406	0,9700	0,9572	0,9654

Arroz integral (AI), arroz integral extrudido (AIE), arroz integral descascarado P.P (AC), arroz cáscara remojado (AR), arroz remojado extrudido (ARE), arroz germinado (AG), arroz germinado extrudido (AGE).

De acuerdo con GAB, AR fue la muestra de valor más bajo, coincidiendo con BET, y el valor más alto correspondió al AG entre las muestras no extrudidas y a AGE entre las muestras extrudidas. En ambos modelos, los valores de C son mayores en las muestras extrudidas porque absorben más agua, entonces provocan un aumento del calor de sorción.

Como se mencionó antes, este efecto podría ser debido al proceso de extrusión que rompe algunas uniones y genera un área de mayor superficie disponible y grupos polares para la adsorción.

IV.4.2.4 Termogramas de las harinas de arroz de grano entero (DSC)

Las **Figuras IV.51** y **IV.52** muestran los termogramas del AI y AIE, respectivamente para todo el rango de a_w estudiado (0,1-0,75). A pesar de los cambios estructurales en la fracción de almidón causado por los diferentes tratamientos mencionados anteriormente, no se observaron cambios en los valores de T_g , ni por el tratamiento, ni por el cambio de contenido de agua en las muestras, dentro del rango de estudio.

Asimismo, la **Tabla IV.23** muestra el punto medio de la T_g y los ΔC_p para las muestras AI y AIE en el rango de contenidos de agua estudiados. Se puede observar que, a pesar de que no se observaron diferencias en la T_g , existió diferencia en los ΔC_p entre AI y AIE. Esto indica que la energía agua-sólido de interacción es mayor en la muestra extrudida (AIE), en comparación con la no extrudida (AI), confirmándose esto con los valores de C discutidos anteriormente en las isotermas.

La bibliografía reciente sobre la evaluación de las temperaturas de transición (T_g) en harinas de grano entero es escasa. Perdon y col. (2000) estudiaron la transición vítrea de granos integrales de arroz utilizando tres métodos diferentes: DSC (*Differential Scanning Calorimetry*), TMA (*Thermo Mechanical Analysis*) y DMA (*Dynamic Mechanical Analysis*) y mostraron que las T_g no se vieron afectadas para el intervalo de humedades en el que fueron realizadas nuestras determinaciones (~ 4-17 g de agua/100 g de muestra).

Algunos estudios indican que la técnica DSC no es lo suficientemente sensible para detectar las transiciones térmicas en muestras de arroz, debido a que el mismo es parcialmente cristalino y amorfo (Sun y col. 2002).

La composición de las muestras contribuiría a la baja sensibilidad para la detección de las T_g . Dado que la mayoría de los carbohidratos, proteínas y fibra no son solubles, especialmente en el caso de muestras no extrudidas que presentan una S muy baja, o no son compatibles con el agua, en el caso de las muestras extrudidas, y se encuentran en el arroz definiendo su propia fase, se espera que se forme una baja cantidad de fase amorfa. Esto, junto con la poca cantidad de muestra que se utiliza para el análisis, podría justificar la baja sensibilidad observada.

El hecho de que no se observaron cambios en la Tg para AI y AIE, ni por el cambio de humedad ni por los tratamientos, impidió hacer cualquier interpretación sobre el comportamiento de transición de fase y cambios estructurales. Por otra parte, la destrucción del almidón y la hidrólisis de las proteínas durante la extrusión, especialmente en granos previamente germinados, aumentó la higroscopicidad de las muestras. Al ser más higroscópicas, la estructura del arroz entero extrudido sería estable en un rango más amplio de humedad. Además, la temperatura de transición vítrea (aproximadamente 50 °C) sería suficientemente alta para asegurar la estabilidad del producto.

Tabla IV.23 Análisis por DSC del arroz integral (AI) y el arroz integral extrudido (AIE) en el rango de a_w estudiado.

a_w	AI			AIE		
	Humedad (g agua/100 g muestra)	Tg (°C)	ΔC_p (J/g.K)	Humedad (g agua/100 g muestra)	Tg (°C)	ΔC_p (J/g.K)
0,113	4,06	58,05	0,098	6,15	59,65	0,130
0,230	5,89	56,86	0,131	7,71	57,82	0,126
0,330	7,66	60,94	0,154	9,40	58,16	0,203
0,430	9,44	62,15	0,165	11,24	59,32	0,166
0,520	10,65	59,77	0,180	12,14	59,74	0,199
0,680	12,57	60,01	0,210	14,06	59,70	0,263
0,755	14,95	59,16	0,182	17,20	59,13	0,412

IV.4.3 Conclusiones parciales

- Se obtuvieron diferentes tipos de harinas mediante los procesos tecnológicos de remojo, germinación y extrusión a escala piloto.
- Se logró disminuir en forma significativa el contenido de AF en ingredientes de grano entero de arroz, principalmente con los tratamientos de remojo (AR), remojo-extrusión (ARE) y germinación-extrusión (AGE).
- La capacidad antioxidante fue mayor en las muestras obtenidas con los procesos estudiados, que en las materias primas. El contenido de polifenoles aumentó de forma significativa en el producto germinado, en comparación con los demás productos obtenidos.
- En relación a las propiedades de hidratación, la AA y la S de los productos aumentó principalmente por el efecto del proceso de extrusión.

- Las muestras extrudidas perdieron prácticamente toda la cristalinidad por el proceso de cocción, a excepción del AIE que conservó el 16 % de su estructura cristalina.
- En cuanto a la interacción con el agua de las harinas, las muestras extrudidas reflejaron cambios que las hacen más higroscópicas que las no extrudidas, pero estos cambios no se vieron reflejados en las Tg medidas por DSC en el rango de humedad estudiado.

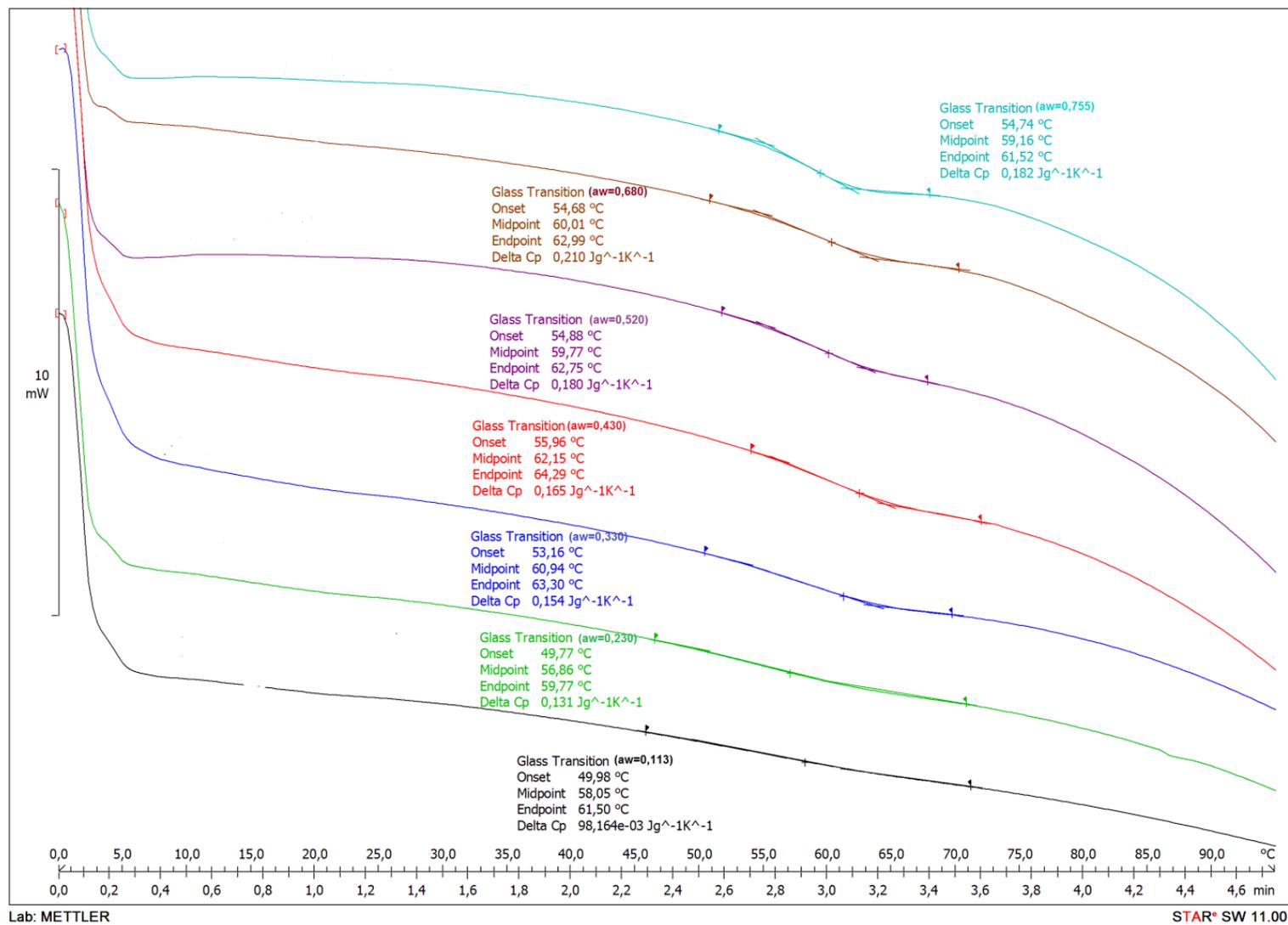


Figura IV.51 Termogramas correspondientes al arroz integral en el rango de a_w estudiado.

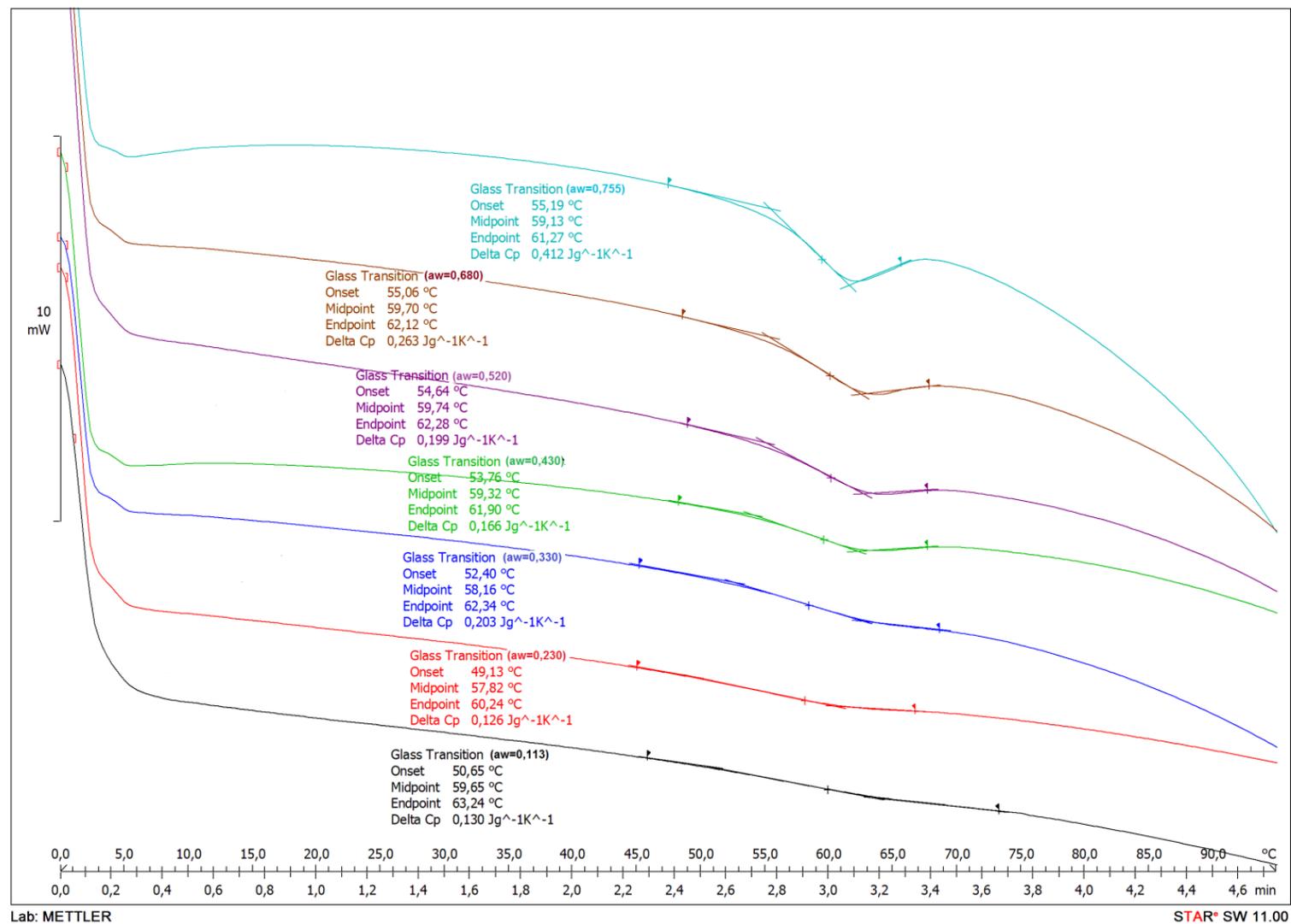


Figura IV.52 Termogramas correspondientes al arroz integral extrudido en el rango de a_w estudiado.

IV.5 ESTUDIO *IN VIVO* DE LAS PROPIEDADES NUTRICIONALES DE HARINAS DE GRANO ENTERO DE ARROZ CON DIFERENTES TRATAMIENTOS

Para los estudios con animales de experimentación se elaboraron productos extrudidos a escala piloto, utilizándose las siguientes condiciones: arroz integral (I) extrudido a 160 °C - 14 %; arroz remojado (R) extrudido a 160 °C - 16,5 % H y arroz germinado (G) extrudido a 175 °C - 14 % H. Con ellos, se elaboraron las diferentes dietas experimentales descritas en el punto **III.6.1.1**.

IV.5.1 Efecto del consumo de las dietas de grano entero de arroz en la ingesta de alimentos y la ganancia de peso

Cabe destacar que las dietas fueron formuladas para proveer similares cantidades de lípidos, proteínas, micronutrientes y 5% de fibra, por lo que la proporción de carbohidratos disponibles varió en cada dieta.

La **Tabla IV.24** muestra los indicadores del crecimiento evaluados durante la experiencia (60 días). Los resultados de la ingesta total y diaria indicaron que hubo diferencias significativas entre los lotes de las ratas alimentados con las diferentes dietas, siendo estos valores menores para el caso de las dietas I y R, lo que se tradujo en una menor ganancia de peso de las ratas que consumieron estas dietas, y menor eficiencia de estas dietas en la experiencia. En el caso de los animales que consumieron la dieta G, si bien hubo un 12% menos de ingesta total, la ganancia de peso y la eficiencia no difirieron del C.

Un estudio realizado por Coudray y col. (2001) indicó que los animales alimentados con una dieta de GE de trigo tuvieron menor crecimiento que aquellos alimentados con una dieta C, y a su vez, una dieta de trigo refinado condujo a un menor crecimiento en comparación con la dieta de GE de trigo y la dieta C. Además, los consumos también fueron menores para estos grupos en comparación con la dieta C. Sin embargo, no encontraron ningún signo clínico de deficiencia en las ratas alimentadas con grano refinado de trigo.

Paturi y col. (2012) encontraron que el consumo de dietas con 7% de inulina o fibra de papa (pared celular) disminuyó la ingesta de alimentos un 10% cuando se les suministró a ratas Sprague–Dawley, en comparación con la dieta control de celulosa. La inulina, es un carbohidrato de cadena corta rápidamente fermentable y la fibra de papa, una mezcla de

fibra fermentable (pectina y hemicelulosa) y no-fermentable (celulosa). Los investigadores indicaron que la suplementación con fibra dietaria podría haber promovido la saciedad mediante la disminución significativa en la ingesta de alimentos. Se planteó la posibilidad de que un freno colónico, que involucra una retroalimentación por la fermentación en el intestino grueso, demore el vaciado gástrico. Este concepto denominado “*ileal break*” fue definido como un mecanismo para controlar el tránsito de una comida a través del tracto gastrointestinal, a fin de optimizar la digestión y la absorción de nutrientes (Maljaars y col., 2008).

Tabla IV.24 Ingesta Total, Ingesta Diaria, Ganancia de Peso y Eficiencia.

Dietas	Ingesta Total (g/60 días)	Ingesta Diaria (g/día)	Ganancia de peso (g/60 días)	Eficiencia (g peso/g dieta)
C	1043,87±36,6 ^a	17,04±0,71 ^a	225,99±10,65 ^a	0,27±0,01 ^a
I	785,25±38,4 ^c	13,28±0,62 ^c	188,04±10,70 ^b	0,24±0,01 ^b
R	872,94±30,2 ^{bc}	14,53±0,51 ^{bc}	215,17±10,98 ^b	0,24±0,01 ^b
G	913,64±20,4 ^b	15,55±0,35 ^{ab}	267,05±7,81 ^a	0,29±0,01 ^a
p	0,0001	0,0005	<0,0001	0,0001

Media ± SEM (n=8); Letras diferentes en una misma columna indican diferencia significativa entre las muestras (p<0.05). Dieta control (C), dieta a base de arroz integral (I), dieta a base de arroz remojado (R) extrudido, dieta a base de arroz germinado extrudido (G)

Asimismo, existen numerosos estudios en humanos que relacionaron el menor peso corporal con el consumo de alimentos de tipo GE, ya que promueven la saciedad y disminuyen espontáneamente la ingesta de alimentos (Turconi y col., 1995; Delargy y col., 1997; Pasma y col., 1997; Howarth y col., 2001; Roberts y col., 2002).

Por otra parte, se debería considerar que particularmente las dietas I y R fueron elaboradas con AIE y ARE, que presentaron menor digestibilidad dentro de los ingredientes de GE evaluados (**Tabla IV.19**). Esto podría estar asociado a una menor biodisponibilidad de algún aminoácido que limitaría la utilización de la proteína, generando un efecto de anorexia, disminuyendo la ingesta total y la ganancia de peso. (Martín de Portela y col., 2006). Este efecto inhibitorio podría desaparecer en parte por el proceso de germinación del arroz cáscara.

IV.5.2 Efecto del consumo de las dietas de grano entero de arroz a nivel intestinal

La **Tabla IV.25** muestra los parámetros medidos relacionados con el ciego de los animales en estudio. Los resultados indicaron que no hubo cambios en el tamaño del ciego, excepto en las ratas alimentadas con la dieta I, las cuales presentaron un menor peso del ciego vacío, aunque al relacionarse este último con el peso corporal del animal, no se encontraron diferencias con el resto de las dietas.

Las dietas a base de grano entero de arroz ejercieron un cambio en el pH del ciego ($<0,0001$). Este cambio hacia pH más bajos puede atribuirse a la fermentación de la fibra de los GE, y a la producción de AGCC. La dieta C contiene celulosa que es resistente a la fermentación, por lo que el pH es más elevado que en el resto de las dietas de GE (Paturi y col., 2012). Estudios previos realizados en el grupo (Albarracín y col., 2014) coinciden con esto, ya que se encontró que el consumo de GE de maíz extrudido también disminuía el pH del ciego por fermentación de la fibra, en relación a una dieta C con celulosa.

Esta disminución de pH es importante, ya que está reconocido que promueve la salud intestinal mediante la alteración de la absorción de metabolitos potencialmente tóxicos y de la prevención de la proliferación de bacterias patógenas (Topping y Clifton, 2001).

Existen varios estudios realizados en humanos en los cuales el pH disminuyó por el consumo de fibra de GE (McIntosh y col., 2003; Adam y col., 2001 y 2003; Bird y col., 2008). Se han realizado estudios acerca de la influencia de la harina de GE de diferentes variedades de trigo (Adam y col., 2001) y luego del efecto del consumo de harina de GE de trigo y pan de GE de trigo (Adam y col., 2003); y los resultados, tanto del primer como del segundo trabajo, indicaron una disminución significativa del pH del contenido cecal, por consumo de alimentos a base de GE de trigo, ya sea en sus diferentes variedades de trigo, como en sus diferentes formas de consumo (harina o pan de GE).

McIntosh y col. (2003) realizaron estudios en humanos relacionados con el consumo de harina de GE de centeno y de trigo (alto contenido de fibra), y los compararon con alimentos bajos en fibra. Los resultados indicaron un pH ligeramente menor en los sujetos alimentados con las dietas de alto contenido de fibra, y asociaron este pH más bajo a la producción de butirato proveniente del consumo de la dieta de GE de centeno. Destacaron que el butirato tenía un papel esencial como fuente de energía para el mantenimiento de los colonocitos normales y además, se consideraba un agente anticancerígeno, debido a su capacidad para inducir la apoptosis de las células del colon mutadas (Cummings, 1997; McIntyre y col., 1993; Csordas, 1996).

Bird y col. (2008) compararon dietas con alimentos a base de GE de cebada, GE de trigo y trigo refinado; y encontraron una disminución significativa del pH del contenido cecal en los sujetos alimentados con la dieta a base de GE de cebada.

Por otro lado, Weaver y col. (2010) estudiaron la fermentación de diferentes tipos de fibras e indicaron que tanto las FS (inulina, povidex, synergy, fibra soluble de maíz, etc.) como la FI (almidón resistente) fueron fermentables, pero que las FS producían mayor cantidad de AGCC, como acetato y butirato que la FI estudiada, e incluso que ambas proporcionaron mayores cantidades de AGCC que la celulosa, componente de la dieta C.

Estos trabajos mencionados anteriormente confirmarían los resultados que indican que los alimentos a base de GE podrían modificar el pH cecal y ejercer un efecto beneficioso para el huésped.

Tabla IV.25 Ciego vacío, ciego vacío relativo al peso corporal y pH del contenido cecal.

Dietas	Ciego		
	Ciego vacío (g)	vacío relativo al peso corporal (g/100 g peso corporal)	pH Contenido cecal
C	1,09±0,07 ^a	0,37±0,02	7,06±0,06 ^a
I	0,81±0,09 ^b	0,33±0,02	6,40±0,06 ^b
R	1,11±0,06 ^a	0,40±0,04	6,38±0,04 ^b
G	1,18±0,05 ^a	0,40±0,03	6,33±0,07 ^b
<i>p</i>	0,0041	0,2508	<0,0001

Media ± SEM (n=8). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$). Dieta control (C), dieta a base de arroz integral (I), dieta a base de arroz remojado (R) extrudido, dieta a base de arroz germinado extrudido (G).

La **Figura IV.53** muestra los resultados obtenidos de la excreción de **Heces (b.s) y contenido de agua (%)** de las mismas en función del tiempo de experiencia. Se puede observar que las ratas alimentadas con la dieta C tuvieron mayor excreción de heces ($p < 0,0001$) en base seca, que aquellas alimentadas con dietas a base de GE. El menor contenido de heces excretadas por los animales alimentados con dietas de GE estaría relacionado con su mayor contenido de fibra fermentable (fibra soluble), lo que hace que sea degradada por las bacterias del colon y que resulte en una menor masa, en comparación

con la celulosa de la dieta C; y también debido al hecho de que dichos animales tuvieron una ingesta menor.

Por otra parte, como se observó en el **capítulo IV.4**, los ingredientes a base de GE utilizados para las dietas tienen un contenido del 16, 18 y 29 % de FS según sea ARE, AGE y AIE, respectivamente. Siguiendo el razonamiento anterior, se justifica que los animales que consumieron la dieta I excretan la menor masa de heces. Sin embargo, a pesar de tener similar contenido de FS, existen diferencias entre la excreción de los lotes G y R. Esto podría explicarse por un mayor contenido de masa bacteriana en las heces de los animales que consumieron la dieta G (Zarzuelo Zurita y Gálvez Peralta, 2010), aunque esto no ha sido analizado.

Paturi y col. (2014) realizaron una evaluación del tránsito gastrointestinal de la celulosa, inulina y de fibras proveniente de la papa y el maíz, y encontraron que los animales que consumieron una dieta con celulosa, como fibra constituyente de la dieta C, tuvieron mayor excreción de heces que aquellos que consumieron dietas de inulina o fibra, debido a que la celulosa produce una mayor velocidad de tránsito a través del tracto GI.

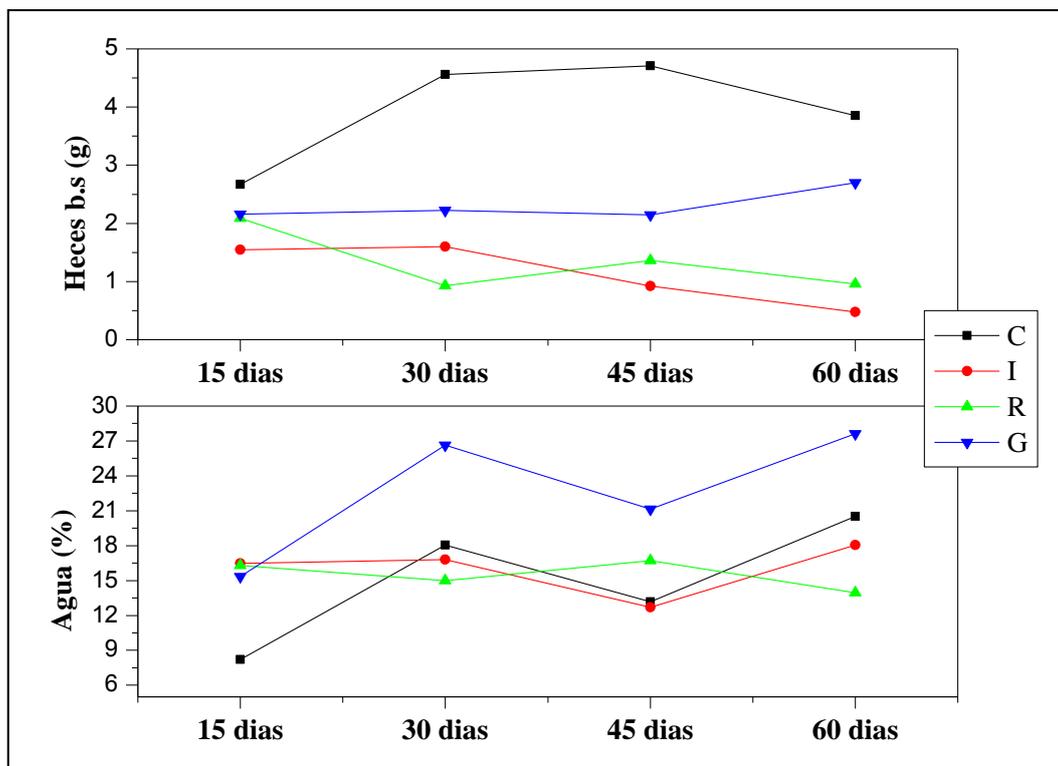


Figura IV.53 Peso heces (b.s) y contenido de agua de las heces (%). Dieta control (C), dieta a base de arroz integral (I), dieta a base de arroz remojado (R) extrudido, dieta a base de arroz germinado extrudido (G).

A su vez, Rahontra y col. (1991) realizaron un estudio en ratas con dietas a base de harinas de tipo GE de diferentes cereales (trigo, avena, centeno y cebada) y encontraron la misma tendencia, siendo la dieta con celulosa la que condujo a una mayor excreción fecal, y las dietas con mayor contenido de FS (avena y cebada), las de menor excreción.

En relación al contenido de agua de las heces, se puede observar en la **Figura IV.53** que el consumo de la dieta G luego de los primeros 15 días condujo a un contenido de agua en las heces significativamente mayor.

El peso total de las heces (b.h), la materia seca y el contenido de agua a los 60 días de dieta se muestra en la **Tabla IV.26**. El peso de las heces de los animales que consumieron las dietas a base de GE fueron significativamente menor que el C, siendo los correspondientes a la dieta G los que tuvieron una mayor excreción en comparación con aquellos de las dietas I y R.

Tabla IV.26 Pesos de heces en base húmeda (b.h) y base seca (b.s) y % Agua de las heces a 60 días.

Dietas	Peso	Peso	% Agua de
	Heces (b.h) (g)	Heces (b.s) (g)	las heces (%)
C	4,88±0,30 ^a	3,85±0,18 ^a	20,52±4,47 ^{ab}
I	0,58±0,06 ^c	0,48±0,05 ^d	14,51±2,08 ^b
R	1,12±0,20 ^c	0,96±0,17 ^c	13,96±0,73 ^b
G	3,63±0,28 ^b	2,70±0,15 ^b	24,40±3,23 ^a
p	<0,0001	<0,0001	0,0165

Media ± SEM (n=8). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras (p<0.05). Dieta control (C), dieta a base de arroz integral (I), dieta a base de arroz remojado (R) extrudido, dieta a base de arroz germinado extrudido (G)

El contenido de fibra de las harinas de grano entero no es el único factor que determina su capacidad de aumento del volumen fecal. Otros factores, tales como tamaño de partícula, la capacidad de retención de agua, la presencia de almidón resistente, y la cantidad de FS, también podrían afectar a la masa fecal (Rahontra y col., 1991; Brownlee, 2011; Raninen y col., 2011).

En relación al volumen fecal, existen evidencias de que una dieta rica en fibra, por lo general genera un mayor volumen fecal y se asocia con una menor incidencia de cáncer

de colon (Brownlee, 2011). Es por esto, que se recomienda preferentemente el consumo de harinas de GE antes que refinados (Rahontra y col, 1991).

IV.5.3 Efecto del consumo de las dietas de grano entero de arroz en el metabolismo del Ca

IV.5.3.1 Absorción aparente de Ca

En la **Figura IV.54** se muestra la ingesta, la excreción y la absorción aparente de Ca. Puede observarse que si bien la ingesta fue diferente entre las dietas ($p < 0,0001$), la excreción también lo fue ($p < 0,0001$), por lo que la absorción aparente de Ca no difirió entre los lotes que consumieron las diferentes dietas ($p 0,2113$).

La absorción de Ca no depende sólo de la concentración del Ca luminal, sino también de la edad. La absorción de Ca en ratas normales, alimentadas con un nivel de Ca recomendado, alcanza su máximo al tiempo de destete y luego comienza a disminuir hasta llegar a los valores más bajos en la madurez (Pansu y col, 1983). En los ensayos realizados, todos los animales tenían similar edad y peso, y las dietas fueron suministradas con la misma proporción de Ca. La mayor ingesta de Ca está relacionada con el mayor consumo de alimentos de algunos lotes, pero el hecho de que la absorción aparente sea la misma, indicaría que el menor pH de las dietas de GE no habría favorecido la absorción del Ca.

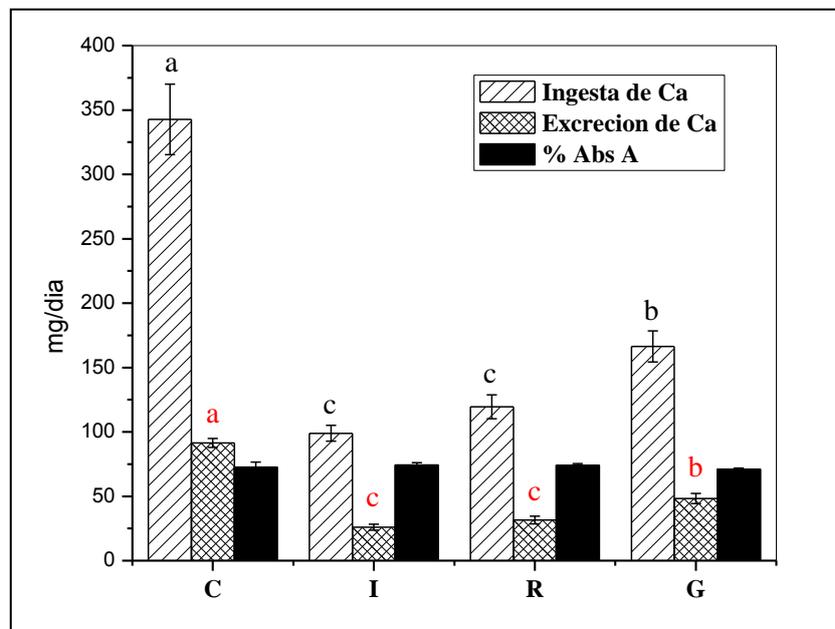


Figura IV.54 Ingesta Diaria de Ca, Excreción fecal diaria de Ca y Absorción aparente de Ca (% Ab_{ap} Ca). Dieta control (C), dieta a base de arroz integral (I), dieta a base de arroz remojado (R) extrudido, dieta a base de arroz germinado extrudido (G)

Numerosos estudios indican que los polisacáridos y oligosacáridos pueden mejorar el estado óseo a través de su influencia en la absorción y retención mineral. Una dieta con FOS (fructooligosacáridos de cadena corta y larga) puede mejorar la absorción de Ca (Coudray y col. 2003) y la inulina-FOS aumenta la retención del Ca (Zafar y col. 2004). Por otro lado, la povidexrosa (FS) puede ser fermentada en el colon y producir AGCC que disminuyen el pH, contribuyendo a un aumento en la absorción y retención del Ca (Dos Santos, y col., 2009; Weisstaub y col., 2013; Albarracín y col., 2014). Sin embargo, en este estudio no fue posible observar una diferencia en la absorción aparente del Ca con las dietas a base de GE con distintos tratamientos.

IV.5.3.2 Contenido y densidad mineral

Las medidas de la absorción pueden evidenciar cambios en el metabolismo del Ca a corto plazo, sin embargo existen medidas de Ca en huesos, densidad de los huesos, y/o resultados histológicos que permiten demostrar el impacto por un período mayor (Weisstaub y col., 2013).

La **Tabla IV.27** muestra los resultados de las densitometrías de los animales al tiempo final de la experiencia (Tf=60 días). Se puede observar que el Contenido Mineral Total (CMT) y el CMT t60 en función del peso corporal, fueron menores en todos los grupos alimentados con las dietas de GE de arroz extrudido en comparación con los animales del grupo C. Considerando las dietas de GE de arroz, los animales que consumieron las dietas I y R presentaron menor CMT y aquellos que consumieron la dieta G, mayor valor. Estas diferencias se minimizaron al expresar los resultados en función del peso corporal total, pero aún así el grupo I tuvo menor CMT t60.

La densidad mineral ósea es un fuerte biomarcador que indica la tendencia a la fractura. Para evaluar la eficacia de los alimentos funcionales que utilizan este método, el período de intervención tiene que ser mucho más largo que para el caso de la evaluación de los parámetros del metabolismo Ca (Weaver y col., 2002). Cuando el CMT se expresa por áreas al Tf=60 días, se obtiene la denominada Densidad Mineral Total (DMT t60). Se observó que la DMT t60 fue menor en los animales alimentados con las dietas R y G, en comparación con las dietas de C e I, las cuales poseen valores similares. Por el contrario, las evaluaciones de la Densidad Mineral en Fémur, Columna y Tibia (F-DM, C-DM y T-DM, respectivamente) fueron menores para todos los lotes que consumieron las dietas de GE en comparación con el C, constituyendo en general, los animales que consumieron la dieta G los que obtuvieron los valores de DM más altos luego de la dieta C.

Tabla IV.27 Contenido mineral total (CMT y CMT t60), Densidad Mineral Total t60 (DMT t60), del Fémur (F-DM t60), Columna (C-DM t60) y Tibia proximal (T-DM t60) (mg/cm^2).

Dietas	CMT (mg)	CMT t60 (mg/g PC)	DMT t60 (mg/cm^2)	F-DM t60 (mg/cm^2)	C-DM t60 (mg/cm^2)	T-DM t60 (mg/cm^2)
C	4051±288 ^a	11,8 ± 0,65 ^a	259,75±2,55 ^a	259,25±11,1 ^a	242,50±6,5 ^a	219,5±8,1 ^a
I	997±95 ^c	4,62 ± 0,23 ^c	252,25±2,63 ^a	188,38±3,9 ^c	187,50±3,3 ^c	176,0±4,6 ^{bc}
R	1282±113 ^c	5,79 ± 0,18 ^b	241,12±2,15 ^b	198,38±4,3 ^c	191,88±1,3 ^c	173,6±3,1 ^c
G	1963±182 ^b	6,11 ± 0,41 ^b	243,50±1,65 ^b	213,63±5,0 ^b	200,71±2,7 ^b	187,7±3,2 ^b
p	<0,0001	<0,0001	0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Media ± SEM (n=8); Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$); PC: peso corporal. Dieta control (C), dieta a base de arroz integral (I), dieta a base de arroz remojado (R) extrudido, dieta a base de arroz germinado extrudido (G)

Estos resultados indican que el consumo de estas dietas de GE de arroz extrudido se tradujo en un deterioro del contenido mineral en relación a la dieta C. En un estudio previo realizado por Albarracín y col. (2014), se demostró que la ingesta de maíz entero extrudido mejoró el CMT y el CMT t60 en función del peso corporal, pero no así la DMT de los animales. En el mismo, los lotes que consumieron la dieta C y la dieta con maíz tuvieron la misma eficiencia de la dieta ($0,26 \pm 0,01$ g peso corporal/g dieta), aunque hubo una mayor ingesta de alimento y de Ca en el caso de la dieta C ($1134,44 \pm 24,92$ vs. $982,58 \pm 28,15$ g/60 días; $365,12 \pm 19,9$ vs. $281,25 \pm 11,7$ mg Ca/día).

En este estudio de dietas a base de arroz entero, los bajos niveles de ingesta se traducen en una baja ingesta de Ca, que independientemente de su tasa de absorción, impacta en la salud ósea negativamente. De estas dietas basadas en arroz, la mejor en este aspecto resultó la dieta G, ya que los animales tuvieron valores de contenido y densidad mineral más cercanos al control, a pesar de que la ingesta de Ca fue menor, por lo que otro factor estaría interviniendo en la retención de este mineral.

IV.5.3.3 Estudio de la composición ósea en el Fémur Derecho

La **Tabla IV.28** muestra los resultados de la composición ósea del fémur derecho de los animales, al final de la experiencia (Tf=60 días). El hueso del fémur es un tejido óseo representativo del resto, debido a que está sujeto a remodelación continua, e incluso

es un parámetro representativo de la fuerza del hueso, asociado con el riesgo a posibles fracturas (Coudray y col., 2001).

El contenido de cenizas fue menor para los fémures de las ratas alimentadas con las dietas a base de GE de arroz en relación al C, siendo los animales alimentados con la dieta G, los que presentaron el mayor contenido de cenizas en fémur.

Al contrario de las cenizas, el contenido orgánico (CO) fue mayor en los animales que consumieron las dietas de GE de arroz respecto a C, siendo mayor para I y R, y luego para G. La relación cenizas/CO de los animales que consumieron las dietas de GE fue en todos los casos menores que en C. Esto indicaría que en estos animales hay una menor deposición mineral en la matriz de colágeno del hueso que en el C.

Por otra parte, para el caso de las dietas I y R, el Ca del fémur fue más alto que para las dietas C y G, y lo contrario resultó para el contenido de P, por lo que estos animales presentaron una mayor relación Ca/P en su fémur.

Tabla IV.28 Composición ósea del fémur derecho. Cenizas, Contenido Orgánico (CO), relación Cenizas/CO, Calcio, Fósforo (P) y relación Ca/P.

Dietas	Cenizas (mg/100g)	CO (mg/100g)	Cenizas/CO (mg/mg)	Ca (mg/100g)	P (mg/100g)	Ca/P
C	55,03±0,55 ^a	44,97±0,5 ^c	1,22±0,03 ^a	21,50±1,6 ^b	12,30±0,1 ^a	1,78±0,2 ^b
I	47,56±0,2 ^c	52,44±0,2 ^a	0,91±0,01 ^c	27,05±1,4 ^a	9,99±0,05 ^d	2,60±0,1 ^a
R	46,80±0,8 ^c	53,20±0,8 ^a	0,88±0,01 ^c	28,94±1,50 ^a	10,49±0,2 ^c	2,57±0,2 ^a
G	49,53±0,3 ^b	50,48±0,3 ^b	0,98±0,01 ^b	22,80±0,50 ^b	11,08±0,1 ^b	2,06±0,01 ^b
p	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0020	<0,0001	0,0006

Media ± SEM (n=8); Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras (p<0,05). Dieta control (C), dieta a base de arroz integral (I), dieta a base de arroz remojado (R) extrudido, dieta a base de arroz germinado extrudido (G).

El Ca y el P constituyen los principales componentes minerales del hueso, ya sea formando cristales de hidroxiapatita con distinto grado de maduración, o como fosfato cálcico amorfo (Arnaud y Sánchez, 1997).

Ambos deben estar disponibles en cantidades suficientes para que la mineralización ósea sea adecuada. La relación Ca/P del hueso en individuos adultos en estado saludable posee un valor aproximado a 2 (Zaichicka y Tzaphlidou, 2002 y 2003). En este estudio, esta

relación fue mayor en las ratas alimentadas con dietas I y R y alcanzó este valor en el caso de la dieta G.

IV.5.4 Efecto del consumo de las dietas de grano entero de arroz en el contenido de IgA y actividad de enzimas cecales

Los resultados del contenido de IgA secretoria presentes en el contenido cecal se muestran en la **Tabla IV.29**. Se observó que no hubo diferencias significativas entre los animales que consumieron las diferentes dietas. Cabe destacar que hasta el momento no existen estudios realizados sobre el efecto del consumo de GE de arroz en el contenido de IgA secretoria cecal.

La IgA secretoria constituye un mecanismo de defensa del epitelio intestinal frente a la continua exposición a microorganismos. Es producida mayoritariamente en forma local e inducida por citoquinas, y constituye uno de los principales mecanismos de defensa en la mucosa intestinal y resiste la intensa actividad proteolítica del lumen intestinal. Su función más importante es evitar la adhesión de antígenos a la superficie del enterocito, mediante la formación de complejos inmunitarios de gran tamaño, que son retenidos en la capa de mucus. De esta manera, neutraliza toxinas, virus y microorganismos (Fagarasan y col., 2010).

TablaIV.29 Contenido de IgA en el contenido cecal

Dietas	IgA ($\mu\text{g/gCC}$)
C	12,65 \pm 5,38
I	5,39 \pm 0,99
R	8,59 \pm 2,70
G	4,55 \pm 1,42
<i>p</i>	0,1953

Media \pm SEM (n=8). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$). Dieta control (C), dieta a base de arroz integral (I), dieta a base de arroz remojado (R) extrudido, dieta a base de arroz germinado extrudido (G).

Por otra parte, la **Figura IV.55** muestra las actividades enzimáticas de β -Glucosidasa y β -Glucuronidasa, en el contenido cecal.

Puede observarse que hubo diferencias significativas en la actividad de la β -Glucosidasa por el consumo de dietas a base de GE. Todas las dietas a base de GE disminuyeron esta actividad enzimática, y en particular la dieta I fue la que presentó una menor actividad enzimática en el contenido cecal. La reducción de la actividad de la glucosidasa en el lumen colónico indicaría una posible protección ofrecida por este tipo de dieta de GE para el organismo. Es posible entonces que la incorporación de este tipo de fibra en la dieta pueda disminuir la activación bacteriana de pro-carcinógenos dietéticos, evitando así la exposición de las células del colon a los mutágenos luminales (Prizont, 1984).

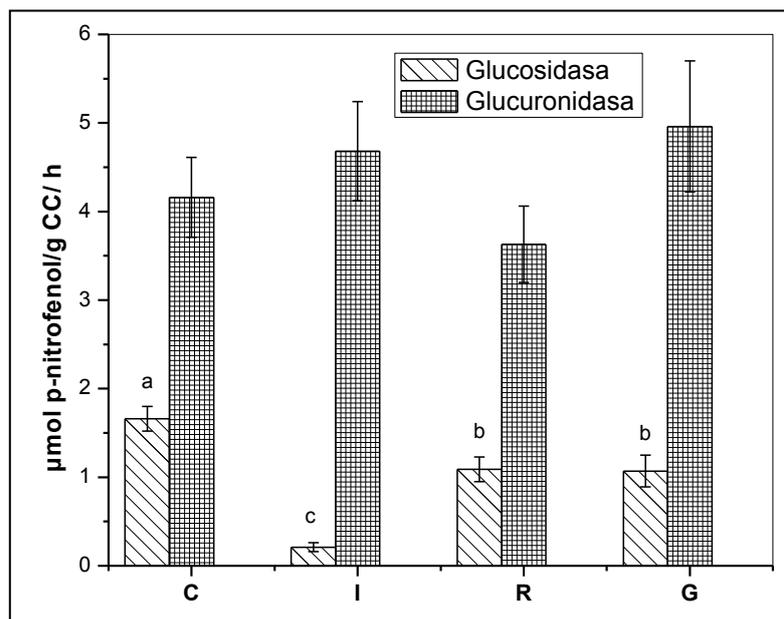


Figura IV.55 Actividad de β -Glucosidasa y β -Glucuronidasa en contenido cecal. Media \pm SEM (n=8). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$). Dieta control (C), dieta a base de arroz integral (I), dieta a base de arroz remojado (R) extrudido, dieta a base de arroz germinado extrudido (G).

IV.5.5 Efecto del consumo de las dietas de grano entero de arroz en el metabolismo lipídico

En la **Tabla IV.30** se observa el contenido de lípidos séricos y hepáticos de los animales que consumieron las diferentes dietas. El consumo de dietas a base de GE disminuyó significativamente el contenido de TG séricos. El menor valor se obtuvo en el caso de los animales que consumieron la dieta G, presentando una disminución del 35%, en relación al valor obtenido en la dieta C. Sin embargo, los resultados en hígado fueron diferentes ya que los animales que consumieron la dieta G mostraron el mayor contenido de TG, a diferencia del C, I y R que no presentaron diferencias significativas entre ellos.

Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en el contenido de colesterol sérico y hepático por el consumo de las diferentes dietas.

Existen referencias del efecto del consumo de dietas a base de GE sobre el estado lipídico de animales de experimentación. Adam y col. (2001 y 2003) observaron que el consumo de dietas a base de GE de trigo disminuyó en todos los casos, el contenido de TG del suero y en algunos casos, el contenido del tejido hepático. Por otra parte, Fardet y col. (2007) no encontraron diferencias significativas cuando estudiaron dietas a base de harina de trigo entera y refinada.

En el estudio previo, realizado a base de una dieta de maíz entero extrudido (Albarracín y col., 2014), se observó que el consumo disminuyó significativamente el contenido de TG hepáticos (aproximadamente 26%).

Tabla IV.30 Contenido de Triglicéridos (TG), colesterol y malondialdehído (MDA) en suero e hígado.

Dietas	SUERO			HIGADO		
	TG (g/L)	Colesterol (g/L)	MDA (nmol/g proteína)	TG (μ mol/g tejido)	Colesterol (mg/g tejido)	MDA (nmol/ 100 g proteína)
C	0,84 \pm 0,03 ^a	0,45 \pm 0,04	47,27 \pm 2,2	14,79 \pm 0,84 ^{ab}	4,61 \pm 0,16	23,11 \pm 0,95 ^a
I	0,46 \pm 0,08 ^b	0,42 \pm 0,03	52,54 \pm 3,1	14,42 \pm 1,13 ^b	5,09 \pm 0,26	14,51 \pm 1,76 ^c
R	0,50 \pm 0,08 ^b	0,51 \pm 0,03	54,36 \pm 3,4	13,04 \pm 1,50 ^b	4,29 \pm 0,17	17,72 \pm 1,07 ^b
G	0,32 \pm 0,08 ^b	0,43 \pm 0,03	50,33 \pm 3,3	17,74 \pm 0,80 ^a	4,73 \pm 0,23	13,66 \pm 0,62 ^c
p	0,0013	0,2456	0,5381	0,0400	0,0732	<0,0001

Media \pm SEM (n=8). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras (p<0,05). Dieta control (C), dieta a base de arroz integral (I), dieta a base de arroz remojado (R) extrudido, dieta a base de arroz germinado extrudido (G).

En cuanto al contenido de MDA sérico, no se observaron diferencias significativas entre los animales que consumieron las diferentes dietas. Sin embargo, las dietas a base de GE promovieron un menor contenido de MDA en el hígado en todos los casos, siendo las

dietas de G e I las que tuvieron mayor efecto en la disminución de este marcador de estrés oxidativo.

Albarracín y col. (2014) observaron un menor contenido de MDA hepático en ratas alimentadas con una dieta de maíz entero extrudido. Asimismo, existen estudios que establecieron que el consumo de diferentes variedades de cereales, particularmente aquellos ricos en antocianinas, como el arroz negro o rojo, tienen efecto sobre algunos marcadores del estrés oxidativo (Xia y col., 2003). Además, Jang y col. (2001), en un estudio clínico encontraron que la ingesta de una dieta a base de grano entero, durante 16 semanas en sujetos con enfermedad coronaria, redujo significativamente los marcadores de estrés oxidativo: MDA en plasma y 8-isopropano en orina.

Por el contrario, Sing-Chung y col. (2011) encontraron que el consumo de arroz integral, salvado de arroz o arroz pulido cocidos no tuvo efecto significativo en el contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en plasma e hígado de animales (Ratas F344) en los cuales se indujo la carcinogénesis mediante el uso de 1,2-dimetilhidrazina.

IV.5.6 Efecto del consumo de las dietas de grano entero de arroz en marcadores y enzimas del estrés oxidativo

En relación a los marcadores del estado oxidativo, la **Tabla IV.31** presenta los resultados obtenidos para los animales alimentados con las diferentes dietas.

Tabla IV.31 Actividad de las enzimas Catalasa, Glutathion Reductasa (GR) y Peroxidasa (GPx), glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) y relación GSH/GSSG en hígado.

Dietas	Catalasa	GR	GPx	GSH	GSSG	GSH/GSSG
	($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}$)	($\text{nmol NADPH}/\text{min}/\text{mg prot}$)	($\text{nmol NADPH}/\text{min}/\text{mg prot}$)	($\mu\text{g}/\text{g tejido}$)	($\mu\text{g}/\text{g tejido}$)	
C	9,02 \pm 0,29 ^a	29,00 \pm 1,40 ^b	452,33 \pm 29,92 ^a	153,77 \pm 16,09	1140,11 \pm 125,12 ^a	0,18 \pm 0,03 ^b
I	9,63 \pm 0,30 ^a	29,20 \pm 1,13 ^b	390,19 \pm 12,69 ^b	122,29 \pm 11,27	544,58 \pm 60,99 ^c	0,24 \pm 0,02 ^a
R	7,33 \pm 0,20 ^b	26,93 \pm 1,70 ^b	427,11 \pm 18,77 ^{ab}	128,49 \pm 12,61	853,78 \pm 67,83 ^{ab}	0,15 \pm 0,02 ^b
G	6,48 \pm 0,20 ^c	36,11 \pm 2,28 ^a	468,31 \pm 18,10 ^a	131,27 \pm 15,88	607,04 \pm 119,93 ^{bc}	0,24 \pm 0,02 ^a
p	<0,0001	0,0075	0,0322	0,4336	0,0053	0,0490

Media \pm SEM (n=8). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras (p<0,05). Dieta control (C), dieta a base de arroz integral (I), dieta a base de arroz remojado (R) extrudido, dieta a base de arroz germinado extrudido (G).

Los sistemas antioxidantes se encuentran relacionados entre sí, tal como se indicó en la introducción. Mientras que el sistema antioxidante conformado por la superóxido dismutasa y catalasa (SOD/CAT) actúa en altas concentraciones de H_2O_2 , el sistema glutatión Peroxidasa y glutatión Reductasa (GPx/GR) lo hace a bajas concentraciones (Prego Cisneros, 1995).

Los animales que consumieron la dieta I presentaron igual actividad de CAT y de GR, e igual contenido de GSH en relación a la dieta C. Además, presentaron baja actividad de GPx y bajo contenido de GSSG. Este menor contenido de GSSG podría deberse a una menor actividad de la enzima GPx. Luego, la relación GSH/GSSG aumentada indicaría un mayor estado reductor que los animales que consumieron la dieta C, lo que se traduce en un menor nivel de MDA hepático. Teniendo en cuenta estos resultados en los animales alimentados con la dieta I, la degradación del H_2O_2 sería vía CAT al igual que en el C.

En cuanto a los animales que consumieron la dieta R, presentaron igual actividad de las enzimas GR y GPx hepáticas, en relación a los de la dieta C. Además, el contenido de GSH y GSSG fue igual, y por lo tanto la relación GSH/GSSG similar a la relación encontrada para la dieta C. Los menores niveles de actividad de CAT indican que se estaría produciendo menor H_2O_2 lo cual podría ser confirmado por el menor contenido de MDA hepático.

Por último, los animales alimentados con la dieta G presentaron igual actividad de GPx e igual contenido de GSH en relación a los animales de la dieta C. El menor contenido de GSSG en relación a la dieta C, se traduciría en una mayor relación GSH/GSSG, lo que indicaría que esta dieta provoca un mayor estado reductor. Los menores niveles de actividad de CAT y la mayor actividad de GR serían indicativos de que se estaría produciendo menor H_2O_2 , y que la vía utilizada para degradarlo sería el sistema antioxidante conformado por GPx/GR. Esto sería confirmado por el menor contenido de MDA hepático de los animales que consumieron la dieta G.

Dado que la GR permite mantener concentraciones de GSH en la célula, no sólo para ser utilizado por la GPx en la eliminación del H_2O_2 , sino que además, el GSH es de utilidad en la recuperación de las vitaminas C y E luego de participar en la eliminación de radicales libres generados *in situ* o a distancia (Prego Cisneros, 1995); se podría sugerir que el consumo de la dieta G fue la más beneficiosa desde el punto de vista del estado oxidativo, dado que presentó los mayores niveles de GR y el mayor valor de la relación GSH/GSSG.

IV.5.7 Conclusiones parciales

- Los indicadores del crecimiento de los animales resultaron menores que el C, para el caso de los animales alimentados con las dietas I y R, lo que se tradujo en una menor ganancia de peso y menor eficiencia de estas dietas.
- En relación a los parámetros relacionados con el ciego de los animales, los resultados indicaron que no hubo cambios en el tamaño del ciego, pero que las dietas a base de GE de arroz ejercieron un cambio en el pH cecal hacia valores más bajos, lo cual fue atribuido a la fermentación de la fibra de los GE, y a la producción de AGCC.
- Se encontró un menor contenido de heces excretadas por los animales alimentados con GE, lo cual estaría relacionado con su mayor contenido de fibra fermentable (FS), ya que es degradada por las bacterias del colon y resulta menor su masa, en comparación con la celulosa de la dieta C. Además, dichos animales tuvieron una ingesta menor.
- Los bajos niveles de ingesta encontrados para las dietas a base de arroz entero se tradujeron en una baja ingesta de Ca, que independientemente de su tasa de absorción, impactó en la salud ósea negativamente. De la comparación entre las dietas de GE, la dieta G resultó la mejor, ya que los animales tuvieron valores de contenido y densidad mineral más cercanos al control.
- En relación al contenido de IgA secretoria cecal no se encontraron diferencias significativas entre los lotes que consumieron las diferentes dietas.
- Todas las dietas a base de GE disminuyeron la actividad enzimática de la β -Glucosidasa, y en particular la dieta I fue la que presentó una menor actividad enzimática en el contenido cecal.
- El consumo de dietas a base de GE disminuyó significativamente el contenido de TG séricos, pero no se observaron diferencias significativas en el contenido de colesterol sérico y hepático por el consumo de las diferentes dietas.
- Las dietas a base de GE promovieron un menor contenido de MDA en el hígado en todos los casos, siendo las dietas de G e I las que tuvieron mayor efecto en la disminución de este marcador de estrés oxidativo.
- En relación al estado oxidativo, el consumo de la dieta G fue la más beneficiosa, dado que presentó los mayores niveles de GR y el mayor valor de la relación GSH/GSSG.

V. CONCLUSIONES

El remojo ácido del arroz integral a 45°C-48 h permitió una remoción aproximada del 90% del AF del grano. Esta reducción se debió principalmente a dos fenómenos diferentes, la activación de las fitasas endógenas del cereal, y la lixiviación del AF en el agua de remojo, facilitadas por el medio ácido. La condición seleccionada como óptima (35°C-24h) permitió una remoción aproximada del 88% del AF del grano, con pérdidas del 33,2% de proteínas y 11,8% de sólidos. A pesar de que se vieron mejoradas la digestibilidad proteica y la bioaccesibilidad mineral, el proceso de remojo del arroz integral produjo pérdidas significativas de minerales y proteínas. Por lo tanto, no se sugiere como un proceso útil para reducir el contenido de AF del arroz integral, si se tiene como objetivo la producción de un alimento o ingrediente sin fortificar. Sin embargo, este remojo podría ser útil en la producción de un ingrediente amiláceo con bajo contenido de AF, para utilizarse en preparados alimenticios con bajo contenido de inhibidores de la absorción de minerales, por ejemplo en productos destinados a personas celíacas con necesidades nutricionales especiales.

Cuando se evaluaron las mismas condiciones experimentales en arroz cáscara, las pérdidas de AF se encontraron en un rango de 23,73-54,64 %, y en este caso, las pérdidas de proteínas y sólidos fueron significativamente menores que las producidas por el remojo de granos de arroz integral. Las condiciones de remojo de arroz cáscara seleccionadas fueron 45°C-24h. Luego, la evaluación de los parámetros físico-químicos de las muestras extrudidas de arroz cáscara previamente remojado, mostraron que se logró un mayor GC cuando se realizó este tratamiento, previo al proceso de extrusión, en comparación con la extrusión de arroz integral sin tratamiento. Teniendo en cuenta los resultados de las evaluaciones fisicoquímicas y sensoriales, se seleccionaron las condiciones de 160 °C-16,5 %H como las más adecuadas para la obtención de un producto de arroz de grano entero remojado.

Al realizar los dos procesos a escala piloto, se obtuvo una reducción del contenido de AF de alrededor del 50% por el remojo y 77% por el tratamiento combinado de remojo-extrusión. El proceso de remojo previo a la extrusión no produjo cambios en la digestibilidad de proteínas, pero la combinación de los procesos de remojo-extrusión la disminuyó. En cuanto a la bioaccesibilidad del Fe y Zn, la misma se mejoró de manera significativa por el proceso de remojo del arroz cáscara, probablemente debido a la degradación del AF. Por el contrario, la combinación de los procesos de remojo-extrusión disminuyó la bioaccesibilidad en relación a la muestra remojada. Sin embargo, los productos obtenidos por remojo-extrusión tuvieron una mayor bio-accesibilidad de Fe y Zn

que el arroz cáscara. Podemos concluir, que el proceso de remojo-extrusión de arroz cáscara podría ser útil para la producción de snacks o ingredientes amiláceos (harinas precocidas) con bajo contenido de AF.

Posteriormente, cuando se estudió la germinación, la misma logró importantes mejoras en los productos, reduciendo el contenido de AF, mejorando la digestibilidad proteica, y aumentando el contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante. El estudio del proceso de extrusión de este producto germinado en diferentes condiciones de humedad y temperatura indicó que la germinación produjo cambios en los granos de arroz que se traducen en un menor gasto energético al realizar su cocción por extrusión, alcanzándose un mayor GC de los productos, que el que se alcanza con el arroz integral. En este estudio, se seleccionó las condiciones de 175 °C de temperatura y 14 % de humedad, como las más adecuadas para extrudir la harina de arroz germinado, teniendo en cuenta los resultados de las propiedades físico-químicas y nutricionales, y la evaluación sensorial. Esto permitió obtener un producto germinado-extrudido con una reducción del 50% del contenido de AF y un aumento del contenido de PF Totales y de la capacidad antioxidante.

Se demostró que la cocción por extrusión del arroz germinado constituye un buen método de procesamiento para obtener un nuevo ingrediente libre de gluten que permitirá mejorar el consumo de alimentos a base de grano entero.

Se obtuvieron diferentes tipos de harinas mediante los procesos tecnológicos de remojo, germinación y extrusión a escala piloto. En estos productos de grano entero de arroz se logró disminuir en forma significativa el contenido de AF, principalmente con los tratamientos de remojo (AR), remojo-extrusión (ARE) y germinación-extrusión (AGE). Incluso, la capacidad antioxidante fue mayor en los productos obtenidos, que en las materias primas. El contenido de polifenoles aumentó de forma significativa en el producto germinado, en comparación con los demás productos obtenidos.

En relación a las propiedades de hidratación, la AA y la S de los productos aumentó principalmente por el efecto del proceso de extrusión. Las muestras extrudidas perdieron prácticamente toda la cristalinidad por el proceso de cocción, a excepción del AIE que conservó el 16 % de la estructura cristalina del almidón. En cuanto a la interacción con el agua de las harinas, las muestras extrudidas reflejaron cambios que las hacen más higroscópicas que las no extrudidas, pero estos cambios no se vieron reflejados en las Tg medidas por DSC para el rango estudiado.

Los ensayos *in vivo* en animales de experimentación que evaluaron la influencia del consumo de dietas a base de GE, indicaron que los parámetros del crecimiento de los animales resultaron menores que el C, para el caso de los animales alimentados con las dietas I y R, lo que se tradujo en una menor ganancia de peso y menor eficiencia de estas dietas. En relación a los parámetros relacionados con el ciego de los animales, los resultados indicaron que no hubo cambios en el tamaño del ciego, pero que las dietas a base de GE de arroz ejercieron un cambio en el pH cecal hacia valores más bajos, lo cual fue atribuido a la fermentación de la fibra de los GE, y a la producción de AGCC. Además se encontró un menor contenido de heces excretadas por los animales alimentados con GE, lo cual estaría relacionado con su mayor contenido de fibra fermentable (FS), ya que es degradada por las bacterias del colon y resulta menor su masa, en comparación con la celulosa de la dieta C. Además, dichos animales tuvieron una ingesta menor

En relación al Ca, los bajos niveles de ingesta encontrados para las dietas a base de arroz entero se tradujeron en una baja ingesta de Ca, que independientemente de su tasa de absorción, impactó en la salud ósea en forma negativa. De la comparación entre las dietas de GE, la dieta G resultó la mejor, ya que los animales tuvieron valores de contenido y densidad mineral más cercanos al control.

Por otra parte, todas las dietas a base de GE disminuyeron la actividad enzimática de la β -Glucosidasa, y en particular la dieta I fue la que presentó una menor actividad enzimática en el contenido cecal.

A nivel lipídico, el consumo de dietas a base de GE disminuyó significativamente el contenido de TG séricos, pero no se observaron diferencias significativas en el contenido de colesterol sérico y hepático por el consumo de las diferentes dietas. Y en relación al estado oxidativo promovieron un menor contenido de MDA en el hígado en todos los casos, siendo las dietas de G e I las que tuvieron mayor efecto en la disminución de este marcador de estrés oxidativo. Asimismo, el consumo de la dieta G fue la más beneficiosa, dado que presentó los mayores niveles de GR y el mayor valor de la relación GSH/GSSG.

Podemos concluir que estos tratamientos podrían ser utilizados a nivel industrial por ser simples, de bajo costo y eficientes para lograr cambios deseables en la composición de cereales. Las harinas de arroz de tipo GE podrían ser utilizadas en la producción de expandidos, o como harinas pre-cocidas para el desarrollo de alimentos a base de GE. Asimismo, el consumo de este tipo de alimentos a base de GE de arroz, confirmó un efecto protector a nivel colónico, lipídico y del estado oxidativo, mediado por la acción combinada y sinérgica de los diferentes compuestos encontrados en éstos.

VI. BIBLIOGRAFÍA

AACC Dietary Fiber Technical Committee (2001). *The definition of dietary fiber*. Cereal Food World 46, 112-126.

Adam A., Levrat-Verny M. A., Lopez H. W., Leuillet M., Demigne C., Remesy C. (2001). *Whole Wheat and Triticale Flours with Differing Viscosities Stimulate Cecal Fermentations and Lower Plasma and Hepatic Lipids in Rats*. J. Nutrition 131, 1770–1776.

Adam A., Lopez H. W., Leuillet M., Demigne C., Remesy C. (2003). *Whole wheat flour exerts cholesterol-lowering in rats in its native form and after use in bread-making*. Food Chemistry 80, 337–344.

Adom K. K., Liu R. H. (2002). *Antioxidant Activity of Grains*. J. of Agric. Food Chem. 50, 6182-6187.

Adom K. K., Sorrells M. A., Liu R. H. (2005). *Phytochemicals and Antioxidant Activity of Milled Fractions of Different Wheat Varieties*. J. Agric. Food Chem. 53, 2297-2306.

Aebi H. (1984). *Catalase in vitro*. Methods Enzymology 105, 1, 121-126.

Aguilar-Garcia C., Gavino G., Baragano-Mosqueda M., Hevia P., Gavino V.C. (2007). *Correlation of tocopherol, tocotrienol, γ -oryzanol and total polyphenol content in rice bran with different antioxidant capacity assays*. Food Chem. 102, 1228-1232.

Albarracín M., González R. J., Drago, S. R. (2013). *Effect of soaking process on nutrient bio-accessibility and phytic acid content of brown rice cultivar*. LWT-Food Sci. Tech. 53, 76-80.

Albarracín M., Weisstaub A., Zuleta A., Mandalunis P., González R. J., Drago S. R. (2014). *Effects of extruded whole maize, polydextrose and cellulose as sources of fibre on calcium bioavailability and metabolic parameters of growing Wistar rats*. Food & Function 5, 804.

Altan A., McCarthy K. L., Maskan, M. (2009). *Effect of extrusion process on antioxidant activity, total phenolics and β -glucan content of extrudates developed from barley-fruit and vegetable by-products*. Int. J. Food Sci. Tech. 44, 1263–1271.

Anderson P. A. (1985) *Interactions between proteins and constituents that affect protein quality*. En: Digestibility and Aminoacids Availability in Cereals and Oilseeds. J.W. Finley and D.T. Hopkins (Eds.). Am. Assoc. Cereal Chem., St. Paul. p.p 31.

- Anderson J. W. (2003). *Whole grains protect against atherosclerotic cardiovascular disease*. Proceedings of the Nutrition Society 62, 135–142.
- Anderson R. A., Conway H. F., Pfeiffer V. F., Griffin E. L. (1969). *Gelatinization of corn grits by roll and extrusion-cooking*. Rev. Agrop. y Tec. de Alim. 26, 4, 552-564.
- Andrade R. P., Lemus R. M, Pérez C. E. (2011). *Models of sorption isotherms for food: uses and limitations*. Vitae, revista de la facultad de química farmacéutica, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia 18, 3, 325-334.
- A.O.A.C. (1993). *Methods of Analysis for Nutrition Labelling*. Association of Official Analytical Chemists. Ed. Sullivan DM, Carpenter DE. cap 26.
- A.O.A.C. (1995). *Official Methods of Analysis*, (16th ed.), Horowitz, Washington DC, USA.
- A.O.A.C. (2000). *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemist. 17th edition. Vol. I y II. Published by the Association of Official Analytical Chemist, Inc. Gaithersburg, Maryland, USA.
- Araújo E. M., Menezes H. C. (2005). *Composição centesimal, lisina disponível e digestibilidade in vitro de proteínas de fórmulas para nutrição oral ou enteral*. Ciênc. Tecnol. Aliment. 25, 4, 768-771.
- Arnaud C. D., Sánchez S. D. (1997) *Calcio y Fósforo*. En: *Conocimientos actuales de nutrición*. 7ª Ed., cap 24, pag. 260 Ed. Ziegler EE y Filer LJ, Washington DC.
- Asada K., Tanaka K., Kasai Z. (1969). *Formation of phytic acid in cereal grins*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 165, 801-814.
- Asp N. G., Björck I. (1989). *Nutritional properties of extruded foods*. En: *Extrusion cooking*. Eds.: Mercier C., Linko P., Harper J.M. Cap. 14. St. Paul, Minnesota, USA.
- Banchuen J., Thammarutwasik P., Ooraikul B., Wuttijumnong P., Sirivongpaisal P. (2009). *Effect of Germinating Processes on Bioactive Component of Sangyod Muang Phatthalung Rice*. Thai Journal of Agricultural Science 42, 4, 191-199.
- Benito P., Miller D. D. (1998). *Iron Absorption and bioavailability: and updated review*. Nutr Res. 18, 3, 581-603.

Bhise V., Chavan J., Kadam S. (1988). *Effects of malting on proximate composition and in vitro protein and starch digestibilities of grain sorghum*. Journal of Food Science and Technology 25, 6, 327-329.

Bird A. R., Vuaran M. S., King R. A., Noakes M., Keogh J., Morell M. K., Topping D. L. (2008). *Wholegrain foods made from a novel high-amylose barley variety (Himalaya 292) improve indices of bowel health in human subjects*. Br. J. Nutr. 99, 1032–1040.

Bjork I., Asp N. G. (1983). *The effect of extrusion cooking on nutritional value—A literature review*. Journal of Food Engineering 2, 281–308.

Bjorck I., Ostman E., Kristensen M., Mateo A. N., Price R. K., Haenen G., Havenaar R., Bach Knudsen E., Frid A., Mykkanen H., Welch R. W., Riccardi G. (2012). *Cereal grains for nutrition and health benefits: Overview of results from in vitro, animal and human studies in the HEALTHGRAIN project*. Trends in Food Science & Technology 25, 87-100.

Bloem M. W. (1995). *Interdependence of vitamin A and iron: an important association for programmes of anaemia control*. Proc. Nutr. Soc. 54, 2, 501-8.

Booth V. H. (1971). *Problems in the determination of FDNB-available lysine*. J. Sci. Food Agric. 22, 2, 658-666.

Brady L. J., Gallagher D. D., Busta F. (2000). *The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer*. J Nutr. 130, 410–4.

Brennan C., Brennan M. A., Derbyshire E., Tiwari B. K. (2011). *Effect of extrusion on the polyphenols, vitamins and antioxidant activity of foods*. Trend in Food Science & Technology 22, 570-575.

Brownlee I. A. (1989). *The physiological roles of dietary fibre*. Food Hydrocolloids 25, 238–250.

Brunauer S., Emmett P. F., Teller E. (1938). *The absorption of gases in multimolecular layers*. Journal of the American Chemical Society 60, 309.

Brunauer S., Deming L. S., Deming W. E., Teller E. (1940). *On a theory of the van de Waals adsorption of gases*. Journal of American Chemistry Society 62, 1723-1732.

Brune M., Rossander L., Hallberg L. (1989). *Iron absorption and phenolic compounds: importance of different phenolic structures*. Eur. J. Clin. Nutr. 43, 547–58.

Brune M., Rossander-Hulten L., Hallberg L., Glerup A., Sandberg A. S. (1992). *Iron Absorption from Bread in Humans: Inhibiting Effects of Cereal Fiber, Phytate and Inositol Phosphates with Different Numbers of Phosphate Groups*. J. Nutr. 122, 442-449.

Buege J. A., Aust S. D. (1978). *Microsomal lipid peroxidation*. Methods Enzymol. 52, 302-310.

Burlando B., Cornara L. (2014) *Therapeutic properties of rice constituents and derivatives (Oryza Sativa L.): A review update*. Trends in Food Science & Technology, 40, 1, 82-89.

Butsat S., Siriamornpun S. (2010). *Antioxidant capacities and phenolic compounds of the husk, bran and endosperm of Thai rice*. Food Chemistry 119, 606–613.

CAA. Código Alimentario Argentino (CAA). www.msal.gov.ar.

Caballero M. S., González R. J., Costa S. C., Sabbag N., Drago S. R. (2012). *Expandidos maíz: soja adicionados con hemoglobina como fuente de hierro. Evaluación de sus características fisicoquímicas, nutricionales y de su estabilidad sensorial en el tiempo*. Ed. Académica Española. LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH&Co.KG Saarbrücken, Alemania.

Cáceres P. J., Martínez-Villaluenga C., Amigo L., Frias J. (2014). *Maximising the phytochemical content and antioxidant activity of Ecuadorian brown rice sprouts through optimal germination conditions*. Food Chemistry 152, 407–414.

Cagampang G. B., Cruz L. J., Espiritu S. G., Santiag R. G., Juliano B. O. (1966). *Studies on the extraction and composition of rice protein*. Cereal Chem. 43, 145- 155.

Camire M. E., Camire A., Krumhar K. (1990). *Chemical and nutritional changes in foods during extrusion*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 29, 1, 35-57.

Carnovale E., Lugaro E., Lombardi-Boccia G. (1988). *Phytic acid in faba bean and pea: effect on protein availability*. Cereal Chem. 65, 114-17.

Carpenter K. J. (1960). *The estimation of available lysine in animal protein foods*. Biochem J. 77, 3, 604-610.

Cayuela M. M. (2010). *Estrés oxidativo y mecanismos de defensa antioxidante*. En: Tratado de Nutrición, Tomo I. Bases fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición (Ed: Gil, A.) 2º Ed. Madrid, España, p. 457.

Chandrasekara A., Naczek M., Shahidi F. (2012). *Effect of processing on the antioxidant activity of millet grains*. Food Chem. 133, 1, 1-9.

Chanlat N., Songsermpong S., Charunuch C., Naivikul O. (2011). *Twin-Screw Extrusion of Pre-Germinated Brown Rice: Physicochemical Properties and γ -Aminobutyric Acid Content (GABA) of Extruded Snacks*. International J. of Food Engineering 7, 4, 18.

Cheftel J. C. (1986). *Nutritional Effects of Extrusion-Cooking*. Food Chem. 20, 263-283.

Cheryan M. (1980). *Phytic acid interactions in food systems*. C.R.C. Crit Rev Food Sci Nutr. 13, 297-35.

Choi Y., Jeong H. S., Lee J. (2007). *Antioxidant activity of methanolic extracts from some grains consumed in Korea*. Food Chemistry 103, 130–138.

Cian R. E., Caballero M. S., Sabbag N., González R. J., Drago S. R. (2014). *Bioaccessibility of bioactive compounds (ACE inhibitors and antioxidants) from extruded maize products added with a red seaweed *Porphyra columbina**. LWT - Food Science and Technology 55, 51-58.

Closa S. J. (2002). *Lípidos*. En: *Energía y macronutrientes en la nutrición del siglo XXI*. M. L. Martín de Portela, La Prensa Médica Argentina (Eds.).

Colonna P., Buleon A., Mercier C. (1987). *Physically modified starches* En: *Clinical Reports on Applied Chemistry, volume 13, Starch: Properties and Potential*. T. Galliard (Ed.). Society of Chemical Industry by John Wiley & Sons.

Colonna P., Tayeb J., Mercier C. (1989). *Extrusion cooking of starch and starchy products*. En: *Extrusion Cooking*. C. Mercier, P. Linko and J.M. Harper (Eds.) pp. 247–319, Am. Assoc. Cereal Chem., St. Paul, MN.

Cook J.D. (1983). *Determinants of non-heme iron absorption in man*. Food Tech. 37, 10, 124-126.

Cosgrove D. J. (1966). *Chemistry and biochemistry of inositol polyphosphates*. Review in Pure Applied Chemistry 16, 209–224.

Coudray C., Levrat-Verny M. A., Tressol J. C., Feillet-Coudray C., Horcajada-Molteni N. M., Demign C., Rayssiguier Y., Rémésy C. (2001) *Mineral supplementation of*

white wheat flour is necessary to maintain adequate mineral status and bone characteristics in rats. Trace Elem. Med. Biol. 15, 131-137.

Coudray C., Tressol J. C., Gueux E., Rayssiguier Y. (2003) *Effects of inulin-type fructans of different chain length and type of branching on intestinal absorption and balance of calcium and magnesium in rats.* European Journal of Nutrition 42, 2, 91–98.

Coxam V., Horcajada M. N. (2004). *Prevention nutritionnelle de l'osteoporose.* Cachon (France): EM Inter, Lavoisier editions.

Csordas A. (1996). *Butyrate, aspirin and colorectal cancer.* Eur J Cancer Prev 5, 221–31.

Cumming J. H., Branch W. J. (1986). *Fermentation and the production of short-chain fatty acids in the human intestine.* En: Dietary fiber: Basic and clinical aspects. Vahouny, G. V., Kritchevsky, D. (Eds.) pp., 131-152. New York: Plenum.

Cummings J. H., Macfarlane G. T. (1991). *The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon.* Journal of Applied Bacteriology 70, 443-459.

Cummings J. H. (1997). *The large intestine in nutrition and disease.* Brussels, Belgium: Institut Danone.

Cummings J. H., Macfarlane G. T. (2002). *Gastrointestinal effects of prebiotics.* British J of Nutrition 87, 2, 145-151.

Delargy H. J., O'Sullivan K. R., Fletcher R. J., Blundell J. E. (1997). *Effects of amount and type of dietary fibre (soluble and insoluble) on short-term control of appetite.* Int. J. Food Sci. Nutr. 48, 67-77.

Davidson V. J. (1992). *The rheology of starch-based material in extrusion process.* En: Food extrusion science and technology. J. L. Kokini, C. Ho., M.V Karwe (Eds.). pp 263-275. New York: Marcel Dekker.

Della Valle G., Quillien L., Gueguen J. (1994). *Relationships between processing conditions and starch and protein modifications during extrusion-cooking of pea flour.* Journal of the Science of Food and Agriculture 64, 509–517.

Derringer G.C., Suich R. (1980). *Simultaneous optimization of several response variables.* J. Quality Technol. 12, 10, 214-219.

Deshpande S. S., Damodaran S. (1989). *Effect of phytate on solubility, activity and conformation of trypsin and chymotrypsin.* J Food Sci. 54, 695-99.

Dewanto V., Wu X., Liu R. H. (2002) *Processed sweet corn has higher antioxidant activity*. J. Agric. Food Chemistry 50, 4959-4964.

Dietary Guidelines Advisory Committee. Report of the Dietary Guidelines Advisory Committee on the Dietary Guidelines for Americans (2010). USDA Center for Nutrition Policy and Promotion, Alexandria, VA.

Dikeman C. L., Fahey G. C. J. (2006). *Viscosity as related to dietary fiber: A review*. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 46, 649-663.

Ding Q., Ainsworth P., Tucker G., Marson H. (2005). *The effect of extrusion conditions on the physicochemical properties and sensory characteristics of rice-based expanded snacks*. Journal of Food Engineering 66, 283–289.

Dlamini N. R., Taylor J. R. N., Rooney L.W. (2007). *The effect of sorghum type and processing on the antioxidant properties of African sorghum-based foods*. Food Chemistry 105, 1412–1419.

Donkor O. N., Stojanovska L., Ginn P., Ashton J., Vasiljevic T. (2012). *Germinated grains – Sources of bioactive compounds*. Food Chemistry 135, 950–959.

Donovan S. M., Lönnerdal B. (1989) *Non-protein nitrogen and true protein in infant formulas*. Acta Paediatr. Scand. 78, 4, 497-504.

Doria J. (2010). *Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento*. Cultivos Tropicales 31, 1, 74-85.

Dos Santos E. F., Tsuboi K. H., Araujo M. R., Ouwehand A. C., Andreollo N. A., Miyasaka C. K. (2009). *Dietary polydextrose increases calcium absorption in normal rats*. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva 22, 4, 201–205.

Drago S. R., Binaghi M. J., Valencia M. E. (2005). *Effect of gastric digestion pH on iron, zinc and calcium availability from preterm and term starting infant formulas*. Journal of Food Science 70, 107-112.

Drago S., Zuleta A., De Greef M., Torres R., González R., Chel Guerrero L., Betancur Ancona D. (2010). *Disponibilidad de minerales de extrudidos elaborados con granos enteros de maíz y/o leguminosa (Phaseolus vulgaris)*. Utilización de recursos naturales tropicales para el desarrollo de alimentos. D. Betancur Ancona, L. Chel Guerrero, AF. Castellanos Ruelas. Ediciones de la Univ. Aut. De Yucatán. Mérida, Yucatán, México. Cap. 16, pp. 208-223.

Egli I., Davidsson L., Jullierat M. A., Barclay D., Hurrell R. F. (2002). *The Influence of Soaking and Germination on the Phytase Activity and Phytic Acid Content of Grains and Seeds Potentially Useful for Complementary Feeding*. Journal of Food Science 67, 9.

Egli I., Davidsson L., Juillerat M. A., Barclay D., Hurrell R. (2003). *Phytic acid degradation in complementary foods using phytase naturally occurring in whole grain Cereals*. Journal of Food Science 68, 1855-1859.

Ellis R., Morris E. R. (1986). *Appropriate resin selection for rapid phytate analysis by ion-exchange chromatography*. Cereal Chem. 63, 1.

El Oufir L., Barry J. L., Flourié B., Cherbut C., Cloarec D., Bornet F., Galmiche J. P. (2000). *Relationship between transit time and in vitro fermentation of dietary fiber by fecal bacteria*. Eur. J. Clin. Nutr. 54, 603-609.

Elmaki H. B., Babiker E. E., El Tinay A. H. (1999). *Changes in chemical composition, grain malting, starch and tannin contents and protein digestibility during germination of sorghum cultivars*. Food Chemistry 64, 331–336.

Fagarasan S., Kawamoto S., Kanagawa O., Suzuki K. (2010). *Adaptive immune regulation in the gut: T cell- dependent and T cell-independent IgA synthesis*. Annu Rev Immunol 28, 243-273.

FAO, FAOSTAT (2014) Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/S>.

Fares C., Menga V. (2012). *Effects of toasting on the carbohydrate profile and antioxidant properties of chickpea (Cicer arietinum L) flour added to durum wheat*. Food Chemistry 131, 1140-1148.

Fardet A., Canlet C., Gottardi G., Lyan B., Llorach R., Remesy C., Mazur A., Paris A., Scalbert A. (2007). *Whole-Grain and Refined Wheat Flours Show Distinct Metabolic Profiles in Rats as Assessed by a 1H NMR-Based Metabonomic Approach*. The journal of Nutrition 137, 923-929.

Fardet A. (2008). *Is the in vitro antioxidant potential of whole-grain cereals and cereal products well reflected in vivo?* Journal of Cereal Science 48, 258-276.

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

Flight I., Clifton P. (2006). *Cereal grains and legumes in the prevention of coronary heart disease and stroke: a review of the literature*. European Journal of Clinical Nutrition 60, 1145–1159.

Flint A. J., Hu F. B., Glynn R. J., Jensen M. K., Franz M., Sampson L., Rimm E. B. (2009). *Whole grains and incident hypertension in men*. American Journal of Clinical Nutrition 90, 493-498.

Folch J., Lees M., Sloane Stanley G. H. (1957). *A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues*. J. Biol. Chem. 226, 497-509.

Friedman M. (1996). *Food Browning and Its Prevention: An Overview*. J. Agric. Food Chem. 44, 631–653.

Frontela C., Ros G., Martínez C. (2008). *Empleo de fitasas como ingrediente funcional en alimentos*. Archivos Latinoamericanos de Nutricion 58, 3.

Gajula H., Alavi S., Adhikari K., Herald T. (2008). *Precooked bran-enriched wheat flour using extrusion: dietary fiber profile and sensory characteristics*. Journal of Food Science 73, 4, S173-S179.

Garcia-Casal M. N., Layrisse M., Solano L., Baron M. A., Arguello F., Llovera D., Ramírez J., Leets I., Tropper E. (1998). *Vitamin A and beta-carotene can improve nonheme iron absorption from rice, wheat and corn by humans*. J Nutr. 128, 3, 646-50.

García-Villanova Ruíz B., Guerra Hernández E. J. (2010). *Cereales y productos derivados*. En: Tratado de Nutrición, Tomo II. Composición y calidad nutritiva de los alimentos (Ed: Gil, A.) 2º Ed. Madrid, España, p. 99-137.

Giacco R., Della Pepa G., Luongo D., Riccardi G. (2011). *Whole grain intake in relation to body weight: From epidemiological evidence to clinical trials*. Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. 21, 901.

Gibson R. S., Hess S. Y., Hotz C., Brown K. H. (2008). *Indicators of zinc status at the population level: a review of the evidence*. British Journal of Nutrition 99, 3, S14–S23.

Goldin S. L. (1986). *Function of the normal human microflora*. Scand. J. Infect. Dis. 49, 17-30.

Goldin B.R. (1990). *Intestinal microflora: metabolism of drugs and carcinogens*. Ann. Med. 22, 43-8.

- Gomori G. A. (1942). *A modification of the colorimeter phosphorus determination for use with the photoelectric colorimeter*. J Lab Clin Med. 27, 955-960.
- González R. J., Torres R. L., De Greef D. M., Gordo, N. A. (1986). *Efectos de algunas variables de extrusión sobre la harina de maíz*. Arch. Latinoam. Nutr. 37, 3, 578-592.
- González R. J., Torres R. L., De Greef M. D. (2002a). *Extrusión –Cocción de Cereales*. Boletín da Sociedade Brasileira de Ciencia e Tec de Alimentos (sbCTA), Campinas 36, 2, 83-136.
- González R., Torres R. L., De Greef D. M., Tosi E., Re E. (2002b). *Effects of popping and extrusion processes on some hydration properties of amaranth*. Brazilian J of Chemical Eng. 19, 4, 391-395.
- Gonzalez R. J., De Greef D. M., Torres R. L., Borrás F., Robuti J. (2004). *Effects of endosperm hardness and extrusion temperature on properties of products obtained with grits from two commercial maize cultivars*. Lebensm.-Wiss. U. Technol. 37, 193-198.
- González R. J., Pastor–Cavada E., Vioque J., Torres R. L., De Greef M. D., Drago S. R. (2013). *Extrusion conditions and amylose content affect physicochemical properties of extrudates obtained from brown rice grains*. International Journal of Food Science-Hindawi Publishing Corporation, ID 584148, 8 pages.
- González R. J., Drago S. R., Torres R. L., De Greef M. D. (2014). *Extrusion cooking of cereal-based products*. En: Pinho Ferreira Guiné R. & Dos Reis Correia P. M. (Eds), Engineering aspects of cereal and cereal-based products (pp. 269-291). Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Gorbach S. L., Goldin, B. R. (1990). *The intestinal microflora and the colon cancer connection*. Rev. Infect. Dis. 12, 242-61.
- Greenspan L. (1977). *Humidity fixed point of binary saturated aqueous solutions*. Journal of Research of the National Bureau of Standards – a Physics and Chemistry, 81, 89–96.
- Greiner R., Konietzny U. (2006). *Phytase for food application*. Food Technol Biotechnol. 44, 2, 125-140.

Gudiel-Urbano M., Goñi I. (2002). *Effect of edible seaweeds (undaria pinnatifida and porphyra tenera) on the metabolic activities of intestinal microflora in rats*. Nutrition Research 22, 323-331.

Guías Alimentarias para la Población Argentina (2003). *Guías alimentarias: manual de multiplicadores*. Silvia Lema, Elsa N. Longo y Alicia Lopresti. - 1ª. ed. 1ª reimpresión - Buenos Aires: Asociación Argentina de Dietistas y Nutricionistas Dietistas.

Guías Alimentarias para la Población Argentina (2013). *Documento Base para la revisión de las guías alimentarias para la población argentina*.

Hallberg L., Brune M., Erlandsson M., Sandberg A. S., Rossander-Hulthén L. (1991). *Calcium: effect of different amounts on nonheme- and heme-iron absorption in man*. Am. J. Clin. Nutr. 53:112-9.

Hara H., Suzuki T., Aoyama Y. (2000). *Ingestion of the soluble dietary fibre, polydextrose, increases calcium absorption and bone mineralization in normal and total-gastrectomized rats*. British Journal of Nutrition 84, 655-661.

Harper J. M. (1989). *Food extruders and their applications*. En: Extrusion cooking C. Mercier, P. Linko, J.M. Harper (Eds.). American Association of Cereal Chemists, St. Paul. Minnesota, cap. 10, pp. 321-342.

Harvey L. (2001). *Mineral bioavailability*. Nutr. Food Sci. 31, 4, 179-182.

Hass P., Machado M. J., Anton A. A., Silva A. S., De Francisco A. (2009). *Effectiveness of whole grain consumption in the prevention of colorectal cancer: Meta-analysis of cohort studies*. Int J. Food. Sci. Nutr. 21, 1.

Hauer H., Bechthold A., Boeing H., Bronstrup A., Buyken A., Leschik-Bonnet E., Linseisen J., Schulze M., Strohm D., Wolfram, G., German Nutrition Society. (2012). *Evidence-based guideline of the German Nutrition Society: Carbohydrate intake and prevention of nutrition-related diseases*. Ann. Nutr. Metab. 60, 1, 1-58.

Hayakawa T., Koyama S., Kurasawa H., Igaue I. (1977). *Myo-inositol 1-phosphate aynthase of rice seed in embryo, bran endosperm, seedling and milky stages*. Niigata Daigaku Nogakubu Kenkyu Hokoku 29, 27-34.

Hayakawa T., Toma Y., Igaue I. (1989). *Purification and Characterization of Acid Phosphatases with or without Phytase Activity from Rice Bran*. Agric. Biol. Chem. 53, 6, 1475- 1483.

- Hazell T., Johnson I. T. (1989). *Influence of Food Processing on Iron Availability in Vitro from Extruded Maize-based Snack Foods*. J. Sci. Food Agric. 46, 365-374.
- Hemavathy J., Prabhakar J.V. (1987). *Lipid composition of rice (Oryza sativa L.) bran*. J. Am. Oil Chem. Soc. 64, 1016-1019.
- Hill R., Tyler C. (1954). *The reaction between protein and phytate*. Journal of Agricultural Science 44, 324–326.
- Hissin P. J., Hilf R. (1976). *A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues*. Analytical Biochemistry 74, 214-226.
- Ho C. T., Izzo M. T. (1992). *Lipid-protein and lipid-carbohydrate interactions during extrusion*. In *Food extrusion science and technology*. Kokini J.L., Ho C.T., Karwe M. (Eds.) V. New York, USA.
- Horn H. D. (1982) *Glutathione reductase*. En: *Methods of Enzymatic Analysis*. Bergmeyer, H.U (Ed.) Weniheim. Germany. Verlag Chemie.
- Hoseney R. C. (1986). *Cereal Starch*. Principles of Cereal and Technology. American Association of Cereal Chemist.
- Howarth N. C., Saltzman E., Roberts S. B. (2001). *Dietary fiber and weight regulation*. Nutr Rev. 59, 129-139.
- Huang V T. (1999). *Effect of glass transitions on the rheological properties of food polymers*. Macromolecular Symposia, 140, 125-135.
- Hurrel R. F., Reddy M. B., Juillerat M. A., Cook J. D. (2003). *Degradation of phytic acid in cereal porridges improves iron absorption by human subjects*. Am. J. Clin. Nutr. 77, 5, 1213-9.
- Hurrel R. F. (2004). *Phytic acid degradation as a means of improving iron absorption*. Int J Vitam Nutr Res 74, 445–452.
- Hurrel R. F., Egli I. (2010). *Iron bioavailability and dietary reference values*. Am. J. Clin. Nutr. 91, 1461S–7S.
- Iqbal T. H., Lewis K. O., Cooper B. T. (1994). *Phytase activity in the human and rat small intestine*. Gut, 35, 1233–1236.

Jacob D. R. Jr., Meyer K. A., Kushi L. H., Folsom A. R. (1998). *Whole-grain intake may reduce the risk of ischemic heart disease death in postmenopausal women: the Iowa Women's Health Study*. American J Clinical Nutrition 68, 248–257.

Jang Y., Lee J. H., Kim O. Y., Park H. Y., Lee S. Y. (2001) *Consumption of whole grain and legume powder reduces insulin demand, lipid peroxidation, and plasma homocysteine concentrations in patients with coronary artery disease: randomized controlled clinical trial*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 21, 2065–2071.

Jenkins D. J., Kendall C. W., Axelsen M., Augustin L. S., Vuksan V. (2000) *Viscous and nonviscous fibres, nonabsorbable and low glycaemic index carbohydrates, blood lipids and coronary heart disease*. Current Opinion Lipidol. 11, 49-56.

Jones J. M., Reicks M., Adams J.; Fulcher, G., Weaver G., Kanter M., Marquart L. (2002). *The Importance of Promoting a Whole Grain Foods Message*. J of the American College of Nutrition 21, 4, 293-297.

Jones J. M. (2010). *Regulatory Aspects of Whole Grain and Whole Grain Foods: Definitions and Labeling*. Cereal Chem. 87, 2, 150-154.

Juliano B. O. (1985). *Rice: Chemistry and technology* (2nd Ed.). St. Paul, Minnesota (USA): American Association of Cereal Chemists, Inc, Gross Composition.

Juliano B.O., Goddard, M.S. (1986). *Cause of varietal difference in insulin and glucose responses to ingested rice*. Qual. Plant. Plant Foods Hum. Nutr, 36, 35-41.

Katcher H. I., Legro R. S., Kunselman A. R., Gillies P. J., Demers L. M., Bagshaw D. M., Kris-Etherton P. M. (2008). *The effects of a whole grain enriched hypocaloric diet on cardiovascular disease risk factors in men and women with metabolic syndrome*. American Journal of Clinical Nutrition 87, 79-90.

Kemme P. A., Jongbloed A. W., Mroz Z., Kogut J., Beynen A. C. (1999). *Digestibility of nutrients in growing-finishing pigs is affected by Aspergillus niger phytase, phytate and lactic acid levels: 1. Apparent ileal digestibility of amino acids*. Livestock Production Science 58, 107–117.

Kim J. H., Kho Y. H., Lee H. J., Kim M. H., Lee S. M. (2001). *Regulation of apoptotic cell death in U937 leukemia cells by fatty acids*. Food Science and Biotechnology 10, 529–533.

- Kim H. Y., Hwang I. G., Kim T. M., Woo K. S., Park D. S., Kim J. H., Kim D. J., Lee J., Lee Y. R., Jeong H. S. (2012). *Chemical and functional components in different parts of rough rice (Oryza sativa L.) before and after germination*. Food Chemistry 134, 288–293.
- Kokini J., Lih S., Chedid L. (1992). *Effect of starch structure on starch rheological properties*. Food Technol. 46, 124-139.
- Kumar V., Sinha A. K., Makkar H., Becker K. (2010). *Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review*. Food Chemistry 120, 945–959.
- Laemmli U. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 227-680.
- Lambers L., Delcour J. A. (2008). *Carotenoids in Raw and Parboiled Brown and Milled Rice*. J. Agric. Food Chem. 56, 11914–11919.
- Lay L., Kokini J. (1991). *Physicochemical and rheological of starch during extrusion*. Biotechnol Progress 7, 251-266.
- Lee S. H., Park H. J., Chun H. K., Cho S. Y., Cho S. M., Lillehoj H. S. (2006). *Dietary phytic acid lowers the blood glucose level in diabetic KK mice*. Nutrition Research 26, 9, 474–479.
- Le Meste M., Champion M., Roudaut G., Blond G., Simatos D. (2002). *Glass Transition and Food Technology: A Critical Appraisal*. Journal of Food Science 67, 7.
- Leinonen K. S., Poutanen K. S., Mykkänen H. M. (2000). *Rye bread decreases serum total and LDL cholesterol in men with moderately elevated serum cholesterol*. Journal of Nutrition 130, 164-170.
- Lestienne I., Icard-Vernière C., Mouquet C., Picq C., Trèche S. (2005). *Effects of soaking whole cereal and legume seeds on iron, zinc and phytate contents*. Food Chemistry 89, 421-425.
- Liang J., Han B., Nout M. J., Hamer R. J. (2008). *Effects of soaking, germination and fermentation on phytic acid, total and in vitro soluble zinc in brown rice*. Food Chemistry 110, 821-828.

- Liang J., Han B., Nout M. J., Hamer R. J. (2009). *Effect of soaking and phytase treatment on phytic acid, calcium, iron and zinc in rice fractions*. Food Chemistry 115, 789-794.
- Linko P., Colonna P., Mercier C. (1981). *High-temperature, short-time extrusion cooking*. Adv. Cereal Sci. and Technol. 4, 145.
- Liu R. H. (2004). *Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action*. The Journal of Nutrition 134, 3479–3485.
- Llopart E. E., Drago S. R., De Greef D. M., Torres R. L., González R. J. (2013) *Effects of extrusion conditions on physical and nutritional properties of extruded whole grain red sorghum (sorghum spp)*. Int J Food Sci Nutr. 65, 1, 34-41.
- Lönnerdal B., Cederblad A., Davidsson L., Sandstrom B. (1984). *The effect of individual components of soy formula and cow's milk formula on zinc bioavailability*. Am J Clin Nutr. 40, 1064-70.
- Lönnerdal B.O. (2000). *Dietary factors influencing zinc absorption*. J. Nutr. 130, 5, 1378S-1383S.
- Lowry O., Rosebrough N., Farr L., Randall R. (1951). *Protein measurement with the folin phenol reagent*. Journal of Biological Chemistry 193-265.
- Ma G., Li Y., Jin Y., Zhai F., Kok F. J., Yang X. (2007). *Phytate intake and molar ratios of phytate to zinc, iron and calcium in the diets of people in China*. European Journal of Clinical Nutrition 61, 3, 368-374.
- Maljaars P. W. J., Peters H. P. F., Mela D. J., Masclee A. A. M. (2008). *Ileal brake: A sensible food target for appetite control*. A review. Physiology and Behavior 95, 271–281.
- Mallet A. K., Rowland I. R., Bearne C. A. (1986) *Influence of wheat bran on some reductive and hydrolytic activities of the rat caecal flora*. Nutr Cancer 8, 125–31.
- Mateau X. (2004). *La fibra en la alimentación*. Farmacia hospitalaria. Edikamed S. L. Barcelona.
- Marshall W. E., Wadsworth J. I. (1994). *Rice science and technology*. Ed. Marcel Dekker, Inc. New York.

- Marteau P., Marteau P., Florurie B., Pellier P., Santos L., Desjeux F. J., Rambaud J. C. (1990) *Effect of chronic ingestion of a fermented dairy product containing Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum on metabolic activities of the colonic flora in humans*. American Journal of Clinical Nutrition 52, 685–8.
- Martín de Portela, M. L. (1993). *Vitaminas y minerales en nutrición* (1º Ed.) Libreros López (Ed.), Buenos Aires, Argentina.
- Martín de Portela M. L., Fernández I., Pallaro A. (2006). *Anexo I: Metodología para determinar la calidad proteica*. En: Energía y macronutrientes en la nutrición del siglo XXI. M. L. P. Martín de Portela. La prensa médica argentina (Eds.) pp. 373.
- Martínez Domínguez B., Ibáñez Gómez M. V., Rincón León F. (2002). *Acido fítico: aspectos nutricionales e implicaciones analíticas*. ALAN, 52, 3.
- Martínez-Navarrete N., Andrés A., Chiralt A., Fito P. (1998). *Termodinámica y cinética de sistemas alimento entorno*. Servicio de Publicaciones Universidad Politécnica de Valencia. España, nº ref.: 984034.
- Martínez-Sánchez G. (2005). *Especies reactivas del oxígeno y balance redox, parte I: aspectos básicos y principales especies reactivas del oxígeno*. Rev. Cubana Farm. 39, 3.
- Martins S. I. F. S., Jongen W. M. F., Van Boekel M. A. J. S. (2001). *A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling*. Trends in Food Science & Technology 11 364–373.
- Matveev Y. I., Grinberg V. Y., Tolstoguzov V. B. (2000). *The plasticizing effect of water on proteins, polysaccharides and their mixtures. Glassy state of biopolymers, food and seeds*. Food Hydrocolloids 14, 5, 425-437.
- McIntosh G. H., Noakes M., Royle P.J., Foster P.R. (2003). *Whole-grain rye and wheat foods and markers of bowel health in overweight middle-aged men*. Am J Clin. Nutr. 77, 967–974.
- McIntyre A., Gibson P. R., Young G. P. (1993). *Butyrate production from dietary fiber and protection against large bowel cancer in a rat model*. Gut 34, 386–91.
- Mellen P. B., Walsh T. F., Herrington D. M. (2008). *Whole grain intake and cardiovascular disease: A meta-analysis*. Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. 18, 283.
- Mercier C. (1993). *Nutritional appraisal of extruded foods*. International Journal of Food Science and Nutrition. 44, S45-S53.

Michaelsen K. F., Astrup A. V., Mosekilde L., Richelsen B., Schroll M., Sorensen O. H. (1994). *The importance of nutrition for the prevention of osteoporosis*. Ugeskr Laeger 156, 958-960.

Miller D. D., Schriker B. R., Rasmussen R. R., Campen D. (1981). *An in vitro method for the estimation of iron availability from meals* Am J Clin Nutr. 34, 2248-2256.

Miller H. E., Rigelhof F., Marquart L., Prakash R. D. A., Kanter, M. (2000). *Antioxidant content of whole grain breakfast cereals, fruits and vegetables*. J. Am. College Nutr. 19, 312S-319S.

Mitchell J., Areas J. (1992). *Structural changes in biopolymers during extrusion*. *Food Extrusion Science and Technology*. J. L. Kokini, C. T. Ho, M. V. Karwe (Eds). Marcel Dekker, New York, Estados Unidos, p 345-360.

Moongngarm A., Saetung N. (2010). *Comparison of chemical compositions and bioactive compound of germinated rough rice and brown rice*. Food Chemistry 122, 782-788.

Moongngarm A., Khomphiphatkul E. (2011). *Germination time dependence of bioactive compounds and antioxidant activity in germinated rough rice (Oryza sativa L.)*. American Journal of Applied Sciences 8, 15-25.

Moroni A.V., Iametti S., Bonomi F., Arendt E.K., Dal Bello F. (2010). *Solubility of proteins from non-gluten cereals: A comparative study on combinations of solubilising agents*. Food Chemistry, 121, 1225–1230.

Namiki H. E. (1988). *Chemistry of Maillard Reactions: Recent Studies on the Browning Reaction Mechanism and the Developments of Antioxidants and Mutagens*. Adv. Food Research 32, 115–184.

Nappi G. U., Ribeiro-Cunha M. R., Coelho J. V., Jokl L. (2006). *Validação de métodos para determinação dos ácidos fítico e oxálico em multimistura*. Ciênc Tecnol. Aliment. 26, 811-20.

Navarro S. Z., Moreiras G. V., Mosquera G. V. (2010). *Evolución de la Nutrición*. En: Tratado de Nutrición, Tomo I. Bases fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición (Ed: Gil, A.) 2º Ed. Madrid, España, p. 3-15.

Nelina A. R. F. (2005). *Efectos beneficiosos de una dieta rica en granos enteros*. Rev Chil Nutr. 32, 3.

O' Dell B. L. (1969). *Effect of dietary components upon zinc availability. A review with original data.* Am. J. Clin. Nutr. 22, 1315-22.

Ohishi K., Kasai M., Shimada A., Hatae K. (2003). *Effect of Acetic Acid Added to Cooking Water on the Dissolution of Proteins and Activation of Protease in Rice.* J. Agric. Food Chem. 51, 4054-4059.

Olivares Grohnert M., Arredondo Olgún M., Pizarro Aguirre F. (2010a). *Hierro.* En: Tratado de Nutrición, Tomo I. Bases fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición (Ed: Gil, A.) 2º Ed. Madrid, España, p. 671.

Olivares Grohnert M., Castillo Durán C., Uauy Dagach-Imbarach R. (2010b). *Cobre y Zinc.* En: Tratado de Nutrición, Tomo I. Bases fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición (Ed: Gil, A.) 2º Ed. Madrid, España, p. 698.

Onyango C., Noetzold H., Bleya T., Henle T. (2004). *Proximate composition and digestibility of fermented and extruded uji from maize–finger millet blend.* Lebensm.-Wiss. u.-Technol. 37, 827–832.

Osborne T. (1924). En: The Vegetable Proteins. 2^{da}. Edición. Longmans and Green (Eds.), Nueva York.

Ostergard K., Björk I., Vainionpää J. (1989). *Effects of extrusion cooking on starch and dietary fibre in barley.* Food Chemistry 34, 215-227.

Paglia D. E., Valentine W. N. (1967). *Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase.* J Lab. Clin. Med 70, 158-169.

Pansu D., Bellaton C., Bronner F. (1983) *Developmental changes in the mechanisms of duodenal calcium transport in the rat.* The American Journal of Physiology 244, 1, G20–26.

Parada J., Aguilera J. M. (2007). *Food Microstructure Affects the Bioavailability of Several Nutrients.* Journal of Food Science 72, 2.

Park J., Rhee K. S., Kim B. K., Rhee K. C. (1993). *Single–screw extrusion of defatted soy flour, corn starch and raw beef blends.* J. Food Sci. 58, 1, 9-19.

Pasman W. J., Saris W. H., Wauters M. A., Westerterp-Plantenga M. S. (1997). *Effect of one week of fibre supplementation on hunger and satiety ratings and energy intake.* Appetite. 29, 77-87.

Pastor-Cavada E., Drago S. R., González R. J., Juan R., Pastor J. E., Alaiz M., Vioque J. (2011). *Effects of the addition of wild legumes (Lathyrus annuus and Lathyrus clymenum) on the physical and nutritional properties of extruded products based on whole corn and brown rice*. Food Chemistry 128, 961–967.

Pastor-Cavada E., Drago S. R., González R. J. (2014) *Evaluation of physical and nutritional properties of extruded products based on brown rice and wild legume mixtures*. En: Wheat and rice in disease prevention and health: Benefits, risks and mechanisms of whole grains in health promotion. Watson R. R., Preedy V. R., Zibadi S (Eds.).

Paturi G., Butts C. A., Monro J. A., Hedderley D., Stoklosinski H., Roy N. C., Ansell J. (2012) *Evaluation of gastrointestinal transit in rats fed dietary fibres differing in their susceptibility to large intestine fermentation*. Journal of Functional Foods 4, 107-115.

Peers F. G. (1953). *The phytase of wheat*. Biochemical Journal 53, 102–10.

Perdon A., Siebenmorgen T. J., Mauromoustakos A. (2000). *Glassy state transition and rice drying: development of a brown rice state diagram*. Cereal Chemistry 77, 708–713.

Pérez A. A., Drago S. R., Carrara C. R., De Greef D. M., Torres R. L., González R. J. (2008). *Extrusion cooking of a maize/soybean mixture: Factors affecting expanded product characteristics and flour dispersion viscosity*. J of Food Engineering 87, 3, 333–340.

Pérez-Llamas F., Gil Hernández A., Zamora Navarro, S. (2010). *Calcio, fósforo, magnesio y flúor. Metabolismo óseo y su regulación*. En: Tratado de Nutrición, Tomo I. Bases fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición (Ed: Gil, A.) 2º Ed. Madrid, España, p. 643.

Pérez-Navarrete C., Betancur-Ancona D., Casotto M., Carmona A., Tovar J. (2007). *Efecto de la extrusión sobre la biodisponibilidad de protein y almidón en mezclas de harinas de maíz y frijol lima*. Arch. Latinoam. Nutr. Organo Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición 57, 3.

Persson H., Türk M., Nyman M., Sandberg A. (1998). *Binding of Cu^{2+} , Zn^{2+} , and Cd^{2+} to Inositol Tri-, Tetra-, Penta-, and Hexaphosphates*. J. Agric. Food Chem. 46, 3194-3200.

Phillips R. D. (1989). *Effect of Extrusion Cooking on the Nutritional Quality of Plant Proteins*, in *Protein Quality and the Effect of Processing*, Phillips R.D. and Finley J.W. (Eds.). Marcel Dekker: New York. pp. 219-246.

Pomeranz Y., Ory R. L. (1982). *Rice processing and utilization*, CRC Handbook of Processing and Utilization in Agriculture, Vol. II (I. A. Wolff, ed.), CRC Press, West Palm Beach, FL (USA).

Prego Cisneros E. (1995). *La glutatión reductasa y su importancia biomedica*. Rev Cubana Invest Biomed. 14, 1.

Prego Cisneros E., Pupo Balboa J., Céspedes Miranda E. (1997). *Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: III. Glutatión Peroxidasa*. Rev Cubana Invest Bioméd 16, 1.

Prizont R. (1984). *Influence of High Dietary Cellulose on Fecal Glycosidases in Experimental Rat Colon Carcinogenesis*. Cancer research 44, 557-561.

Qiu Y., Liu Q., Beta T. (2010). *Antioxidant properties of commercial wild rice and analysis of soluble and insoluble phenolic acids*. Food Chemistry 121, 140–147.

Quezada S. M., Meneses J. O., Llorente C. G. (2010). *Compuestos bioactivos de los alimentos de origen vegetal*. En: Tratado de Nutrición, Tomo II. Composición y calidad nutritiva de los alimentos (Ed: Gil, A.) 2º Ed. Madrid, España, p. 399-427.

Ranhotra G. S., Gelroth J. A., Glaser B. K., Rag C. S. (1991) *Fecal Bulking Effect of Whole Grain Flour from Selected Grains*. Cereal Chem. 68, 5, 556-558.

Raninen K., Lappi J., Mykkänen H., Poutanen K. (2011). *Dietary fiber type reflects physiological functionality: comparison of grain fiber, inulin, and polydextrose*. Nutrition Reviews 69, 1, 9–21.

Ravindran V., Ravindran G., Sivalogan S. (1994). *Total and phytate phosphorus contents of various foods and feedstuffs of plant origin*. Food Chem 50, 133-36.

Reddy M., Richard F., Cook J. (2000). *Estimation of nonheme-iron bioavailability from meal composition*. Am. J Clin. Nutr. 71, 937-43.

Redondo L. (2002). *Propiedades de la fibra dietética*. En: La fibra terapéutica. Ed. Glosa. Barcelona, 2002, pp. 29-51.

Reeves P. G., Nielsen F. H., Hahey G. C. (1993). *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*. J Nutr. 123, 11, 1939-51.

Repo-Carrasco-Valencia R., Pena J., Kallio H., Salminen S. (2009). *Dietary fiber and other functional components in to varieties of crude and extruded kiwicha (Amaranthus caudatus)*. Journal of Cereal Science 49, 219–224.

Reyes M. G., Corzo O., Bracho N., Rodríguez Y. (2008). *Optimización de la deshidratación osmótica con pulso de vacío de láminas de sardina*. Revista Científica, FCV-LUZ XVIII, 3, 320 – 328.

Richardson D. P. (2003). *Wholegrain health claims in Europe*. Proceed of the Nutrition Society 62, 161-169.

Roberfroid M. B. (2002). *Functional foods: concepts and application to inulin and oligofructose*. British J of Nutrition 87, 2, S 139-143.

Roberfroid M. B. (2005). *Introducing inulin-type fructans*. British Journal of Nutrition 93, 1, S13-S25.

Roberts S. B., McCrory M. A., Saltzman E. (2002). *The influence of dietary composition on energy intake and body weight*. J Am. Coll. Nutr. 21, 140S-145S.

Robin F., Schuchmannb H. P., Palzer S. (2012). *Dietary fiber in extruded cereals: Limitations and opportunities*. Trends in Food Science & Technology 28, 23-32.

Rochín-Medina J. J., Gutiérrez-Dorado R., Mora-Rochín S., Medina-Godoy S., Valdez-Ortiz Á., López-Valenzuela J., Delgado-Vargas F., Milán-Carrillo J., Reyes-Moreno C. (2012). *Nutraceutical beverage from a high antioxidant activity mixture of extruded whole maize and chickpea flours*. European International Journal of Science and Technology 1, 3, 1–14.

Roohinejad S., Omidzadeh A., Mirhosseini H., Saari N., Mustafa S., Yusof R. M., Hussin A. S. M., Hamid A., AbdManapa M. Y. (2009). *Effect of pre-germination time of brown rice on serum cholesterol levels of hypercholesterolaemic rats*. J Sci Food Agric 90, 245–251.

Romaña D. L., Castillo C., Diazgranados D. (2010). *El zinc en la salud humana – I*. Rev Chil Nutr 37, 2.

Rudloff S., Lönnerdal B. (1992). *Solubility and digestibility of milk protein in infant formulas exposed at different heat treatments*. J of Pediatric Gastroenterology and Nutrition 15, 25-33.

Sanchez A., Puche R., Zeni S., Oliveri B., Galich A. M., Maffei L., Plantalech L., Poudes G., Bregni C. (2002). *Papel del calcio y de la vitamina D en la salud ósea (parte I)*. Reemo 11, 6, 201-17.

Sandberg A. S., Ahderinne R. (1986). *HPLC method for determination of inositol tri-, tetra-, penta-, and hexaphosphates in foods and intestinal contents*. J Food Sci. 51, 3, 547-550.

Sandberg A. S., Andlid T. (2002). *Phytogenic and microbial phytases in human nutrition*. International Journal of Food Science and Technology 37, 823–833.

Sandstrom B., Cederblad A. (1980). *Zinc absorption from composite meals. II. Influence of the main protein source*. Am. J Clin. Nutr. 33, 1778-83.

Saura-Calixto F., Serrano J., Goñi I. (2007). *Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet*. Food Chemistry 101, 492–501.

Seal C. J. (2006). *Whole grains and CVD risk*. Proceedings of the Nutrition Society 65, 24–34.

Selle P. H., Ravindran V., Caldwell R. A., Bryden W. L. (2000). *Phytate and phytase: Consequences for protein utilization*. Nutrition Research Reviews 13, 255–278.

Shen Y., Jin L., Xiao P., Lu Y., Bao J. (2009). *Total phenolics, flavonoids, antioxidant capacity in rice grain and their relation to grain color, size and weight*. Journal of Cereal Science 49, 106-111.

Sing-Chung L., Tsui-Chuan C., Chun-Kuang S. (2011). *Effects of brown rice, rice bran, and polished rice on colon carcinogenesis in rats*. Food Research International 44, 209–216.

Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventos M. R. (1999). *Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent*. Methods in Enzymology 299, 152-178.

Slavin J.; Tucker M.; Harriman C., Jonnalagadda, S. (2013). *Whole Grains: Definition, Dietary Recommendations, and Health Benefits*. Cereal Food World, AACC International, Inc. July-August vol. 58, 4.

Smith B. D. (1998). *The Emergence of Agriculture*, 1ª edición (en inglés), Nueva York: W H Freeman & Co.

Spieß W. E. L., Wolf W. R. (1983). *The results of the COST 90 Project on water activity*. In: *Physical Properties of Foods*. R. Jowitt, F. Escher, B. Hallström, H.F.Th. Meffert, W.E.L. Spiess. y G. Vos (Eds.). pp. 65–91. London and New York: Applied Science Publishers.

Sun Z., Yang W., Siebenmorgen T., Stelwagen A., Clossen A. (2002). *Thermomechanical Transitions of Rice Kernels*. Cereal Chemistry 79, 3, 349–353.

Taira H., Nakagahra M., Nagamine T. (1988). *Fatty acid composition of indica, sinica, japonica, and japonica groups of nonglutinous brown rice*. J. Agric. Food Chem., 36, 45-47.

Tan J., Baisakh N., Oliva N., Parkhi V., Rai M., Torrizo L., Datta K., Datta S. K. (2005). *The screening of rice germplasm, including those transgenic rice lines which accumulate beta-carotene in their polished seeds, for their carotenoid profile*. Int. J. Food Sci. Technol. 40, 563–569.

Tanaka Y., Yoshida T., Kasai Z. (1976). *Phosphorylation of myo-inositol by isolated aleurone particles of rice*. Agric. Biol. Chem. 40, 1319-1325.

Tanaka Y., Resurrecion A. P., Jualiano B. O., Bechtel D. B. (1978). *Properties of whole and undigested fraction of protein bodies of milled rice*. Agric. Biol. Chem. 42, 2015-2023.

Teucher B., Olivares M., Cori H. (2004). *Enhancers of iron absorption: ascorbic acid and other organic acids*. Int. J Vitam. Nutr. Res. 74, 6, 403-19.

Tian S., Nakamura K., Kayahara H. (2004). *Analysis of Phenolic Compounds in White Rice, Brown Rice, and Germinated Brown Rice*. J. Agric. Food Chem. 52, 4808-4813.

Tighe P., Duthie G., Vaughan N., Brittenden J., Simpson W. G., Duthie S., Mutch W., Wahle K., Horgan G., Thies F. (2010). *Effect of increased consumption of wholegrain foods on blood pressure and other cardiovascular risk markers in healthy middle-aged*

persons: a randomized controlled trial. *American Journal of Clinical Nutrition*, 92, 733-740.

Tijsskens L. M. M., Greiner R., Biekman E. S. A., Konietzny U. (1997). *Modeling the Effect of Temperature and pH on Activity of Enzymes: The Case of Phytases*. *Biotechnology and Bioengineering* 72, 3, 323-330.

Timmermann E. O. (2003). *Multilayer sorption parameters: BET or GAB values?* *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 220, 235-260.

Topping D. L., Clifton P. M. (2001). *Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and non-starch polysaccharides*. *Physiological Reviews* 81, 3, 1031–1064.

Torgensen H., Toledo R. T. (1977). *Physical properties of protein preparations related to their functional characteristics in comminuted meat systems*. *Journal of Food Science* 42, 1615–1620.

Tovar J., Björck I., Asp N. G. (1990). *Starch content and alpha-amylolysis rate in precooked legume flours*. *J. Agric. Chem.* 38, 1818-1823.

Towo E. E., Svanberg U., Ndossi G. D. (2003). *Effect of grain pre-treatment on different extractable phenolic groups in cereals and legumes commonly consumed in Tanzania*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83, 980–986.

Turconi G., Bazzano R., Caramella R., Porrini M., Crovetto R., Lanzola E. (1995). *The effects of high intakes of fibre ingested at breakfast on satiety*. *Eur J Clin Nutr.* 49, 3, S281-S285.

Uauy R., Hertrampf E., Reddy M. (2002). *Iron fortification of foods: Overcoming technical and practical barriers*. *J. Nutr.* 132, 4, 849-852.

USDA. (2005) *Dietary Guidelines for Americans*. USDA Human Nutrition Information Service Hyattsville, MD.

Van den Berg C., Bruin S. (1981). *Water activity and its estimation in food systems: theoretical aspects*. En: Rockland, L.B., Stewart, G.F. (Eds.), *Water Activity: Influences on Food Quality*. Academic Press, New York, pp. 1–43.

Van Loo J., Cummings J., Delzenne N., Englyst H., Franck A., Hopkins M., Kok N., Macfarlane G., Newton D., Quigley M., Roberfroid M., Van Vliet T., Van den Heuvel

E. (2002). *Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO Project (DGXII AIRII-CT94-1095)*. Br. J Nutrition 87, 2, S163-S168.

Veluppillai S., Nithyanantharajah K., Vasantharuba K., Balakumar S., Arasaratnam V. (2009). *Biochemical Changes Associated with Germinating Rice Grains and Germination Improvement*. Rice Science 16, 3, 240–242.

Viadel B., Barbera R., Farre, R. (2006). *Uptake and retention of calcium, iron, and zinc from raw legumes and the effect of cooking on lentils in Caco-2 cells*. Nutr. Res. 26, 11, 591-596.

Vitaglione P., Napolitano A., Focliano V. (2008) *Cereal dietary fibre: A natural functional ingredient to deliver phenolic compounds into the gut*. Trends in Food Science Technology 19, 451-463.

Watzke H. J. (1998). *Impact of processing on bioavailability examples of minerals in foods*. Trends in Food Science & Technology 9, 320-327.

Weaver C. M., Liebman M. (2002). *Biomarkers of bone health appropriate for evaluating functional foods designed to reduce risk of osteoporosis*. British Journal of Nutrition 88, 2, S225–S232.

Weaver C. M., Martin B. R., Story J. A., Hutchinson I., Sanders L. (2010) *Novel fibers increase bone calcium content and strength beyond efficiency of large intestine fermentation*. J. Agric. Food Chemistry 58, 8952-8957.

Wei X., Wang R., Cao L., Yuan N., Huang J., Qiao W., Zhang W., Zeng H., Yang Q. (2012). *Origin of Oryza sativa in China inferred by nucleotide polymorphisms of organelle DNA*. PLoS One, 7, 11, e49546.

Weickert M.O., Mohlig M., Schofl C., Arafat A. M., Otto B., Viehoff H., Koebnick C., Kohl A., Spranger J., Pfeiffer A. F. (2006). *Cereal fiber improves whole-body insulin sensitivity in overweight and obese women*. Diabetes Care 29, 775-790.

Weisstaub A. R., Abadala V., Chavez, M. G., Mandalunis P.; Zuleta A., Zeni S. (2013). *Polydextrose enhances calcium absorption and bone retention in ovariectomized rats*. Hindawi – Int. J. Food Sc. 2013, 450794, 8 pages.

Wieser H., Koehler P. (2008). *The Biochemical Basis of Celiac Disease*. Cereal Chem. 85, 1, 1–13.

Xia M., Ling W. H., Ma J., Kitts D. D., Zawistowski J. (2003). *Supplementation of diets with the black rice pigment fraction attenuates atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E deficient mice*. J Nutr. 133, 744–51

Yagi K. (1976). *A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma*. Biochem. Med. 15, 212-216.

Yang L., Zhang H., Cheng L., Gu Z., Hua D., Qi X., Qian H., Wang L. (2014). *Effect of Extrusion on the Hydrophilic Antioxidant Capacity of Four Whole Grains*. Journal of Food and Nutrition Research 2, 2, 80-87.

Ye E. Q., Chacko S. A., Chou, E. L., Kugizaki M., Liu S. (2012). *Greater whole-grain intake is associated with lower risk of type 2 diabetes, cardiovascular disease, and weight gain*. J. Nutr. 142, 1304.

Yoshida T., Tanaka K., Kasai Z. (1975). *Phytate activity associated with isolated aleurone particles of rice grains*. Agricultural and Biological Chemistry, 39, 1, 289-290.

Youn M., Csallany A. S., Gallaher D. D. (2012). *Whole grain consumption has a modest effect on the development of diabetes in the Goto–Kakisaki rat*. British Journal of Nutrition 107, 192–201.

Zafar T. A., Weaver C. M., Zhao Y., Martin B. R., Wastney, M. E. (2004). *Nondigestible oligosaccharides increase calcium absorption and suppress bone resorption in ovariectomized rats*. The Journal of Nutrition 134, 2, 399–402.

Zaichicka V., Tzaphlidoub M. (2002). *Determination of calcium, phosphorus, and the calcium/ phosphorus ratio in cortical bone from the human femoral neck by neutron activation analysis*. Applied Radiation and Isotopes 56, 781–786.

Zaichicka V., Tzaphlidoub M. (2003). *Calcium and phosphorus concentrations and the calcium/phosphorus ratio in trabecular bone from the femoral neck of healthy humans as determined by neutron activation analysis*. Applied Radiation and Isotopes 58, 623–627.

Zarzuelo Zurita A., Gálvez Peralta J. (2010). *Fibra dietética*. En: Tratado de Nutrición, Tomo I. Bases fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición (Ed: Gil, A.) 2º Ed. Madrid, España, p. 235.

Zeni S. N., Di Gregorio S., Gomez Acotto C., Mautalen C. (2002). *Olpadronate prevents the bone loss induced by cyclosporine in the rat*. Calcif Tissue Int. 70, 48–53.

Ziegler E. E., Filer L. J. (1990). *Conocimientos Actuales sobre nutrición* (7° Ed.) OMS. ILSI Pub Cientif, Washinton DC, USA.

Zielinski H., Kozłowska H., Lewczuk B. (2001). *Bioactive compounds in the cereal grains before and after hydrothermal processing*. Innovative Food Science & Emerging Technologies 2, 159-169.

Zimmermann B., Lantsch H. J., Langbein U., Drochner W. (2002). *Determination of phytase activity in cereals grains by direct incubation*. J Anim. Physiol. A Anim Nutr. 86, 347-352.