



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
INSTITUTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral, para la obtención del Grado Académico de: Doctor en Ciencia y Tecnología de Alimentos

“OBTENCIÓN DE FRACCIONES RICAS EN CARBOHIDRATOS NO DIGERIBLES DE LA HEZ DE MALTA (HM) DE LA INDUSTRIA CERVECERA. CARACTERIZACIÓN DESDE EL PUNTO DE VISTA DE SU COMPOSICIÓN Y ESTUDIO DE SUS PROPIEDADES TECNO Y BIO-FUNCIONALES”

Autor: Ing. Gabriel D. Heinen

Directora: Dra. Silvina R. Drago

Codirector: Dr. Raúl E. Cian

Área de Cereales y Oleaginosas
Instituto de Tecnología de Alimentos - Facultad de Ingeniería Química

Integrantes del Jurado de la Tesis:

Dra. Ana Binetti

Dra. Cristina Ferrero

Dra. María Alejandra García

2025

PUBLICACIONES

La presente tesis dió lugar a la siguiente publicación y presentaciones a reuniones científicas:

Artículo en revista científica

Heinen GD, Garzón AG, Cian RE, Drago SR. (2025) Gastrointestinal and colonic bioaccessibility of calcium and ferulic acid from microcapsules made with brewer spent grain arabinoxylans. *International Journal of Biological Macromolecules* 292, 139237. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.139237

Resúmenes presentados en reuniones científicas

Hidrólisis de Arabinoxilanos y evaluación de sus propiedades fisicoquímicas y antioxidantes. Heinen GD y Drago SR. Libro de Resúmenes del IX Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. 16 al 18 de Octubre de 2024, Córdoba

Obtención de celulosa microcristalina a partir de un residuo lignocelulósico de hez de malta cervecera. Heinen GD y Drago SR. Libro de Resúmenes del IX Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. 16 al 18 de Octubre de 2024, Córdoba.

Obtención de microcápsulas de calcio utilizando arabinoxilanos de hez de malta. Heinen GD; Garzón A; Cian R E; Drago SR. Libro de Resúmenes del X Congreso de Alimentos Siglo XXI. 4 al 6 de Septiembre de 2023, Santa Fe.

Extrudidos de maíz fortificados con hierro microencapsulado con arabinoxilanos. Heinen GD; Garzón A; Drago SR. Libro de Resúmenes del X Congreso de Alimentos Siglo XXI. 4 al 6 de Septiembre de 2023, Santa Fe.

Digestibilidad proteica de extrudidos de arroz, lentejas y sus mezclas. Argentina. Pontoni SM; Garzón A; Albarracin M; Heinen GD; Drago SR. Libro de Resúmenes del X Congreso de Alimentos Siglo XXI. 4 al 6 de Septiembre de 2023, Santa Fe.

Bioaccesibilidad de péptidos bioactivos del alga *Ulva* spp. microencapsulados con polisacáridos de hez de malta. Heinen GD; Garzón A; Cian RE; Drago SR. Libro de Resúmenes del VIII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Provincia de Córdoba. 4 al 6 de Octubre de 2022, Córdoba.

Propiedades antioxidantes y antidiabetogénicas de microcápsulas mixtas de péptidos y arabinosilanos. Heinen GD; Garzón A; Cian RE; Drago SR. Libro de Resúmenes del VIII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Provincia de Córdoba. 4 al 6 de Octubre de 2022, Córdoba.

Obtención de fracciones ricas en arabinosilanos, lignina y compuestos fenólicos a partir de la hez de malta. Evaluación de su potencial bioactivo. Heinen GD; Garzón A; Cian RE; Drago SR. Libro de Resúmenes del IX Congreso de Alimentos Siglo XXI: Alimentos, Nutrición Y Salud XLIII Reunión del Capítulo Argentino de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición (CASLAN) I Jornada Patagónica de la Asociación de Nutricionistas del Chubut (ANCH). Capítulo Argentino de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición (CASLAN) y Asociación de Nutricionistas del Chubut (ANCH). 13 al 15 de Octubre de 2021, Chubut.

Trabajos en eventos de ciencia y tecnología no publicados

Microencapsulación con arabinosilanos como estrategia de protección de péptidos bioactivos frente a la digestión gastrointestinal. Heinen GD. Resumen extendido. Presentación oral. Encuentro de Jóvenes Investigadores de la Universidad Nacional del Litoral. 18 de Octubre de 2022, Santa Fe.

Obtención de fracciones con potencial bioactivo a partir de la fibra de hez de malta. Heinen GD. Resumen extendido. Presentación oral. Encuentro de Jóvenes Investigadores de la Universidad Nacional del Litoral. 5 al 7 de Octubre de 2021, Santa Fe.

Extracción de arabinosilanos a partir de hez de malta facilitada por procesos enzimáticos. Heinen GD. Resumen extendido. Primer Encuentro Virtual de Jóvenes Investigadores de la Asociación Universidades Grupo Montevideo. Universidad Autónoma de Santiago de Chile. 27 al 29 de Octubre de 2020, Chile.

Caracterización de la hez de malta respecto al perfil de compuestos fenólicos. Heinen GD. Resumen extendido. Presentación oral. XXIII Encuentro de Jóvenes Investigadores. 9 y 10 de Octubre de 2019, Santa Fe.

AGRADECIMIENTOS

A la Agencia Nacional de Promoción de la Ciencia y la Tecnología (ANPCyT) por la beca obtenida durante los años 2018-2021, bajo el proyecto Proyecto PICT-2016-2879, para iniciar mis estudios de doctorado.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por la beca de finalización de doctorado obtenida durante los años 2022-2024.

A mis directores Silvina y Raúl, por el apoyo, la dedicación y la enseñanza brindada, por acompañarme en todo momento a lo largo de este camino. Por toda su sabiduría, generosidad, y por compartir sus experiencias.

A todos mis compañeros del Instituto de Tecnología de Alimentos.

A mi familia y a mi compañera de vida, por ese apoyo incondicional.

ÍNDICE

Abreviaturas y Símbolos	14
Resumen	15
I-Introducción general	24
I.1-Desechos de la industria y economía circular	24
I.2- Hez de malta	26
I.2.1-Grano de cebada	26
I.2.1.1- Partes del grano.....	26
I.2.1.2- Composición de los granos de cebada	27
I.2.2-Proceso de producción de cerveza.....	29
I.2.3-Composicion de la HM.....	31
I.3-Carbohidratos no digeribles	32
I.3.1-Arabinosilanos	32
I.3.1.1-Estructura química	32
I.3.1.2-Métodos de extracción de AX.....	33
I.3.1.2.1-Métodos químicos	33
I.3.1.2.2-Métodos enzimáticos.....	35
I.3.1.2.4-Métodos físicos	36
I.3.2-Celulosa	36
I.3.2.1-Estructura química.....	36
I.3.2.2-Métodos de obtención de celulosa	37
I.3.3-Polifenoles	38
I.3.3.1-Compuestos fenólicos	38
I.3.3.1.1-Estructura química	39
I.3.3.1.2-Compuestos fenólicos en cereales.....	39
I.3.4-Lignina.....	41
I.3.4.1-Estructura química	41
I.3.5-Propiedades bioactivas	42
I.3.5.1-Propiedades bioactivas de arabinosilanos	42
I.3.5.2-Propiedades bioactivas del ácido ferúlico.....	43
I.3.5.3-Propiedades bioactivas de la lignina	44
II-Objetivos.....	46

II.1-Objetivo General.....	46
II.2-Objetivos Específicos	46
III-Proceso de biorrefinería. Obtención de arabinosilanos, compuestos polifenólicos y celulosa microcristalina a partir de hez de malta.....	48
III.1-Introducción	48
III.2-Objetivos	49
III.2.1-Objetivo general.....	49
III.2.2-Objetivos específicos	50
III.3-Materiales y métodos	50
III.3.1-Materias primas.....	50
III.3.2-Characterización de la composición de la hez de malta (HM) de la industria cervecera.	50
III.3.2.1-Determinación de la composición centesimal.....	50
III.3.2.2-Determinación del perfil de compuestos fenólicos y compuestos fenólicos totales	51
III.3.3-Estudio de procesos de extracción de arabinosilanos.....	52
III.3.3.1-Extracción mediante el uso de enzimas comerciales y extracción alcalina directa.....	52
III.3.3.2-Seguimiento de los procesos	53
III.3.4-Mejoramiento del proceso de extracción alcalina directa.....	53
III.3.4.1-Estudio del impacto de la temperatura en la extracción alcalina	54
III.3.4.2- Estudio del impacto del pH en la etapa de precipitación etanólica.....	54
III.3.4.3- Estudio del lavado de R1 obtenido a partir de la extracción alcalina directa y precipitación etanólica del agua del lavado.	54
III.3.4.4- Ensayo de precipitación con diferentes proporciones de etanol	54
III.3.5-Ensayo a escala semi-piloto. Obtención de arabinosilanos, compuestos fenólicos y de lignina	55
III.3.6-Evaluación de las fracciones de arabinosilanos, compuestos fenólicos y lignina.....	56
III.3.6.1-Perfil de compuestos fenólicos y fenólicos totales.....	56
III.3.6.2-Espectrometría de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) de las fracciones.....	56
III.3.6.3-Propiedades bioactivas de las fracciones	57
III.3.6.3.1-Capacidad antioxidante.....	57
III.3.6.3.2-Capacidad hipoglucemiante.....	57
III.3.7-Evaluación de las propiedades fisicoquímicas y tecno-funcionales del concentrado de arabinosilanos (AX-c)	58

III.3.7.1-Composición de AX-c	58
III.3.7.2-Perfil de azúcares por cromatografía gaseosa (CG)	58
III.3.7.3-Potencial Z y tamaño hidrodinámico	59
III.3.7.4-Espectrometría de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) del concentrado de arabinosilanos (AX-c).....	59
III.3.7.5-Propiedades tecnofuncionales del concentrado de arabinosilanos (AX-c)	59
III.3.7.5.1-Absorción de agua	59
III.3.7.5.2-Propiedades gelificantes	59
III.3.8-Obtención de celulosa microcristalina	60
III.3.8.1-Obtención de celulosa	60
III.3.8.2-Characterización fisicoquímica de la celulosa microcristalina (CMC)...	60
III.3.8.2.1-Microscopía electrónica de barrido (SEM)	60
III.3.8.2.2-Espectrometría de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)	60
III.3.8.2.3-Patrón de Difracción de rayos X.....	61
III.3.8.2.4-Color	61
III.3.9-Análisis estadísticos	62
III.4-Resultados y discusión	62
III.4.1-Composición de la hez de malta y del residuo de extracción de proteínas (REP).....	62
III.4.2-Extracción de arabinosilanos.....	65
III.4.2.1-Extracción asistida por enzimas y extracción alcalina directa	65
III.4.2.2-Estudio del impacto de la temperatura en la extracción alcalina directa	70
III.4.2.3-Impacto del pH en la precipitación etanólica	72
III.4.2.4-Estudio del lavado del R2 y precipitación etanólica	74
III.4.2.5-Ensayo de precipitación con diferentes proporciones de etanol	76
III.4.3-Ensayo a escala semi-piloto. Obtención de arabinosilanos (AX-c), compuestos fenólicos (CFS) y lignina	77
III.4.3.1-Perfil de compuestos fenólicos de las distintas fracciones.....	78
III.4.3.2-Espectrometría de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) de las fracciones CFS, AX-c y lignina.....	79
III.4.3.3-Propiedades bioactivas de las fracciones CFS, AX-c y lignina	81
III.4.4-Propiedades fisicoquímicas y tecnofuncionales de la fracción AX-c.....	82
III.4.4.2-Potencial Z y tamaño hidrodinámico del AX-c.....	83
III.4.4.3-Absorción de agua.....	84
III.4.4.4-Pruebas de gelificación de AX-c.....	85

III.4.5-Obtención de celulosa microcristalina	86
III.4.5.1-Microscopia electrónica de barrido (SEM) de REAx, CMC-1 y CMC-2	87
III.4.5.2-Espectrometría de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) de REAx, CMC-1 y CMC-2.....	88
III.4.5.4-Parámetros de color de CMC-1 y CMC-2.....	91
III.5-Conclusiones parciales	92
IV-Microencapsulación con arabinosilanos como estrategia de protección de péptidos bioactivos del alga verde <i>ulva spp</i> frente a la digestión gastrointestinal.....	94
IV.1-Introducción	94
IV.2-Objetivos	95
IV.2.1-Objetivo general	95
IV.2.2-Objetivos específicos	95
IV.3-Materiales y métodos	96
IV.3.1-Materias primas	96
IV.3.2-Obtención del hidrolizado proteico del alga <i>Ulva spp</i>	96
IV.3.3-Obtención de arabinosilanos a partir de HM.....	97
IV.3.4-Formulación de las microcápsulas.....	97
IV.3.5-Characterización fisicoquímica de las microcápsulas	98
IV.3.6-Digestión gastrointestinal simulada y bioaccesibilidad.....	99
IV.3.7-Characterización del perfil de péptidos	100
IV.3.8-Perfiles de peso molecular de péptidos.....	100
IV.3.9-Perfiles de compuestos fenólicos.....	100
IV.3.10-Ensayo de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA-I)	100
IV.3.11-Actividad antioxidante.....	101
IV.3.12-Ensayo de inhibición de dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV)	102
IV.3.13-Análisis estadísticos.....	102
IV.4-Resultados y discusión	103
IV.4.1-Characterización fisicoquímica de las microcápsulas	103
IV.4.2-Digestión gastrointestinal simulada, bioaccesibilidad y propiedades bioactivas de los péptidos microencapsulados	107
IV.5-Conclusiones parciales.....	114
V-Evaluación de los arabinosilanos como agentes de encapsulación de minerales. Desarrollo de un suplemento dietario a base de arabinosilanos y calcio	116
V.1-Introducción	116
V.2-Objetivos	117

V.2.1-Objetivo general.....	117
V.2.1-Objetivos específicos	117
V.3-Materiales y Métodos	117
V.3.1-Materias primas.....	117
V.3.2-Estudio de la interacción del calcio con los AX-c. Potencial zeta.....	118
V.3.3-Formulación de microcápsulas	118
V.3.4-Characterización fisicoquímica de las microcápsulas.....	118
V.3.4.1-Composición.....	118
V.3.4.2-Contenido de calcio y eficiencia de encapsulación	119
V.3.4.3-Microscopía electrónica de barrido (SEM)	119
V.3.4.4-Potencial Z.....	119
V.3.4.5-Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	120
V.3.4.6-Contenido de ácidos fenólicos.....	120
V.3.5-Bioaccesibilidad gastrointestinal y colónica <i>in vitro</i> del calcio y de los ácidos fenólicos.	121
V.3.5.1-Simulación de la digestión gastrointestinal y fermentación colónica <i>in</i> <i>vitro</i>	121
V.3.5.2- Bioaccesibilidad de calcio y ácidos fenólicos	122
V.3.5.3- Fermentación de ácidos fenólicos	123
V.3.6- Análisis estadísticos	123
V.4- Resultados y discusión	123
V.4.1-Potencial zeta de dispersiones Ca:AX	123
V.4.2-Characterización fisicoquímica de las microcápsulas.....	125
V.4.3-Bioaccesibilidad de calcio.....	128
V.4.4-Bioaccesibilidad intestinal y colónica de compuestos fenólicos	130
V.4.5-Actividad antioxidante de dializados y digeridos	134
V.5-Conclusiones parciales	135
VI-Evaluación de los arabinosilanos como agentes de encapsulación de minerales. Desarrollo de un fortificante a base de arabinosilanos y hierro y estudio de su aplicación en un alimento extrudido	138
VI.1-Introducción	138
VI.2-Objetivos	144
VI.2.1-Objetivo General.....	144
VI.2.2-Objetivos específicos	144
VI.3-Materiales y Métodos.....	144
VI.3.1-Materias primas	144

VI.3.2-Potencial Z de AX-c y mezclas Fe:AX-c	144
VI.3.3-Formulación y elaboración de las microcápsulas de hierro.....	145
VI.3.4-Análisis fisicoquímico de las microcápsulas	145
VI.3.4.1-Composición de las microcápsulas	145
VI.3.4.2-Contenido de hierro y eficiencia de encapsulación.....	145
VI.3.4.3-Contenido de ácido ascórbico	145
VI.3.4.4-Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	146
VI.3.4.5-Potencial Z	146
VI.3.4.6-Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	146
VI.3.4.7-Bioaccesibilidad de hierro.....	146
VI.3.5-Estudio de la fortificación de expandidos de maíz con microcápsulas	147
VI.3.5.1-Formulación y elaboración de extrudidos	147
VI.3.5.2-Characterización de los productos extrudidos	147
VI.3.5.3-Ensayo de estabilidad de los productos extrudidos a temperatura ambiente	148
VI.3.6-Análisis estadísticos.....	148
VI.4-Resultados y discusión	148
VI.4.1-Potencial Z de las dispersiones Fe:AX.....	148
VI.4.2-Characterización fisicoquímica de las microcápsulas	151
VI.4.3-Obtención de expandidos y evaluación de sus propiedades físicas.....	154
VI.4.4-Contenido y retención de ácido ascórbico	155
VI.4.5-Bioaccesibilidad del hierro de las microcápsulas	156
VI.4.6-Bioaccesibilidad de hierro en los productos expandidos.....	156
VI.4.6-Estabilidad de los productos extrudidos fortificados.....	159
VI.5-Conclusiones parciales.....	166
VII-Hidrólisis de arabinosilanos y evaluación de las propiedades fisicoquímicas y bioactivas de los hidrolizados.....	168
VII.1-Introducción.....	168
VII.2-Objetivos.....	170
VII.2.1-Objetivo General	170
VII.2.2-Objetivos específicos.....	170
VII.3-Materiales y métodos	170
VII.3.1-Materias primas	170
VII.3.2-Obtención de los hidrolizados	170
VII.3.3-Characterización de los hidrolizados.....	171
VII.3.3.1-Propiedades fisicoquímicas	171

VII.3.3.1.1-Potencial Z	171
VII.3.3.1.2-Contenido de ácidos fenólicos	171
VII.3.3.1.3-Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)..	172
VII.3.3.1.4-Generación de aminos libres	172
VII.3.3.1.5-Estudios reológicos	172
VII.3.3.2-Propiedades biofuncionales	173
VII.3.3.2.1-Inhibición del radical ABTS ⁺	173
VII.3.3.2.2-Capacidad quelante ligada al Cu ⁺²	173
VII.3.3.2.3-Poder reductor (ferric ion reducing antioxidant power, FRAP)..	174
VII.3.3.2.4-Inhibición de las enzimas α -glucosidasa y α -amilasa	174
VII.3.3.2.5-Determinación de la inhibición de las enzimas lipasa pancreática y colesterol esterasa	174
VII.3.3.2.6-Potencial prebiótico	174
VII.3.3.2.6.1-Cepas y condiciones de cultivo	174
VII.3.3.2.6.2-Crecimiento del probiótico.....	175
VII.3.3.2.6.3-Crecimiento de patógenos	175
VII.3.3.2.6.4-Estimación del potencial prebiótico	175
VII.3.3.2.6.5-Grado de hidrólisis durante la esterilización.....	176
VII.3.4-Bioaccesibilidad in-vitro intestinal y colónica de ácidos fenólicos	176
VII.3.5-Análisis estadísticos	176
VII.4-Resultados.....	176
VII.4.1-Grado de hidrólisis	176
VII.4.2-Potencial Z y tamaño de partículas de los hidrolizados	179
VII.4.3-Impacto de los tratamientos en el contenido de compuestos fenólicos....	181
VII.4.4-Impacto de los tratamientos en la hidrólisis de proteínas residuales del AX- c	183
VII.4.5-Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) de los hidrolizados enzimáticos de AX-c	183
VII.4.6-Ensayos reológicos:.....	185
VII.4.7-Bioaccesibilidad intestinal y colónica de compuestos fenólicos.....	190
VII.4.8-Propiedades bioactivas de los hidrolizados	193
VII.4.8.1-Propiedades antioxidantes	193
VII.4.8.1.1-Inhibición del radical ABTS ⁺	193
VII.4.8.1.2-FRAP.....	194
VII.4.8.1.3-Capacidad quelante ligada al Cu ⁺²	195
VII.4.9-Potencial Prebiótico.....	197

VII.4.9.1-Efecto de la esterilización en autoclave, sobre el grado de hidrólisis de los arabinosilanos.	197
VII.4.9.2-Evaluación del potencial prebiótico.....	197
VII.4.10-Conclusiones parciales	199
Conclusiones.....	200
Bibliografía.....	202

Abreviaturas y Símbolos

AA: Ácido ascórbico

ABTS: ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

AF: Ácido ferúlico

AG: Ácido gálico

AGCC: Ácidos grasos de cadena corta

AX: Arabinoxilano

AX-c: concentrado de arabinoxilanos

BEC: Bioeconomía circular

CFS: Compuestos fenólicos solubles

CMC: Celulosa microcristalina

DPPH: Depleción del 2,2-difenil-1-picrilhidrazil.

EC: Economía circular

FOS: Fructo-oligosacáridos

FRAP: Poder antioxidante reductor del hierro

FTIR: Transformación Infrarroja de Fourier

GOS: Galacto-oligosacáridos

HM: Hez de malta

MD: Maltodextrina

PM: Peso molecular

REAx: Residuo de extracción de arabinoxilanos

REP: Residuo de extracción de proteínas

SEM: Microscopía electrónica de barrido.

Sn: Sobrenadante

WEAX: Arabinoxilanos extraíbles en agua

WUAX: Arabinoxilanos no extraíbles en agua

Resumen

La pérdida de alimentos a lo largo de la cadena productiva afecta significativamente a la seguridad alimentaria, la economía y el medio ambiente. Asimismo, cada vez es más importante el diseño y la implementación de biorrefinerías integradas para el aprovechamiento de todos los subproductos y desechos generados durante el procesamiento de alimentos. La cerveza es una de las bebidas alcohólicas más populares en todo el mundo, siendo la hez de malta (HM) el principal subproducto de la industria cervecera, generándose 20 Kg de HM por cada 100 L de cerveza producida. La HM está compuesta mayoritariamente por hemicelulosa, lignina, celulosa y proteínas que representan aproximadamente el 25, 28, 17 y 20% del peso seco, respectivamente. La hemicelulosa de la HM se compone principalmente de arabinoxilanos (AX). Los arabinoxilanos están formados por una cadena lineal de xilas unidas por enlaces glicosídicos β -(1→4), a la cual se unen residuos de arabinosas mediante enlaces glicosídicos α -(1→3) o α -(1→2), o ambos. Además de las unidades de arabinosa es común encontrar otros sustituyentes minoritarios como son el ácido glucurónico y la galactosa. También presenta ácido ferúlico en su estructura, unido en la posición O-5 de la arabinosa por medio de un enlace éster. Se ha reportado que los AX bloquean radicales libres, contribuyen a inhibir la peroxidación de los lípidos, poseen propiedades prebióticas y antiinflamatorias, disminuyen la absorción de grasa y colesterol y tienen un efecto en el metabolismo de la glucosa a través de diferentes mecanismos. Por estos motivos, los AX, representan una biomolécula de gran interés biofuncional que puede ser obtenida a partir de un subproducto de bajo valor para la industria cervecera, el cual se produce en grandes cantidades.

Un estudio previo realizado en el grupo de investigación permitió obtener un concentrado proteico de HM, dejando un residuo de extracción de proteínas (**REP**) que constituye el material de partida para establecer un proceso de obtención de diferentes fracciones enriquecidas en diversas biomoléculas. El objetivo general de este trabajo fue establecer un proceso de biorefinería completo de la HM, mediante la obtención de compuestos de alto valor agregado a partir del residuo de la obtención de proteínas y péptidos, con especial énfasis en la producción de fracciones de arabinoxilanos, ligninas y celulosa microcristalina y el estudio de sus propiedades tecno y biofuncionales.

Para tal fin, en primer lugar se estudió el proceso de extracción de AX a fin de obtener un buen rendimiento. Para la selección del proceso, se tuvo en cuenta su factibilidad de escalado (escala piloto). Resulta importante destacar que la manera en que se extraen los AX de la pared celular influye en la estructura final del compuesto obtenido. A su vez, la estructura de este heteropolisacárido tiene un gran impacto no sólo en las propiedades fisicoquímicas como la solubilidad y viscosidad, sino también, en las propiedades biofuncionales. Estas propiedades bioactivas dependen en gran medida del peso molecular y de los sustituyentes que posean los AX. Al respecto, se ha observado que la presencia de grupos hidroxilo, ácido urónico y ácidos derivados del hidroxicinámico en las cadenas moleculares de xilanos actúan como potentes donadores de hidrógeno, estabilizando los radicales libres.

A partir del **REP** se estudió en primer lugar la extracción de AX y ácidos fenólicos, mediante su solubilización en medio alcalino. Se evaluaron diferentes condiciones, tales como temperatura y pH del proceso, a fin de obtener el mejor rendimiento posible. Al residuo de estas extracciones (que ha sido reducido en proteínas y hemicelulosa) se lo sometió a un proceso químico para obtener celulosa microcristalina. Luego de la optimización del proceso de extracción en laboratorio y posterior escalado en planta piloto, se obtuvo un concentrado de arbinoxilanos (AX-c) con 71 g 100 g⁻¹ de carbohidratos que representaron el 16,74±2,52% de los sólidos del **REP**. Este concentrado presentó un contenido total de ácido ferúlico y p-cumárico de 30 mg 100 g⁻¹ y de 5 mg 100 g⁻¹, respectivamente. Cabe mencionar que el 68% del contenido total de estos ácidos fenólicos se encontró en su forma libre. Conjuntamente con los AX, se obtuvieron tres fracciones adicionales. La primera correspondió a compuestos fenólicos solubles (610 mg ácido ferúlico 100 g⁻¹), cuyo rendimiento de extracción fue 21,51±0,54 g 100 g⁻¹ de sólidos del **REP**. La segunda fracción fue de lignina (184 mg ácido ferúlico 100 g⁻¹), siendo el rendimiento de extracción 10,00±0,05 g 100 g⁻¹ de sólidos del **REP**. Ambas fracciones presentaron propiedades antioxidantes e hipoglucemiantes. En la última fracción se obtuvo celulosa con un rendimiento de 35,68±1,45 g 100 g⁻¹ de sólidos del **REP**, siendo su cristalinidad de 46%.

Respecto a las propiedades tecno-funcionales, se estudió la capacidad que poseen los AX para actuar como material encapsulante de péptidos bioactivos, calcio y hierro. En lo que refiere a la encapsulación de péptidos, el objetivo principal fue proteger a estos compuestos bioactivos del ambiente gastrointestinal. Al respecto, se pudo establecer que la digestión gastrointestinal tiene un impacto negativo sobre las

propiedades bioactivas de péptidos obtenidos a partir del alga *Ulva spp*, las que fueron reducidas tras el proceso digestivo. Por tal motivo, se procedió al estudio de la encapsulación peptídica mediante secado por aspersión, utilizando como material de pared AX, maltodextrinas y calcio. Posteriormente, se evaluó la capacidad de protección que ejerció el material de pared sobre dichos péptidos luego de un ensayo de digestión gastrointestinal simulada. Se pudo observar que los AX lograron conservar las propiedades antidiabetogénicas y antihipertensivas de los péptidos de *Ulva spp* luego del proceso digestivo *in vitro*, siendo la fórmula sin calcio la de mejor desempeño. Además, el empleo de AX como material de pared incrementó las propiedades antioxidantes de los productos obtenidos luego de la digestión gastrointestinal.

En lo que se refiere a la encapsulación de calcio, el objetivo principal fue desarrollar un suplemento a base de AX y calcio que cubra los requerimientos diarios de este mineral y contribuya con el estado redox intestinal mediante el aporte de compuestos con propiedades antioxidantes. Para ello, se formularon distintas microcápsulas utilizando como material de pared AX y maltodextrinas. Además, se estudiaron tres niveles de calcio. Con las microcápsulas obtenidas se determinó la bioaccesibilidad de calcio y de ácido ferúlico. Se pudo observar que el incremento del contenido de calcio en las microcápsulas aumentó la bioaccesibilidad del mineral, y a su vez, disminuyó la bioaccesibilidad de ácido ferúlico. En este sentido, las microcápsulas con 10,9 g de calcio 100 g⁻¹ presentaron la mayor bioaccesibilidad de calcio total (~37%).

Por último, se estudió la encapsulación de hierro con el fin de proteger a este mineral de los procesos oxidativos sufridos al ser incorporado en una matriz alimentaria. Cabe mencionar que el hierro en su forma ferrosa es más fácilmente absorbido a nivel intestinal. Para tal fin, se formularon microcápsulas utilizando como material de pared AX y maltodextrina. Además, a la formulación se adicionó ácido ascórbico para mantener el hierro en forma soluble. Se estudiaron dos niveles de hierro (12,8 y 24,4 mg Fe g sólidos⁻¹), manteniendo constante la proporción hierro:AX (1:18). Se pudo observar que los AX lograron encapsular al hierro y al ácido ascórbico, protegiendo parcialmente a este complejo de la oxidación durante el proceso de secado por aspersión. Esto permitió, mantener al hierro bioaccesible bajo las condiciones del ambiente gastrointestinal. Posteriormente, las microcápsulas de hierro fueron incorporadas como fortificante a extrudidos de maíz y se evaluó la bioaccesibilidad *in vitro* del mineral. El producto extrudido con agregado de microcápsulas de hierro y

ácido ascórbico presentó buena bioaccesibilidad del mineral. Sin embargo, el material de pared no logró proteger al ácido ascórbico de su degradación durante el proceso térmico de extrusión. Además, se estudió la estabilidad del producto extrudido fortificado almacenado a temperatura ambiente durante 1 año. Los productos fortificados con las microcápsulas con el menor nivel de hierro fueron más estables que el producto fortificado con hierro sin encapsular.

Finalmente, se estudiaron estrategias de modificación del AX-c a fin de obtener productos con diferente longitud de cadena y composición química, y por lo tanto, con distintas propiedades bioactivas. Para tal fin, se estudiaron dos procesos de modificación, uno enzimático, y otro fisicoquímico (ultrasonido y medio ácido). El proceso con enzimas permitió obtener un grado de hidrólisis de AX superior al hallado con ultrasonido y medio ácido (~14% vs. ~2,5%, respectivamente). En los productos hidrolizados enzimáticamente se observaron cambios en el potencial Z de la molécula, disminuyendo el diámetro hidrodinámico y la viscosidad. Además, hubo variaciones en las propiedades antioxidantes, las cuales dependieron del grado de hidrólisis y del mecanismo antioxidante estudiado (inhibición de ABTS⁺, FRAP y capacidad quelante del Cu⁺²). Además, se evaluó el potencial prebiótico de AX-c y de la muestra hidrolizada enzimáticamente, hallándose un buen desarrollo en la población de *Bifidobacteria*, utilizando el AX hidrolizado como fuente de Carbono, respecto al AX-c sin hidrolizar.

A través de este trabajo se logró completar un proceso de biorefinería de la hez de malta que permitió la recuperación de las proteínas, los arabinosilanos, los compuestos fenólicos, la lignina y la celulosa. Finalmente debe destacarse el potencial de este proceso de biorefinería para recuperar biomoléculas de alto valor, facilitando el uso de residuos en las cervecerías, y creando un proceso industrial más sostenible.

Abstract

Food losses along the production chains significantly affect food security, economy and environment. Furthermore, the design and implementation of integrated biorefineries to take advantage of all by-products and waste generated during food processing are becoming increasingly important. Beer is one of the most popular alcoholic beverages worldwide, with brewer's spent grain (BSG) being the main by-product of the brewing industry, with 20 kg of this by-product generated for every 100 L of beer produced. It is mainly composed of lignin, hemicellulose, cellulose and proteins, which represent approximately 28, 25, 17 and 20% of the dry weight. Hemicellulose is a heteropolysaccharide formed by a heterogeneous set of polysaccharides, which in the case of BSG is mainly composed of arabinoxylans (AX). Arabinoxylans are formed by a linear chain of xyloses linked by β -(1 \rightarrow 4) glycosidic bonds, to which arabinose residues are linked by α -(1 \rightarrow 3) or α -(1 \rightarrow 2) glycosidic bonds, or both. In addition to the arabinose units, it is common to find other minor substituents such as glucuronic acid and galactose. It also has ferulic acid in its structure, linked in the O-5 position of the arabinose by means of ester bond. It has been reported that AX block free radicals, contribute to inhibit lipid peroxidation, have prebiotic and anti-inflammatory properties, decrease fat and cholesterol absorption and have an effect on glucose metabolism through different mechanisms. For these reasons, the AX are biomolecules of interest, which can be obtained from a low-value by-product of the brewing industry produced in large quantities.

A previous study carried out by the research group allowed obtaining a protein concentrate from BSG, leaving a protein extraction residue (PER) that constitutes the starting material to establish a process for obtaining different fractions enriched in different biomolecules. The general objective of this work was to establish a complete biorefinery process of BSG, by obtaining high added value compounds from the residue of obtaining proteins and peptides, with special emphasis on the production of fractions of arabinoxylans, lignins and microcrystalline cellulose and the study of their techno and biofunctional properties.

For this purpose, first the AX extraction process was studied in order to obtain good yield. For the selection of the process, its feasibility of scaling (pilot scale) was taken into account. It is important to point out, that the way in which the AXs are extracted from the cell wall influences the final structure of the compound obtained. The structure has a great impact not only on the physicochemical properties such as solubility and viscosity, but also on the bioactive properties. These properties depend largely on the molecular weight and the substituents that the AX possess. The presence of hydroxyl groups, uronic acid, and hydroxycinnamic acids in the xylan molecular chains act as hydrogen donors, stabilizing free radicals.

From the REP, the extraction of AX and phenolic acids was first studied by solubilizing them in an alkaline medium. Different conditions were evaluated, such as temperature and pH of the process, in order to obtain the best possible yield. The residue from these extractions (which has been reduced in proteins and hemicellulose) was subjected to a chemical process to obtain microcrystalline cellulose. After the optimization of the extraction process in the laboratory and subsequent scaling in pilot plant, a concentrate of arbinoxylans (AX-c) with 71 g 100 g⁻¹ of carbohydrates was obtained in a pilot plant, which represented 16.74±2.52% of the solids of the PER. This concentrate presented 30 mg 100 g⁻¹ ferulic acid content and 5 mg 100 g⁻¹ of p-coumaric acid, of which 68% was in free form for both compounds. Together with the AX, three additional fractions were obtained. The first corresponded to soluble phenolic compounds (610 mg ferulic acid 100 g⁻¹) whose extraction yield was 21.51±0.54 g 100 g⁻¹ of REP solids. The second fraction was lignin (184 mg ferulic acid 100 g⁻¹), which was obtained with a yield of 21.51±0.54% of the solids of the PER. Both fractions showed antioxidant and hypoglycemic properties. In the last fraction, cellulose was obtained with a yield of 35.68±1.45 g 100 g⁻¹ of REP solids, with a crystallinity of 46%.

Regarding the techno-functional properties, the capacity of AX to act as encapsulating material for bioactive peptides, calcium and iron was studied. Regarding peptide encapsulation, the main objective was to protect these bioactive compounds from the gastrointestinal environment. In this regard, it was established that gastrointestinal digestion has a negative impact on the bioactive properties of peptides obtained from the algae *Ulva spp*, which were reduced after the digestive process. For this reason, the study of peptide encapsulation by spray drying was carried out, using AX, maltodextrins and calcium as wall material. Subsequently, the protective capacity

of the wall material on these peptides was evaluated after a simulated gastrointestinal digestion test. It was observed that the AX managed to preserve the antidiabetogenic and antihypertensive properties of the *Ulva spp* peptides after the *in vitro* digestive process, with the calcium-free formula being the one with the best performance. Additionally, the use of AX as wall material increased the antioxidant properties of the products obtained after gastrointestinal digestion.

Regarding calcium encapsulation, the main objective was to develop a supplement based on AX and calcium that covers the daily requirements of this mineral and contributes to the intestinal redox state by providing compounds with antioxidant properties. To do this, different microcapsules were formulated using AX and maltodextrins as wall material. For this purpose, different microcapsules were formulated using AX and maltodextrins as wall material. In addition, three levels of calcium were studied. The bioaccessibility of calcium and ferulic acid was determined with the microcapsules obtained. It was observed that the increase in the calcium content of the microcapsules increased its bioaccessibility, and in turn decreased the bioaccessibility of ferulic acid. The microcapsules with 10.9 g of calcium 100 g⁻¹ presented the highest bioaccessibility of total calcium (~37%).

Finally, the encapsulation of iron was studied in order to protect this mineral from the oxidative processes suffered when incorporated into a food matrix. It is worth mentioning that iron in its ferrous form is more easily absorbed at the intestinal level. For this purpose, microcapsules were formulated using AX and maltodextrin as wall material. In addition, ascorbic acid was added to the formulation to keep the iron in soluble form. Two levels of iron were studied (12.8 and 24.4 mg Fe g solids⁻¹), keeping the iron:AX ratio constant (1:18). It was observed that the AX managed to encapsulate the iron and ascorbic acid, partially protecting this complex from oxidation during the spray drying process. This allowed the iron to remain bioaccessible under the conditions of the gastrointestinal environment. Subsequently, iron microcapsules were incorporated as a fortifier into corn extrudates and the *in vitro* bioaccessibility of the mineral was evaluated. The extruded product with the addition of iron microcapsules and ascorbic acid presented good bioaccessibility of the mineral. However, the wall material failed to protect the ascorbic acid from degradation during the thermal extrusion process. In addition, the stability of the fortified extruded product stored at room temperature for 1 year was studied. The products fortified with the microcapsules

with the lowest iron level were more stable than the product fortified with unencapsulated iron.

Finally, AX-c modification strategies were studied in order to obtain products with different chain lengths and chemical compositions, and therefore, with different bioactive properties. For this purpose, two modification processes were studied: one enzymatic and the other physicochemical (ultrasound and acid medium). The enzymatic process proved to be more efficient with a higher degree of hydrolysis compared to the physicochemical one (~14% vs ~2.5%). In the enzymatically hydrolyzed products, changes in the Z potential of the molecule were observed, decreasing the hydrodynamic diameter and viscosity. In addition, there were variations in the antioxidant properties, which depended on the degree of hydrolysis and the antioxidant mechanism studied (inhibition of ABTS⁺, FRAP and Cu⁺² chelating capacity).

Through this work, it was possible to complete a Brewer's spent grain biorefinery process that allowed the recovery of proteins, arabinoxylans, phenolic compounds, lignin and cellulose. Finally, the potential of this biorefinery process to recover high-value biomolecules should be highlighted, facilitating the use of waste in breweries, and creating a more sustainable industrial process.

I-INTRODUCCIÓN GENERAL

I-Introducción general

I.1-Desechos de la industria y economía circular

La bioeconomía puede definirse como la “producción de recursos biológicos renovables y la conversión de estos recursos y flujos de desechos en productos con valor agregado, tales como alimentos: piensos, bioproductos y bioenergía” (Comisión Europea, 2012).

Mientras que algunos autores (Carrez y Van Leeuwen, 2015; Sheridan, 2016) consideran que la bioeconomía es “circular por naturaleza”, Hetemäki et al. (2017) alertan sobre el riesgo de seguir un enfoque lineal de negocios como siempre, si no se consideran los principios de una economía circular (EC). La EC es definida por la Comisión Europea (2015) en términos de minimizar la generación de residuos y mantener el valor de los productos, materiales y recursos durante el mayor tiempo posible.

La fusión de estos dos conceptos ha dado lugar al término “bioeconomía circular” (BEC), que apareció alrededor de 2015 y se utiliza cada vez más en publicaciones científicas desde 2016. Sin embargo, sólo ha habido unos pocos intentos de definir el término y describir lo que realmente implica el concepto de BEC. Además, falta una perspectiva ascendente sobre el papel de la BEC en los grupos regionales de bioeconomía. Esta perspectiva es particularmente relevante, ya que muchas estrategias clave conducen hacia una bioeconomía circular y más eficiente en el uso de recursos. Por ejemplo, las biorrefinerías integradas y el uso en cascada de la biomasa dependen de una estrecha cooperación de actores locales de la agricultura, la industria, la investigación y las instituciones públicas regionales. En este sentido, cada vez se reconoce más el importante papel de los *clusters* regionales en el impulso de la bioeconomía europea (Stegmann et al. 2020; Kircher, 2012).

Las biorrefinerías (integradas) se consideran una parte importante del BEC y una medida para mejorar la eficiencia de los recursos y el valor total de la biomasa (Hetemäki et al. 2017; Temmes y Peck, 2020). De Jong et al. (2012) definen a la biorrefinería como “el procesamiento sostenible de la biomasa en un espectro de productos comercializables (alimentos, piensos, materiales, productos químicos) y energía (combustibles, energía, calor)”. Las biorrefinerías integradas son una combinación de varias tecnologías de conversión de biomasa que permiten una mayor flexibilidad y reducción de costos (McCormick y Kautto, 2013). Por lo tanto, facilitan el

uso de corrientes secundarias y desechos, y facilitan la producción combinada de productos de alto valor (por ejemplo, productos químicos finos) con productos de menor valor (por ejemplo, bioenergía).

A pesar de las grandes cantidades y posibilidades de reutilización de los subproductos (sólidos y líquidos) generados por la industria cervecera, la adecuada disposición de estos subproductos ha impuesto severos problemas para las transiciones de producción circular y más limpia a nivel mundial. Estos desafíos son aún más importantes para las pequeñas cervecerías debido a la reconocida falta de recursos, como conocimientos, finanzas y personal calificado (Bonato et al. 2022). Se ha observado que se necesitan alternativas más eficientes y sostenibles para las operaciones de las pequeñas cervecerías frente a los desafíos impuestos para la eliminación adecuada de residuos y las restricciones regulatorias. En este caso, los residuos con un impacto ambiental significativo incluyen el bagazo de malta o bagazo cervecero o hez de malta (HM), la turba y la levadura residual (Su et al. 2021; García-García et al. 2017).

La urgencia de realizar estudios que examinen la gestión de residuos sólidos y las opciones de valorización de la biomasa para los subproductos en las cadenas de valor de las pequeñas cervecerías se debe a que la industria cervecera genera grandes cantidades de HM (Codina-Torrella et al. 2021; Czubaszek et al. 2021; Lynch et al. 2016; Vanreppelen et al. 2014). La misma es el subproducto más abundante resultante del proceso de elaboración de cerveza (Barbu et al. 2021; Ran et al. 2021; Lynch et al. 2016). Sin embargo, aunque estos desechos sólidos podrían reciclarse inmediatamente, en la práctica no reciben suficiente atención por parte de la cadena de valor como producto básico. Frecuentemente, su disposición se convierte en un problema para las empresas del sector, lo que lleva a la necesidad de desarrollar alternativas no sostenibles para su gestión y disposición (Bonato et al. 2022). En este sentido, considerando que en promedio el 85% de los residuos de las cervecerías son HM (Ivanova et al. 2017), una de las alternativas es la reventa de dicho residuo en mercados secundarios, eliminando la necesidad de su eliminación (Olajire, 2020).

La reutilización y el reciclaje son estrategias esenciales para transformar los residuos en nuevos recursos valiosos (Ricciardi, 2020). Además, dichas estrategias permiten soluciones circulares para mantener el valor de los productos y recursos durante el mayor tiempo posible (Stelick et al. 2021; Rigamonti et al. 2019; Kirchherr et al. 2017). Hoy más que nunca es necesario ampliar el potencial de las estrategias sostenibles para sectores sub-explotados, como las cadenas de valor de las pequeñas

cervecerías, para avanzar en el conocimiento que se traduzca en mejores decisiones para la disposición o valorización de residuos (Yoo et al. 2021; Kral et al. 2019). Por lo tanto, son social y estratégicamente necesarios estudios que aborden aspectos de infraestructura de gestión de residuos (Liu et al. 2017), producción más limpia o estrategias de producción de productos con valor añadido a partir de los residuos de las empresas cerveceras (Borel et al. 2018).

I.2- Hez de malta

I.2.1-Grano de cebada

I.2.1.1- Partes del grano

En general, el grano de cebada tiene forma de huso y mide de 7 a 12 mm de largo (Jadhav et al. 1998). Este grano es rico en almidón y proteínas, y consta de tres partes principales: el germen (embrión), el endospermo (que comprende la aleurona y el endospermo almidonoso) y las cubiertas de grano (Mussatto et al. 2006).

En la **Figura I.1** se muestran sus partes constitutivas y su sección transversal.

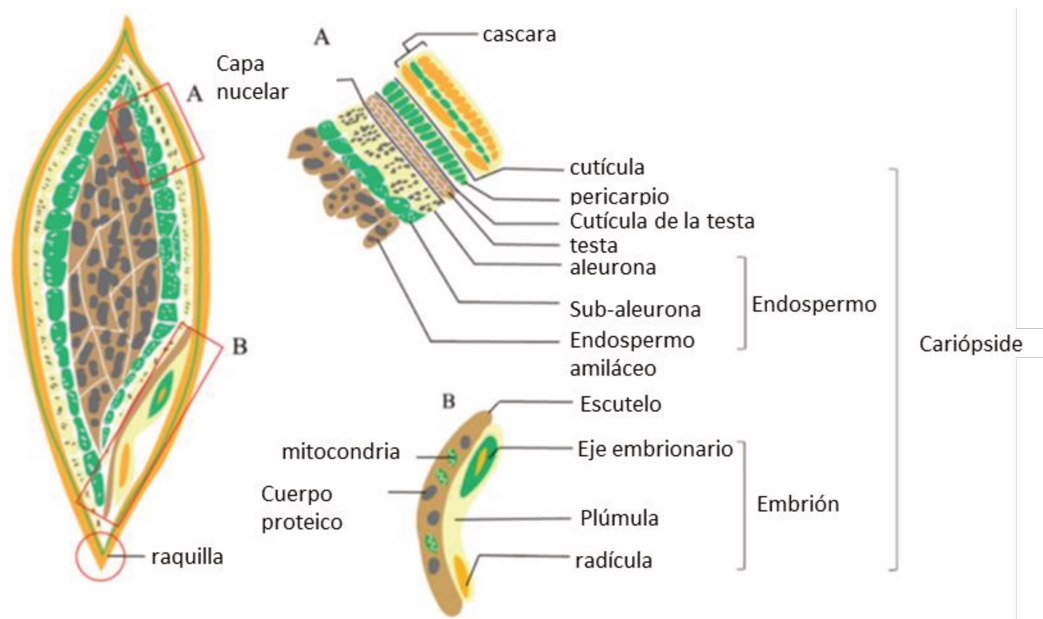


Figura I.1- Grano de Cebada (Geng et al. 2022).

La cáscara es el componente más externo de los granos maduros, que se compone principalmente de celulosa, lignina y silicio. Las cáscaras están estrechamente adheridas a la cariópside en la cebada vestida, mientras que están separadas en la cebada desnuda.

La cariósida representa la mayor parte de todo el grano de cereal maduro (Evers et al. 1999). La cariósida de la cebada comprende principalmente el embrión y el endospermo, que a su vez está rodeado por la capa nucelar, la testa (cubierta de la semilla) y el pericarpio (cubierta del fruto) (**Figura I.1**). El intervalo entre la capa de la nucela y la testa es el más delgado, mientras que el intervalo entre la testa y el pericarpio es el más grueso (Brennan et al. 2017).

El endospermo ocupa la mayor parte de la composición del grano y está formado por aleurona, subaleurona y endospermo almidonoso (Zheng y Wang, 2014). La aleurona de la cebada está formada por células multicapa, generalmente tres capas celulares (Bacic y Stone, 1981; Becraft y Yi, 2011). La aleurona es rica en nutrientes como lípidos, proteínas, minerales, vitaminas del tipo B, como niacina y folatos, y algunos otros micronutrientes (Brouns et al. 2012; Zheng y Wang, 2014). La proteína de almacenamiento se acumula en forma de gránulos en las células de aleurona (Zheng y Wang, 2014). Los gránulos de almidón se acumulan principalmente en el endospermo almidonoso interno, mientras que más proteínas se acumulan en la subaleurona intermedia entre la aleurona externa y el endospermo almidonado interno (Zheng y Wang, 2014).

El embrión es el componente más importante de los granos para la generación filial (Evers y Millar, 2002), que se adhiere a un lado del raquis y se ubica en el lado dorsal de la cariósida (**Figura I.1**). El embrión consta principalmente de eje embrionario, plúmula y radícula, que suministran nutrientes para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Evers y Millar, 2002). El embrión está bien protegido y rodeado por el coleóptilo y la coleorriza. El escutelo es un tejido protector externo, aplanado y hundido, que se conecta con el eje embrionario y el endospermo en ambos lados (Evers y Millar, 2002).

I.2.1.2- Composición de los granos de cebada

Los carbohidratos son el componente mayoritario del grano, representando entre 78 y 83 g 100 g⁻¹ del grano en base seca. Pueden ser de tres tipos: monosacáridos (3-8% del total de carbohidratos), no estructurales como el almidón, y polisacáridos de la pared celular (β -glucanos y AX) (Geng et al. 2022). El nivel de proteínas en los granos varía entre 10 y 20 g 100 g⁻¹ del grano, y se encuentra principalmente en el endospermo. Las prolaminas, predominantemente hordeínas, representan el 50% de la fracción proteica

de la cebada. El contenido de lípidos varía entre 2 y 3 g 100 g⁻¹ del grano, y se encuentran principalmente en el endospermo (Raj et al. 2023).

El grano de cebada es una excelente fuente de fibra dietaria soluble e insoluble y otros componentes tales como la vitamina E (incluyendo tocotrienoles), vitaminas del complejo B, minerales y compuestos fenólicos (Madhujith et al. 2009). Una de las principales vitaminas de la cebada es la vitamina E, que se encuentra en las capas externas del grano, su contenido no cambia durante el malteado, y suele encontrarse en la hez de malta.

Los minerales se encuentran principalmente en las capas externas del grano, y los más abundantes son el potasio (0,37-0,50 g 100 g⁻¹ de materia seca) y el fósforo (0,33-0,60 g 100 g⁻¹ de materia seca) (Geng et al. 2022).

El grano también contiene fitoquímicos tales como: lignanos, tocoles, fitoesteroles, flavonoides, ácidos fenólicos y folatos. La cebada tiene una gran cantidad de flavonoides, principalmente catequina (62-300 mg g⁻¹). En cuanto a los ácidos fenólicos el principal es ácido ferúlico (68% del total), seguido por ácido cumárico, vainílico, sirínico, 2-4-dihidroxibenzoico y sinápico. Estos compuestos fenólicos se hallan principalmente en las capas externas del grano, y su concentración varía entre 604-1346 mg g⁻¹ (Holtekjølen et al. 2006). El pericarpio de los granos de cebada contiene antocianinas y flavanoles, principalmente en su forma glicosilada (62-300 mg g⁻¹) (Kim et al. 2007). A pesar de representar sólo entre el 10 y el 20 % del peso total del grano, las cáscaras representan alrededor del 45 % de la capacidad antioxidante total medida en las harinas integrales recubiertas (Holtekjølen et al. 2006).

Los principales componentes de la pared celular son celulosa, hemicelulosa y lignina. La celulosa es el componente estructural más importante de las células de las plantas, y está constituida por moléculas de β-D-glucosa unidas mediante enlaces β-1,4-O-glucosídicos (Rubin 2008). La hemicelulosa es el segundo componente más abundante en la biomasa lignocelulósica. Está compuesta por una familia de monosacáridos de 5 y 6 átomos de carbono, y tiene la función de unir las fibras de celulosa en microfibrillas entrelazadas con lignina, creando una compleja red de enlaces que le da rigidez estructural (Rubin 2008). Finalmente, la lignina es un polímero tridimensional de unidades fenilpropanoides que puede considerarse como el pegamento celular que brinda al tejido vegetal y a las fibras individuales resistencia a la compresión y rigidez, además de proporcionar resistencia a insectos y patógenos (Del rio et al. 2007).

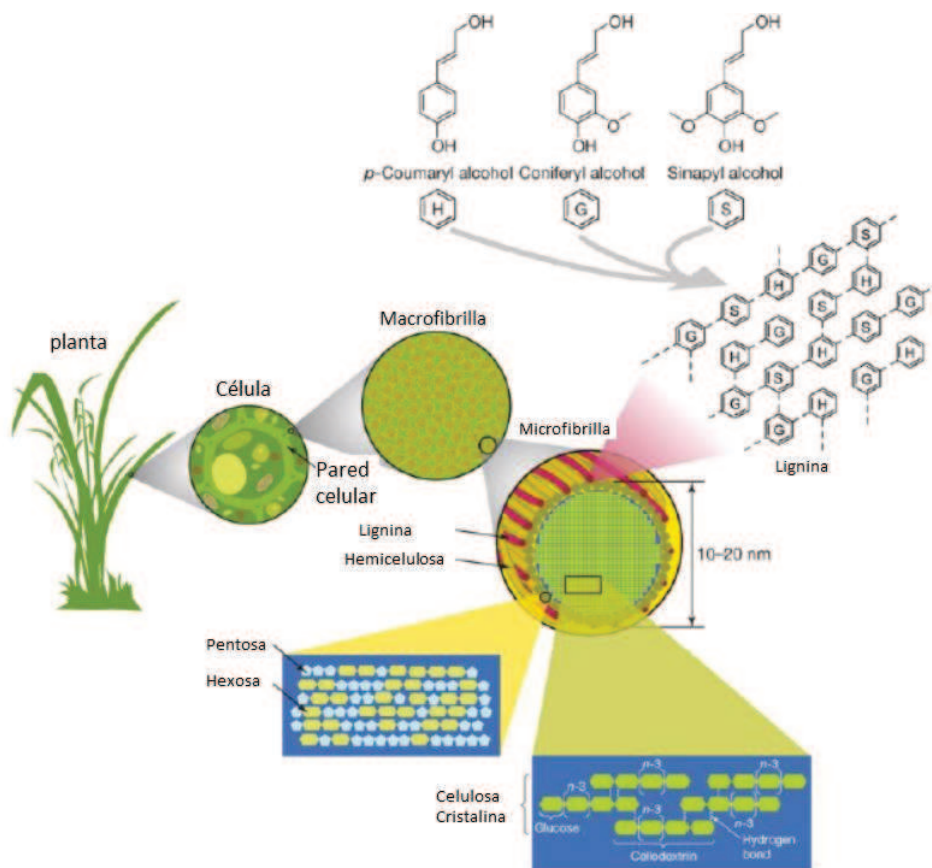


Figura I.2- Esquema de la pared celular y sus componentes: Celulosa, Hemicelulosa y Lignina (Rubin 2008).

I.2.2-Proceso de producción de cerveza

En el proceso de malteado, la cebada cosechada se limpia y se clasifica según el tamaño. Después de un período de latencia de 4 a 6 semanas, la cebada se maltea en un proceso de germinación controlado, que sirve para aumentar el contenido enzimático del grano. El malteado comprende tres pasos: (1) remojo, (2) germinación y (3) secado o cocción (Mussatto et al. 2006).

Durante el remojo, los granos de cebada limpios se colocan en tanques con agua a una temperatura entre 5 y 18 ° C durante aproximadamente 2 días. La hidratación durante el remojo inicia la germinación y conduce a la activación del metabolismo de la aleurona. Después de remojar, la cebada se transporta a un recipiente de germinación, donde se mantiene en contacto con una corriente de aire húmedo que fluye a través del lecho de granos manteniendo la temperatura entre 15 y 21 °C. Este paso promueve la síntesis y activación de enzimas en la aleurona y el endospermo amiláceo, incluidas las amilasas, proteasas, β -glucanasas, etc. Al final del proceso de germinación, que normalmente dura 6 o 7 días, el endospermo se modifica de manera completa y

uniforme. La cebada malteada se seca a 40–60 °C hasta un contenido de humedad del 4–5%, para evitar la contaminación microbiana y generación de componentes de sabor indeseados. Después de este paso, la malta seca se almacena durante 3 o 4 semanas, para alcanzar la homogeneidad y el equilibrio (Mussatto et al. 2006).

En la cervecería, la cebada malteada se muele, se mezcla con agua y la temperatura aumenta lentamente (de 37 a 78 ° C) para promover la hidrólisis enzimática de los componentes de la malta, principalmente almidón, pero también otros componentes como las proteínas, β -glucanos (enlaces: 1→3 y 1→4) y arabinosilanos, y para solubilizar sus productos de hidrólisis. Durante este proceso, el almidón se convierte en azúcares fermentables (principalmente maltosa y maltotriosa) y azúcares no fermentables (dextrinas). Además, las proteínas se degradan parcialmente a polipéptidos y aminoácidos. Esta conversión enzimática, conocida como etapa de maceración, produce un líquido dulce denominado mosto. La parte insoluble, no degradada del grano de cebada malteada, se deja sedimentar para formar un lecho y el mosto dulce se filtra a través de él (filtrado). El mosto filtrado se utiliza como medio de fermentación de las levaduras para producir cerveza (Dragone et al. 2002; Linko et al. 1998). La fracción sólida residual se conoce como "granos gastados" o "granos agotados" de cervecería.



Figura I.3- Representación esquemática del proceso de elaboración de cerveza que resulta en la producción de granos gastados o agotados (heza de malta) a partir de granos de cebada (Mussatto et al. 2006).

I.2.3-Composicion de la HM

En la **Tabla I.1** se muestra la composición de la HM de acuerdo a diferentes autores. Como se mencionó anteriormente, se trata de un material que contiene celulosa (12-25%), hemicelulosa (20-30%), lignina (12-20%) y proteínas (15-30%) (Xiros et al. 2008; Steiner et al. 2015).

Tabla I.1. Composición química de la hez de malta de acuerdo a diferentes autores
(período 2006-2016)

Componentes	Mussatto et al. (2006)	Xiros et al. (2008)	Robertson et al. (2010)	Meneses et al. (2013)	Steiner et al. (2015)	Kemppainen et al. (2016)
Proteínas	15,2	14,0	20,0-24,0	24,7	19,0-30,0	22,6
Lípidos	n.d.	13,0	n.d.	n.d.	10,0	11,4
Almidón	n.d.	2,9	2,0-8,0	n.d.	4,0	3,1
Cenizas	4,6	3,2	n.d.	4,2	2,0-5,0	4,1
Celulosa	16,8	11,5	n.d.	21,7	12,0-25,0	13,2
Hemicelulosa	28,4	40,0	22,0-29,0	19,2	20,0-25,0	25,3
Lignina	27,8	11,9	13-17	19,4	12,0-28,0	19,6**
Fenólicos	n.d.	n.d.	0,7-0,9	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. No determinado

*valores expresados en g por 100g de material seco

**suma de lignina ácido insoluble (14,7 g 100 g⁻¹) y lignina ácido soluble (4,9 g 100g⁻¹)

La composición de la HM puede variar significativamente debido a variables intrínsecas asociadas al ciclo de cultivo agronómico de la cebada o a las diferentes condiciones a las que se somete el material a nivel industrial tales como malteado, maceración, agregado de adjuntos, etc. Dada la variada composición, gran volumen generado y actual sub-utilización de la HM, las investigaciones científicas relacionadas a su aprovechamiento han ido aumentando a lo largo de los años (Aliyu & Bala, 2011; Buffington, 2014, Zeko-Pivac et al. 2022; Mussatto et al. 2006).

I.3-Carbohidratos no digeribles

I.3.1-Arabinosilanos

I.3.1.1-Estructura química

La hemicelulosa es el componente principal de la HM y puede estar presente en un nivel de hasta 40% en peso seco. Este heteropolisacárido está constituido principalmente por arabinosilanos (AX) (Lynch et al. 2016). Estos hidratos de carbono poseen diversos patrones de sustitución y grado de polimerización. Están formados por una cadena lineal de xilosas unidas por enlaces β -(1 \rightarrow 4) glicosídicos, a la cual se unen residuos de arabinosas mediante enlaces glicosídicos α -(1 \rightarrow 3) o α -(1 \rightarrow 2), o ambos (Figura I.4).

La xilosa puede presentar dos grados de sustitución de acuerdo con el número de residuos de arabinosa: mono-sustituido o di-sustituido. Además de las unidades de arabinosa, es común encontrar otros sustituyentes minoritarios como son el ácido glucurónico, galactosa y ácido ferúlico unido en la posición O-5 de la arabinosa por medio de un enlace éster (Morales-Ortega et al. 2013).

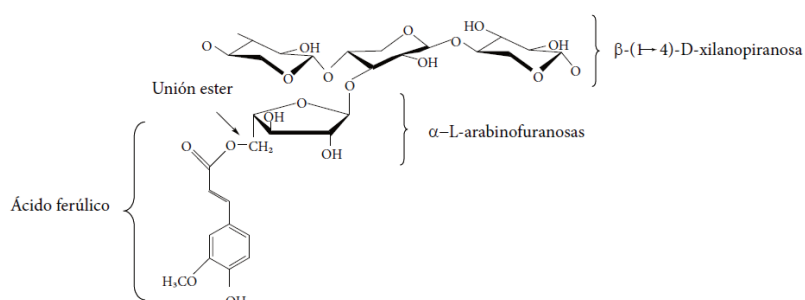


Figura I.4- Estructura general de los arabinosilanos encontrados en cereales (Morales-Ortega et al. 2013).

El término “grado de sustitución” utilizado en la descripción de los AX se refiere al número de unidades de arabinosas unidas a la cadena principal de xilosas, y también se describe como la relación arabinosa-xilosa (A/X). Tanto el grado de sustitución como la distribución de las cadenas laterales son factores importantes en las características fisicoquímicas de los arabinosilanos (Morales-Ortega et al. 2013).

En función de su solubilidad, los arabinosilanos se pueden clasificar en: extraíbles en agua (WEAX, *water extractable arabinosilano*) y no extraíbles en agua (WUAX, *water unextractable arabinosilano*). Los WEAX son extraíbles a temperatura ambiente, mientras que los WUAX requieren de un tratamiento alcalino para su solubilización. Esto implica que los WEAX de la cebada se pierden en el proceso de malteado y

durante la fabricación de cerveza. Además de la solubilidad, los WEAX y los WUAX difieren en su estructura. Los WUAX poseen un peso molecular más alto y mayor diversidad en las cadenas laterales que los WEAX. Esto se debe a que contienen ácido glucurónico, galactosa y grupos acetilo como sustituyentes.

En los cereales los WEAX se encuentran principalmente en el endospermo, y los WUAX se ubican tanto en la capa aleurona como en el pericarpio. La cantidad de AX en un tejido vegetal puede variar dependiendo del género, así como también por factores ambientales y el estadio de desarrollo. En términos generales, el contenido de WEAX en el endospermo de los cereales es menor que el de WUAX en el pericarpio (Morales-Ortega et al. 2013).

En la pared celular intacta de los granos de cereal, la mayoría de los AX y otros polímeros están reticulados mediante: puentes intercatenarios de ácido diferúlico de los AX y enlaces éster entre los grupos carboxilo de los ácidos urónicos y/o los grupos hidroxilo de AX con otros componentes de la pared. Estos enlaces cruzados dan origen a una red estructural que no es soluble en agua. Por lo tanto, una proporción importante de los AX en los granos de cereal no puede extraerse fácilmente en medios acuosos, requiriendo de tratamientos alcalinos o enzimáticos (Zhang et al. 2014).

Otro factor que influye sobre la solubilidad de los AX es el grado de sustitución que presenta la xilosa con unidades de arabinosa. El contenido de arabinosa en el AX, así como su distribución a lo largo de la cadena de xilosa, impacta en las interacciones establecidas entre las moléculas de AX, y entre éstas y otros polisacáridos, modificando la solubilidad de la molécula. Al respecto, Andrewartha et al. (1979) observaron que la remoción de las uniones laterales de arabinosa en la molécula de AX de trigo empleando α -L-arabinofuranosidasa provoca un descenso considerable de la solubilidad. Además, estos autores encontraron que la proporción crítica de A/X para mantener la solubilidad de la molécula fue de 0,43 (Morales-Ortega et al. 2013).

I.3.1.2-Métodos de extracción de AX

Se han reportado diferentes tipos de tratamientos para extraer los AX, los cuales pueden dividirse en químicos, físicos y biológicos (Zhang et al. 2014).

I.3.1.2.1-Métodos químicos

Uno de los métodos químicos propuestos para obtener AX es la **extracción alcalina**. El álcali altera los enlaces por puente de hidrógeno y covalentes, debilitando la matriz de la pared celular con la consecuentemente liberación de los polisacáridos

constituyentes (Fincher y Stone, 1986). Al respecto, los iones hidroxilo interrumpen los enlaces de hidrógeno entre la celulosa y la hemicelulosa, y también rompen los enlaces éster, lo que conlleva a la solubilización parcial de la hemicelulosa (Cyran et al. 2004). Las condiciones alcalinas también modifican la carga de los residuos de ácido urónico a su forma aniónica, lo que provoca la repulsión entre las diferentes moléculas, contribuyendo con la extracción de los AX (Zhang et al. 2014). El tratamiento alcalino es una forma eficiente de extraer AX de los materiales de la pared celular. Sin embargo, cambia las propiedades bioactivas de los mismos al hidrolizar algunos grupos funcionales de la molécula tales como el ácido ferúlico (Chen et al. 2019a).

Por otra parte, las condiciones alcalinas han demostrado ser las más efectivas para la solubilización de proteínas de HM (Niemi et al. 2013a). No obstante, la lignina de HM es parcialmente soluble en álcali (pH 10) (Niemi et al. 2012), lo que puede crear desafíos en la extracción de AX a partir de HM, principalmente en lo referido a la pureza (Doner y Hicks, 1997). Se ha demostrado que el peróxido alcalino es un reactivo eficaz para la deslignificación y mejoramiento de la blancura de las hemicelulosas de los cereales (Doner y Hicks, 1997; Pan et al. 1998). En los medios alcalinos, el peróxido de hidrógeno forma el anión hidroperóxido (Peng et al. 2012), lo que produce la oxidación de las estructuras de lignina al reaccionar con los grupos carboxilos, rompiendo algunos enlaces inter-unitarios, permitiendo la separación de lignina y hemicelulosas.

Por otra parte, se ha observado que los iones Ba^{+2} pueden interactuar específicamente con las pentosas de los AX, facilitando la extracción de este heteropolisacárido (Fincher y Stone, 1986). En este sentido, Gruppen et al. (1991) introdujeron el uso de hidróxido de bario como extractor primario para WUAX. Estos autores observaron que los iones de bario mejoraron la separación de AX y β -glucanos, lo que resultó en una extracción selectiva de los WUAX a partir de harina de trigo (80%). De igual modo, Bergmans et al. (1996) observaron que el empleo de bario permite extraer hasta un 50% de los WUAX de salvado de trigo.

Otro de los métodos químicos propuestos para obtener AX es la **extracción ácida**. Xu et al. (2006) compararon el efecto de varios tratamientos ácidos que incluyeron ácido acético, ácido fórmico, metanol y etanol combinados con HCl al 0,1 % (V/V) a 85 °C durante 4 h, sobre los rendimientos de extracción de AX de salvado de trigo. Estos autores observaron que la extracción con los solventes orgánicos (metanol y etanol) sin adición de ácido resultó en una disminución del rendimiento de extracción.

No obstante, el empleo de 3 volúmenes de etanol al 95% permitió extraer más del 90% de la lignina, permaneciendo insoluble la hemicelulosa. De acuerdo a estos estudios, la lignina y la proteína fueron co-extraídas y sólo pudieron separarse parcialmente por precipitación ácida, lo que sugiere solubilidades similares e interacciones fuertes entre estos componentes. Bajo las condiciones de extracción ácida de AX puede ocurrir hidrólisis química, viéndose degradados los AX a compuestos de muy bajo peso molecular, los cuales son solubles en solventes orgánicos. Esto puede conducir a la pérdida de AX durante la extracción con la consecuente disminución en los rendimientos (Xu et al. 2006).

I.3.1.2.2-Métodos enzimáticos

La acción de las xilanasas da como resultado la solubilización parcial y extracción de WUAX, a su vez, conduce a la despolimerización de WEAX. Las endoxilanasas pueden atacar el esqueleto de xilano, escindir los enlaces β -(1,4) internos de manera aleatoria y penetrar en la pared celular, produciendo una mezcla de xilooligosacáridos no sustituidos. De esta manera, una porción de los WUAX se torna soluble y extractable.

Las xilanasas más efectivas pertenecen a la familia de las glucósido- hidrolasas (GH), a saber, GH10 y GH11. Las GH10 requieren dos residuos de xilopiranosas no sustituidos consecutivos para atacar el esqueleto de xilano y son capaces de escindir el enlace glucosídico con residuos de xilopiranosas sustituidos con ácido glucurónico o arabinosa. Por otro lado, las GH11 requieren tres residuos de xilopiranosas no sustituidos consecutivos y no hidrolizan los residuos sustituidos (Biely et al. 2016). Las GH10 son más activas en AX solubles, mientras que las xilanasas GH11 tienen una mayor selectividad para sustratos insolubles, exhibiendo mayor capacidad hidrolítica sobre la pared celular (Zhang et al. 2014).

De acuerdo a Bastos et al. (2018), en el salvado de trigo despalillado, los AX hidrolizados por las xilanasas GH11 exhibieron relaciones A/X más bajas (0,23 - 0,28) que las producidas por las xilanasas GH10 (0,38 - 0,43), lo que indica los distintos patrones de acción. El empleo de estas xilanasas permite recuperar AX con un rendimiento de 50,7%, permaneciendo inalterado el nivel de ácido diferúlico, aunque el contenido en ácidos ferúlico y p-cumárico puede disminuir (Beaugrand et al. 2004).

Por otra parte, los tratamientos enzimáticos producen fracciones de AX de bajo peso molecular con un menor rendimiento de extracción que la hidrólisis alcalina,

dando lugar a extractos con diferentes biofuncionalidades (Fadel et al. 2018). Los obstáculos como la estructura cristalina de la lignocelulosa y la presencia de inhibidores enzimáticos, a menudo, limitan el proceso hidrolítico llevado a cabo por las xilanasas, lo que disminuye el rendimiento de extracción. Sin embargo, la extracción alcalina promueve la liberación de ácido ferúlico a partir del AX, obteniéndose fracciones de este heteropolisacárido con una menor bioactividad respecto al proceso enzimático (Zhou et al. 2010). Además, el método enzimático muestra ventajas ecológicas y económicas respecto a métodos químicos cuando se usa en la producción de alimentos a escala industrial.

I.3.1.2.4-Métodos físicos

Entre los métodos físicos se puede mencionar el tratamiento de explosión de vapor (SE) que se describe como un proceso termo-mecano-químico en el que la descomposición de la biomasa es asistida por el calor como vapor (termo-), por fuerzas de cizallamiento por la expansión de la humedad (mecano-) y por la hidrólisis auto catalizada de enlaces glucosídicos de la hemicelulosa (-químico) (Gírio et al. 2012). En SE, la biomasa se calienta rápidamente al introducir vapor saturado a alta presión en un reactor (preferiblemente a temperaturas entre 160 y 240 ° C y presiones de 0,69-4,83 MPa), durante un período corto (segundos o minutos). A alta presión, el vapor se condensa y penetra la biomasa iniciando las reacciones de auto hidrólisis, catalizadas por el ácido acético liberado por las hemicelulosas. Además, cuando la presión se libera inmediatamente, el condensado dentro del material se evapora nuevamente, causando una interrupción mecánica de la matriz de la pared celular, con la consiguiente ruptura de los enlaces intermoleculares e intramoleculares que conducen a la extracción de hemicelulosas (Bastos et al. 2018). El fraccionamiento de la paja de trigo usando un proceso de dos etapas basado en el pre tratamiento de SE (200°C/15 bar, durante 10-33 min o 220°C/22 bar durante 3-8 min) resulta en xilo-oligosacáridos (XOS) y monosacáridos que representan el 20,5% y el 28,5% del material de partida seco, respectivamente. Los rendimientos de recuperación aumentan a medida que la temperatura del SE y el tiempo de tratamiento se incrementan (Sun et al. 2005).

I.3.2-Celulosa

I.3.2.1-Estructura química

La celulosa representa el componente principal de las paredes celulares de las plantas. Está presente como un polímero de cadena lineal de alto peso molecular que contiene tres grupos hidroxilo por unidad de residuo de glucosa (Ju et al. 2015). Una conformación extendida del polímero surge de los ángulos de torsión principales alrededor de los enlaces C₁-O y O-C₄ del enlace glicosídico β-(1-4). Estas macromoléculas lineales comprenden entre 1.000 y 10.000 residuos de β-glucosa (French et al. 2017). La conformación de las cadenas de celulosa permite una aproximación intra e intercatenaria donde los grupos hidroxilo forman numerosos puentes de hidrógeno. Además, la forma más común de cinta plana de la molécula permite que se establezcan interacciones mediante fuerzas de Van der Waals (French et al. 2014). Estas fuerzas no covalentes dan como resultado varios arreglos cristalinos ordenados (French et al. 2021).

Las fibras de celulosa suelen estar compuestas de nanofibrillas con longitudes de varios micrómetros y diámetros que oscilan entre 2 y 20 nm, donde los cristalitas de celulosa están unidos entre sí mediante dominios de celulosa amorfa (**Figura I.5**). Se han identificado ocho alomorfos cristalinos diferentes denominados: celulosa Ia, Ib, II, III, IIII, IVI, IVII y X. Cabe señalar que Ia e Ib constituyen las formas cristalinas nativas o de origen natural. En la celulosa nativa, los materiales no cristalinos o amorfos están ubicados en las superficies de las fibras elementales de la molécula, así como entre las regiones cristalinas (Salem et al. 2023).

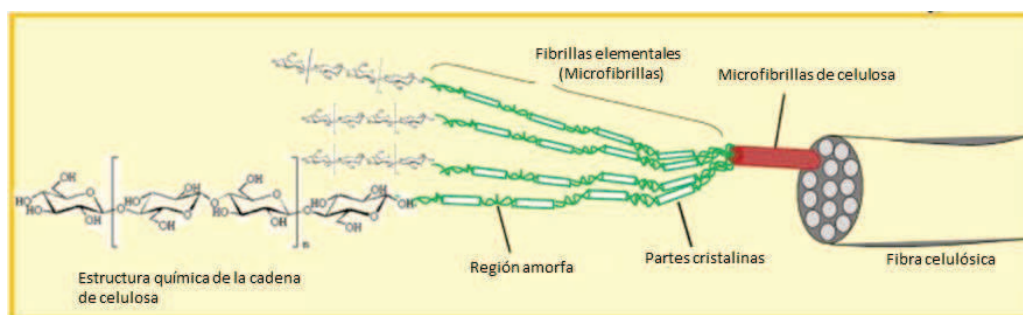


Figura I.5- Esquema de regiones amorfas y cristalinas de microfibrillas de celulosa (Lavoine et al. 2012).

I.3.2.2-Métodos de obtención de celulosa

En la literatura existen numerosos ejemplos de obtención de este polisacárido a partir de descartes de la agroindustria. En general el proceso consiste en tres etapas: i) un tratamiento alcalino con el objetivo de separar las hemicelulosas y solubilizar la fracción de lignina; ii) una etapa de blanqueo en la que se utiliza un agente oxidante

(hipoclorito de sodio o similar) para oxidar la fracción de lignina y quitar color a la muestra; y iii) una etapa de tratamiento ácido para eliminar la fase amorfa e incrementar la cristalinidad del producto (Ahmad et al. 2016; Debnath et al. 2021).

Existen algunas variantes a este procedimiento. Por ejemplo, Mussatto et al. (2008) extrajeron celulosa a partir de HM y utilizaron agua oxigenada en lugar de hipoclorito de sodio en la etapa de blanqueo con el objetivo de reducir los residuos clorados en los sobrenadantes. Realizando el blanqueo en 3 etapas consecutivas, estos autores lograron obtener 95,7 g de celulosa 100 g⁻¹ y 71,3 % de luminosidad (según norma Tappi t 452 om-08). Por otro lado, Mantovan et al. (2021) obtuvieron celulosa a partir del bagazo de naranja, con una recuperación entre 65,3 y 100%, dependiendo del método de obtención utilizado. En este sentido, la combinación de un tratamiento alcalino (NaOH 10 g 100 mL⁻¹) con autoclave (30 min a 121°C) fue el más efectivo. Luego de una etapa de blanqueo y de tratamiento ácido se logró obtener nano-celulosa con un 60% de cristalinidad y 4,4% de rendimiento respecto a bagazo inicial. Por su parte, Johar et al. (2012) obtuvieron nanofibras de celulosa a partir de cáscara de arroz utilizando un tratamiento alcalino (4% w/w NaOH) durante 2 hs, seguido de un blanqueo con cloro (100-130 °C) por 4 h. Luego, aplicaron una hidrólisis con ácido sulfúrico 10 mmol L⁻¹ a 50 °C durante 40 min, obteniendo un producto con 96% de celulosa y 59% de cristalinidad.

I.3.3-Polifenoles

I.3.3.1-Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios y representan el segundo grupo más abundante de compuestos orgánicos en el reino vegetal. Los mismos cumplen diferentes funciones en la planta tales como: soporte estructural y protección contra la radiación solar ultravioleta (UV), el estrés biótico o abiótico, patógenos y herbívoros (de la Rosa et al. 2019).

Estos compuestos se pueden clasificar como flavonoides y no flavonoides, y según su complejidad, como compuestos monoméricos y poliméricos (de la Rosa et al. 2019). Los flavonoides se dividen en varias categorías, incluyendo flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanoles, antocianidinas y chalconas. Tienen una estructura básica de 15 carbonos y son conocidos por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antihipertensivas (Heim et al. 2002). Los compuestos fenólicos no flavonoides incluyen una variedad de moléculas, tales como los ácidos fenólicos (ácido cafeico, ácido

ferúlico, etc.), lignanos, taninos y estilbenos (como el resveratrol). Estos compuestos también exhiben propiedades bioactivas (Robbins 2003).

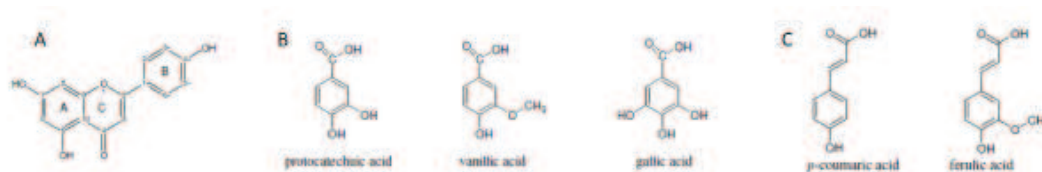


Figura I.6- Estructura química de: (A) Flavonoides, (B) ácidos hidroxibenzoicos y (C) ácidos hidroxicinámicos (Peñarrieta et al. 2014).

I.3.3.1.1-Estructura química

Como su nombre lo indica, los ácidos fenólicos poseen un grupo carboxílico en su estructura. Estos compuestos están presentes en una gran variedad de alimentos de origen vegetal tales como: semillas, cáscaras de frutas y hojas de verduras (Kumar y Goel 2019). Generalmente, se encuentran en forma ligada mediante enlaces amidas, éster o glucosídico (Pereira et al. 2009). A su vez, se los puede clasificar en dos subgrupos: derivados del ácido hidroxibenzoico y derivados del ácido hidroxicinámico (Clifford 1999; Tsao y Deng 2004). Los ácidos hidroxicinámicos se encuentran a menudo en los alimentos como ésteres simples con ácido quínico o glucosa. Las cuatro especies más comunes son el ácido ferúlico, cafeico, p-cumárico y sinápico. Esta clase de ácidos fenólicos se caracteriza por la presencia del grupo $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ en reemplazo del grupo carboxilo, el cual suele estar presente en los ácidos derivados del hidroxibenzoico. El doble enlace carbono ($\text{C} = \text{C}$) de la cadena aumenta la resonancia química, que puede ser descrita como una deslocalización de los electrones en los enlaces π . Esto otorga a la molécula un buen potencial reductor, actuando como agente antioxidante (Peñarrieta et al. 2014). Por otro lado, los ácidos derivados del hidroxibenzoico poseen una estructura común de C6-C1. Las especies solubles se encuentran conjugadas con azúcares o ácidos orgánicos, mientras que las insolubles están unidas a otras moléculas de la pared celular como la lignina (Kumar y Goel 2019).

I.3.3.1.2-Compuestos fenólicos en cereales

El contenido de compuestos fenólicos en los granos varía ampliamente y depende del tipo de grano, genotipo, parte del grano, manejo y procesamiento de los mismos (Adom y Liu, 2002; Ragaee et al. 2012). Los compuestos fenólicos más comunes encontrados en los granos son los ácidos fenólicos y los flavonoides. Los flavonoides existen como glicósidos unidos a varias fracciones de azúcar o en

complejos con ácidos orgánicos, aminas, lípidos, carbohidratos u otros fenoles. Están presentes en los cereales en forma libre y/o conjugada, y se concentran principalmente en la capa de aleurona del grano del cereal. También se pueden encontrar en embriones y en la cubierta de las semillas de los granos (Shirley, 1998).

Como se mencionó anteriormente, los ácidos fenólicos se subdividen en dos grupos, los derivados del ácido hidroxibenzoico e hidroxicinámico (**Figura I.6**) (Liu, 2007). Los derivados del ácido hidroxibenzoico incluyen los ácidos p-hidroxibenzoico, protocatéquico, gálico, siríngico y vanílico. Comúnmente, están presentes en forma ligada formando parte de las ligninas y los taninos. Los derivados del ácido hidroxicinámico comprenden los ácidos p-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico, y principalmente, están presentes en forma ligada unidos a arabinoxilanos, celulosa, lignina y proteínas de la pared celular a través de enlaces éster (Niemi et al. 2012).

El ácido ferúlico (**AF**) y sus derivados comúnmente se encuentran conjugados covalentemente con diferentes moléculas de la pared celular (monosacáridos, disacáridos, polisacáridos, glicoproteínas, poliaminas, lignina, etc.). En las semillas, el **AF** está presente en las paredes celulares de la aleurona y se encuentra esterificado con arabinosa, estanoles, esteroides y glucosa (Ragae et al. 2014). Para el caso de la cebada, los ácidos fenólicos más abundantes son el **AF** y p-cumárico (Hernanz et al. 2001; Madhujith, et al. 2006). Además, la testa del grano de cebada contiene proantocianidinas formando estructuras oligoméricas de prodelfinidinas y procianidinas (Aastrup et al. 1984; McMurrrough et al. 1992).

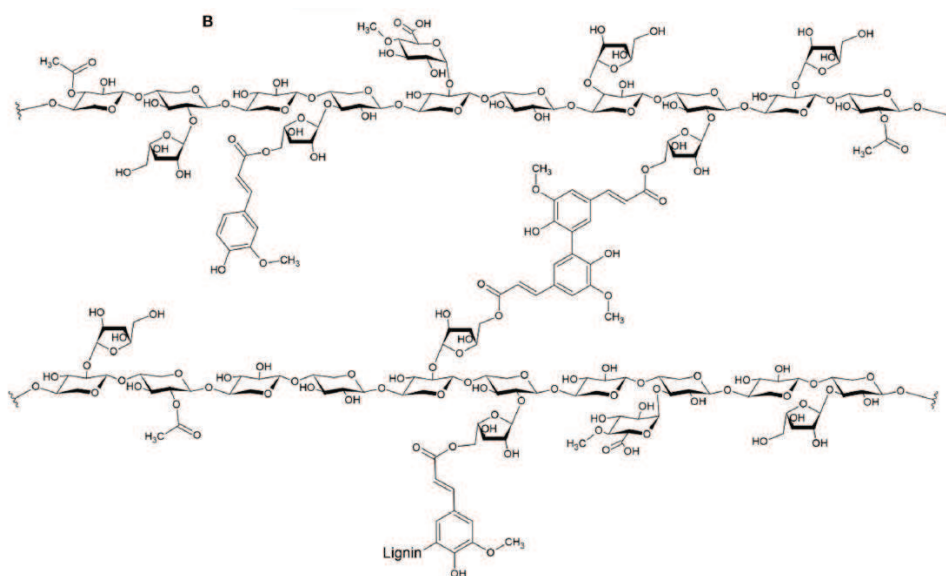


Figura I.6: Acido ferúlico en cereales, esterificado en O-5 de arabinosa, uniendo cadenas de arabinoxilanos, y como molécula de unión entre arabinoxilanos y lignina (Antonopoulou et al. 2022).

I.3.4-Lignina

I.3.4.1-Estructura química

La lignina es uno de los biopolímeros más abundantes en las plantas. La misma junto con la celulosa y la hemicelulosa conforma la pared celular de los vegetales en una disposición regulada a nivel nano-estructural, dando como resultado redes de lignina-hidratos de carbono. La composición o distribución de los tres componentes en esas redes varía dependiendo del tipo de planta (Chávez-Sifontes y Domine, 2013).

La definición estructural de la lignina no es tan clara como la de otros polímeros naturales, debido a la complejidad que afecta su aislamiento, análisis de la composición, y la caracterización estructural. El problema de una definición precisa para la lignina se asocia con la naturaleza de sus múltiples unidades estructurales, las cuales no suelen repetirse de forma regular, dado que la composición y estructura de la lignina varían dependiendo de su origen y el método de extracción o aislamiento utilizado (Lu & Ralph, 2010). En general, las ligninas son co-polímeros que derivan de tres unidades fenilpropano-monoméricas (monolignoles) básicas: alcohol p-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico (Gellerstedt & Henrinksen, 2008) (**Figura I.7**). Los monolignoles son dirigidos (temporal y espacialmente) a diferentes tipos de regiones de la pared celular, en las que polimerizan formando biopolímeros con propiedades biofísicas características, los cuales en conjunto refuerzan la pared celular. Los monómeros se unen a través de enlaces complejos C–O–C y C–C con un predominio de enlaces β -O-4 (~50%) (Zhou et al. 2022). La lignina está presente en la biomasa vegetal, lo que confiere resistencia y rigidez a las plantas y desempeña un papel importante en el mecanismo de defensa. En cuanto a las aplicaciones relacionadas con la agroalimentación, la lignina podría utilizarse como agente biofuncional (Feofilova y Mysyakina, 2016). Por lo tanto, desde el punto de vista de la economía circular, sería valioso que la lignina de residuos agroindustriales pudiera aplicarse en el sistema agroalimentario.

Resulta oportuno agregar que los compuestos del tipo monolignoles son utilizados como precursores para la producción de compuestos aromáticos de alto valor agregado en la industria petroquímica (Chávez-Sifonte y Domine 2013).

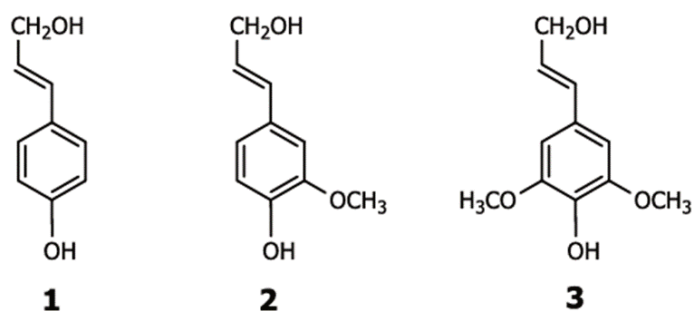


Figura I.7- Unidades estructurales de la Lignina (monolignoles): 1 alcohol p-cumarílico, 2 alcohol coniferílico y 3 alcohol sinapílico (Chávez-Sifonte y Domine 2013).

En cuanto a la extracción de lignina a partir de cebada, el método más eficiente es el alcalino, recuperándose el 99% de lignina tras el tratamiento con NaOH 2 g 100 g⁻¹, 120 °C durante 90 min (Dehnavi et al. 2011). Cabe señalar que el uso de bajas temperaturas y tiempos cortos compromete la eficiencia de extracción (Rossberg et al. 2015). Otro método para la extracción de lignina a partir de cebada, es el empleo de ácido acético o etanol. Dichos procesos otorgan un rendimiento de 54% (Dehnavi et al. 2011) y 59% (Kim et al. 2020), respectivamente. Por último, los métodos con solventes orgánicos son menos eficientes que los métodos alcalinos para la extracción de lignina a partir de cebada.

I.3.5-Propiedades bioactivas

I.3.5.1-Propiedades bioactivas de arabinosilanos

El estrés oxidativo es un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes que se produce en los sistemas biológicos. La ingesta suficiente de antioxidantes en la dieta previene la generación de radicales libres, ayudando a combatir el estrés oxidativo, lo que conduce a la prevención de enfermedades crónicas no transmisibles tales como diabetes tipo 2, cáncer, Alzheimer, etc. (Chen et al. 2019a).

Varios estudios de investigación sugieren que la actividad antioxidante de los AX está estrechamente relacionada con su estructura (Malunga y Beta 2015, Malunga et al. 2017, Zhang et al. 2016). En este sentido, uno de los sustituyentes biofuncionales determinante es el **AF**, cuyo contenido en la molécula condiciona la capacidad antioxidante del AX (Malunga et al. 2017).

Por otra parte, los AX también exhiben actividad hipoglucemiante. Uno de los mecanismos propuestos es a nivel del tracto gastrointestinal, donde estos polisacáridos incrementan la viscosidad del medio, reduciendo la hiperglucemia postprandial. Otro

modo de acción es a través de los **AF** presentes en la molécula de AX, los cuales pueden inhibir la α -amilasa y α -glucosidasa (Malunga et al. 2016), reduciendo la liberación de glucosa en el tracto digestivo. Este efecto hipoglucemiante de los AX depende del peso molecular, el grado de sustitución y el contenido de **AF** (Gemen et al. 2011, Christensen et al. 2013).

Por último, la aplicación de diferentes métodos de extracción de AX puede provocar cambios estructurales en la molécula, los cuales pueden impactar en las propiedades bioactivas de la misma (Zhou et al. 2010).

I.3.5.2-Propiedades bioactivas del ácido ferúlico

Existen numerosas evidencias epidemiológicas y experimentales que describen el papel protector de los ácidos fenólicos frente a enfermedades no transmisibles tales como hipertensión, diabetes, cáncer, etc. (Kumar y Goel 2019, Scalbert et al. 2005). Dicho rol está fuertemente ligado a sus propiedades antioxidantes.

El potencial antioxidante del **AF** se atribuye principalmente a la donación de electrones y a la transferencia de átomos de hidrógeno a los radicales libres (Anson et al. 2012). Su capacidad para inhibir la peroxidación lipídica por eliminación de superóxido (O_2^-) es de mayor magnitud que las de los ácidos cinámico y p-cumárico, pero menor que la del ácido cafeico (Zhou et al. 2006). La presencia de un grupo hidroxilo en lugar del grupo metoxi en el C3 aumenta sustancialmente la actividad de eliminación de radicales (Srinivasan et al. 2007). Su capacidad para inhibir la oxidación de la lipoproteína de baja densidad (LDL), el principal transportador de colesterol en la sangre, es mayor que la del ácido ascórbico (Castelluccio et al. 1996). El radical de ácido ferúlico (radical fenoxi) que se forma a partir de su oxidación es muy estable y no inicia una reacción en cadena oxidativa por sí solo, debido a la estabilización por resonancia de la molécula (Srinivasan et al. 2007).

Luego de ingerir los ácidos derivados del hidroxicinámico en su forma libre se produce una rápida absorción estomacal e intestinal. Una vez incorporados en circulación son conjugados por la acción de enzimas detoxificadoras y excretados (Lafay et al. 2008). Dado que la concentración en la dieta de estos compuestos fenólicos es mucho menor que la de los ácidos derivados del hidroxibenzoico, los estudios de biodisponibilidad son más escasos (Tomás-Barberán y Clifford 2000). Al respecto, el ácido hidroxibenzoico más estudiado en cuanto a absorción y metabolismo es el ácido gálico, cuya gran capacidad de absorción ha sido estudiada (Kumar y Goel 2019).

I.3.5.3-Propiedades bioactivas de la lignina

La lignina exhibe propiedades antioxidantes, antimicrobianas y fotoprotectoras frente a la radiación UV (Zheng et al. 2021; Kai et al. 2016; Zhang y Naebe 2021a). Estas propiedades se atribuyen principalmente a la presencia de grupos hidroxilo-fenólicos y alifáticos en su estructura. Al respecto, se ha observado que moléculas de lignina con elevada proporción de grupos hidroxilo-fenólicos exhiben fuerte capacidad antioxidante frente a especies reactivas de oxígeno (ROS) (Yun et al. 2021). Esto ha llevado a estudiar su utilización para el desarrollo de envases activos (Cassoni et al. 2022).

Al igual que para los AX, el tipo de método de extracción empleado influye sobre el tipo de ligninas obtenidas, lo cual impacta en la bioactividad del producto. En este sentido, hay una estrecha y fuerte relación entre el peso molecular de la molécula y la actividad antioxidante (Azadfar et al. 2015), cuanto menor es el peso molecular, más elevada resulta esta bioactividad. Además, se ha observado una correlación con el contenido de siringilo (Eugenio et al. 2021).

Respecto a las propiedades antimicrobianas, se ha visto que la lignina inhibe tanto bacterias Gram (+) como (-), siendo más efectivas contra las primeras (Cassoni et al. 2022). En este sentido, Wang et al. (2018) reportaron muy buen efecto antibacteriano de lignina obtenida a partir de rastrojo de maíz contra *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*. Además, esta macromolécula exhibe actividad antifúngica. En este sentido, García et al. (2017) reportaron que la lignina extraída de residuos de manzana retrasó el crecimiento de *Aspergillus niger*, provocando cambios morfológicos en este microorganismo.

II-OBJETIVOS

II-Objetivos

II.1-Objetivo General

El objetivo general de este trabajo fue establecer un proceso de biorefinería completo de la HM, mediante la obtención de compuestos de alto valor agregado a partir del residuo de la obtención de proteínas y péptidos, con especial énfasis en la producción de fracciones de arabinosilanos, compuestos fenólicos y celulosa microcristalina y el estudio de sus propiedades tecno y biofuncionales.

II.2-Objetivos Específicos

- 1- Caracterizar desde el punto de vista de la composición la hez de malta (HM) de la industria cervecera.
- 2- Obtener fracciones ricas en carbohidratos no digeribles (arabinosilanos, ácidos fenólicos, ligninas y celulosa) de HM a partir del residuo de la obtención de proteínas /péptidos.
- 3- Caracterizar la fracción rica en arabinosilanos desde el punto de vista de su composición.
- 4- Evaluar propiedades tecno-funcionales de los arabinosilanos (propiedades reológicas, y de gelificación).
- 5- Estudiar las propiedades de encapsulación de los arabinosilanos (encapsulación de péptidos bioactivos y de minerales).
- 6- Obtener arabinosilanos modificados por hidrólisis y estudiar las propiedades bioactivas de las fracciones de diferente peso molecular y establecer la relación estructura vs. bioactividad de los AX.
- 7- Obtener celulosa microcristalina y evaluar sus propiedades fisicoquímicas

**III. PROCESO DE BIOREFINERÍA. OBTENCIÓN DE ARABINOXILANOS,
COMPUESTOS POLIFENÓLICOS Y DE CELULOSA MICROCRISTALINA A
PARTIR DE HEZ DE MALTA**

III-Proceso de biorrefinería. Obtención de arabinosilanos, compuestos polifenólicos y celulosa microcristalina a partir de hez de malta

III.1-Introducción

La HM es el principal subproducto de la industria cervecera, representando aproximadamente el 85% de los subproductos obtenidos. Después del proceso de maceración, el mosto soluble (líquido) se separa por filtración de la parte insoluble (HM). Se producen así aproximadamente 20 Kg de este residuo húmedo por cada hectolitro de cerveza elaborada (Lynch et al. 2016). Si bien se utiliza principalmente para alimentación animal, debido a su alto contenido de proteínas y fibra (≈ 20 y 70% en base seca, respectivamente), también puede servir como fuente de biomoléculas para la nutrición humana, tales como proteínas, oligo y polisacáridos, y ácidos fenólicos.

Se han propuesto diferentes métodos para extraer las proteínas a partir de HM, como así también procesos para obtener otras biomoléculas. En este sentido, Vieira et al. (2014) usaron un proceso integrado para la extracción de proteínas y AX a partir de la HM. Implementaron una extracción de tres pasos donde incrementaron secuencialmente la concentración de álcalis (NaOH o KOH) desde 0,1 hasta 4 mol L⁻¹, en una relación de 1:2 p/v de HM por volumen de solución alcalina, a temperatura ambiente por 24 horas. Al finalizar el proceso, los extractos alcalinos se acidificaron hasta pH 3,0 con ácido cítrico para obtener una fracción rica en proteínas. Los AX se recuperaron por precipitación con etanol y tanto el ácido cítrico como el etanol se reutilizaron. Esta integración permitió extraer las proteínas totales de la HM con un rendimiento del 82-85% y un 66-73% de los AX, con la formación adicional de un residuo rico en celulosa, casi desprovisto de nitrógeno.

Como se indicó anteriormente, el tratamiento alcalino es un método eficiente para extraer AX de la pared celular. Sin embargo, cambia las propiedades funcionales de este heteropolisacárido al hidrolizar algunos grupos funcionales tales como el ácido ferúlico, generándose fracciones de alto peso molecular (PM: 100-200 kDa) (Zhou et al. 2010). Al respecto, Chen et al. (2019a) estudiaron diferentes métodos de extracción de AX de trigo e investigaron los efectos de éstos sobre las propiedades biofuncionales de los AX obtenidos. En dicho trabajo, se determinaron las características estructurales y las actividades antioxidantes e hipoglucemiantes de las fracciones obtenidas de AX con los distintos métodos. Los pesos moleculares de los AX extraídos con enzima o agua fueron más bajos que aquellos extraídos con álcali, observándose una tendencia opuesta

para la relación arabinosa-xilosa. Los AX extraídos con enzimas exhibieron mayores capacidades de adsorción de glucosa y eficacia en la eliminación de radicales hidroxilo que los obtenidos con álcali. Sin embargo, los AX extraídos con álcali presentaron mayor inhibición de la enzima alfa-amilasa y del radical DPPH que los obtenidos con enzimas. Además, los AX extraídos con agua tuvieron el mayor índice de retraso de diálisis de glucosa debido a su buena solubilidad. En todas estas propiedades bioactivas, el AF jugó un papel importante. En este sentido, los AX obtenidos con enzimas contenían niveles más altos de AF esterificado que condujo a una mayor actividad de eliminación de radicales. En contraste, los AX extraídos con álcali contenían niveles más altos de AF libre, lo que condujo a una mayor inhibición de la enzima alfa-amilasa, además de una mayor actividad quelante de metales debido al elevado PM. Por lo tanto, los AX con mayor contenido de AF esterificado y PM tienen mayor capacidad antioxidante, mientras que los AX con mayor nivel de AF libre y solubilidad exhiben una mayor actividad hipoglucemiante. Esto demuestra que los métodos de extracción pueden influir en las propiedades bioactivas de los AX a través de sus características estructurales.

Por otra parte, para completar el proceso de biorefinería de la hez de malta, se planteó la obtención de celulosa microcristalina (CMC) a partir del residuo proveniente de la extracción de las hemicelulosas.

En general, el proceso de obtención de CMC consiste en tres etapas (Ahmad et al. 2016). Primero un tratamiento alcalino con el objetivo de separar las hemicelulosas y solubilizar la fracción de lignina. Luego una etapa de blanqueo en la que se utiliza un agente oxidante (hipoclorito de sodio o similar) para oxidar la fracción de lignina y quitar color a la muestra. Por último, una etapa de tratamiento ácido para eliminar la fase amorfa e incrementar la cristalinidad del producto (Debnath et al. 2021).

Como en este trabajo de tesis la etapa de tratamiento alcalino se realizó para la obtención de AX, para la extracción de la CMC se partió de la etapa de blanqueo del residuo obtenido luego de la extracción alcalina.

III.2-Objetivos

III.2.1-Objetivo general

El objetivo general de esta etapa fue desarrollar el proceso de biorefinería a partir del residuo de obtención de proteínas de la hez de malta.

III.2.2-Objetivos específicos

1- Caracterizar desde el punto de vista de la composición la hez de malta (HM) de la industria cervecera.

2- Estudiar el proceso de obtención de arabinosilanos a partir del residuo de la extracción de proteínas mediante extracción asistida por enzimas comerciales y extracción alcalina directa.

3- Estudiar la obtención de compuestos fenólicos y lignina como subproducto de la obtención de arabinosilanos.

4- Estudiar las propiedades fisicoquímicas y bioactivas de los productos obtenidos.

5- Obtener celulosa microcristalina a partir del residuo final del proceso de biorefinería.

III.3-Materiales y métodos

III.3.1-Materias primas

La hez de Malta (HM) fue suministrada por Cervecería Santa Fe® (Santa Fe, Argentina). Se realizó una extracción proteica de acuerdo con Proaño et al. (2020) y sobre el residuo lignocelulósico obtenido se llevaron a cabo los estudios de obtención de AX.

III.3.2- Caracterización de la composición de la hez de malta (HM) de la industria cervecera.

III.3.2.1-Determinación de la composición centesimal

Una alícuota de HM fue secada en una estufa con circulación forzada de aire a 50°C durante 24 h. Las muestras secas se molieron y se utilizaron para la determinación de la composición centesimal, siguiendo las metodologías de la A.O.A.C. (2000).

Se determinaron la humedad, el contenido de grasa bruta (extracto etéreo), y los contenidos de cenizas y proteínas ($N \times 6,25$). El contenido de fibra dietaria total (FDT%) se determinó en muestras secas y desgrasadas utilizando la metodología AOAC 985.29 (AOAC, 2000) adoptada por el kit comercial de Megazyme®.

El contenido de hemicelulosa se determinó de acuerdo al método de Browning (1976) con modificaciones (Quazafarzedeth et al 2024). Se pesaron 0,5 g de material (HM o REP), se adicionaron 3 mL de NaOH 17,5 g 100 mL⁻¹ y se dejó reposar por 5 min a temperatura ambiente. Luego se adicionaron 6 mL más, se agitó y se dejó reposar por 40 min. Luego, se adicionaron 10 mL de agua destilada a la suspensión alcalina y se dejó reposar por 1 h. La suspensión se centrifugó, obteniéndose un residuo de celulosa y

lignina (RCL) y un sobrenadante al cual se le adicionó etanol en proporción 1,5:1 respecto al volumen del sobrenadante, y se dejó reposar 16 h. Finalmente, el precipitado obtenido se filtró y se secó en estufa a 105°C durante 24 h, y el peso obtenido corresponde al contenido de hemicelulosa. Al residuo obtenido en la centrifugación anterior (RCL), se le determinó lignina Klason ácido insoluble, y por diferencia se obtuvo el contenido de celulosa. La lignina Klason fue determinada de acuerdo a Quazafarzadeth et al (2024) para lo cual, se pesaron 0,1 g de muestra y se hidrolizaron con 1,5 mL de H₂SO₄ (72 g 100 mL⁻¹) a temperatura ambiente, por 2 h. Luego se adicionaron 56 mL de agua destilada y se calentó a 100°C por 4 h en una platina calefaccionada. Se filtró y el residuo fue secado en estufa a 105°C durante 24 h. La lignina Klason-ácido insoluble se calculó como el peso del residuo seco proveniente de la hidrólisis ácida corregido por su contenido de cenizas. El sobrenadante obtenido fue diluido con agua destilada y se midió la absorbancia UV a 205 nm. La concentración de lignina ácido soluble se calculó mediante la ecuación de Beer-Lambert utilizando el coeficiente de extinción (ϵ) de 110 L/g cm⁻¹.

III.3.2.2-Determinación del perfil de compuestos fenólicos y compuestos fenólicos totales

A partir del concentrado de AX se realizó una extracción de compuestos fenólicos libres y ligados de acuerdo a Garzón et al. (2020b). Estos extractos fueron evaluados en cuanto a su perfil de ácidos fenólicos de acuerdo a Garzón et al. (2018). Para ello las muestras fueron sometidas a una hidrólisis ácida, utilizando 400µL de muestra o extracto, y 200µL de HCl 6 mol L⁻¹. Luego, se incubó a 90°C durante 50 min. Después de la hidrólisis, las muestras se dejaron enfriar y se filtraron a través de un filtro de jeringa Unichro Cobetter Lab (Hangzhou, China) con un tamaño de poro de 0,22 µm. Los compuestos fenólicos se separaron por HPLC (bomba Shimadzu Series LC-20AT), con detector de arreglo de diodos (Shimadzu SPD-M20A, Shimadzu Co., Kyoto, Japón), utilizando una columna de 250 × 4,6 mm, tamaño de partícula de 5 µm, Gemini 110A C-18 Phenomenex, según Leitao et al. (2011), con algunas modificaciones. El flujo de la fase móvil fue de 1 mL min⁻¹, con gradiente conteniendo 0,1 mL 100 mL⁻¹ de ácido fórmico (eluyente A) y metanol (eluyente B) de la siguiente manera: 0–25 min, 3–25 % B; 25–26 min, 25–18% B; 26-29 min, 18% B; 29–47 min, 18–30 % B; 47–57 min, 30% B; 57–67 min, 30–65 % B; 67–80 min, 65% B. Se equilibró la columna por 10 min entre muestras. Los ácidos hidroxicinámicos

analizados (ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico y ácido sinápico) se detectaron a 320 nm; el ácido gálico y el alcohol 4-hidroxibenzoil se detectaron a 270 nm; y el ácido 4-hidroxibenzoico y vanílico se detectaron a 254 nm. La identificación de los picos se realizó mediante la comparación de los tiempos de retención y las características espectrales con patrones externos. Los datos fueron procesados utilizando el software Shimadzu LC.

El contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) se midió en ambos extractos utilizando el reactivo de Folin- Ciocalteu y siguiendo la metodología de Singleton et al. (1999), usando ácido gálico (AG) como estándar.

III.3.3-Estudio de procesos de extracción de arabinosilanos

A partir del residuo obtenido luego de la extracción proteica (Proaño et al. 2020), se realizaron los ensayos descriptos a continuación (**Figura III.1**):

III.3.3.1-Extracción mediante el uso de enzimas comerciales y extracción alcalina directa

a- Extracción alcalina directa del **REP**. La extracción se realizó con NaOH 3 mol L⁻¹ durante 2 h a 40°C según Vieira et al. (2014). Luego, la muestra se centrifugó y el residuo fue lavado, redispersándolo con NaOH 0,5 mol L⁻¹, utilizando el mismo volumen de sobrenadante y agitando durante 15 min. Se obtuvieron 3 fracciones: sobrenadante (**S2**), gel (**G**) y residuo (**R2**).

b- Extracción asistida por enzimas comerciales. Se evaluaron tres alternativas:

b.1- Empleo de celulasa comercial, obteniéndose un sobrenadante (**S1**) y un residuo (**R1**).

b.2- Empleo de proteasa (P1) y una celulasa de manera conjunta en condiciones sugeridas por el fabricante. Se obtuvieron: un sobrenadante (**S1**) y un residuo (**R1**).

b.3- Empleo de una proteasa (P2) y una celulasa de manera secuencial en condiciones sugeridas por el fabricante. Para ello, el **REP** primero se sometió a una hidrólisis con proteasa (P2). Posteriormente la muestra se centrifugó, obteniéndose un sobrenadante y un residuo. Luego al residuo se lo trató con celulasa. Posteriormente, la muestra fue centrifugada obteniéndose un sobrenadante (**S1**) y un residuo (**R1**).

Al **R1** obtenido en los puntos **b.1**, **b.2** y **b.3**, se lo extrajo con NaOH 3 mol L⁻¹ durante 2 h a 40°C según Vieira et al. (2014). Luego, la muestra se centrifugó durante 20 min a 3500xg en centrifuga Cavour VT3216. Se realizó el lavado con NaOH 0,5 mol

L⁻¹ como se explicó anteriormente, obteniéndose 3 fracciones: sobrenadante (**S2**), gel (**G**) y residuo (**R2**).

A los sobrenadantes **S1** y **S2** se los precipitó con etanol en una proporción alcohol:sobrenadante de 2,3:1 durante 12 h a temperatura ambiente. Este precipitado (**AX-c**) se secó, molió y se conservó a -20°C en bolsas plásticas hasta su análisis.

III.3.3.2-Seguimiento de los procesos

Las fracciones obtenidas fueron caracterizadas midiendo los contenidos de sólidos, carbohidratos totales (Dubois et al. 1956) y proteínas por semi-micro Kjeldahl (AOAC, 2000).

Se calculó el rendimiento de sólidos o de carbohidratos de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{g en la fracción}}{\text{g iniciales}} \times 100 \quad (\text{III.1})$$

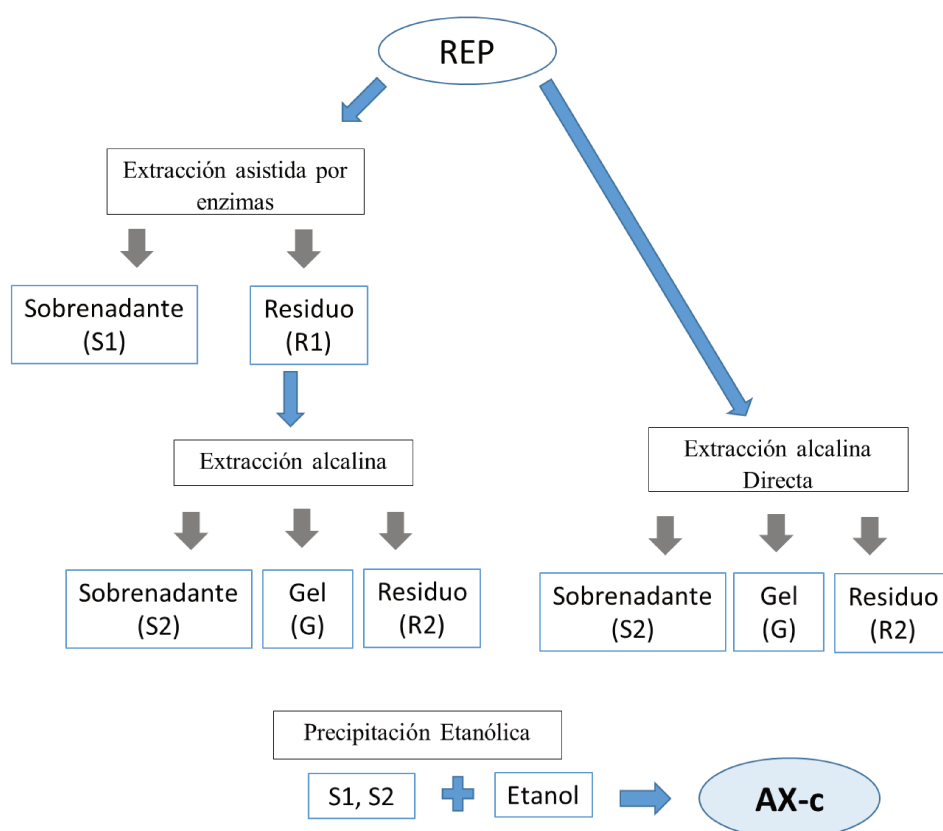


Figura III.1- Esquema de obtención del concentrado de arabinosilanos (**AX-c**) a partir del residuo de extracción de proteínas (**REP**).

III.3.4-Mejoramiento del proceso de extracción alcalina directa

A fin de mejorar la extracción alcalina directa de AX se estudiaron diversos parámetros que se detallan a continuación (**Figura III.2**):

III.3.4.1-Estudio del impacto de la temperatura en la extracción alcalina

A fin de mejorar la extracción alcalina directa de AX, se estudiaron diferentes temperaturas de extracción: 25°C (ambiente), 40°C, 50°C y 60°C, procediendo como se indicó anteriormente. Luego, sobre el sobrenadante de extracción se realizó una precipitación con etanol utilizando una proporción 2,3:1 (acohol:sobrenadante). Posteriormente, se evaluó el rendimiento de extracción de sólidos y de carbohidratos a partir del sobrenadante. Además, para el caso de la extracción a 50°C se realizó un ensayo agregando metabisulfito de sodio 5 mmol L⁻¹ como agente reductor (Vieira et al. 2014).

III.3.4.2- Estudio del impacto del pH en la etapa de precipitación etanólica

Se estudió el impacto del pH en la etapa de la precipitación de los carbohidratos con etanol. Para ello, luego de las 2 h de extracción alcalina a 40°C, la mezcla se centrifugó a 3500xg durante 20 min. El pH del sobrenadante resultante se ajustó a 2, 4, 7 o 12 antes del agregado de etanol.

III.3.4.3- Estudio del lavado de R1 obtenido a partir de la extracción alcalina directa y precipitación etanólica del agua del lavado.

Luego de las 2 h de extracción alcalina, y la subsiguiente centrifugación para separar el S1, se realizó el lavado al residuo (R1) con NaOH 0,5 mol L⁻¹ durante 15 min, como se explicó anteriormente. Se comparó este procedimiento con un lavado de 30 min. Se analizaron los contenidos de sólidos y carbohidratos en el agua de los dos lavados.

III.3.4.4- Ensayo de precipitación con diferentes proporciones de etanol

En la etapa de precipitación con etanol 96% se estudiaron las siguientes relaciones alcohol:sobrenadante: 2,3:1; 1,5:1; y 1:1.

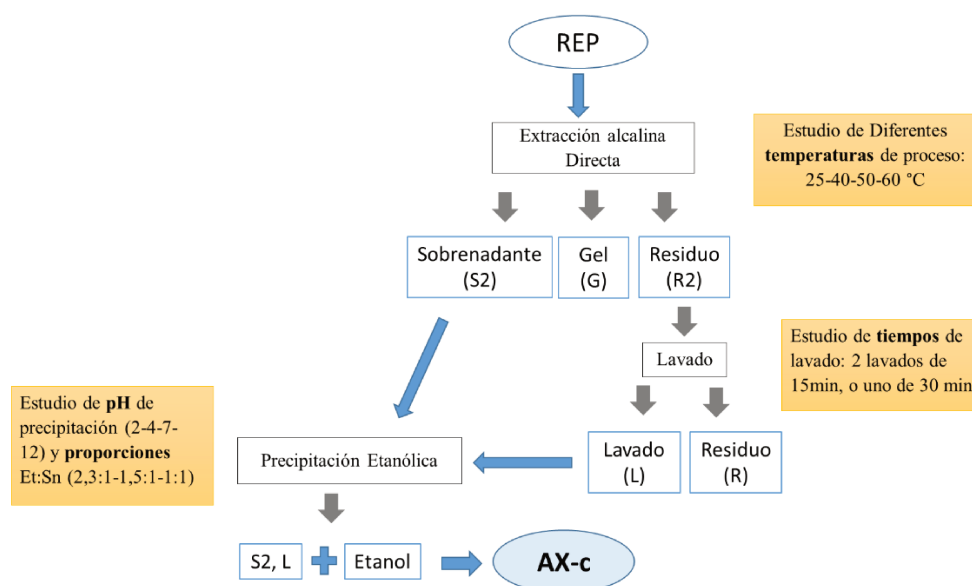


Figura III.2- Esquema de mejoramiento del proceso de extracción alcalina.

III.3.5-Ensayo a escala semi-piloto. Obtención de arabinosilanos, compuestos fenólicos y de lignina

Para el ensayo a escala semi-piloto se utilizó un reactor de 20 L (planta piloto del Instituto de Tecnología de Alimentos-FIQ-UNL), tomando como material de partida el residuo de extracción de proteínas (**REP**) de hez de malta (**Figura III.3**). Para ello, a 2,54 kg de **REP** se le agregaron 6,7 kg de agua y 1,34 L de NaOH 3 mol L⁻¹. Luego de 2 h de tratamiento a 40°C, la muestra se centrifugó en centrífuga de canasta. Sobre el residuo obtenido se realizó un lavado de 30 min, con un volumen de NaOH 0,5 mol L⁻¹ igual al sobrenadante obtenido y se volvió a centrifugar. El residuo obtenido luego de los lavados se denominó **REAx**. Al sobrenadante obtenido, se lo precipitó con etanol 96%, se lo dejó decantar 16 h a temperatura ambiente y posteriormente se filtró con filtro plástico (0,297 mm), obteniéndose un precipitado que correspondió al concentrado de arabinosilanos (**AX-c**) y un sobrenadante etanólico denominado **SE** (fracción rica en lignina y compuestos fenólicos). Luego, **SE** fue concentrado en un equipo Buchi Rotavapor R-II (Buchi Labortechnik AG- Siuza) y se recuperó el etanol. Posteriormente, dicha fracción fue sometida a una precipitación ácida con H₂SO₄ 95-98% en proporción 100:1. Se dejó reposar a 4°C durante 16 h y luego se centrifugó en centrífuga Mistral 40 min a 3000xg para separar los compuestos fenólicos solubles (**CFS**) de la lignina insoluble (**Lignina**). Una alícuota de la fracción **CFS** fue liofilizada para posteriores análisis.

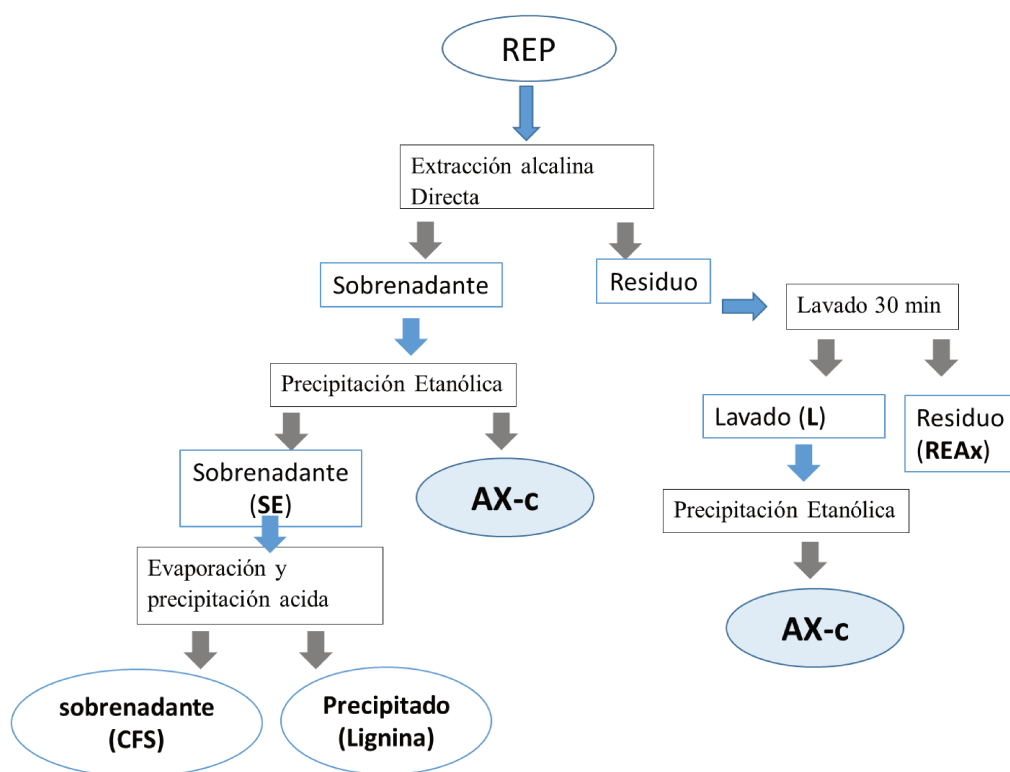


Figura III.3- Esquema de extracción de AX en planta piloto.

III.3.6-Evaluación de las fracciones de arabinosilanos, compuestos fenólicos y lignina

III.3.6.1-Perfil de compuestos fenólicos y fenólicos totales

Las fracciones solubles correspondientes a los sobrenadantes **SE** y **CFS** se filtraron y analizaron directamente. El **AX-c** se sometió a los procedimientos de extracción correspondientes a compuestos fenólicos libres y ligados. La lignina fue sometida a un proceso de extracción de compuestos fenólicos ligados.

La extracción de compuestos fenólicos libres y ligados (según el tipo de muestra mencionado anteriormente) se realizó de acuerdo a Garzón et al. (2020b). Estos extractos fueron evaluados en cuanto a su perfil de ácidos fenólicos de acuerdo con Garzón et al. (2018), como se describió anteriormente.

El contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) se midió en ambos extractos utilizando el reactivo de Folin- Ciocalteu y siguiendo la metodología de Singleton et al. (1999), usando ácido gálico (AG) como estándar.

III.3.6.2-Espectrometría de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) de las fracciones

Las muestras secas se diluyeron en KBr (~ 1% de muestra en KBr) y se prepararon pastillas a partir de las mismas, las cuales se colocaron luego en el porta-muestras adecuado. Se analizaron en un Espectrómetro FTIR marca SHIMADZU modelo IR Prestige-21. Se adquirió la Transmitancia (%T), con una Apodización Happ-Genzel, Resolución: 4 cm⁻¹, Rango: 400 – 4000 cm⁻¹. Se obtuvieron los datos correspondientes a las muestras utilizando el sistema de software del equipo (IR solution, versión 1.3), adquiriendo un background para cada muestra. Se realizaron dos barridos espectrales por muestra. Las muestras se analizaron por duplicado.

III.3.6.3-Propiedades bioactivas de las fracciones

III.3.6.3.1-Capacidad antioxidante

El bloqueo del radical catiónico ABTS⁺ se midió según Cian et al. (2012). Para estimar la capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC), se realizó una curva de concentración-respuesta para la inhibición de ABTS⁺ en función de la concentración estándar de Trolox (0–2,5 mmol L⁻¹ en 0,01 mmol L⁻¹ de solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4). La absorbancia a 734 nm se tomó después de una mezcla inicial de 6 min utilizando un espectrofotómetro (Spectronic Genesys 5; Milton Roy Company, Warrenton, VA, EE. UU.).

Para evaluar la inhibición del radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) se utilizó el método descrito por Brand-Williams et al. (1995), con algunas modificaciones. Para esto, se tomaron 10 µL de muestra y se mezclaron con 190 µL de radical DPPH (0,08 mmol L⁻¹ en metanol). La muestra se mantuvo en oscuridad durante 90 min de reacción y luego se registró la absorbancia a 571 nm (lector de placas ASYS UVM 340). La diferencia entre el blanco (DPPH en metanol) y la muestra se utilizó para calcular el porcentaje de inhibición como se describe a continuación:

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{(A_{bco} - A_{mtra o estándar})}{A_{bco}} \times 100 \quad (\text{III.2})$$

Donde A_{bco} : es la absorbancia del blanco de reacción y $A_{mtra o estándar}$: es la absorbancia de la muestra o estándar, respectivamente.

III.3.6.3.2-Capacidad hipoglucemiante

Se determinó mediante la inhibición de la enzima α -amilasa de acuerdo a Donkor et al. (2012). Se usó una solución sin muestra como control y una solución sin sustrato como blanco. La inhibición de la enzima se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{[A_{\text{control}} - (A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}})]}{A_{\text{control}}} * 100 \quad (\text{III.3})$$

Donde, A_{control} es la absorbancia del sustrato más la enzima sin muestra, A_{muestra} es la absorbancia del sustrato más la enzima con muestra, y A_{blanco} es la absorbancia de la enzima más muestra sin sustrato.

Para determinar la concentración que inhibe el 50% de la enzima (IC_{50}), se realizaron diluciones seriadas de la muestra de 1 a 0,05 mEq ácido gálico L^{-1} . Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

III.3.7-Evaluación de las propiedades fisicoquímicas y tecno-funcionales del concentrado de arabinoxilanos (AX-c)

III.3.7.1-Composición de AX-c

Los contenidos de humedad, cenizas y proteínas se determinaron utilizando los métodos de AOAC (1995). El contenido de carbohidratos totales se determinó según Dubois et al (1956). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

III.3.7.2-Perfil de azúcares por cromatografía gaseosa (CG)

Se siguió el método alditol acetato, que involucra 3 etapas: hidrólisis, reducción y derivatización. La hidrólisis se llevó a cabo de acuerdo a Bartolomé et al. (2002). A 5 mg de muestra se adicionaron 550 μL de HCl 1 mol L^{-1} y se incubaron durante 90 min a 90°C . Para la reducción, la muestra hidrolizada se alcalinizó a pH 11 con NaBH_4 2 mol L^{-1} , y se mantuvo a 40°C durante 30 min. Luego, se añadieron lentamente 400 μL de ácido acético glacial y 3 mL de metanol. Posteriormente, se llevó a sequedad. La derivatización se realizó según Bartolomé et al. (2002), agregando 1 mL de anhídrido acético y 0,2 mL de piridina e incubando a 90°C durante 3,5 h. Luego, se agregaron 4 mL de agua bi-destilada y 4 mL de cloroformo, se agitó por 2min, se desechó la fase acuosa, se agregaron 2 mL de agua nuevamente, se agitó y se quitó la fase acuosa. La fase orgánica se guardó en frascos a -20°C hasta su análisis. Para el análisis cromatográfico se utilizó un cromatógrafo gaseoso Auto System XL Perkin Elmer, con nitrógeno, equipado con una columna Zebron ZB Multiresidue (Phenomenex) 30 m x 0.25 mm x 0.25 μm y un detector de ionización de llama (FID). Se programó la temperatura del horno de la siguiente manera: 150°C durante 2 min, incremento de $20^{\circ}\text{C min}^{-1}$ hasta 250°C , y mantenimiento a 250°C durante 14 min. La temperatura del detector fue 280°C y la del inyector 250°C . Se utilizaron como estándares D-(-)-

Arabinosa, D-Xilosa y D-(+)-Glucosa. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

III.3.7.3-Potencial Z y tamaño hidrodinámico

El potencial zeta de **AX-c** se determinó utilizando un instrumento de microelectroforesis y dispersión de luz dinámica (Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments Ltd., Reino Unido). Para ello, la muestra se dispersó a 0,1 g 100 mL⁻¹ en agua destilada, se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, se agregó 1 mL a la cámara de medición. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

III.3.7.4-Espectrometría de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) del concentrado de arabinosilanos (AX-c)

Se procedió de acuerdo al punto 3.6.2.

III.3.7.5-Propiedades tecnofuncionales del concentrado de arabinosilanos (AX-c)

III.3.7.5.1-Absorción de agua

La absorción de agua se midió en un equipo de absorción de Baumann de acuerdo a Pilosof (2000). Para ello, se extendieron sobre papel de filtro previamente tarado aproximadamente 0,1 g de muestra, y se determinó la cantidad de agua absorbida hasta llegar a un valor de medición constante. La determinación se realizó por triplicado.

III.3.7.5.2-Propiedades gelificantes

Para estudiar las propiedades gelificantes en diversas condiciones de gelificación se realizaron tres tipos de estudios que se describen a continuación.

- a) Se realizó un diseño factorial de 3² con triplicado del punto central. Las variables independientes fueron la concentración de **AX-c** (0,2 - 0,6 g 100 g⁻¹), la concentración CaCl₂ (0,2 - 0,4 g 100 g⁻¹), y el pH (5 - 8), para niveles bajo y alto, respectivamente.
- b) Se realizó un screening donde se evaluaron mayores concentraciones de **AX-c** (0,8, 1,0 y 2,0 g 100 g⁻¹), la concentración CaCl₂ (0,8 y 1,2 g 100 g⁻¹), y el pH (5 y 8).
- c) Se estudió la gelificación enzimática utilizando lacasa según Carvajal-Millan et al. (2005). Se estudiaron diferentes concentraciones de **AX-c** (1, 2, 4 y 6 g 100 g⁻¹). La enzima laccasa (actividad 1,675 nkat/mg AX) se utilizó en proporción 0,1005 U mg⁻¹ de polisacárido. Se evaluaron los pH 2, 4,5, 5,5 y 7,5, a temperaturas de 25 y 30 °C. Además, se evaluó el agregado de la fracción **CFS** (10,6 mg **AF** g⁻¹ sólidos).

III.3.8-Obtención de celulosa microcristalina

III.3.8.1-Obtención de celulosa

Se utilizó la técnica de Ahmad et al. (2016) con modificaciones. En primer lugar se realizó una etapa de blanqueo. Para ello, a 10 g del residuo obtenido de la extracción de hemicelulosas se adicionaron 100 mL de hipoclorito de sodio (concentración de HClO de 5 g 100 mL⁻¹). La reacción se llevó a cabo por 30 min en un baño termostático a 80°C con reflujo. Luego las muestras se enfriaron rápidamente y se centrifugaron a 3500xg en centrífuga Cavour VT3216 durante 20 min. Se descartó el sobrenadante, el residuo se lavó con 100 mL de agua destilada, y se centrifugó nuevamente durante 20 min. Luego, a la muestra blanqueada se le adicionaron 61 mL de HNO₃ 2 mol L⁻¹ y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la muestra se centrifugó 15 min y con el residuo obtenido se efectuaron 3 lavados con 60 mL de agua destilada. Este residuo lavado se dispuso en bandejas y se secó en estufa con recirculación de aire a 50°C durante 24 h. Finalmente, se molió en molino ciclónico Cyclotec Udy utilizando un tamiz de 1 mm y se conservó en bolsas plásticas selladas hasta el momento de su análisis.

Este proceso se realizó con el material de partida acondicionado de dos maneras diferentes: 1) húmedo tal cual se obtiene del proceso de extracción de hemicelulosas, y 2) secado con aire a 50°C y molido con molino ciclónico utilizando un tamiz de 1 mm. De esta manera se obtuvieron dos productos finales denominados celulosa 1 (CMC-1) y celulosa 2 (CMC-2), respectivamente. De esta forma se evaluó la influencia del tamaño de partícula del material de partida para la obtención de celulosa microcristalina.

III.3.8.2-Characterización fisicoquímica de la celulosa microcristalina (CMC)

III.3.8.2.1-Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La morfología superficial del material se evaluó por microscopía electrónica de barrido, utilizando un equipo SEM (Phenom World, modelo Phenom PRO X) con voltajes de aceleración entre 5 y 15 kV. Las muestras se montaron en trozos de aluminio usando una cinta de doble cara y se observaron con aumentos de 1000x. Se usó el programa ImageJ (ImageJ, Institutos Nacionales de Salud, EE. UU.) para determinar el tamaño de las muestras.

III.3.8.2.2-Espectrometría de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

Las muestras sólidas se secaron en estufa por 24 h a 80°C. Luego se diluyeron

en KBr (1% de muestra en KBr) y se prepararon pastillas, las cuales se colocaron luego en el porta-muestras. Los espectros de FTIR del Residuo de obtención de hemicelulosas (**REAx**) y de las celulosas (**CMC-1** y **2**) fueron obtenidos utilizando un espectrómetro FTIR (SHIMADZU, modelo IR Prestige-21), con resolución: 8 cm⁻¹, en el rango: 400 – 4000 cm⁻¹. Los datos correspondientes a las muestras (espectros) se obtuvieron utilizando el sistema de software del equipo (IR solution, versión 1.3), adquiriendo un *background* para cada muestra. Las muestras se analizaron por duplicado.

III.3.8.2.3-Patrón de Difracción de rayos X

Se obtuvo el patrón de difracción de las muestras utilizando un difractómetro de rayos X (DRX) marca PANalytical equipado con monocromador. Las muestras se analizaron utilizando: Radiación: Cu-K α , voltaje de 40 kV, corriente de 45 mA, rango 5-45°, velocidad de barrido: 2° min⁻¹. Se obtuvieron los datos correspondientes a las muestras utilizando el sistema de software del equipo. Además, se analizó la muestra patrón de Si como estándar externo (Aspromonte et al. 2023).

La cristalinidad de se determinó de acuerdo con Salem et al. (2023). Los picos cristalinos corresponden a 2 θ =16°, 22°y 35°. El índice de cristalinidad (IC) se definió como:

$$IC(\%) = \frac{Area\ picos\ cristalinos}{Area\ muestra\ total} \times 100 \quad (III.4)$$

III.3.8.2.4-Color

Se determinó el color de las muestras **CMC-1** y **CMC-2** utilizando un colorímetro (Minolta CM-508d, Japón) en base al espacio de color definido por la norma CIE (Comisión International d'Éclairage): plano cromático de coordenadas a* (valores positivos corresponden a tonos rojos y negativos a verdes) y plano cromático de coordenadas b* (valores positivos tonos amarillos y negativos azules), situándose perpendicular a ellos el eje L* (luminosidad) (**Figura III.4**). Las condiciones de medición fueron Iluminante D65, ángulo de observación 10°, y componente especular ocluido. Se realizaron 3 replicados por muestra. A partir de a* y b* se calculó C* (Croma: saturación del color) y h (ángulo Hue: tono del color) mediante un sistema de coordenadas cilíndricas (**Figura III.4**).

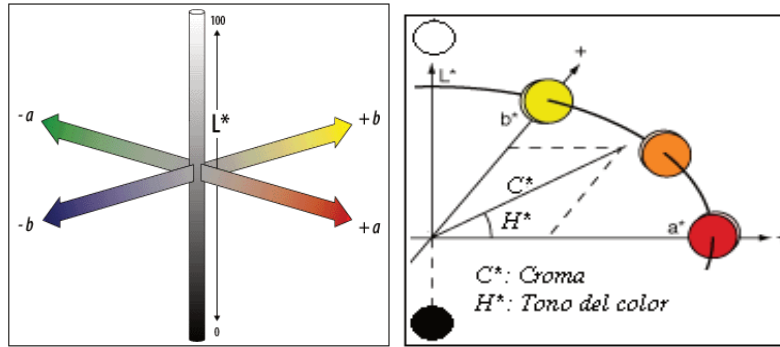


Figura III.4- Diagrama de Hunter, donde L^* corresponde a la luminosidad (negro - blanco), a^* y b^* a la cromaticidad (a^* : rojo-verde; b^* : amarillo – azul). Determinación de C^* y h a partir de los parámetros a^* y b^* , empleando un sistema de coordenadas cilíndricas.

Se determinó la diferencia de color (ΔE^*) de las muestras con respecto a un blanco absoluto $L^*=100$, $a^*=0$, $b^*=0$, según la siguiente ecuación:

$$\Delta E^* = \sqrt{\{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2\}} \quad (\text{III.5})$$

A partir de los valores de a^* y b^* se calculó el índice de blancura (IB) o “whiteness index” (WI) según Hirschler (2012).

$$IB \text{ o } WI = 100 - [(100 - L^*)^2 + (a^*)^2 + (b^*)^2]^{0,5} \quad (\text{III.6})$$

III.3.9-Análisis estadísticos

Cada determinación se realizó al menos por duplicado. Los resultados se expresaron como media \pm desvío estándar (DE). Los datos fueron analizados por un análisis de varianza de ANOVA de un factor, y las diferencias entre muestras se determinaron por el test de Duncan ($p < 0,05$). Se utilizó para tales efectos el software Statgraphic Centurion XV 15.2.06. Además, el software estadístico Design Expert 7.02 (Stat-Ease Inc, Minneapolis, USA) fue usado para construir el diseño de experimentos para evaluar las condiciones de gelificación del **AX-c**.

III.4-Resultados y discusión

III.4.1-Composición de la hez de malta y del residuo de extracción de proteínas (REP)

En este trabajo se utilizó bagazo que proviene de la elaboración de cerveza rubia, sin el agregado de adjuntos, es decir 100% malta de cebada. En la **Tabla III.1** se

muestra la composición de **HM** y del **REP**. Los resultados se expresaron en base seca, considerando el contenido de humedad de la **HM** y **REP** estabilizados por secado ($5,79 \pm 0,01$ y $6,39 \pm 0,22$ g 100g^{-1} , respectivamente).

Tabla III.1- Composición de la hez de malta (**HM**) y del residuo de extracción de proteínas (**REP**)

Componente	HM (g 100g^{-1} b.s)	REP (g 100g^{-1} b.s)
Proteínas	$26,5 \pm 0,4^b$	$12,4 \pm 0,3^a$
Hemicelulosa	$33,1 \pm 0,1^a$	$47,9 \pm 0,8^b$
Celulosa	$11,1 \pm 0,1^b$	$8,7 \pm 0,5^a$
Lignina soluble	$8,7 \pm 0,3^b$	$5,0 \pm 0,1^a$
Lignina Insoluble	$18,1 \pm 0,5^a$	$20,5 \pm 0,6^b$
Ext. etéreo	$9,1 \pm 0,1^b$	$6,8 \pm 0,3^a$
Cenizas	$4,3 \pm 0,0^a$	$5,1 \pm 0,1^b$
Fibra dietaria total (FDT)	$59,9 \pm 3,7^a$	$76,7 \pm 0,7^b$
Fibra dietaria soluble (FDS)	$4,6 \pm 0,3^a$	$5,7 \pm 0,3^b$
Fibra dietaria insoluble (FDI)	$55,3 \pm 3,3^a$	$71,0 \pm 0,6^b$
Polifenoles Totales (mg AG 100g^{-1} b.s.)	$284,0 \pm 27,3^a$	$442,9 \pm 16,4^b$
Libres	$23,4 \pm 1,4^a$	$81,5 \pm 2,5^b$
Ligados	$260,6 \pm 21,2^a$	$360,9 \pm 15,1^b$

$X \pm \text{DE}$. Letras diferentes en una fila indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

Como se puede observar, el constituyente mayoritario de HM fue la fibra dietaria total (FDT), de la cual aproximadamente el 8% correspondió a fibra dietaria soluble (FDS) y el 92% a fibra dietaria insoluble (FDI). Esta proporción de FDS y FDI se mantuvo en **REP**. Sin embargo, el contenido de FDT en **REP** fue significativamente superior al hallado para HM ($p < 0,05$). Este resultado es lógico, ya que el proceso de extracción proteica a partir de **HM** genera un residuo rico en fibra ($\approx 80\%$), cuyo contenido de proteínas es significativamente inferior al del material de partida (**HM**).

Por otra parte, el 92% de los compuestos fenólicos totales correspondieron a especies ligadas. Esto fue comprobado mediante el análisis de compuestos fenólicos por HPLC. Como se evidencia en la **Tabla III.2**, los compuestos fenólicos mayoritarios de la HM fueron los ácidos ferúlico y p-cumárico, principalmente en su forma ligada. En

este sentido, el ácido ferúlico representó el 79% de los ácidos fenólicos ligados en la HM. Cabe mencionar que no se detectaron ácido hidroxibenzoico, ácido vanílico e hidroxibencil alcohol en HM. Respecto a los ácidos fenólicos libres, el mayoritario fue el ácido gálico, representando 7,66% del contenido total de ácidos fenólicos. Estos resultados concuerdan con los reportados por Petrón et al. (2021).

Tabla III.2- Perfil de ácidos fenólicos

Ácidos fenólicos ($\mu\text{g g}^{-1}$ b.s.)	Hez de malta (HM)		Residuo (REP)	
	Libres	Ligados	Libres	Ligados
Ac. gálico	101,83 \pm 0,45	ND	8,07 \pm 0,09	ND
Ac. cafeico	9,56 \pm 0,06	ND	5,19 \pm 0,06	ND
Ac. p-cumárico	27,30 \pm 0,44	247,43 \pm 2,87	ND	473,36 \pm 14,13
Ac. ferúlico	ND	942,87 \pm 44,67	ND	1543,43 \pm 20,76
Ac sinápico	5,97 \pm 0,55	ND	ND	ND
TOTAL	144,66\pm2,12	1190,30\pm67,23	13,26\pm0,21	2016,79\pm49,34

X \pm DE. ND: No detectado

Respecto al **REP**, el contenido de compuestos fenólicos totales de este residuo fue 1,5 veces mayor que el hallado para HM ($p < 0,05$), indicando una concentración de los mismos luego de la extracción proteica. Si bien se observó una disminución en el contenido de compuestos fenólicos libres respecto a HM (**Tabla III.2**), probablemente debido a su solubilización durante el proceso de extracción proteica, se evidencia un notable incremento (de aproximadamente 1,7 veces) de los compuestos fenólicos ligados ($p < 0,05$). Al respecto, el 99% de los compuestos fenólicos presentes en **REP** estuvieron ligados. Por lo tanto, luego de la extracción proteica, la proporción de ácido ferúlico y p-cumárico en su forma ligada aumentaron en el residuo a expensas en parte de la reducción en el contenido proteico (solubilización proteica) e incremento de la FDT. Entonces, el residuo utilizado para la extracción de AX contiene una gran proporción de ácidos fenólicos ligados, confiriendo gran potencial bioactivo a las fracciones obtenidas a partir del **REP**.

En cuanto al extracto etéreo, el contenido de grasas bruta en la HM fue similar al reportado por Proaño et al. (2020), pero disminuyó en el **REP** ($p < 0,05$) posiblemente debido a una saponificación de la grasa durante el proceso de extracción de proteínas. El contenido de cenizas en la HM fue acorde a los valores reportados en bibliografía (Meneses et al. 2013, Kemppainen et al. 2016), y aumentó en el **REP** ($p < 0,05$)

posiblemente debido a la incorporación de sales por ajustes de pH durante el proceso de extracción de proteínas.

En cuanto al contenido de carbohidratos no digeribles, se determinaron celulosa y hemicelulosa. Los resultados fueron similares a los hallados en bibliografía para HM (celulosa: $16,8 \pm 0,8$ y $13,2$ g 100 g⁻¹ b.s., hemicelulosa $28,4 \pm 2,0$ y $25,3$ g 100 g⁻¹ b.s. de acuerdo con Mussatto et al. (2006) y Kemppainen et al. (2016), respectivamente). Las diferencias se deben a la variabilidad intrínseca del material (HM) y a las metodologías de análisis empleadas por los autores.

En cuanto a la lignina de HM, los contenidos de lignina insoluble y soluble fueron similares a los informados por Kemppainen et al. (2016), siendo dichos valores $14,7$ y $4,9$ g 100 g⁻¹ b.s., respectivamente. Además, el contenido total de lignina (soluble+insoluble) fue de $26,8$ y $25,5$ g 100 g⁻¹ b.s. para HM y **REP**. Se observó una disminución en la cantidad de lignina soluble y un aumento de la lignina insoluble en el **REP**, posiblemente debido a la co-extracción de lignina durante el proceso de obtención de proteínas, especialmente cuando se trabaja a pH alcalino (Niemi et al. 2013b).

III.4.2-Extracción de arabinosilanos

III.4.2.1-Extracción asistida por enzimas y extracción alcalina directa

Como se mencionó anteriormente, los AX fueron extraídos a partir del **REP** mediante dos metodologías diferentes: extracción asistida por enzimas con posterior extracción alcalina y extracción alcalina directa. Cabe recordar que para la extracción asistida por enzimas se utilizaron tres sistemas enzimáticos: hidrólisis con celulasa, hidrólisis con proteasa (P1) y celulasa de forma simultánea, e hidrólisis con proteasa (P2) y celulasa de forma secuencial. Sobre el residuo obtenido con cada sistema enzimático (**R1**) se aplicó posteriormente una extracción alcalina directa.

En la **Tabla III.3** se muestra la composición del residuo post-tratamiento enzimático (**R1**), así como también, la del sobrenadante obtenido (**S1**) en cada caso. El empleo de proteasas y celulasas de forma combinada (hidrólisis simultánea o secuencial) provocó un incremento del contenido de sólidos, proteínas e hidratos de carbono en los sobrenadantes obtenidos (**S1**) respecto al uso sólo de celulasa. Consecuentemente, se observó una disminución del contenido de sólidos en **R1**. Este resultado indicaría que la acción combinada de proteasas y celulasas sobre el **REP**

resulta más eficiente que el empleo de sólo celulasa para eliminar la fracción celulo-proteica.

Tabla III.3- Composición de **R1** y **S1** obtenidos luego de tratamientos enzimáticos

Método de extracción	S1			R1	
	Sólidos (g 100 mL ⁻¹)	Proteínas (g 100 mL ⁻¹)	CH (g 100 mL ⁻¹)	Sólidos (g 100 g ⁻¹)	Proteínas (g 100 g ⁻¹)
Celulasa	1,40±0,10 ^a	0,27±0,01 ^a	0,42±0,14	18,25±0,61 ^b	1,46±0,11
Celulasa + P1	1,96±0,10 ^b	0,46±0,03 ^b	0,69±0,26	15,63±0,49 ^a	1,14±0,16
P2 + celulasa (secuencial)	1,71±0,14 ^{ab}	0,39±0,09 ^{ab}	0,73±0,36	16,58±0,16 ^a	1,12±0,02

X±DE. Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$). CH: carbohidratos; **S1** y **R1**: sobrenadantes y residuos correspondientes al tratamiento asistido por enzimas.

A partir de los sobrenadantes obtenidos con los distintos sistemas enzimáticos (**S1**), se procedió a realizar una precipitación etanólica (sin extracción alcalina). Los resultados obtenidos respecto al contenido de hidratos de carbono y proteínas se muestran en la **Tabla III.4**. Como se puede observar, el contenido de hidratos de carbono no difirió entre los distintos precipitados obtenidos a partir de **S1** con las diferentes enzimas ($p < 0,05$). Sin embargo, el nivel de proteínas precipitadas a partir de **S1-celulasa** fue significativamente superior al hallado para los sistemas celulasa + proteasa ($p < 0,05$). Este resultado es lógico, ya que la adición de una proteasa genera péptidos de diversos tamaños a partir de las proteínas presentes en **REP**, muchos de los cuales pueden permanecer solubles en medio etanólico debido a su bajo peso molecular (Niemi et al. 2013a). No obstante, la acción de una celulasa sin adición de proteasas podría promover la solubilización proteica como consecuencia de la ruptura de la pared celular. En este caso, las proteínas intactas resultarían sensibles a la acción del etanol, disminuyendo su solubilidad e incrementando su contenido en el precipitado.

Además, se realizó un ensayo de reconstitución en agua de los precipitados. A nivel funcional, estos precipitados etanólicos no se dispersaron bien, presentando muchos sólidos en suspensión y no generaron aumento de consistencia, lo que es indicativo de que en estos pretratamientos los carbohidratos extraídos y precipitados con etanol no serían AX.

Tabla III.4- Contenido de hidratos de carbono y proteínas en el precipitado resuspendido obtenido a partir de **S1** con los diferentes sistemas enzimáticos

Precipitados etanólicos	H de C (g 100 g b.s.⁻¹)	Proteínas (g 100 g b.s.⁻¹)
Celulasa	14,20±1,49 ^a	5,32±0,56 ^b
Celulasa+P1	16,20±1,70 ^a	4,26±0,45 ^a
P2-celulasa	14,79±1,55 ^a	4,95±0,52 ^a

X±DE. H de C: hidratos de carbono. Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

Como se mencionó anteriormente, sobre el **R1** obtenido con los distintos sistemas enzimáticos se aplicó una extracción alcalina. A partir de esta etapa se obtuvo un sobrenadante (**S2**), un residuo (**R2**) y una fracción con características de gel (**Gel**). Igualmente, sobre el **REP** se aplicó una extracción alcalina directa, obteniéndose también un sobrenadante (**S2**), un residuo (**R2**) y una fracción con características de gel (**Gel**).

En la **Tabla III.5** se muestra el contenido y rendimiento de sólidos de las fracciones obtenidas con los diferentes sistemas extractivos. Como se puede observar, los rendimientos de sólidos en **S2** fueron similares tanto para los sistemas enzimáticos como para la extracción alcalina directa ($p > 0,05$). Sin embargo, el contenido de hidratos de carbono en **S2** obtenido con extracción alcalina directa fue significativamente superior al hallado para los sistemas enzimáticos ($p < 0,05$). Este resultado podría estar asociado a una solubilización previa de los hidratos de carbono por acción de las enzimas (**Tabla III.3**), por lo que el contenido de carbohidratos del residuo de partida (**R1 vs. REP**) resultó inferior. Por otro lado, la pureza de hidratos de carbono en **S2** obtenido con extracción alcalina directa fue significativamente superior al encontrado para los sistemas enzimáticos ($p < 0,05$). Esto podría deberse a la solubilización de otras macromoléculas presentes en **R1** durante la extracción alcalina. Cabe mencionar que el tratamiento enzimático aplicado con proteasas y celulasa puede generar un residuo de hidrólisis cuya estructura macromolecular es más laxa (Faulds et al. 2009), promoviéndose la solubilización posterior en medio alcalino de especies distintas a los carbohidratos.

Otro aspecto que puede impactar en el nivel de hidratos de carbono y su pureza en **S2** es la formación de la fracción con aspecto de gel. Como se puede ver en la **Tabla III.5**, el proceso enzimático con celulasa generó un **Gel** con mayor contenido de hidratos de carbono y pureza que el hallado con la extracción alcalina directa ($p < 0,05$).

Este resultado podría indicar que los hidratos de carbono extraídos a partir del **R1-celulasa** son retenidos en el gel en mayor medida que los extraídos directamente con álcalis a partir de **REP**, lo que disminuye su proporción en el respectivo sobrenadante, evidenciándose menor contenido de carbohidratos y pureza en **S2-celulasa**.

Posteriormente, sobre cada **S2** se llevó a cabo un proceso de precipitación etanólica, obteniéndose cuatro precipitados: el proveniente de la extracción alcalina directa, y los obtenidos a partir de los pretratamientos con celulasa, celulasa+P1 y P2+celulasa. El objetivo principal de esta etapa fue obtener los **AX-c**. En la **Tabla III.6** se muestran los resultados obtenidos respecto al rendimiento y composición de los **AX-c** para cada **S2**. Como se puede ver, no hubo diferencias en el rendimiento de sólidos e hidratos de carbono obtenidos con los diferentes sistemas extractivos ($p > 0,05$). Sin embargo, la pureza de hidratos de carbono en el **AX-c** obtenido mediante extracción alcalina directa fue superior a la hallada para los concentrados obtenidos con los pretratamientos enzimáticos ($p < 0,05$). Estos resultados concuerdan con el menor contenido de proteínas del **AX-c** de extracción alcalina directa (**Tabla III.5**) ($p < 0,05$). Por lo tanto, la menor pureza en carbohidratos de los **AX-c** obtenidos a partir de **R1** podría estar asociada a una co-precipitación con las proteínas residuales. Cabe recordar que la pureza de hidratos de carbono del **S2** proveniente de los diferentes sistemas enzimáticos fue inferior a la obtenida con la extracción alcalina directa sobre **REP** (**Tabla III.5**).

Por último, no se observaron diferencias significativas en las propiedades antioxidantes de los distintos **AX-c** ($p > 0,05$). Esto podría deberse a que tanto los **AX** como las proteínas pueden inhibir al radical ABTS (Naibaho et al. 2022), lo que se manifiesta como una misma actividad antioxidante para todos los precipitados, independientemente de la pureza de hidratos de carbono.

Tabla III.5- Contenido y rendimiento de sólidos, contenido de hidratos de carbono y pureza respecto a los sólidos solubles de las diferentes fracciones obtenidas luego de los procesos enzimáticos y extracción alcalina directa.

Proceso	S2					Gel					R2
	Sólidos (g 100 mL ⁻¹)	Rendimiento (%)	H de C (g 100 mL ⁻¹)	Pureza (g 100 g ⁻¹ sólidos)	Proteínas (g 100 mL ⁻¹)	Sólidos (g 100 g ⁻¹)	Rendimiento (%)	H de C (g 100 g ⁻¹)	Pureza (g 100 g ⁻¹ sólidos)	Proteínas (g 100 g ⁻¹)	Sólidos (g 100 g ⁻¹)
Alcalina directa	3,9±0,2	25,1±0,6	1,2±0,0 ^c	30,8±1,6 ^c	0,4±0,0 ^c	6,7±0,2	21,0±1,9 ^c	0,6±0,3 ^b	9,6±4,1 ^b	0,5±0,1 ^a	10,6±0,4
Celulasa	4,0±0,2	25,6±0,1	0,5±0, ^a	11,1±3,2 ^a	0,3±0,0 ^b	6,9±0,4	8,0±1,7 ^b	0,8±0,2 ^c	11,9±3,6 ^b	0,7±0,0 ^b	12,0±1,1
Celulasa+ P1	4,0±0,2	27,9±2,8	0,8±0,1 ^b	20,1±2,3 ^b	0,4±0,0 ^{bc}	6,7±0,1	5,3±0,3 ^a	0,3±0,1 ^a	4,9±1,1 ^a	0,7±0,0 ^b	10,9±0,3
P2 + Celulasa	3,8±0,1	22,6±3,0	0,7±0,1 ^b	15,8±2,6 ^a	0,3±0,0 ^a	6,7±0,1	9,8±0,1 ^b	0,3±0,3 ^a	4,7±0,9 ^a	0,4±0,0 ^a	9,8±1,6

X±DE. Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas entre las muestras (p <0,05). H de C: hidratos de carbono.

Tabla III.6- Rendimientos y composición del precipitado etanólico (AX-c) obtenido a partir de los sobrenadantes S2

Precipitados etanólicos	Rendimiento de sólidos a partir de S2 (%)	Rendimiento de H de C a partir de S2 (%)	Pureza de H de C (g 100 g ⁻¹ sólidos)	Proteínas (g proteína 100 g ⁻¹ sólidos)	ABTS ⁺ (mmol Trolox Eq 100 g ⁻¹ sólidos)
Alcalina directa	30,6±3,2	67,5±7,1	70,3±7,4 ^b	5,4±0,6 ^a	32,2±3,1
Celulasa	30,8±3,1	63,3±6,0	34,7±3,5 ^a	11,6±1,2 ^b	37,5±3,75
Celulasa+ P1	31,8±3,1	62,0±6,2	42,3±4,2 ^a	12,1±1,2 ^{bc}	38,8±3,6
P2 + Celulasa	32,1±3,1	62,0±6,2	41,7±4,2 ^a	9,8±1,0 ^b	30,3±3,0

X±DE. Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas entre las muestras (p <0,05). H de C: hidratos de carbono.

III.4.2.2-Estudio del impacto de la temperatura en la extracción alcalina directa

Como se indicó anteriormente, la extracción alcalina directa fue el proceso que permitió obtener mayor pureza de hidratos de carbono (**Tabla III.6**). Por este motivo, se estudió el efecto de la temperatura durante esta etapa extractiva. Para ello, se evaluaron cuatro temperaturas de extracción (25, 40, 50 y 60°C), obteniéndose al final del tratamiento con álcalis sobre **REP**: un sobrenadante (**S2**), un residuo (**R2**) y una fracción con características de gel (**Gel**) para cada una de las temperaturas evaluadas. En la **Tabla III.7** se puede observar una tendencia de mayor extracción de sólidos en **S2**, con mayor rendimiento a medida que aumentó la temperatura de extracción hasta alcanzar un plateau a 50°C. A diferencia del rendimiento, la pureza de hidratos de carbono en **S2** pasó por un máximo comprendido entre 40 y 50°C, siendo los valores obtenidos para 25 y 60°C más bajos ($p < 0,05$). Sorprendentemente, no hubo diferencias en el contenido de proteínas obtenido a las distintas temperaturas, por lo cual, la variabilidad en la pureza de hidratos de carbono podría estar asociada a la solubilización de otras especies no proteicas tales como lignina, minerales, etc. Con respecto a la fracción gel, se pudo evidenciar un mayor rendimiento de sólidos entre 40 y 50°C. Sin embargo, la pureza de hidratos de carbono obtenida a 50°C fue superior a la de 40°C ($p < 0,05$). Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en el contenido de proteínas de esta fracción para las diferentes temperaturas ($p > 0,05$).

Posteriormente, sobre cada **S2** se llevó a cabo un proceso de precipitación etanólica. En la **Tabla III.8** se muestran los resultados obtenidos respecto al rendimiento y composición de **AX-c**. El mayor rendimiento de sólidos se obtuvo a 50°C. Sin embargo, el mayor rendimiento de hidratos de carbono y pureza se obtuvo a 40°C ($p < 0,05$). En línea con este resultado, el precipitado obtenido a 40°C presentó un bajo contenido proteico ($p < 0,05$) y el mayor nivel de ácido ferúlico asociado a los **AX**, (**Tabla III.9**).

Tabla III.7- Contenido y rendimiento de sólidos, contenido de hidratos de carbono y pureza, y contenido de proteínas de las diferentes fracciones obtenidas luego del proceso de extracción alcalina directa a diferentes temperaturas.

T (°C)	S2					GEL				
	Sólidos (g 100g ⁻¹)	Rendimiento (%)	H de C (g 100 g ⁻¹)	Pureza de H de C (g 100 g ⁻¹ sólidos)	Proteínas (g 100 g ⁻¹ b.s.)	Sólidos (g 100g ⁻¹)	Rendimiento (%)	H de C (g 100 g ⁻¹)	Pureza de H de C (g 100 g ⁻¹ sólidos)	Proteínas (g 100 g ⁻¹ b.s.)
25	3,7±0,1 ^a	23,2±0,4 ^a	0,8±0,1 ^a	22,2±0,9 ^a	9,6±0,1	5,2±0,1 ^a	12,2±0,3 ^a	1,3±0,0 ^a	25,4±1,9 ^b	9,2±0,8
40	3,9±0,2 ^a	25,1±0,6 ^b	1,2±0,1 ^b	30,8±1,6 ^c	8,9±0,1	6,7±0,1 ^b	21,1±1,9 ^c	1,3±0,1 ^a	18,8±2,1 ^a	9,8±0,6
50	4,6±0,4 ^b	30,4±2,7 ^c	1,5±0,1 ^c	31,5±1,0 ^c	9,8±0,1	6,3±0,1 ^b	18,8±1,5 ^c	1,8±0,2 ^c	29,2±2,0 ^c	9,0±0,6
60	4,6±0,4 ^b	34,26±2,4 ^c	1,2±0,1 ^b	26,2±0,4 ^b	9,0±0,1	7,3±0,2 ^c	16,6±1,5 ^b	1,5±0,2 ^b	21,0±2,9 ^b	9,1±0,1

X±DE. Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas entre las muestras (p <0,05). H de C: hidratos de carbono.

Tabla III.8- Rendimientos y composición del precipitado etanólico (AX-c) obtenido a partir de los sobrenadantes S2 utilizando distintas temperaturas de extracción

T (°C)	Rendimiento de sólidos a partir de S2 (%)	Rendimiento de H de C a partir de S2 (%)	Pureza de H de C (g 100 g ⁻¹ b.s.)	Proteínas (g proteína 100 g ⁻¹ b.s.)	ABTS ⁺ (mmol Trolox Eq 100 g ⁻¹ b.s.)
25	26,6±2,6 ^a	50,3±3,9 ^a	42,0±3,3 ^a	5,7±0,3 ^a	11,0±0,2 ^a
40	31,9±1,8 ^a	79,7±7,8 ^d	70,9±3,8 ^c	5,7±0,4 ^a	31,0±0,7 ^c
50	36,9±2,6 ^b	73,3±7,2 ^c	59,6±5,9 ^b	7,3±0,5 ^b	20,0±0,3 ^b
60	32,7±3,3 ^a	60,4±5,9 ^b	48,3±4,6 ^a	13,7±1,1 ^c	21,2±1,1 ^b

X±DE. Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas entre las muestras (p <0,05). H de C: hidratos de carbono.

Tabla III.9- Contenido de ácido ferúlico libre del precipitado etanólico (**AX-c**) obtenido a partir de los sobrenadantes **S2** utilizando distintas temperaturas de extracción

Temperatura (°C)	AF mg 100g ⁻¹ AX-c	ABTS ⁺ (mmol Trolox Eq 100 g ⁻¹ b.s.)
25	537,5±8,9 ^b	11,0±0,2 ^a
40	622,6±12,5 ^c	31,0±0,7 ^c
50	370,4±7,4 ^a	20,0±0,3 ^b
60	360,4±8,3 ^a	21,2±1,1 ^b

X±DE. Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

Respecto a las propiedades antioxidantes, el proceso de extracción alcalina directa sobre **REP** a 40°C exhibió el mayor valor de inhibición del radical ABTS⁺ (**Tabla III.9**). Esto está en relación con los valores de **AF** presentes en los **AX-c** obtenidos para cada condición de temperatura (**Tabla III.9**). Como se mencionó anteriormente, el **AF** exhibe fuertes propiedades antioxidantes, las cuales son otorgadas a la molécula de **AX** (Morales-Ortega et al. 2013).

A partir de estos resultados, la temperatura seleccionada para llevar a cabo la extracción alcalina directa fue 40°C, ya que hubo una mejora en la extracción de sólidos respecto al proceso a 25°C y permitió obtener un precipitado con mayor pureza de hidratos de carbono y contenido de ácido ferúlico, relacionados con los **AX**. Se descartó la extracción a mayores temperaturas (50 y 60°C), ya que no ofrecen una mejora sustancial en el rendimiento de hidratos de carbono e implican un mayor gasto de energía. Además, los valores de pureza de hidratos de carbono y contenido de ácido ferúlico son inferiores a los obtenidos a 40°C.

III.4.2.3-Impacto del pH en la precipitación etanólica

El pH al cual se lleva a cabo el proceso de precipitación etanólica puede impactar en las especies que precipitan (Vieira et al. 2014). Por este motivo, se estudió el efecto del pH durante la precipitación etanólica post-extracción alcalina directa sobre el **REP**. Para ello, se realizó la extracción alcalina directa sobre el **REP** durante 2 horas a 40°C. Posteriormente, se centrifugó a 3000xg durante 15 min y al sobrenadante obtenido se le ajustó el pH a 2, 4, 7 y 12. Por último, se adicionó el etanol y se procedió con la precipitación. Como se puede observar en la **Tabla III.10**, a excepción de pH 2, el rendimiento de sólidos en el precipitado no difirió significativamente entre los pHs

evaluados ($p > 0,05$). Sin embargo, el rendimiento de hidratos de carbono fue significativamente superior a pH neutro y alcalino, no observándose diferencias entre ambos pHs. De igual modo, los mayores valores de pureza fueron obtenidos a pH 7 y 12. Resulta oportuno destacar que el nivel de proteínas en el precipitado de pH 4 fue prácticamente nulo, lo que podría estar asociado con el punto isoeléctrico de las proteínas extraídas (Proaño et al. 2020). Un aspecto relevante es que el nivel de proteínas obtenido en el precipitado a pH 12 fue 2,5 veces menor al hallado a pH 7, siendo el rendimiento y la pureza de hidratos de carbono en ambos precipitados similar ($p > 0,05$). Por lo tanto, el proceso de precipitación a pH endógeno (pH de la extracción alcalina directa) contribuye con la precipitación de los hidratos de carbono de forma eficiente, obteniéndose un precipitado con bajo tenor proteico.

Tabla III.10- Rendimientos y composición del precipitado etanólico (AX-c) obtenido a partir del sobrenadante S2 utilizando distintos pHs de precipitación etanólica

pH	Rendimiento de sólidos a partir de S2 (%)	Rendimiento de H de C a partir de S2 (%)	Pureza de H de C (g 100 g ⁻¹ b.s.)	Proteínas (g 100 g ⁻¹ b.s.)
2	24,2±2,5 ^a	66,3±1,7 ^b	65,7±7,0 ^b	2,0±0,3 ^a
4	35,0±3,2 ^b	54,83±5,5 ^a	29,5±3,0 ^a	n.d.
7	30,5±3,0 ^b	72,5±7,3 ^c	68,3±6,9 ^b	13,1±0,9 ^c
12	35,8±3,8 ^b	78,9±1,2 ^c	71,1±0,8 ^b	5,2±0,5 ^b

X±DE. Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$). H de C: hidratos de carbono. n.d.: no detectado.

Por otra parte, el precipitado etanólico obtenido a pH 7 presentó fuerte adherencia al papel de filtro luego del proceso de secado, dificultando la recuperación del producto. Además, en el proceso de dispersión en agua se observó una mayor dificultad que con el precipitado obtenido a pH 12. Así mismo, durante el proceso de ajuste de pH de 12 a 7 se incrementa la cantidad de sales en el medio, lo que resulta indeseable. Por todo lo expuesto, el pH seleccionado para efectuar la precipitación etanólica fue 12, siendo dicho pH el mismo de la extracción alcalina directa (endógeno). En la **Figura III.5** se muestra el precipitado etanólico obtenido a pH 12.

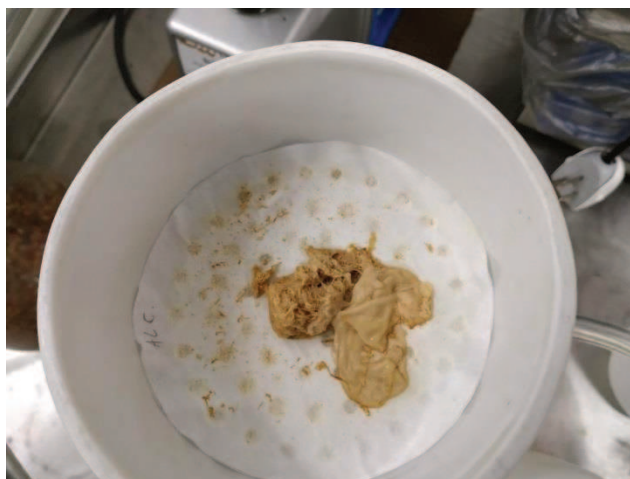


Figura III.5- Precipitado etanólico obtenido a partir de **S2** a pH 12.

III.4.2.4-Estudio del lavado del **R2** y precipitación etanólica

Como se mencionó anteriormente, luego de la extracción alcalina directa a 40°C se obtiene el **S2** y un residuo (**R2**). Sobre este último se realizó un lavado de 15 min o un lavado de 30 min con NaOH 0,5 mol L⁻¹. Sobre el agua de lavado obtenida, se analizaron los contenidos de sólidos e hidratos de carbono. Los resultados se muestran en la **Tabla III.11**.

Tabla III.11- Contenido de sólidos e hidratos de carbono de **S2** y del agua de lavado

Extracción alcalina directa a 40°C	Sólidos		H de C (g 100 g ⁻¹ b.s.)
	Sólidos (%)	Rendimiento (%)*	
S2	3,9±0,2 ^a	25,1±0,6 ^b	30,8±1,6 ^b
Lavado - 15 min	3,65±0,2 ^a	19,7±1,0 ^a	14,5±0,7 ^a
Lavado - 30 min	4,34±0,1 ^b	23,7±0,8 ^b	27,4±1,4 ^b

X±DE. Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas entre las muestras (p < 0,05). *Rendimiento = sólidos lavado/sólidos iniciales **R2**. H de C: hidratos de carbono.

Como se puede ver en la **Tabla III.11**, el proceso de lavado de **R2** extrajo sólidos e hidratos de carbono que podrían ser recuperados con la precipitación etanólica, aumentando el rendimiento global del proceso. En este sentido, un mayor tiempo de lavado implicó mayor extracción de sólidos e hidratos de carbono. Al respecto, el agua del lavado de 15 min exhibió un 47% de hidratos de carbono respecto al hallado en **S2**, mientras que para 30 min de lavado, el contenido de hidratos representó un 88% del obtenido con **S2**. Esto demuestra que lavar durante 30 min resulta más apropiado para recuperar los hidratos de carbono de **R2**. A partir del agua de lavado obtenida a 15 o 30

min de tratamiento, se hicieron pruebas de precipitación etanólica y se caracterizaron los precipitados. Además, en la **Tabla III.12** se muestra la composición de los precipitados obtenidos a partir de dichos lavados.

Tabla III.12- Rendimientos y composición del precipitado etanólico (**AX-c**) obtenido a partir del sobrenadante **S2** y del agua de lavado a 15 y 30 minutos de tratamiento

Precipitado	Rendimiento de H de C (%)	Pureza de H de C (g 100 g ⁻¹ b.s.)	Proteínas (g 100 g ⁻¹ b.s.)
S2	78,3±7,2 ^b	71,1±0,8 ^c	5,2±0,5
Lavado – 15 min	47,6±2,4 ^a	29,5±1,5 ^a	4,9±0,2
Lavado – 30 min	50,5±2,5 ^a	34,5±1,5 ^b	5,0±0,2

X±DE. Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$). H de C: hidratos de carbono.

Como se puede observar en la **Tabla III.12**, el precipitado obtenido a partir del lavado durante 30 min exhibió mayor pureza de hidratos de carbono que el precipitado del lavado de 15 min ($p < 0,05$). Además, no se observaron diferencias significativas en el contenido de proteínas de ambos precipitados ($p > 0,05$). Por lo tanto, se decidió realizar el lavado durante 30 min. Desde el punto de vista funcional, este precipitado se reconstituyó muy bien, de manera similar al obtenido a partir de **S2**, aunque la dispersión resultante fue menos viscosa y amarillenta.

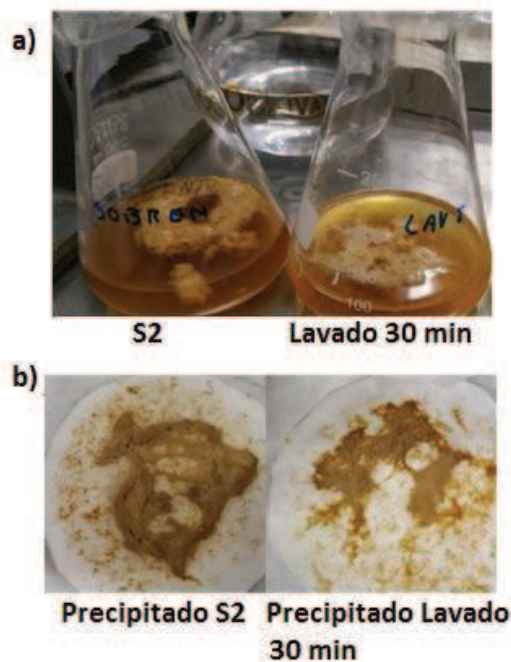


Figura III.6 a) **S2** y agua de lavado obtenida a 30 min, b) precipitados obtenidos a partir de **S2** y del agua de lavado a 30 min.

Como se puede ver en la **Figura III.6**, el precipitado obtenido a partir del agua de lavado a 30 min resultó muy similar al que se obtuvo a partir de **S2**. Además, el aspecto del agua de lavado a este tiempo posee similares características que **S2**.

En base a los resultados obtenidos a partir de **R2** y sus lavados, se seleccionó 30 min como tiempo adecuado para efectuar este proceso.

III.4.2.5-Ensayo de precipitación con diferentes proporciones de etanol

Con el objetivo de optimizar la proporción de etanol:sobrenadante en la precipitación, se evaluaron diferentes relaciones **etanol:S2** (2,3:1; 1,5:1 y 1:1). Cabe señalar que la relación 2,3:1 fue la proporción **etanol:S2** utilizada originalmente. En la **Tabla III.13** se muestra el rendimiento de sólidos de los precipitados obtenidos y su pureza en carbohidratos. Como se puede apreciar, no se observaron diferencias significativas en el rendimiento de sólidos ni en la pureza obtenidos con la proporción 2,3:1 y 1,5:1 ($p > 0,05$). Sin embargo, una reducción de la proporción **etanol:S2** más allá de 1,5:1 provocó una disminución tanto en el rendimiento de sólidos como en la pureza en carbohidratos ($p < 0,05$).

Tabla III.13- Rendimiento de sólidos de precipitación obtenidos con diferentes proporciones de etanol

Proporción Etanol:S2	Rendimiento de sólidos Pureza de H de C	
	a partir de S2 (%)	(g 100g ⁻¹ b.s.)
2,3:1*	43,2±1,5 ^b	71,1±0,8 ^b
1,5:1	44,7±1,1 ^b	70,6±1,9 ^b
1:1	30,6±1,8 ^a	54,5±0,7 ^a

X±DE. Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

Respecto a las características de los precipitados obtenidos con los diferentes niveles de **etanol:S2** (**Figura III.7**), se pudo apreciar que la proporción 1:1 produjo menor cantidad de precipitado, y un líquido más turbio. Sin embargo, con las demás relaciones **etanol:S2** se formó mayor cantidad de precipitado, independientemente del nivel de etanol adicionado. Además, para la relación 1,5:1 el líquido fue más traslúcido.

En la **Figura III.7** se observan los Sn con etanol en las diferentes condiciones de precipitación.

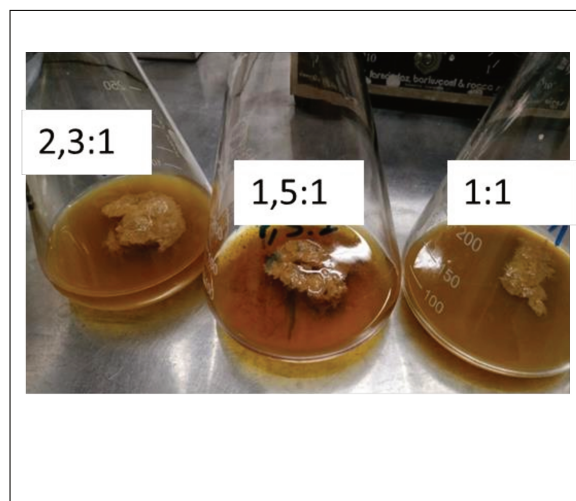


Figura III.7- Sobrenadante (S2) con agregado de etanol en distintos niveles.

De este ensayo se concluye que utilizar una proporción de **etanol:S2** de 1,5:1 proporciona similares resultados a los obtenidos con la relación 2,3:1. Por tal motivo, y en vistas de utilizar la menor cantidad posible de etanol para la precipitación, se seleccionó para los ensayos posteriores la proporción 1,5:1.

III.4.3-Ensayo a escala semi-piloto. Obtención de arabinosilanos (AX-c), compuestos fenólicos (CFS) y lignina

En base a los resultados obtenidos anteriormente, se estableció el proceso de extracción de AX a escala semi-piloto (**Figura III.3**).

En la **Tabla III.14** se muestra la composición de las fracciones obtenidas.

Tabla III.14- Composición de las fracciones obtenidas a partir del proceso a escala semi-piloto

Fracción	Sólidos (g 100 mL ⁻¹)	Pureza H de C (g 100 g ⁻¹ b.s.)	Proteínas (g 100 g ⁻¹ b.s.)	Cenizas (g 100 g ⁻¹ b.s.)
AX-c	82,6±2,9	70,6±1,9	3,0±0,3	16,2±0,4
CFS	2,5±0,5	2,5±0,2	10,7±0,2	1,5±0,1
Lignina	98,0±0,5	3,6±0,2	ND	87,9±2,5

X±DE. CFS: compuestos fenólicos. H de C: hidratos de carbono. ND: No Detectado

Los rendimientos de obtención de **AX-c**, fracción de compuestos fenólicos (**CFS**) y lignina calculados a partir de sólidos del **REP** fueron 16,7±0,9, 21,5±0,3 y 10,1±0,2%, respectivamente. El **AX-c** obtenido por extracción alcalina directa y

precipitación etanólica presentó un contenido de carbohidratos mayor al 50% apropiado para un concentrado de esta biomolécula. Adicionalmente, sobre el AX-c se determinó el contenido de xilosa y arabinosa de acuerdo a Bartolomé et al. (2002), resultando una relación Arabinosa/Xilosa de $0,62 \pm 0,06$.

El contenido de proteínas residuales fue mayor en la fracción **CFS**, lo que probablemente se debe a que se buscó minimizar la proporción de proteínas en el precipitado etanólico ajustando el pH de la precipitación, y por lo tanto permanecieron solubles en el sobrenadante. Sin embargo, el contenido de cenizas fue elevado en la fracción Lignina, indicando que la mayor parte de los minerales y las sales generadas durante el proceso, permanecieron en esta fracción. Se deberá proponer posteriormente un proceso de extracción/purificación de sales que escapen a los alcances de esta tesis.

Además, teniendo en cuenta el contenido de hemicelulosa del **REP** ($47,9 \pm 0,8$ g 100 g⁻¹ b.s.), se calculó el rendimiento de extracción de hemicelulosa del proceso, resultando del $36,84 \pm 2,63\%$. Este valor es superior al obtenido por Lynch et al. (2021) que logró solubilizar 21% de AX de la HM, utilizando un tratamiento enzimático y una fermentación con *L. plantarum F10* y al de Chen et al. (2019a) que logró extraer AX de trigo obteniendo un rendimiento de ~15% con un tratamiento enzimático y posterior extracción alcalina. Es decir que aproximadamente un 63% de las hemicelulosas continúan en **REAx**, luego de la extracción.

III.4.3.1-Perfil de compuestos fenólicos de las distintas fracciones

En la **Tabla III.15** se muestra el contenido de ácido cumárico y ferúlico del **AX-c**, y las fracciones **CFS** y **lignina**. El ácido fenólico mayoritario en todas las fracciones fue el **AF**, seguido por el ácido cumárico. No obstante, no fue posible detectar ácido cafeico y sinápico. Como era de esperar, el mayor contenido de **AF** y cumárico fue obtenido en **CFS**, siguiéndole en magnitud la fracción de **lignina** (**Tabla III.15**). En este sentido, el contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) en **CFS** fue significativamente superior al hallado para **AX-c** y **lignina**, siendo los valores $11,9 \pm 0,2$ vs. $1,3 \pm 0,0$ y $4,7 \pm 0,1$ mg AG g⁻¹ sólidos para **CFS**, **AX-c** y **lignina** respectivamente.

Como se muestra en la **Tabla III.16**, la proporción de **AF** en todas las fracciones superó el 80% respecto al total de ácidos fenólicos cuantificados. Por su parte, el ácido p-cumárico representó más del 13% en las fracciones obtenidas a escala semi-piloto. Esto demuestra la predominancia de este ácido fenólico respecto a las demás especies. En este sentido, Chen et al. (2019a) reportaron que los **AX** extraídos de forma alcalina

contienen elevado contenido de ácido ferúlico, el cual permanece principalmente en su forma libre. Al respecto, los compuestos fenólicos libres (ácido ferúlico y p-cumárico) en **AX-c** fueron 2 veces mayores que los ligados (242,3±12,1 vs. 112,6±5,6 µg g⁻¹ sólidos, respectivamente).

Tabla III.15-Contenido de compuestos fenólicos totales (libres y ligados) en las distintas fracciones

	AX-c	CFS	Lignina
Ácido p-cumárico (µg g⁻¹ sol)	56,5±2,8 ^A	988,0±49,4 ^C	373,0±18,7 ^B
Ácido ferúlico (µg g⁻¹ sol)	298,3±14,9 ^A	6109,4±305,5 ^C	1840,4±92,0 ^B
Total (µg g⁻¹ sol)	354,8±17,7^A	7097,4±354,9^C	2213,4±110,7^B

X±DE. Letras en mayúscula diferentes en cada fila indican diferencias significativas (p < 0,05).

Tabla III.16- Proporción de ácidos fenólicos respecto al total cuantificado en las distintas fracciones

Fracción	Ácido ferúlico (%)	Ácido p-cumárico (%)
AX-c	84,1±3,3	15,9±1,4
CFS	86,1±5,2	13,9±0,7
Lignina	83,2±2,0	16,9±0,1

X±DE. Letras en mayúscula diferentes en cada columna indican diferencias significativas (p < 0,05).

III.4.3.2-Espectrometría de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) de las fracciones CFS, AX-c y lignina

En la **Figura III.8** se muestra el perfil FTIR de las fracciones **CFS**, **AX-c** y **lignina**. Además, se exhibe el perfil FTIR de un estándar de **AF**.

El espectro de **AF** exhibió los picos característicos a 1508 y 1620 cm⁻¹, los cuales corresponden al enlace C-C y C=C del anillo aromático respectivamente (Woranuch y Yoksan 2013). Además, la absorción 1458 cm⁻¹ corresponde al enlace C-H del anillo aromático y el pico situado en 1270cm⁻¹ corresponde a la unión C-O en el grupo Arilo-O de este ácido fenólico (Pazo-Cepeda et al. 2023). Como se observa en la **Figura III.8**, la fracción **CFS** exhibió los picos a 1508 y 1620 cm⁻¹, con un leve corrimiento (1538 y 1620 cm⁻¹) probablemente debido a la presencia de proteínas solubles (Woranuch y Yoksan 2013). Notar que el contenido de proteínas en **CFS** fue

significativamente superior al obtenido con **AX-c** y **lignina** ($10,7\pm 0,2$ vs. $3,0\pm 0,3$ g 100g^{-1} base seca y no detectado, respectivamente).

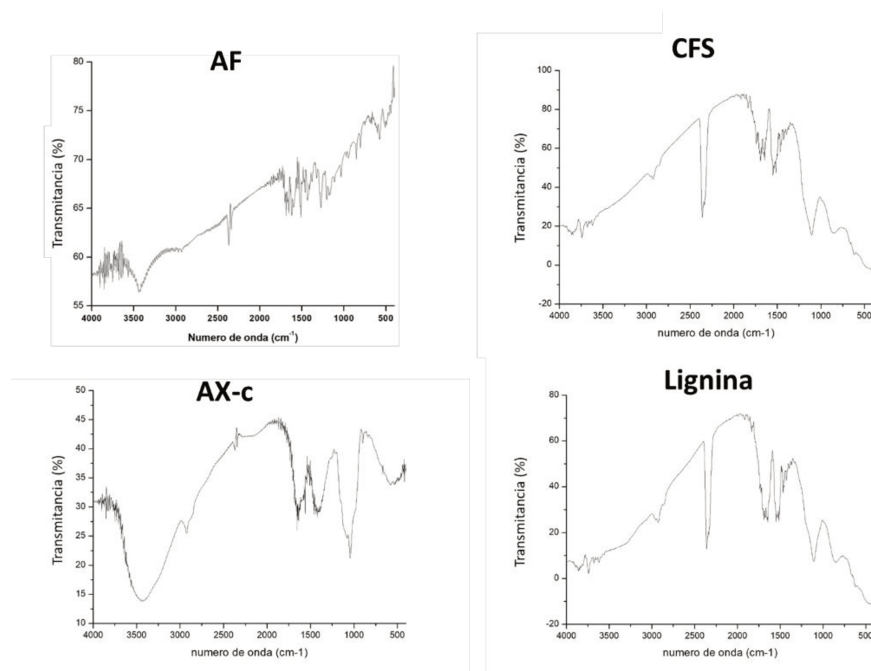


Figura III.8- Perfil FTIR de AF y las fracciones **CFS**, **AX-c** y **lignina** en la región 2200 a 500 cm^{-1} .

El perfil de FTIR de la fracción **AX-c** presentó los picos característicos de los AX. En este sentido, se pudieron observar en la región considerada huella dactilar de esta molécula ($700 - 1500\text{ cm}^{-1}$) los picos correspondientes a los enlaces β -(1 \rightarrow 4) ($1000-700\text{ cm}^{-1}$), la molécula de xilosa (1040 cm^{-1}), la molécula de arabinosa (1160 cm^{-1}), y los grupos carbonilos del ácido urónico (1420 cm^{-1}) (Jaguey-Hernández et al. 2022; Jiang et al. 2019). Además, en el perfil de **AX-c** se observaron picos en la región comprendida entre 3600 y 3200 cm^{-1} , los cuales se deben a las vibraciones de estiramiento características de los grupos hidroxilo presentes en la molécula. Así mismo, el pico a 2922 cm^{-1} se atribuye a enlaces C-H presentes en la estructura de este polisacárido (Naibaho et al. 2021).

Como se mencionó anteriormente, la banda de absorción en la región de $1500-1700\text{ cm}^{-1}$ se atribuye a vibraciones de los grupos funcionales presentes en el **AF** (1508 y 1620 cm^{-1}) y las proteínas (Zhang et al. 2019), mientras que el pico a 1650 cm^{-1} se debe al grupo amida de las proteínas (Naibaho et al. 2021). En base a este perfil, se puede evidenciar la presencia de proteínas en **AX-c**, las cuales son co-extraídas durante el tratamiento alcalino directo. Además, se evidencia la presencia de **AF** en la molécula de AX.

Por último, la fracción de **lignina** presenta un perfil similar al de **CFS**, aunque los picos mostraron diferente intensidad de absorción. En este sentido, se pudieron visualizar los picos a 1508 y 1620 cm^{-1} , característicos del anillo aromático de **AF**, como así también, tres picos a 1264, 1120 y 1030 cm^{-1} . El primero es atribuido a la vibración O-H del grupo éter fenólico de la lignina, el segundo se debe a la vibración de deformación C-H aromática, y el tercero corresponde a la vibración de estiramiento OH del alcohol primario (Zhao et al. 2023).

III.4.3.3-Propiedades bioactivas de las fracciones **CFS**, **AX-c** y **lignina**

En la **Tabla III.17** se muestran los resultados de propiedades antioxidantes e hipoglucemiante de las fracciones **CFS**, **AX-c** y **lignina**. Como se puede apreciar, todas las fracciones inhibieron los radicales libres ABTS⁺ y DPPH, siendo **CFS** la que presentó mayor actividad antioxidante ($p < 0,05$), lo que se corresponde con el mayor contenido de ácidos fenólicos que presentó esta fracción (**Tabla III.15**). Como se mencionó anteriormente, los ácidos fenólicos poseen fuerte capacidad antioxidante, siendo el **AF** un potente agente reductor (Naibaho et al. 2022). Por lo tanto, la actividad antioxidante de las diferentes fracciones estuvo estrechamente relacionada con el contenido de compuestos fenólicos. En este sentido, se evidenció una correlación directa positiva entre la actividad antioxidante (inhibición del radical ABTS⁺) y la concentración de compuestos fenólicos totales, obteniéndose un coeficiente de correlación de Pearson (r) de 0,8529. Además, los valores obtenidos en las 3 fracciones (**AX-c**, **CFS** y **Lignina**) fueron mayores a aquellos reportados por Connolly et al. (2021), quienes analizaron la actividad antioxidante de diferentes extractos alcalinos y enzimáticos de HM mediante el ensayo de inhibición del radical ABTS⁺ expresado como Capacidad Antioxidante Trolox Equivalente (TEAC), obteniendo un valor de 0,273 mmol Trolox g^{-1} sólidos.

Respecto a las propiedades hipoglucemiantes, todas las fracciones inhibieron a la enzima α -amilasa, siendo **AX-c** y **lignina** las fracciones más activas (menor valor de IC_{50}). Si bien, los ácidos fenólicos actúan como inhibidores de la enzima α -amilasa (Chen et al. 2019a), no se observó una correlación directa entre el contenido de estos compuestos y el valor de IC_{50} obtenido para las diferentes fracciones. Al respecto, la fracción que presentó mayor nivel de ácidos fenólicos (**CFS**) fue la que exhibió menor actividad hipoglucemiante. Por el contrario, las fracciones **AX-c** y **lignina**, cuyo contenido de compuestos fenólicos totales fue diferente (**Tabla III.15**), presentaron

similar valor de IC₅₀ ($p > 0,05$). Esto estaría indicando que el efecto inhibitorio sobre la enzima α -amilasa de las distintas fracciones se debe en parte a los ácidos fenólicos, jugando un papel importante otras características moleculares tales como el PM. En este sentido, la extracción alcalina directa favorece la solubilización de AX de elevado PM (100-200 kDa) (Zhou et al. 2010). A su vez, se puede co-extraer moléculas de lignina cuyo PM naturalmente es elevado (Rencoret et al. 2015). Por lo tanto, el efecto inhibitorio podría estar asociado a un impedimento estérico ocasionado por los AX o la lignina, lo que impediría la interacción entre el sustrato (almidón) y la enzima (Kang et al. 2023).

Tabla III.17- Actividad antioxidante e hipoglucemiante en las distintas fracciones

Fracción	Antioxidante		Hipoglucemiante
	Inhibición de ABTS ⁺ (mmol Trolox g ⁻¹ sólidos)	Inhibición de DPPH (mg ácido ascórbico g ⁻¹ sólidos)	IC ₅₀ - α -amilasa (mg ácido gálico 100 g ⁻¹ sólidos)
AX-c	0,9±0,1 ^b	ND	0,16±0,02 ^a
CFS	1,9±0,0 ^c	6,0±0,8 ^b	1,69±0,08 ^b
Lignina	0,4±0,0 ^a	3,1±0,0 ^a	0,21±0,03 ^a

X±DE. Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas entre muestras ($p < 0,05$). ND: no detectado.

III.4.4-Propiedades fisicoquímicas y tecnofuncionales de la fracción AX-c

III.4.4.1-Parámetros de color de AX-c

En la **Tabla III.18** se muestran los parámetros de color obtenidos para el AX-c. Como se puede ver, tanto el valor de a* como el de b* resultaron positivos. Esto indica que AX-c posee una tonalidad en el rango de color que va desde el amarillo al rojo. Además, se obtuvo un valor de L* superior a 50%, lo que indicaría que esta tonalidad tiende a ser clara.

Por otro lado, el croma (C*) representa el módulo o longitud del vector y h la rotación del mismo. Cuanto mayor es el valor de C* más saturado son los colores, es decir más separados se encuentran del centro del gráfico (**Figura III.4**). Además, un valor de h de 90° representa un tono amarillo, mientras que objetos con valores menores tienden a tonos más naranjas o incluso rojos (para a* y b* positivos) (Gnanasekharan et al. 1992). Como se observa en la **Tabla III.18**, el valor de h fue inferior a 90°, lo que

indicaría que **AX-c** presenta un tono naranja. Además, el valor de C^* fue relativamente bajo, indicando poca saturación del color.

Tabla III.18- Valores de coordenadas cilíndricas de **AX-c**

Parámetros CIELab	Media \pm DS
a*	5,4 \pm 0,1
b*	22,9 \pm 0,2
L*	63,1 \pm 0,5
C*	23,5 \pm 0,2
h	76,7 \pm 0,3

$X \pm DE$. Valores de coordenadas cilíndricas a^* (valores positivos corresponden a tonos rojos y negativos a verdes), b^* (valores positivos corresponden a tonos amarillos y negativos a azules), L^* (luminosidad), C^* (Croma: saturación del color), y h (ángulo Hue: tono del color). DS: desviación estándar.

III.4.4.2-Potencial Z y tamaño hidrodinámico del AX-c

En la **Figuras III.9 A y B** se muestra el potencial Z y el tamaño hidrodinámico de **AX-c**, respectivamente. Como se puede apreciar en la **Figuras III.9 A**, la carga negativa de los AX aumentó con el pH del medio, alcanzándose el máximo valor de potencial Z a pH 10.0 (-19,25 \pm 0,01 mV). Este comportamiento de potencial Z en función del pH concuerda con el obtenido para otros polisacáridos tales como goma arábica, alginato y pectina (Barbosa et al. 2019).

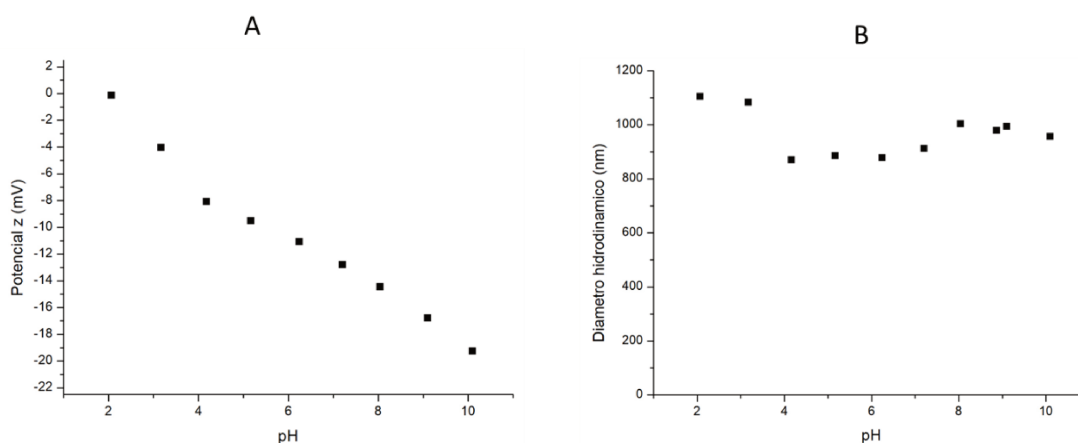


Figura III.9- Potencial Z (**A**) y tamaño hidrodinámico (**B**) de una dispersión de **AX-c** en función del pH.

El incremento de la carga negativa de los **AX-c** en función del pH podría atribuirse en gran parte al **AF** presente en la molécula. Como se sabe, este compuesto fenólico es un ácido orgánico débil cuyos valores de pK_a son 4,56 (grupo carboxilo) y

9,39 (grupo fenoxilo). Por lo tanto, dependiendo del valor de pH de la solución, el **AF** puede estar en su forma no dissociada o como ión ferulato o ión ferulato-fenolato (Ragnar et al. 2000). Sin embargo, cuando el **AF** forma parte de la molécula de **AX**, los grupos carboxilo de este compuesto fenólico están esterificados con arabinosa, lo que reduce el impacto de la carga negativa aportada por el ión ferulato. Por lo tanto, los grupos fenoxilo en su forma de ión (fenolato) contribuirían en mayor magnitud con la carga negativa de los **AX** a pH alcalinos (Pérez-Flores et al. 2019). Resulta oportuno agregar que las proteínas co-extraídas junto con los **AX** también podrían contribuir con la carga negativa del **AX-c**. Al respecto, se ha reportado que los **AX** suelen contener proteínas que están fuertemente asociadas o ligadas covalentemente a la estructura del polisacárido (Mendez-Encinas et al. 2018), otorgando carga al complejo macromolecular (Jaguey-Hernández et al. 2022).

Como se puede apreciar en la **Figuras III.9 B**, el tamaño hidrodinámico de las moléculas de **AX-c** estuvo comprendido entre 800 y 1100 nm, siendo el valor máximo alcanzado a pH 2,0 (1104 ± 20 nm). Esto podría deberse a la densidad de cargas superficiales de las moléculas en función del pH. Como se puede ver en la **Figuras III.9 A**, a pH 2,0 el valor de potencial Z fue prácticamente nulo, lo que indicaría ausencia de carga neta en la molécula de **AX**. Esto impide una correcta solvatación de las moléculas de **AX**, debido a la ausencia de carga neta, lo que favorece su agregación a pH ácido, reflejándose como un incremento del tamaño de partícula.

III.4.4.3-Absorción de agua

En la **Figura III.10** se muestra la cinética de absorción de agua del **AX-c**.

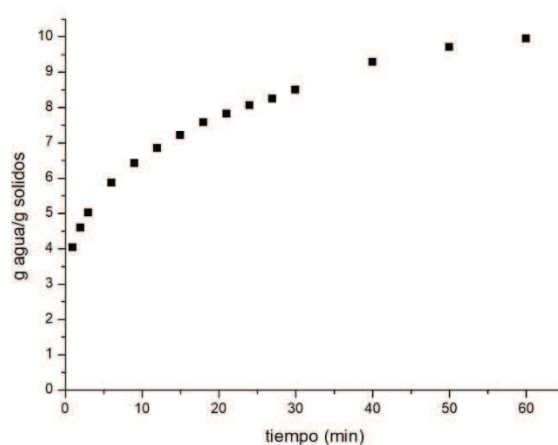


Figura III.10-Cinética de absorción de agua de **AX-c** medida con un equipo de Baumann.

Como se puede apreciar, el valor máximo de absorción de agua se obtuvo a los 60 minutos, siendo el mismo $9,32 \pm 0,54$ g agua g^{-1} sólidos. Esta elevada capacidad de absorción de agua es característica de la fibra (Izydorczyk y Biliaderis 1992, Izydorczyk 2009, Wang et al. 2002). En este sentido, se ha reportado un valor de absorción de agua para fibra de papa prensada de $7,4$ g g^{-1} sólidos (Ramaswamy et al. 2013). Así mismo, Ralet et al. (1990) reportaron un valor de absorción de agua para salvado de trigo de $6,4$ g g^{-1} sólidos.

III.4.4.4-Pruebas de gelificación de AX-c

Como se mencionó anteriormente, se evaluó el efecto de la concentración de **AX-c** ($0,2$ y $0,6$ g 100 g^{-1}) y de Ca^{2+} ($CaCl_2$: $0,2$ y $0,4$ g 100 g^{-1}), sobre las propiedades gelificantes de este heteropolisacárido. Los ensayos fueron realizados a pH $5,0$ y $8,0$. Al respecto, no se observó formación de gel bajo las condiciones estudiadas. Por tal motivo, se decidió incrementar los niveles de **AX-c** (2 g 100 g^{-1}) y Ca^{2+} ($CaCl_2$: $0,8$ g 100 g^{-1}). Se pudo observar que el aumento de la concentración de **AX-c** y Ca^{2+} incrementó la viscosidad de la dispersión. Sin embargo, no fue posible obtener gel bajo ninguna de las condiciones estudiadas. Por otra parte, se evaluaron las propiedades gelificantes de **AX-c** empleando la enzima lacasa. Al respecto, no se observó formación de gel bajo ninguna de las condiciones ensayadas (**Tabla III.19**).

Tabla III.19- Estudio de la gelificación enzimática con la enzima lacasa

AX-c g/100 g	CFS g/100 g	pH	Temp	Observaciones: (ninguna condición gelificó)
1	-	5,5	ambiente	búfer fosfato/citrato pH 5,5
2	-	5,5		
1		7,5	30	
2		7,5	30	
4		7,5	30	
6		7,5	30	
6		2		
6	6	4 y 5	6 hs 30°	La enzima no actúa a esos pH
6	3	4	6 hs 30°	
6		5	6 hs 30°	Solo agua, sin buffer.
6	6	7,5	6 hs 30°	Desarrolla viscosidad. Luego al bajar a pH 2 se observa un fluido plástico.
6	3	7,5	6 hs 30°	Desarrolla viscosidad. Al bajar a pH 2 se espesa ligeramente
6		7,5	6 hs 30°	Al bajar a pH 2 se espesa ligeramente
6	10	7,5	6 hs 30°	No gelifico. Al bajar a pH 2 tampoco.

Sin embargo, la condición 6 g **AX-c** 100 g⁻¹, 6 g **CFS** 100 g⁻¹ a pH 7,5, permitió obtener un fluido plástico.

III.4.5-Obtención de celulosa microcristalina

A partir de **REAx** (residuo obtenido luego de la extracción alcalina directa de **AX-c**), se obtuvo celulosa empleando dos métodos (**Figura III.11**). El primer método consistió en tratar directamente a **REAx** con hipoclorito de sodio (blanqueo) y luego someterlo a una digestión ácida, lo que dio lugar al producto denominado celulosa microcristalina 1 (**CMC-1**). El segundo método implicó secar y moler a **REAx** y luego proceder como se obtuvo **CMC-1**. Esto dio lugar al producto llamado celulosa microcristalina 2 (**CMC-2**). Cabe recordar que **REAx** constituye un residuo al cual se le han extraído proteínas, hemicelulosas y lignina.

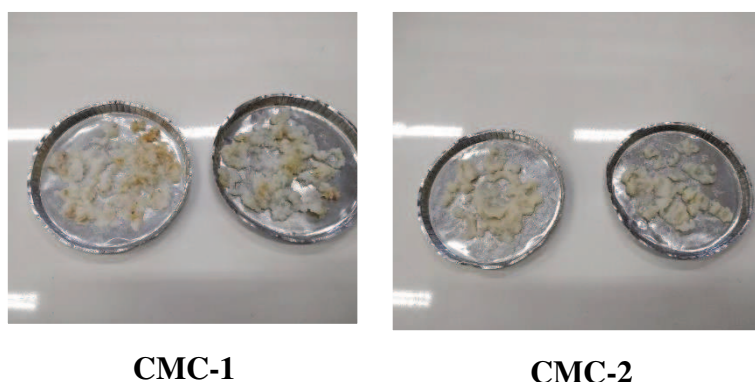


Figura III.11- Celulosa obtenida a partir de **R2** (**CMC-1**) y obtenida a partir de **R2** seco (**CMC-2**).

Los rendimientos de celulosa para **CMC-1** y **CMC-2** fueron $40,17 \pm 1,45\%$ y $29,54 \pm 0,22\%$, respectivamente. Como se puede apreciar **CMC-1** presentó mayor rendimiento que **CMC-2** ($p < 0,05$). Esta diferencia podría deberse al tamaño de partícula del material de partida que es sometido al proceso de extracción de celulosa. Al respecto, Alhaji Mohammed et al. (2022) obtuvieron celulosa a partir de polvo de cascara de almendras, probando diferentes tamaños de partícula. Si bien el rendimiento de celulosa fue mayor para tamaños de partícula mayores, obtuvieron productos con mayor cristalinidad a menor tamaño de partículas del material de partida ($66,2\%$ y $34,8\%$ para $250 \mu\text{m}$ y $500 \mu\text{m}$, respectivamente), indicando que fue necesario emplear mayor temperatura y mayor tiempo de proceso para lograr extraer hemicelulosa y lignina de la muestra cuando se utiliza un tamaño de partícula mayor, debido a la menor área superficial del material. Además, se propuso que cuando el material posee tamaños

pequeños ($125\mu\text{m}$) se puede producir degradación química de la celulosa por poseer partículas con gran área superficial. En este sentido, el proceso **CMC-2** extraería más eficientemente las ligninas residuales que el **CMC-1** durante el tratamiento ácido, lo que contribuiría con una mayor eliminación de sólidos, viéndose reflejado en un menor rendimiento en **CMC-2**. No obstante, la pureza de dicho producto podría ser mayor que la de **CMC-1**.

III.4.5.1-Microscopia electrónica de barrido (SEM) de REAx, CMC-1 y CMC-2

En la **Figura III.12** se muestra la morfología superficial del residuo de partida (**REAx**) y de las celulosas obtenidas mediante diferentes métodos (**CMC-1** y **CMC-2**).



Figura III.12. Microscopia electrónica de barrido (SEM) de **REAx** (residuo de partida), **CMC-1** y **CMC-2**. (370x).

Como se puede ver en la **Figura III.12**, la estructura de **REAx** fue compacta, de gran tamaño, con partículas uniformes, de superficie rugosa e irregular. Esto puede deberse a la composición química del material y a las interacciones macromoleculares

establecidas. Al respecto, las moléculas de celulosa y los restos de lignina y hemicelulosa presentes en el residuo pueden interactuar entre sí mediante enlaces covalentes O-H, puentes de H y fuerzas de Van der Waals, generando una estructura altamente compacta (Debiagi et al. 2020). Por otro lado, la presencia de superficies irregulares y porosas en **REAx** puede deberse a la extracción parcial de estructuras durante el tratamiento alcalino (Mantovan et al. 2021).

Para el caso de **CMC-1**, se observan estructuras más abiertas que las observadas en **REAx**, pero con similar irregularidad y porosidad. Además, el tamaño de las fibras fue muy diverso, observándose un valor promedio de diámetro de 190 μm . No obstante, algunas fibras individuales exhibieron un diámetro de 8,79 μm . Por otro lado, en **CMC-2** se observaron muchos haces de fibras pequeñas cuyo diámetro promedio fue de 8 μm . Así mismo, dichas fibras están entrelazadas entre sí formando “paquetes” de fibras más grandes de 30-80 μm . El tamaño de las fibras individuales fue igual o levemente menor a **CMC-1**, pero los haces de fibras formados fueron más pequeños. Es decir, las fibras de celulosa se separaron de la estructura inicial conectada.

III.4.5.2-Espectrometría de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) de **REAx**, **CMC-1** y **CMC-2**

En la **Figura III.13** se exhibe el perfil FTIR de **REAx**, **CMC-1** y **CMC-2**

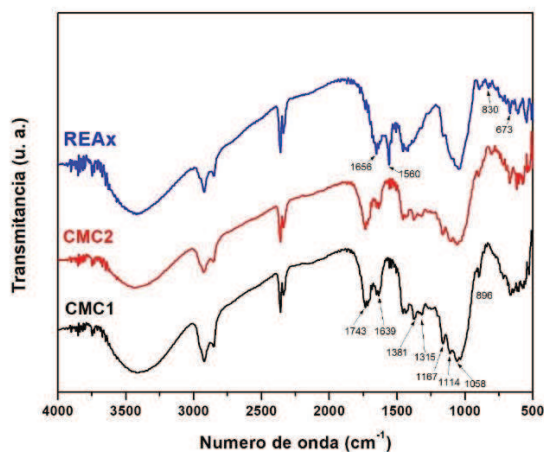


Figura III.13- Espectrometría de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) de **REAx**, **CMC-1** y **CMC-2**.

En todos los espectros se observó una banda comprendida entre 3600-3200 cm^{-1} , la cual se atribuye a vibraciones de estiramiento características de los grupos hidroxilo presentes en la celulosa y hemicelulosa (Naibaho et al. 2021). Por otro lado, las bandas de absorción comprendidas entre 1500 y 1700 cm^{-1} corresponderían a las vibraciones de

los grupos funcionales presentes en el **AF** y las proteínas (Zhang et al. 2019). A su vez, el pico a 1650 cm^{-1} podrían atribuirse a vibraciones de los dobles enlaces $\text{C}=\text{C}$ presentes en el anillo aromático de la lignina (Naibaho et al. 2021). Por último, las bandas de absorción comprendidas entre 1520 y 1530 cm^{-1} se deberían al **AF** (Yilmaz-Turan et al. 2020; Lee et al. 2015).

Como se mencionó anteriormente, las bandas de absorción comprendidas entre 1500 y 1700 cm^{-1} corresponderían al **AF** y las proteínas, mientras que el pico de absorción a 1650 cm^{-1} se debería a la presencia de la lignina. Para el caso de **REAx**, los picos a 1656 y 1560 cm^{-1} estuvieron presentes. Sin embargo, para **CMC-1** y **CMC-2** dichos picos no se visualizaron, reafirmando los cambios estructurales observados por SEM. En este sentido, la ausencia del pico a 1656 cm^{-1} indicaría la remoción completa de la lignina (Yeasmin et al. 2015). Tanto para **REAx** como para **CMC-1** y **CMC-2**, no se observaron picos en la región de 1250 cm^{-1} , el cual corresponde al grupo C-O-C (aril-alquil éter) del grupo guaiacilo, una subunidad de la lignina (Alves et al. 2019).

Por último, los picos a 1058 - 1044 y 896 cm^{-1} conciernen a los estiramientos C-O y C-H de la celulosa. Estos picos se mantienen en **CMC-1** y **CMC-2**. Incluso el pico a 896 cm^{-1} , se intensifica, lo que indicaría un incremento en el contenido de celulosa luego del proceso de blanqueo (Alves et al. 2019). Además, el pico a 1161 cm^{-1} que corresponde a C-O-C enlace glicosídico asimétrico de la celulosa (Yeasmin et al. 2015), presente en el **REAx** se incrementa en **CMC-1** y **CMC-2**.

III.4.5.3- Patrón de difracción de rayos X (Rx) de REAx, CMC-1 y CMC-2

A partir del patrón de difracción de rayos X (Rx) es posible calcular el índice de cristalinidad (IC). Dicho parámetro se utiliza comúnmente para medir la cantidad relativa de la fracción cristalina de materiales celulósicos y cuantificar su modificación tras diferentes tratamientos fisicoquímicos y biológicos. El IC constituye el porcentaje de la fase cristalina en un modelo de dos fases del material: una fase cristalina y una fase amorfa (Salem et al. 2023).

En la **Figura III.14** se muestran los resultados de patrón de difracción de Rx de **REAx**, **CMC-1** y **CMC-2**.

Mantovan et al. (2021) determinaron para celulosa obtenida de bagazo de naranja picos cristalinos correspondientes a $2\theta = 16^\circ$, 22° y $34,5^\circ$. En este caso, para el

bagazo o hez de malta se determinaron picos cristalinos correspondientes a $2\theta = 16^\circ$, 22° y 35° y a partir de ellos se calculó el Índice de cristalinidad (IC) (**Tabla III.20**).

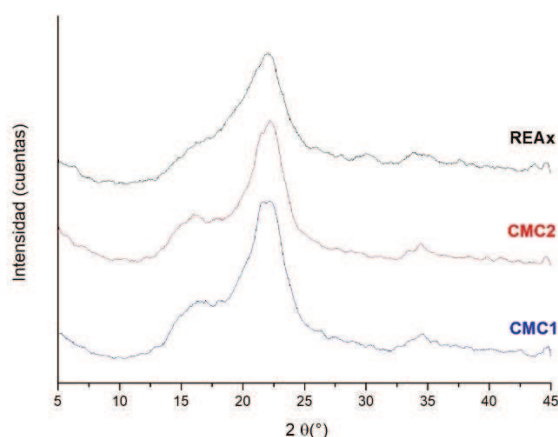


Figura III.14. Patrón de difracción de rayos X de **REAx**, **CMC-1** y **CMC-2**

Tabla III.20- Índice de cristalinidad de **REAx**, **CMC-1** y **CMC-2**

Muestra	Índice de cristalinidad (%)	Cristalinidad método Segal (%)
REAx	$30,9 \pm 0,6^a$	$45,5 \pm 0,9^a$
CMC-1	$34,6 \pm 0,7^b$	$50,9 \pm 1,0^b$
CMC-2	$41,2 \pm 0,8^c$	$55,4 \pm 1,1^c$

$X \pm DE$. Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas entre muestras ($p < 0,05$).

Como se puede ver en la **Tabla III.20**, **CMC-2** presentó el mayor IC, lo que podría estar asociado con el menor tamaño de partícula del material de partida para obtener la celulosa (Alhaji Mohamed et al. 2022). Este resultado se replicó al medir cristalinidad por el método Segal, obteniéndose el valor más elevado con **CMC-2**. Estos valores están en rangos reportados en bibliografía. Al respecto, Mantovan et al. (2021) obtuvieron valores de cristalinidad (método Segal) para celulosa extraída de bagazo de naranja de 26% a 60%. Además, Ahmad et al. (2016) reportó un valor de cristalinidad (método Segal) para celulosa de cáscara de arroz de 63,9%. De acuerdo con Salem et al. (2023), el método Segal es un método rápido, donde se asigna la intensidad máxima correspondiente a $2\theta = 22-23^\circ$, a la suma de los componentes amorfo y cristalino, mientras que el componente amorfo está representado por la intensidad mínima, alrededor de 18° . Este razonamiento surge de que no hay picos significativos de la red cristalina en $2\theta = 18^\circ$, por lo que toda la intensidad corresponde a la dispersión amorfa.

Esto puede ser erróneo ya que la intensidad de pequeños cristales superpuestos no es considerada. Generalmente el método Segal resulta en valores sobreestimados, como es el caso de la presente tesis. Sin embargo, este método es sencillo y puede ser utilizado para comparar diferencias entre muestras de igual naturaleza, con diferentes tratamientos. Por último, la reducción del tamaño de partícula del residuo **REAx** permitió obtener un producto con mayor cristalinidad.

III.4.5.4-Parámetros de color de CMC-1 y CMC-2

En la **Tabla III.21** se muestran los parámetros de color obtenidos con **CMC-1** y **CMC-2**. Como se puede ver, tanto el valor de a^* como el de b^* resultaron positivos. Esto indica que ambos productos poseen una tonalidad en el rango de color que va desde el amarillo al rojo. Además, se obtuvieron valores de L^* superiores a 50%, lo que indicaría que las tonalidades de ambos productos tienden a ser claras. Sin embargo, **CMC-2** presentó mayor valor de L y menor valor de C^* que **CMC-1** ($p < 0.05$). A su vez, la diferencia de color global de color (ΔE^*) de **CMC-2** fue menor que la hallada para **CMC-1**, mientras que el índice de blancura (IB) fue mayor.

Tabla III.21- Valores de coordenadas cilíndricas y diferencia de color (ΔE^*) de las muestras CMC-1 y CMC-2

Parámetro	CMC-1	CMC-2
L^*	71,0±0,2 ^a	75,2±0,7 ^b
a^*	1,0±0,1 ^a	1,6±0,1 ^b
b^*	18,0±0,3 ^b	15,5±0,2 ^a
C^*	18,1 ±0,3 ^b	15,5±0,2 ^a
h	86,7±0,1 ^b	84,2±0,2 ^a
ΔE^*	34,1±0,1 ^b	29,3±0,6 ^a
IB	65,9±0,1 ^a	70,7±0,6 ^b

$X \pm DE$. Letras diferentes en una fila indican diferencias significativas entre muestras ($p < 0,05$). ΔE : calculado en base a las coordenadas de un blanco perfecto $L^*=100$, $a^*=0$ y $b^*=0$.

III.5-Conclusiones parciales

Se concluye que fue posible obtener un concentrado de arabinosilanos (**AX-c**), un sobrenadante rico en compuestos fenólicos solubles (**CFS**) y celulosa microcristalina a partir del residuo de extracción de proteínas de la HM, y de esta manera, completar el proceso de bio-refinería que permite aprovechar integralmente este subproducto de la industria cervecera.

**IV.MICROENCAPSULACIÓN CON ARABINOXILANOS COMO
ESTRATEGIA DE PROTECCIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS DEL ALGA
VERDE *ULVA SPP* FRENTE A LA DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL**

IV-Microencapsulación con arabinosilanos como estrategia de protección de péptidos bioactivos del alga verde *ulva spp* frente a la digestión gastrointestinal

IV.1-Introducción

El alga verde *Ulva spp* es una fuente alternativa de proteínas y un ingrediente prometedor para el desarrollo de alimentos funcionales. Se encuentra a lo largo de las costas oceánicas en todo el mundo, y puede obtenerse en las costas de la Patagonia argentina. Tiene un contenido proteico que oscila entre el 15 y el 35%, lo que la convierte en una buena fuente proteica para la producción de péptidos bioactivos (García-Vaquero et al. 2016). En este sentido, varios péptidos bioactivos derivados de *Ulva* se han obtenido por hidrólisis enzimática *in vitro* (Cian et al. 2018b; García-Vaquero et al. 2016). Estos péptidos han presentado propiedades bioactivas tales como: antioxidantes, anticancerígenas, antihipertensivas, inhibidores de DPP-IV e inmunomoduladoras (Cian et al. 2018b; Cian et al. 2020, Lafarga et al. 2020). Sin embargo, varios estudios han demostrado que la mayoría de los péptidos bioactivos que contienen más de 2-3 residuos de aminoácidos no resisten la digestión gastrointestinal simulada, perdiendo sus propiedades biofuncionales (De Koker et al. 2011). Una alternativa para protegerlos dentro del tracto gastrointestinal es mediante microencapsulación por secado spray utilizando diferentes biopolímeros (Cian et al. 2019). Por otra parte, la microencapsulación puede usarse como estrategia para enmascarar el sabor amargo de los péptidos que contienen residuos de aminoácidos hidrófobos y para reducir la higroscopicidad de hidrolizados de proteínas y péptidos, lo que contribuye a aumentar la estabilidad en el almacenamiento (Mohan et al. 2015). Particularmente, los polisacáridos son generalmente ideales para usar como agentes de encapsulación porque son estructuralmente estables, abundantes en la naturaleza y económicos. Asimismo, los grupos funcionales reactivos de los polisacáridos los convierten en una de las mejores opciones como matrices encapsulantes. Los polisacáridos derivados de plantas, animales y fuentes microbianas, como la goma arábica, el quitosano, la ciclodextrina y la maltodextrina, se han utilizado para la encapsulación de proteínas y péptidos alimentarios (Ruiz-Ruiz 2013, Rocha et al. 2009, Cian et al. 2019, Cian et al. 2020). Sin embargo, hay muy pocos estudios del empleo de arabinosilanos para encapsulación. Recientemente, Liu et al. (2020a) reportaron el uso de AX de diferentes cereales, como material encapsulante o sistema de *delivery* de diferentes compuestos (Paz-Samaniego et al. 2018). Estos están formados por una

cadena lineal de xilosas unidas por enlaces glicosídicos $\beta(1-4)$ a la cual se unen residuos de arabinosa mediante enlaces glicosídicos $\alpha(1-3)$, $\alpha(1-2)$, o ambos. A su vez, las moléculas de arabinosa suelen presentar ácido ferúlico (**AF**) en su estructura, unido en la posición O-5. La estructura tiene un gran impacto no sólo en las propiedades fisicoquímicas tales como la solubilidad y la viscosidad, sino también en las propiedades bioactivas, asociadas a los ácidos hidroxicinámicos unidos a estos compuestos. Los AX pueden obtenerse de desechos y subproductos de la industria tales como la hez de malta (HM). La HM, principal subproducto de la industria cervecera, está compuesta mayoritariamente por 28% de lignina, 25% de hemicelulosa, 17% de celulosa y 30% de proteínas (McCarthy et al. 2013). La hemicelulosa consiste principalmente de arabinoxilanos (AX) que pueden estar presentes hasta el 40% en peso seco, constituyendo el principal carbohidrato no celulósico de cereales y hierbas (Lynch et al. 2016). Por este motivo, la HM podría ser una fuente potencial para obtener los AX.

IV.2-Objetivos

IV.2.1-Objetivo general

El objetivo fue estudiar el impacto de la microencapsulación de péptidos bioactivos del alga verde *Ulva spp.* con arabinoxilanos de la hez de malta como material de pared, sobre la bioaccesibilidad de los péptidos microencapsulados con diferentes fórmulas.

IV.2.2-Objetivos específicos

- 1) Obtención y caracterización del hidrolizado proteico del alga *Ulva spp.*
- 2) Estudiar el comportamiento de sistemas **AX-c** con calcio.
- 3) Obtener microcápsulas de péptidos de alga *Ulva spp.* utilizando **AX-c** como material de pared utilizando diferentes formulaciones.
- 4) Caracterizar las microcápsulas desde el punto de vista fisicoquímico (tamaño y morfología, potencial Z e hidrofobicidad superficial).
- 5) Digestión gastrointestinal simulada y bioaccesibilidad de péptidos del hidrolizado del alga y de las microcápsulas
- 6) Estudio de propiedades antihipertensiva (inhibición de ECA-I), antioxidante (inhibición de ABTS) e hipoglucemiante (inhibición de dipeptidil peptidasa IV) y su relación con los compuestos bioactivos y su estructura (perfil de péptidos, perfil de compuestos fenólicos).

IV.3-Materiales y métodos

IV.3.1-Materias primas

Se recogió manualmente un kilogramo de diferentes ejemplares de *Ulva spp.* en Punta Maqueda (46 000S, 67 340W) durante la primavera (septiembre/octubre 2022). Punta Maqueda, una playa virgen alejada de las actividades antropogénicas, se encuentra dentro del Golfo San Jorge, a 30 km al sur de Comodoro Rivadavia, Argentina. Las muestras fueron transportadas al laboratorio y almacenadas a 4°C dentro de bolsas de plástico. Para eliminar adherentes, agua de mar, sedimentos, desechos orgánicos, macrofauna y epibiota, las muestras fueron raspadas y enjuagadas con agua destilada. Las muestras se secaron hasta un peso constante ($100 \pm 4^\circ\text{C}$), se molieron hasta obtener un polvo, con un tamaño de partícula inferior a 1 mm, utilizando un Molino de martillos (Retsch, Haan, Alemania). Luego las muestras se pasaron por un tamiz de malla 20 (0,85 mm) y se almacenaron a 4° C en bolsas plásticas hasta su análisis.

La HM fue suministrada por la Cervecería Santa Fe® (Santa Fe, Argentina). El material de partida fue el residuo de la obtención de proteínas (**REP**).

IV.3.2-Obtención del hidrolizado proteico del alga *Ulva spp.*

El hidrolizado proteico se obtuvo de acuerdo a Cian et al. (2022). Para eliminar la clorofila, el alga verde se dispersó a razón de 25 g kg⁻¹ en acetona durante 30 min y se filtró a través de un tamiz de malla 50 (0,297 mm). El residuo obtenido, se volvió a extraer cuatro veces. Para eliminar la acetona del residuo final, se llevó a cabo un secado en estufa de vacío Arcano DFZ-6020 (China) a 40 °C durante 3 h. El residuo seco sin clorofila se utilizó como sustrato para la hidrólisis enzimática. Para ello, se utilizaron las enzimas Neutrasa (Nutring, Buenos Aires, Argentina) y Flavourzyme (Sigma). El proceso de hidrólisis fue secuencial de acuerdo a Cian et al. (2022). Una vez finalizada la reacción, se centrifugó a 2000 rpm. Posteriormente, y a los fines de eliminar contaminantes solubles, se realizó una precipitación con etanol en una relación alcohol/hidrolizado 70:30. Se dejó reposar overnight a 4°C. Luego, la muestra se centrifugó en centrífuga Mistral durante 30 min a 3000xg y el sobrenadante (que contiene los péptidos) se concentró en rotavapor y se liofilizó. El contenido de proteínas, carbohidratos y humedad del hidrolizado fueron: 28,9 g 100g⁻¹ b.s.; 4,0 g 100g⁻¹ b.s.; y 7,1 g 100g⁻¹, respectivamente.

Para el seguimiento de la reacción de hidrólisis se determinó el grado de

hidrólisis (GH) a través de la medición de aminos libres utilizando la técnica del o-ftaldialdehído (OPA) según Nielsen et al. (2001).

El GH se calculó como se describe a continuación:

$$GH (\%) = (h - h_0)/h_{tot} \times 100 \quad (IV.1)$$

Dónde: h_{tot} es el número total de uniones peptídicas hidrolizables en la proteína (7,78 mEq g^{-1} proteína); h , es el número de uniones peptídicas hidrolizadas y h_0 , es el contenido de aminos libres en la proteína de partida.

IV.3.3-Obtención de arabinoxilanos a partir de HM

Para la extracción de arabinoxilanos a partir de la HM se realizó una extracción de proteínas de acuerdo con Proaño et al. (2020). Sobre el residuo se realizó una extracción alcalina utilizando NaOH, seguido de una precipitación etanólica de acuerdo a lo informado precedentemente en el capítulo 3. Se obtuvo un concentrado de AX (**AX-c**) cuya composición en base seca fue: carbohidratos totales $70,6 \pm 1,9 g 100g^{-1}$ b.s. (determinados por Dubois et al. 1956), con una relación Arabinosa/Xilosa de $0,62 \pm 0,06$ (obtenida de acuerdo a Bartolomé et al. 2002), proteínas $3,00 \pm 0,29 g 100g^{-1}$, cenizas $16,17 \pm 0,37 g 100g^{-1}$ y humedad $19,4 g 100g^{-1}$ (medida por AOAC 1995).

IV.3.4-Formulación de las microcápsulas

Las microcápsulas de los péptidos de *Ulva spp.* se obtuvieron mediante secado spray, utilizando como material de pared maltodextrina (15 DE, Globe® 019150, El Bahiense, Buenos Aires) y el **AX-c**. Además, a esta formulación base se le adicionaron dos niveles de cloruro de calcio: 2 y 5 $g 100g^{-1}$ de sólidos. Esto dio lugar a tres formulaciones diferentes, las cuales fueron denominadas: **MCP0** (0 $g CaCl_2 100g^{-1}$), **MCP2** (2 $g CaCl_2 100g^{-1}$) y **MCP5** (5 $g CaCl_2 100g^{-1}$). Adicionalmente, se obtuvo una cápsula control sin agregado de hidrolizado y con 5 g de $CaCl_2 100g^{-1}$ sólidos (**MC5**). Los niveles de **AX-c** y de hidrolizado se mantuvieron constantes en 49,5 g y 12,0 $g 100g^{-1}$ de sólidos, respectivamente. La maltodextrina se adicionó hasta completar los 100 g de sólidos. Las formulaciones se secaron por aspersion, utilizando un secador spray de laboratorio (Spray Dryer Yamato ADL311S, Japan) equipado con una boquilla atomizadora de 700 μm de diámetro. Las dispersiones se alimentaron a la cámara principal (70 cm de diámetro) a través de una bomba peristáltica y el caudal de alimentación se controló mediante la velocidad de rotación de la bomba (3,1 $mL min^{-1}$). El caudal de aire de secado fue de 357 $L h^{-1}$ y la presión del aire del compresor fue de

6–8 bar. Las temperaturas del aire de entrada y salida fueron de 180 ± 2 °C y 96 ± 8 °C, respectivamente. Las microcápsulas fueron almacenadas en oscuridad en recipientes de vidrio color caramelo a -20 °C hasta su posterior análisis. Se realizaron dos réplicas para cada formulación.

IV.3.5- Caracterización fisicoquímica de las microcápsulas

Los contenidos de humedad y proteína de las microcápsulas se determinaron usando los métodos AOAC (1995). El contenido de carbohidratos totales se determinó según Dubois et al. (1956). La actividad de agua (aw) de las microcápsulas se determinó utilizando el equipo AquaLab CX-2 (Decagon Devices Inc, USA). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

La eficiencia de encapsulación de las microcápsulas se midió según Garzón et al. (2024) y se calculó como la relación entre el contenido de proteínas de las microcápsulas (g) y el contenido de proteína de las dispersiones (g).

El tamaño de partícula y la morfología de las microcápsulas se evaluaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Los polvos se montaron en trozos de aluminio usando una cinta de doble cara. Las imágenes SEM se adquirieron con un microscopio electrónico de barrido (Phenom Pro-X, PhenomWorld, Holanda) con voltajes de aceleración entre 5 y 15 kV, de acuerdo con Cian et al. (2019). Las muestras se observaron con aumentos de 1000x. El SEM de cada fórmula de cápsula se realizó por duplicado. Se usó el programa ImageJ (ImageJ, Institutos Nacionales de Salud, EE. UU.) para determinar el tamaño de las microcápsulas.

El potencial Z de las microcápsulas se determinó utilizando un instrumento de microelectroforesis y dispersión de luz dinámica (Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments Ltd., Reino Unido). Para ello, las microcápsulas se dispersaron a $0,1 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$ en agua destilada, se agitaron y se equilibraron durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, se agregó 1 mL de cada muestra a la cámara de medición. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Adicionalmente se estudió el potencial Z de dispersiones de **AX-c** dispersando $0,1 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$ en agua destilada.

La hidrofobicidad superficial de las microcápsulas se determinó según Molina-Ortiz et al. (2009). Brevemente, las microcápsulas se dispersaron a $0,05 \text{ g}$ de proteína 100 g^{-1} en 10 mmol L^{-1} de tampón de fosfato de potasio pH 7,0. Se realizaron cinco diluciones seriadas de la muestra de $0,05$ a $0,005 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ de proteína. Luego, se adicionaron $10 \mu\text{L}$ de solución de 8-anilina-1-naftalensulfonato (ANS) 8 mmol L^{-1} a 2

mL de cada muestra. La fluorescencia se midió a una longitud de onda de excitación de 390 nm y una longitud de onda de emisión de 468 nm usando un espectrofotómetro de fluorescencia Hitachi 2000 (Japón). La gráfica de la pendiente de la intensidad de fluorescencia frente a la concentración de proteína ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$) se calculó mediante análisis de regresión lineal y se usó como un índice de hidrofobicidad superficial. Las mediciones se realizaron por triplicado a temperatura ambiente. Además, se evaluó el efecto del NaCl y del dodecilsulfato de sodio (SDS) en la hidrofobicidad de las microcápsulas según Li et al. (2018). Para ello, se añadieron diluciones seriadas de dispersiones de microcápsulas ($0,05 - 0,005 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ de proteína) en una solución de NaCl 10 mmol L^{-1} o de SDS $0,25 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$. Luego, se llevaron a cabo las mediciones como se mencionó anteriormente.

IV.3.6-Digestión gastrointestinal simulada y bioaccesibilidad

La digestión gastrointestinal simulada y la bioaccesibilidad de compuestos bioactivos del hidrolizado del alga y de las microcápsulas se realizaron de acuerdo a Garzón et al. (2020b). Para ello, 10 mL de $0,4 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$ del hidrolizado proteico o de las microcápsulas se ajustaron a pH 2,0 con HCl 3 mol L^{-1} . Luego, se agregaron 0,4 mL de una suspensión de pepsina $16 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$ de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ y las mezclas se incubaron en un baño con agitación a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 h. Al final de la digestión con pepsina, se colocaron bolsas de diálisis (cut-off: 6-8 kDa) que contenían 10 mL de NaHCO_3 $0,12 \text{ mol L}^{-1}$ y se incubaron durante 50 min en un baño de agua con agitación a 37°C . Luego, se agregaron 3 mL de solución de pancreatina ($0,4 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$ de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ NaHCO_3) y se continuó la incubación durante otras 2 h. Una vez finalizada la reacción, se retiraron las bolsas de diálisis y se enjuagaron con agua destilada. Los contenidos de las bolsas (dializados) y el residuo post-digestión (digeridos) se pesaron y congelaron a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su análisis. Los dializados del hidrolizado, **MCP0**, **MCP2** y **MCP5** fueron denominados D-H, D-**MCP0**, D-**MCP2** y D-**MCP5**, respectivamente.

Los contenidos de proteínas y aminos libres en los dializados y digeridos se determinaron como se mencionó anteriormente. El grado de hidrólisis (DH) en los dializados se calculó según Nielsen et al. (2001).

La dializabilidad peptídica se calculó de acuerdo a Cian et al. (2020), siguiendo la siguiente ecuación:

$$\text{Dializabilidad peptídica (\%)} = \frac{\text{mEq dializados}}{(\text{mEq dializado} + \text{mEq del digerido})} \times 100 \quad (\text{IV.2})$$

IV.3.7-Caracterización del perfil de péptidos

El perfil de péptidos del hidrolizado y de su fracción dializada se realizó mediante HPLC-FR según Garzón et al. (2020a) con modificaciones. Para ello se utilizó una columna Phenomenex C18 (Gemini 250 x 4,6 mm, 5µm). La elución se realizó por gradiente, utilizando como fase móvil A: agua con ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1 %, y como fase móvil B: acetonitrilo con TFA al 0,1 %. El gradiente aumentó linealmente, de 0 % a 40 % de B, en un tiempo de ejecución de 60 min. La columna se colocó a una temperatura de 40°C y el flujo de elución fue de 1 mL min⁻¹. Se registraron los picos de absorbancia a 220 nm y/o 280 nm. A fin de analizar los cromatogramas de acuerdo a la hidrofobicidad de los péptidos eluidos, se realizaron integraciones de las áreas de los picos considerando tres sectores por cromatograma (Garzón et al. 2024): componentes de baja hidrofobicidad (BH): rango de elución 0-20 min; componentes de hidrofobicidad media (MH): rango de elución 20-40 min; y componentes de alta hidrofobicidad (AH): rango de elución 40-52 min.

IV.3.8-Perfiles de peso molecular de péptidos

Con el objetivo de separar los péptidos bioactivos en función de su peso molecular se realizó un fraccionamiento mediante cromatografía de filtración en gel usando FPLC según Garzón et al. (2020a). Para ello, se utilizó un sistema Knauer Azura® equipado con una columna Superdex 30L. La elución se controló a 280 nm y la masa molecular se estimó utilizando estándares de peso molecular de Sigma-Aldrich: Citocromo C N° CAS 9007-43-6 (12400 Da), Aprotinina N° CAS: 9087-70-1 (6550 Da) y una mezcla de estándares (H2016-1VL) que contiene: Acetato de Angiotensina II N° CAS (1046,2 Da), Acetato de Metionina Encefalina N° CAS (573,7 Da) y Val-Tyr (379,5 Da).

IV.3.9-Perfiles de compuestos fenólicos

Se realizó una extracción de los compuestos fenólicos libres y ligados presentes en los dializados de acuerdo a Garzón et al. (2020b). Posteriormente, se evaluó el perfil de ácidos fenólicos de acuerdo con Garzón et al. (2018).

La Bioaccesibilidad de compuestos fenólicos se calculó como la cantidad porcentual del compuesto fenólico detectado en la fracción dializada en relación al contenido en la muestra inicial.

IV.3.10-Ensayo de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA-I)

Se determinó la actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA-I), siguiendo la técnica propuesta por Hayakari et al. (1978) con algunas modificaciones. Este método se basa en la reacción colorimétrica del ácido hipúrico con 2,4,6 tricloro 1,3,5 triazina (TT). Esto se llevó a cabo en un volumen total de 1995 mL conteniendo: 175 μL de buffer de fosfato de potasio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) pH 8,3, 15 μL de cloruro de sodio (5 mol L^{-1}), 20 μL del sustrato sintético N-Hippuryl-His-Leu (HHL) ($3,3 \text{ g L}^{-1}$) y 20 μL de extracto enzimático. Se incubó a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 45 min. La reacción fue terminada por la adición de 665 μL de TT (30 g L^{-1}) en dioxano seguido por 1,1 mL de buffer fosfato de potasio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 8,3. Se esperó 5 min para la formación de color y se centrifugó a $10000 \times g$ durante 10 min. Luego se midió la absorbancia a 382 nm. La inhibición de la ECA I se calculó como se detalla a continuación:

$$\text{Inhibición de ECA I (\%)} = 100 - [((A_{\text{MES}} - A_{\text{BME}}) / (A_{\text{ES}} - A_{\text{BES}})) \times 100] \quad (\text{IV.3})$$

Donde, A_{MES} : es la absorbancia de ECA-I con la muestra y el sustrato; A_{BME} : es la absorbancia de ECA I y la muestra (Blanco de muestra); A_{ES} : es la absorbancia de ECA I con el sustrato y A_{BES} : es la absorbancia del sustrato sin la muestra o enzima (Blanco).

Para determinar la concentración de muestra que produce una inhibición del 50% (IC_{50}) de ECA-I, se hicieron diluciones seriadas de las muestras ($0-10 \text{ g proteína L}^{-1}$). Luego, con los valores experimentales de inhibición vs. concentración se construyó una curva de regresión que ajustó con un modelo matemático de acuerdo a Cian et al. (2015), utilizando el software OriginPro® 8.0. Los ensayos se realizaron por triplicado.

IV.3.11-Actividad antioxidante

La inhibición del radical catiónico ABTS^+ se midió según Cian et al. (2012). Para estimar la capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC), se realizó una curva de concentración-respuesta para la inhibición de ABTS^+ en función de la concentración estándar de Trolox ($0-2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ en $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$ de solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4). La absorbancia a 734 nm se tomó después de una mezcla inicial de 6 min utilizando un espectrofotómetro (Spectronic Genesys 5; Milton Roy Company, Warrenton, VA, EE. UU.).

Para determinar la concentración de muestra que produce una inhibición del 50% (IC_{50}) del radical ABTS^+ , se hicieron diluciones seriadas de las muestras de $0-2 \text{ g proteína L}^{-1}$ y de $0-6 \text{ g proteína L}^{-1}$) para los dializados de las microcápsulas, y el

hidrolizado y su dializado, respectivamente. Luego, con los valores experimentales de inhibición vs. concentración se construyó una curva de regresión que ajustó con un modelo matemático de acuerdo a Cian et al. (2015), utilizando el software OriginPro® 8.0. Los ensayos se realizaron por triplicado.

IV.3.12-Ensayo de inhibición de dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV)

Para determinar la inhibición de la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV), se siguió la metodología propuesta por Wang et al. (2017). El ensayo se realizó en microplacas de 96 pocillos, y se midió el incremento de la absorbancia a 385 nm usando como sustrato Gly-Pro-p-nitroanilina (pNGly-Pro). A las muestras (25 µL) se adicionaron 25 µL de pNGly-Pro (1,6 mmol L⁻¹, en 100 mmol L⁻¹ de buffer Tris, pH 8,0). La mezcla se pre-incubó por 20 min a 37 °C, seguido de la adición de 50 µL de DPP-IV (diluida en buffer tris a 0,01 U mL⁻¹). La mezcla de reacción fue incubada a 37 °C por 60 min, y la reacción fue frenada por adición de 100 µL de buffer acetato de sodio (1 mol L⁻¹, pH 4,0). La absorbancia de la solución resultante fue medida a 385 nm utilizando un lector de placas (Biochrom Asys UVM340 Microplate Reader, Cambridge, UK). El porcentaje de inhibición de la DPP-IV se determinó como se describe a continuación:

$$\text{Inhibición DPP - IV (\%)} = 100 - \left[\left(\frac{A_{MES} - A_{BME}}{A_{ES} - A_{BES}} \right) \times 100 \right] \quad (\text{IV.4})$$

Dónde: A_{MES}: es la absorbancia del ensayo con DPP-IV, muestra y sustrato; A_{BME}: es la absorbancia del blanco de muestra (sin el sustrato); A_{ES}: es la absorbancia de DPP-IV con el sustrato y A_{BES}: es la absorbancia de la enzima y el sustrato sin dejar reaccionar.

Para determinar la concentración de muestra que produce una inhibición del 50% (IC₅₀) de DPP-IV, se hicieron diluciones seriadas de 0-5 g proteínas L⁻¹ y 0-14 g proteína L⁻¹, para los dializados de las microcápsulas, y el dializado del hidrolizado respectivamente. Luego, con los valores experimentales de inhibición vs. concentración se construyó una curva de regresión que ajustó con un modelo matemático de acuerdo a Aquino et al. (2024a), utilizando el software OriginPro® 8.0. Los ensayos se realizaron por triplicado.

IV.3.13-Análisis estadísticos

Cada determinación fue realizada al menos en duplicado. Los resultados fueron

expresados como promedio \pm desviación estándar (SD). Se utilizó el software Statgraphic Centurion XVI para realizar los estudios estadísticos de análisis de la varianza ANOVA y test LSD para comparación de medias a un nivel de confianza de 95%.

IV.4-Resultados y discusión

IV.4.1-Caracterización fisicoquímica de las microcápsulas

El tamaño de las cápsulas estuvo en el rango de 4-18 μm . Estos valores de tamaño fueron similares a los reportados por Kowalska et al. (2021) para microcápsulas de AX obtenido a partir de salvado de arroz por secado por aspersión (tamaño promedio 11 μm). Por otro lado, las microcápsulas presentaron formas redondas y lisas con algunas abolladuras en la superficie (**Figura IV.1**), lo cual es característico de los productos atomizados (Mohan et al. 2015). Además, se pudo apreciar que un incremento en la proporción de calcio en la formulación permitió obtener microcápsulas más redondas, lisas y sin abolladuras (**Figura IV.1**). En este sentido, Yin et al. (2012) demostraron que existe una fuerte interacción entre los iones Ca^{2+} y los ácidos glucurónico y/o ferúlico de los AX extraídos a partir de *Plantago asiatica L.* Por lo tanto, la presencia de calcio en la formulación de las microcápsulas contribuiría con la integridad de la pared, tornándola más uniforme y compacta como consecuencia de las interacciones Ca-ácido glucurónico y/o ferúlico.

Por otro lado, no hubo diferencias entre la eficiencia de encapsulación peptídica de **MCP0** y **MCP2** ($p > 0,05$). Sin embargo, la eficiencia de encapsulación obtenida para **MCP5** fue significativamente mayor a la hallada con **MCP0** y **MCP2** ($88,6 \pm 4,4\%$ vs. $52,0 \pm 2,6$ y $48,8 \pm 3,1\%$, respectivamente). Este resultado podría indicar que un nivel elevado de calcio en la formulación contribuye con la retención de los péptidos en la estructura de la cápsula debido a la formación de una estructura más compacta (Li et al. 2023). Por otra parte, los valores obtenidos con todas las formulaciones concuerdan con los reportados por Cian et al. (2019) para péptidos de *Phaseolus lunatus* encapsulados con diferentes niveles de maltodextrina y goma arábica.

En la **Tabla IV.1** se muestran los valores obtenidos para la actividad de agua de las diferentes microcápsulas. Estos valores concuerdan con los reportados por Sarabandi et al. (2018) para péptidos obtenidos a partir de caseína microencapsulados con maltodextrina (valor promedio: 0,28). Además, los valores de actividad de agua de las

microcápsulas resultaron inferiores a 0,6, lo cual es apropiado para evitar el crecimiento microbiano durante el almacenamiento (Sarabandi et al. 2018).

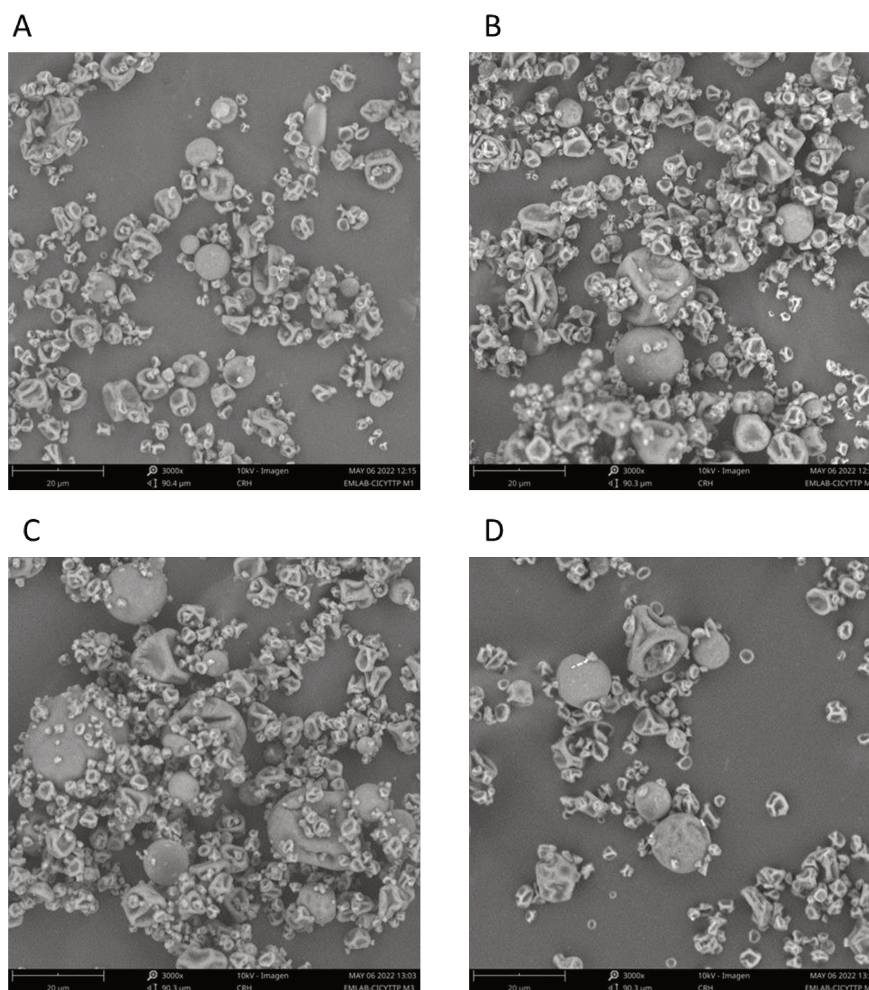


Figura IV.1- Imágenes SEM de las microcápsulas, en 3000X de A: **MCP0** (0 g CaCl₂ 100g⁻¹), B: **MCP2** (2 g CaCl₂ 100g⁻¹), C: **MCP5** (5 g CaCl₂ 100g⁻¹) y D: **MC5** (5 g de CaCl₂ 100g⁻¹ sólidos).

Tabla IV.1-Actividad de agua (*A_w*) de las diferentes microcápsulas

Cápsula	<i>A_w</i>
MCP0	0,383±0,024 ^b
MCP2	0,354±0,001 ^b
MCP5	0,305±0,012 ^a
MC5	0,386±0,004 ^b

X±DE. Distintas letras en una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

En la **Figura IV.2** se muestra el potencial Z obtenido para los arabinosilanos (**AX-c**) y las microcápsulas dispersadas en soluciones de distintos valores de pH. Como

se puede observar para **AX-c**, a medida que aumentó el pH, la carga negativa de los AX se incrementó, obteniéndose un valor de potencial Z a pH 10,0 de aproximadamente -18 mV. Para el caso de **MCP0** (microcápsulas sin agregado de calcio), se observó un comportamiento similar. Sin embargo, el incremento de la carga negativa superficial de **MCP0** a partir de pH 7,0 resultó menos pronunciado que para **AX-c**. Al respecto, el valor de potencial Z a pH 10,0 fue alrededor de -11 mV. Este menor incremento en la carga negativa superficial podría deberse a interacciones de los AX con los péptidos presentes en la estructura de la microcápsula.

Por otra parte, la adición de calcio en un nivel del 2% (**MCP2**), provocó un incremento menor de la carga negativa superficial en función del pH que el observado para **MCP0**, obteniéndose valores de potencial Z a pH 10,0 de aproximadamente -10 mV. Este resultado indicaría que el agregado de calcio a la formulación neutraliza las cargas negativas de la partícula aportadas principalmente por los AX. En este sentido, un incremento de calcio en la formulación al 5% impactó fuertemente en la carga superficial de **MCP5**, provocando una neutralización de las cargas negativas, lo que se visualiza en la **Figura IV.2** como un amesetamiento del potencial Z a partir de pH 6,0. Al respecto, el valor de potencial Z a pH 10,0 fue alrededor de -5,5 mV.

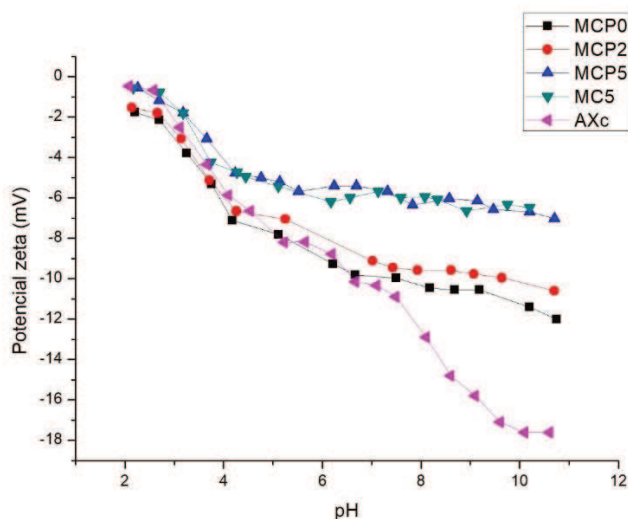


Figura IV.2. Potencial Z de arabinosilanos (**AX-c**) y microcápsulas de distintos valores de pH.

Para la formulación sin agregado de péptidos (**MC5**), el perfil de cargas superficiales en función del pH fue muy similar al hallado para **MCP5**. Este resultado indicaría que el calcio adicionado a la formulación, independientemente si contiene o no péptidos, interacciona principalmente con los AX, lo que se evidencia como una

neutralización de cargas negativas. Por otra parte, se ha observado que los péptidos bioactivos ubicados en la superficie de las microcápsulas obtenidas por secado spray tienden a incrementar los valores de potencial Z, tornándolos más negativos (Cian et al. 2021). En base a esto, podría pensarse que los péptidos de *Ulva spp.* se encuentran en el interior de la estructura de la microcápsula, no observándose diferencias entre el perfil de cargas superficiales de **MCP5** y **MC5**.

En la **Tabla IV.2** se puede observar que la hidrofobicidad superficial de **MCP0** fue significativamente superior a la obtenida con **MCP2** y **MCP5** ($p < 0,05$). Este resultado podría indicar que la adición de calcio a la formulación contribuye con el confinamiento de los péptidos en el interior de la cápsula formando un *core*, lo que se traduce en una disminución de la hidrofobicidad superficial. Esto concuerda con lo mencionado anteriormente para el potencial Z. Por otro lado, la ausencia de péptidos en la formulación, no implicó una reducción adicional de la hidrofobicidad superficial, ya que no hubo diferencias significativas entre **MC5** y **MCP2** o **MCP5** ($p > 0,05$). Este resultado confirmaría que los péptidos en **MCP2** o **MCP5** no están en la superficie de la microcápsula, y por lo tanto, no influyen directamente sobre este parámetro. En este sentido, Garzón et al. (2023) observaron que un incremento en la concentración de péptidos en la formulación de microcápsulas de agar obtenidas por secado spray provocó un aumento de la hidrofobicidad superficial. Al respecto, estos autores observaron que a medida que aumentó la proporción de péptidos en la formulación, la capacidad para ser retenidos por el agar formando un *core* disminuyó, lo que se tradujo en una disposición de los péptidos en la superficie de las microcápsulas, incrementándose la hidrofobicidad superficial.

Tabla IV.2-Hidrofobicidad superficial de las diferentes microcápsulas

Capsula	Hidrofobicidad
MCP0	5730,1±301,8 ^b
MCP2	4950,1±15,5 ^a
MCP5	4896,1±67,0 ^a
MC5	4669,45±52,3 ^a

X±DE. Distintas letras en una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

En la **Figura IV.3** se muestra el efecto de la adición de NaCl o SDS sobre la hidrofobicidad superficial de las distintas microcápsulas. Como se puede observar, la adición de NaCl provocó un incremento de la hidrofobicidad superficial, lo que indica que la sal interrumpió las fuerzas electrostáticas entre los distintos componentes de las microcápsulas (**AX**, péptidos y calcio), incrementándose la exposición de los péptidos y la hidrofobicidad (Cian et al. 2020). Por otra parte, el agregado de SDS no tuvo efecto sobre la hidrofobicidad superficial de las microcápsulas. Cabe mencionar que el SDS es un detergente aniónico que actúa como un potente disruptor de las interacciones hidrofóbicas entre moléculas (Schmitt et al. 2010). Por lo tanto, los distintos componentes de las microcápsulas interaccionan entre sí mediante fuerzas electrostáticas, no evidenciándose uniones hidrofóbicas. Esto concuerda con lo mencionado anteriormente para el potencial Z.

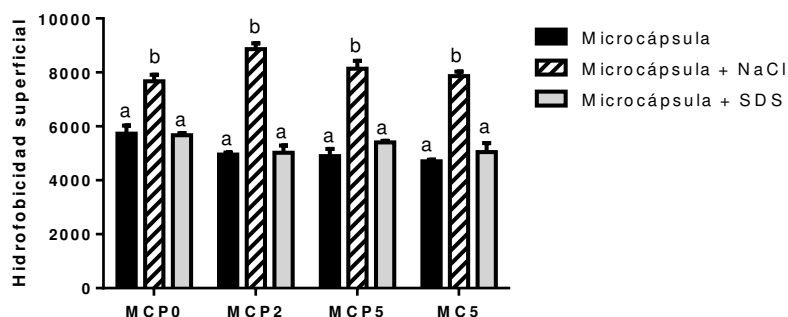


Figura IV.3. Hidrofobicidad superficial de las microcápsulas en ausencia o presencia de NaCl (10 mmol L⁻¹) o SDS (0,25%). Distintas letras en barras para una misma formulación indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

IV.4.2-Digestión gastrointestinal simulada, bioaccesibilidad y propiedades bioactivas de los péptidos microencapsulados

El hidrolizado de *Ulva spp* tuvo un GH de $18,1 \pm 0,4\%$. Este resultado es similar al reportado por Cian et al. (2022) para un hidrolizado obtenido a partir de *Ulva spp* con el mismo sistema enzimático utilizado en la presente tesis. Por otro lado, luego del proceso de digestión gastrointestinal, el GH aumentó significativamente ($p < 0,05$), obteniéndose un valor de $55,1 \pm 0,1\%$. Este resultado es lógico, ya que las proteasas digestivas hidrolizan los péptidos del alga *Ulva spp*, liberando especies de menor PM (Cian et al. 2020; Aquino et al. 2024b). Esto se puede evidenciar en el perfil de pesos moleculares obtenido por FPLC (**Figura IV.4**). Como se puede apreciar, la fracción peptídica del hidrolizado de 5,6 kDa fue totalmente degradada luego del proceso

digestivo, no observándose dicho pico en el perfil de D-H. Además, la proporción de péptidos < 700 Da en D-H fue significativamente superior a la hallada para el hidrolizado ($92,7 \pm 1,1$ vs. $85,1 \pm 0,2\%$, respectivamente), lo que demuestra una concreta degradación de los polipéptidos ($\approx 5,6$ kDa) presentes en el hidrolizado. En este sentido, la proporción de péptidos de ≈ 320 Da en D-H fue significativamente superior a la obtenida con el hidrolizado ($17,7 \pm 0,3$ vs. $9,9 \pm 0,4\%$, respectivamente), lo que confirma lo mencionado anteriormente.

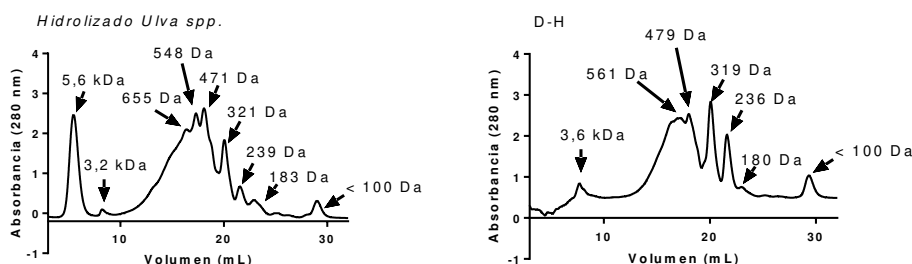


Figura IV.4. Perfil de pesos moleculares obtenidos mediante FPLC del hidrolizado de *Ulva spp* y su dializado (D-H).

Resulta oportuno agregar que tras la digestión gastrointestinal del hidrolizado se observó un incremento en la proporción de péptidos hidrofóbicos, lo que fue acompañado con una disminución de la cantidad de péptidos hidrofílicos (**Tabla IV.3**). Este resultado concuerda con los reportados por Aquino et al. (2024b). Al respecto, estos autores observaron que la digestión gastrointestinal de péptidos obtenidos a partir de levadura residual de cervecería contribuyó con la liberación de péptidos de bajo PM y elevada hidrofobicidad.

Tabla IV.3-Proporción de péptidos de baja, media y elevada hidrofobicidad del hidrolizado y su dializado obtenido por HPLC

	Hidrolizado	H-D
Baja hidrofobicidad (%)	$87,9 \pm 1,1^b$	$80,9 \pm 0,4^a$
Media hidrofobicidad (%)	$8,6 \pm 1,1^a$	$13,4 \pm 0,4^b$
Alta hidrofobicidad (%)	$3,6 \pm 0,1^a$	$5,7 \pm 0,1^b$

X \pm DE. Distintas letras en una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Por otro lado, luego del proceso de digestión gastrointestinal, el GH obtenido para las microcápsulas fue significativamente menor al hallado para el hidrolizado sin encapsular ($55,1 \pm 0,1\%$) ($p < 0,05$). Al respecto, los valores del GH de D-MCP0, D-MCP2 y D-MCP5 fueron $18,3 \pm 0,2$, $43,4 \pm 1,1$ y $50,3 \pm 1,3\%$, respectivamente. Como

se observar, conforme aumentó el nivel de calcio en las microcápsulas, mayor fue el GH obtenido ($p < 0,05$). Esto puede estar asociado con la integridad de la cápsula en el ambiente gastrointestinal. Como se mencionó anteriormente, a mayor nivel de calcio, menor fue la densidad de cargas negativas de las cápsulas, obteniéndose un potencial Z menos negativo (**Figura IV.2**). En este sentido, se ha reportado que la estabilidad de las microcápsulas en el ambiente gastrointestinal depende del potencial Z, contribuyendo con la integridad de la misma valores superiores a ± 9 mV (Garzón et al. 2023). Cabe señalar que solo **MCP0** alcanzó ese valor de potencial Z a pH 7,0 (pH intestinal). Por lo tanto, la adición de calcio no contribuiría con la protección de los péptidos durante la digestión gastrointestinal, lo que se reflejó en el incremento del GH conforme se aumentó el nivel de calcio en la formulación. En este mismo sentido, el perfil de péptidos obtenido para los diferentes dializados de las distintas microcápsulas muestra que **MCP0** resulta más eficaz para proteger a los péptidos de elevado PM (5,6 kDa) que las demás formulaciones (**Figura IV.5**). Al respecto, la proporción de polipéptidos ($> 4,5$ kDa) en **D-MCP5** fue significativamente inferior a la hallada para **D-MCP0** ($3,8 \pm 0,1$ vs. $0,3 \pm 0,0\%$, respectivamente). Además, se observó un incremento notable en la proporción de péptidos de ≈ 700 Da en **D-MCP5**, probablemente debido a la degradación de especies de mayor tamaño molecular. En este sentido, la dializabilidad peptídica obtenida luego de la digestión gastrointestinal de **D-MCP5** fue significativamente superior a la hallada para **D-MCP0** y **MCP2** ($p < 0,05$), como se muestra en la **Tabla IV.4**.

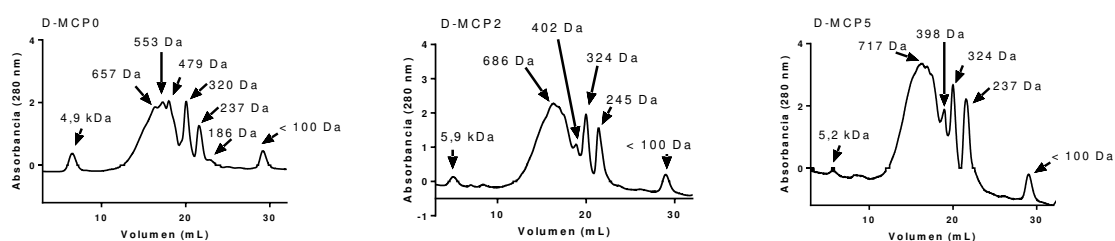


Figura IV.5. Perfil de pesos moleculares obtenidos mediante FPLC de los dializados de las diferentes microcápsulas.

Además, la dializabilidad peptídica en **D-MCP0** fue significativamente inferior a la obtenida para **D-H** y las demás microcápsulas (**Tabla IV.4**). Esto indicaría que la formulación con **AX-c** ejerce una buena protección de los péptidos de *Ulva spp* en el ambiente gastrointestinal. En este sentido, Cian et al. (2020) reportaron que la encapsulación de péptidos de hez de malta con ficocoloides del alga roja *P. columbina*

redujo la dializabilidad de los péptidos respecto a otras formulaciones de microcápsulas, lo cual se asoció con una mayor protección de los péptidos frente a la acción de las proteasas digestivas. Además, estos autores atribuyeron este efecto de protección peptídica a una mayor estabilidad de la microcápsula en el ambiente gastrointestinal, lo que se asoció con un buen valor de potencial Z a pH 7,0 (≈ -28 mV).

Tabla IV.4-Dializabilidad peptídica de D-H, D-MCP0, D-MCP2 y D-MCP5

Muestra	Dializabilidad peptídica (%)
D-H	19,6 \pm 0,6 ^d
D-MCP0	11,5 \pm 0,3 ^a
D-MCP2	14,4 \pm 0,4 ^b
D-MCP5	17,7 \pm 0,2 ^c

X \pm DE. Distintas letras en una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

En la **Figura IV.6** se muestran las propiedades antihipertensivas del hidrolizado, de su dializado y de los dializados de las microcápsulas (D-H, D-MCP0, D-MCP2 y D-MCP5). Como se puede observar, los péptidos obtenidos a partir de *Ulva spp.* poseen propiedades antihipertensivas. Esto concuerda con lo reportado por otros autores (Cian et al. 2018b; Thuanthong et al. 2017). Al respecto, Garcia-Vaquero et al. (2019) obtuvieron péptidos inhibidores de ECA-I a partir del alga *Ulva lactuca* utilizando papaína. Estos autores indicaron que la actividad de los péptidos estuvo asociada con el tamaño molecular de los mismos, siendo la fracción más activa la de menor PM (< 1 kDa). Asimismo, Sun et al. (2019) identificaron dos péptidos inhibidores de ECA-I (FGMPLDR y MELVLR) a partir de hidrolizados de *Ulva intestinalis* obtenidos con tripsina, siendo el valor de IC50 inferior a 0,18 g proteína L⁻¹. Por otra parte, el valor de IC50 obtenido para D-H fue significativamente superior al hallado para el hidrolizado. Este resultado indicaría que el proceso de digestión gastrointestinal simulada redujo las propiedades antihipertensivas de los péptidos de *Ulva spp.* En este sentido, se ha reportado que las proteasas digestivas pueden degradar péptidos antihipertensivos, lo que se traduce en una reducción de la bioactividad en el dializado (Cian et al. 2020; Cermeño et al. 2019). Por lo tanto, resulta necesario encapsular los péptidos *Ulva spp.* para preservar su actividad en un entorno gastrointestinal.

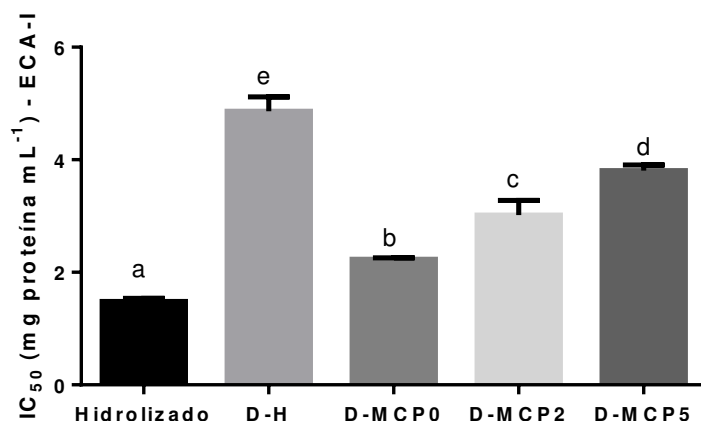


Figura IV.6. Concentración del hidrolizado o de los dializados que produce el 50% de inhibición de la enzima ECA-I (IC₅₀). Distintas letras en las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Como se aprecia en la **Figura IV.6**, los valores de IC₅₀ obtenidos para los dializados de las microcápsulas fueron superiores al hallado para el hidrolizado ($p < 0,05$), pero más bajos que los de D-H ($p < 0,05$). Esto demuestra que las microcápsulas ejercen una protección parcial de los péptidos antihipertensivos en el ambiente gastrointestinal. Este resultado concuerda con lo observado por Garzón et al. (2023) para péptidos de hez de malta encapsulados con agar y maltodextrina. Estos autores observaron que el proceso de encapsulación protegió parcialmente a los péptidos antihipertensivos de la degradación proteolítica durante un proceso de digestión gastrointestinal simulada. Resulta oportuno agregar, que la protección ejercida por las microcápsulas frente a la proteólisis dependió de su formulación, obteniéndose una mayor protección con **MCP0 (Figura IV.6)**. Esto podría estar asociado con una mayor estabilidad de la microcápsula en el ambiente gastrointestinal. Como se mencionó anteriormente, esta formulación preservó de forma más eficiente la degradación de los péptidos presentes en el hidrolizado luego de la digestión gastrointestinal, lo cual fue evidenciado en el perfil de péptidos obtenido por FPLC (**Figura IV.5**) y la dializabilidad peptídica (**Tabla IV.4**). Por otra parte, un incremento en el nivel de calcio en la formulación, se tradujo en un aumento del valor de IC₅₀, lo que indica una reducción en las propiedades antihipertensivas. Esto concuerda con los valores obtenidos del GH. Como se mencionó anteriormente, a mayor nivel de calcio, mayor inestabilidad de la capsula en el ambiente gastrointestinal, y por consiguiente, mayor proteólisis. En este mismo sentido, Cian et al. (2020) reportaron una relación directa entre el GH obtenido luego del proceso de digestión gastrointestinal de las microcápsulas y el valor de IC₅₀-ECA-I.

En la **Figura IV.7** se muestran las propiedades hipoglucemiantes (inhibición de DPP-IV) del hidrolizado y los dializados D-H, D-MCP0, D-MCP2 y D-MCP5. Como se puede observar, los péptidos obtenidos a partir de *Ulva spp.* inhibieron a la enzima DPP-IV. Esto concuerda con lo reportado por Cian et al. (2022). Estos autores encontraron que los péptidos obtenidos a partir de *Ulva spp.* con el mismo sistema enzimático utilizado en la presente tesis presentan 57% de residuos hidrofóbicos en su secuencia (incluyendo Ala y aminoácidos de cadena ramificada), lo que podría ser una característica común entre los péptidos inhibidores de DPP-IV. Además, observaron que el tamaño molecular de los péptidos responsables de inhibir a esta enzima era inferior a 1 kDa. No obstante, luego del proceso de digestión gastrointestinal, las propiedades inhibitoras de los péptidos frente a la enzima DPP-IV disminuyeron significativamente ($p < 0.05$). Esto concuerda con lo reportado por Cermeño et al. (2019) para péptidos obtenidos a partir de hez de malta y sometidos a un proceso de digestión gastrointestinal simulada. En este sentido, y al igual que para la ECA-I, las proteasas digestivas degradan las especies más activas frente a DPP-IV, provocando un incremento de la IC50 (Garzón et al. 2023). Por lo tanto, la protección mediante microencapsulación de los péptidos más activos, resulta una estrategia promisoriosa.

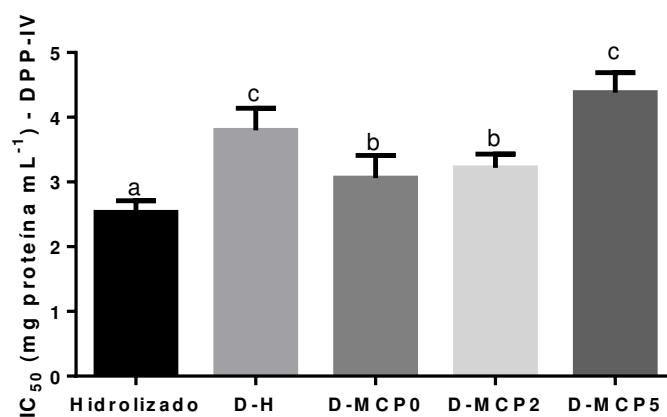


Figura IV.7. Concentración del hidrolizado o de los dializados que produce el 50% de inhibición de la enzima DPP-IV (IC50). Distintas letras en las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Como se puede ver en la **Figura IV.7**, las formulaciones MCP0 y MCP2 preservaron parcialmente las propiedades inhibitoras de DPP-IV, mientras que la cápsula MCP5 no logró ser efectiva para este propósito. Estas diferencias pueden estar asociadas con la integridad de las diferentes cápsulas en el ambiente gastrointestinal (pH y enzimas digestivas), lo que condiciona la proteólisis de los péptidos encapsulados y su bioaccesibilidad (Garzón et al. 2023; Cian et al. 2020).

Por otra parte, se pudo observar que el hidrolizado de *Ulva spp.* presentó propiedades antioxidantes (**Figura IV.8**). En este sentido, Kang et al. (2023) reportaron que los péptidos obtenidos a partir *Ulva australis* con Alcalase y Flavourzyme poseen propiedades multi-biofuncionales, incluida la capacidad antioxidante frente al radical ABTS⁺. Además, estos autores identificaron el péptido TGTW que exhibió una fuerte capacidad donadora de electrones frente al ABTS⁺. Por otro lado, el proceso de digestión gastrointestinal incrementó las propiedades antioxidantes de los péptidos, lo que se evidencia como un menor valor de IC₅₀ en D-H (**Figura IV.8**). Este resultado indicaría que los péptidos antioxidantes del hidrolizado son escindidos por las proteasas digestivas en especies más activas. Este resultado concuerda con lo reportado por Aquino et al. (2024b) para péptidos de levadura residual sometidos a un proceso de digestión gastrointestinal simulada seguido de una fermentación colónica *in vitro*. Al respecto, estos autores observaron que la digestión gastrointestinal incrementó la proporción de péptidos de bajo PM e hidrofóbicos, los cuales poseen mayor poder reductor. En este sentido, el proceso de digestión gastrointestinal de los péptidos de *Ulva spp.* incrementó la proporción de péptidos de bajo PM y elevada hidrofobicidad (**Figura IV.4** y **Tabla IV.3**). Diversos trabajos concuerdan con este resultado, indicando que los péptidos que exhiben elevada actividad antioxidante generalmente tienen un peso molecular bajo y alta hidrofobicidad (Ulagesan et al. 2022; Qian et al. 2020).

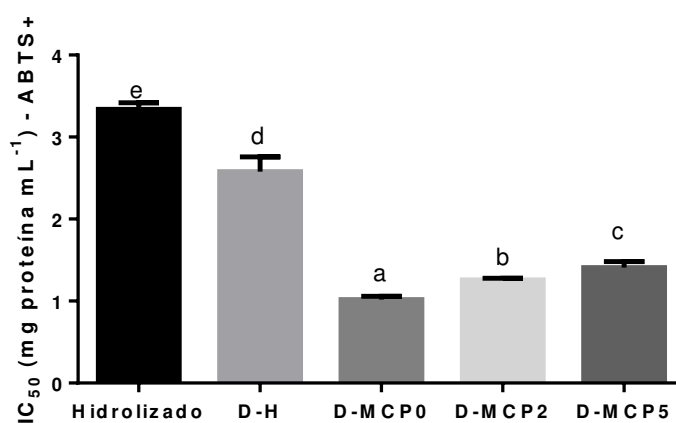


Figura IV.8. Concentración del hidrolizado o de los dializados que produce el 50% de inhibición del radical ABTS⁺ (IC₅₀). Distintas letras en las barras indican diferencias significativas (p < 0,05).

Como se puede ver en la **Figura IV.8**, los dializados obtenidos a partir de las diferentes formulaciones presentaron menor IC₅₀ que D-H (p < 0,05). Este resultado podría indicar que la potencia inhibidora frente al radical ABTS⁺ de D-MCP0, D-

MCP2 y **D-MCP5** está asociada no sólo a los péptidos microencapsulados, sino también, a los compuestos fenólicos aportados por los **AX-c**. Como se sabe, los **AX** exhiben fuerte actividad inhibidora frente al radical **ABTS⁺** (Bravi et al. 2021; Malunga y Beta, 2015), principalmente atribuida al ácido ferúlico. En este sentido, la dializabilidad del ácido ferúlico de **D-MCP0** fue significativamente superior a la obtenida para **D-MCP2** y **D-MCP5** (**Figura IV.9**). Cabe señalar que hubo una correlación inversa entre la dializabilidad del ácido ferúlico y el valor de **IC50-ABTS** obtenido, siendo el coeficiente de correlación 0,9935. Por lo tanto, cuanto mayor fue la dializabilidad de este ácido fenólico, mayor fue la potencia antioxidante del dializado, y consecuentemente, menor fue el valor de **IC50** obtenido.

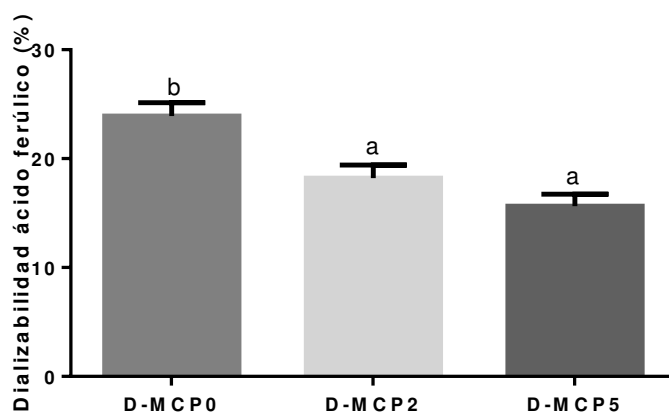


Figura IV.9. Dializabilidad de ácido ferúlico en los dializados de las diferentes microcápsulas. Distintas letras en las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Estos resultados indicarían que el material de pared resulta determinante en las propiedades antioxidantes de los dializados, debiéndose la actividad antioxidante principalmente a los compuestos fenólicos aportados por los **AX**. No obstante, los péptidos de *Ulva spp* también contribuirían a inhibir el radical **ABTS⁺**.

IV.5-Conclusiones parciales

Estos resultados ponen de manifiesto que la encapsulación por secado espray con arabinosilanos es una estrategia apropiada para proteger a los péptidos antihipertensivos y antidiabetogénicos provenientes de *Ulva spp* del ambiente gastrointestinal. Por otra parte, el empleo de calcio en la formulación de las microcápsulas no resultó apropiado para la protección peptídica frente a las enzimas digestivas. Sin embargo, la utilización de arabinosilanos como material de pared incrementó las propiedades antioxidantes de las microcápsulas luego del proceso digestivo, atribuyéndose dicho efecto a los ácidos fenólicos.

CAPÍTULO V. EVALUACIÓN DE LOS ARABINOXILANOS COMO AGENTES DE ENCAPSULACIÓN DE MINERALES. DESARROLLO DE UN SUPLEMENTO DIETARIO A BASE DE ARABINOXILANOS Y CALCIO

V-Evaluación de los arabinosilanos como agentes de encapsulación de minerales.

Desarrollo de un suplemento dietario a base de arabinosilanos y calcio

V.1-Introducción

La salud ósea es una gran preocupación pública. Cada año, alrededor de 9 millones de personas en todo el mundo sufren fracturas por osteoporosis (Curtis et al. 2016). La ingesta insuficiente de calcio y vitamina D, el estilo de vida inadecuado, el patrón dietético y la genética juegan un papel importante en el desarrollo de la osteoporosis. La deficiencia de calcio también puede provocar una reducción de la capacidad de coagulación de la sangre, dientes débiles y otros síntomas (Meschino, 2002). Las personas intolerantes a la lactosa tienen una ingesta reducida de calcio debido a la falta de consumo de productos lácteos ricos en calcio como la leche, el queso y el yogur (Heaney, 2013). Además, la biodisponibilidad de calcio de fuentes no lácteas se ve afectada por la presencia de ácido fítico, ácido oxálico y fibra (Janve y Singhal 2018).

La biodisponibilidad es la fracción de una dosis ingerida de una sustancia que llega a la circulación sistémica. Es un fenómeno fisiológico dependiente de factores variables como la edad, el genotipo, el estado nutricional y/o la secreción de ácidos gástricos que no es posible determinar *in vitro*. Por otro lado, la bioaccesibilidad es la fracción de una dosis ingerida de una sustancia que está disponible para su absorción en el intestino después de la digestión gastrointestinal, y puede ser estimada de manera *in vitro* (Moraes et al. 2022, da Silva et al. 2018). Los métodos *in vitro* brindan información sobre la bioaccesibilidad de un nutriente potencial con respecto a los efectos de los factores luminales (incluidos el pH y las enzimas), la preparación de alimentos, las prácticas de procesamiento y la naturaleza de la matriz alimentaria (Etcheverry et al. 2012).

Beggs et al. (2022) observaron que, en condiciones de ingesta adecuada de calcio, la mayor parte de la absorción ocurre en el íleon, aunque también contribuyen el resto del intestino delgado y el colon. Al respecto, se ha visto que el calcio puede unirse a polisacáridos no digeribles que son fermentados en el colon, lo que promueve la liberación y la absorción del calcio en el intestino grueso, facilitado por cambios en la microbiota intestinal (incremento de las bifidobacterias fecales) (Abrams et al. 2007; Whisner et al. 2013). En este sentido, los polisacáridos con actividad prebiótica podrían

utilizarse para desarrollar suplementos con calcio que mejoren su biodisponibilidad, y a su vez generen beneficios en la salud colónica.

Dentro de los polisacáridos, se ha visto que los arabinosilanos (AX) extraídos de diferentes cereales interactúan con el calcio para formar geles (Yan et al. 2022) o microesferas (Lee et al. 2015). Además, Lynch et al. (2021) encontraron que los AX extraídos de la hez de malta (HM) poseen potencial prebiótico, lo que podría influenciar positivamente en la bioaccesibilidad colónica del calcio.

Recientemente se reportó el uso de AX obtenido a partir de diferentes fuentes de cereales, como material encapsulante de diferentes compuestos (Liu et al. 2020a, Paz-Samaniego et al. 2018). Sin embargo, hasta la fecha no se han encontrado estudios que reporten el uso de AX para encapsular calcio.

V.2-Objetivos

V.2.1-Objetivo general

El objetivo general fue desarrollar microcápsulas de calcio utilizando **AX-c** extraídos de la HM como material encapsulante, para ser utilizadas como suplemento dietario.

V.2.1-Objetivos específicos

- 1- Estudio de la interacción del calcio con los **AX-c**. Potencial zeta.
- 2-Elaborar microcápsulas con el **AX-c** y diferentes niveles de calcio
- 3- Caracterizar desde el punto de vista fisicoquímico a las microcápsulas obtenidas con las diferentes formulaciones.
- 4-Evaluar la bioaccesibilidad gastrointestinal y colónica *in vitro* del calcio y de los ácidos fenólicos.
- 5- Estudiar las propiedades antioxidantes de los productos de la digestión gastrointestinal y colónica simulada.

V.3-Materiales y Métodos

V.3.1-Materias primas

La hez de Malta (HM) fue suministrada por Cervecería Santa Fe® (Santa Fe, Argentina). La obtención del residuo libre de proteínas (**REP**) y de los arabinosilanos fue descrita anteriormente en el Capítulo I.

La maltodextrina 15 DE fue obtenida en El bahiense, Buenos Aires, Argentina.

V.3.2-Estudio de la interacción del calcio con los AX-c. Potencial zeta

Para estudiar el potencial zeta de **AX-c** y sus mezclas con calcio, se preparó una dispersión de AX de 0,1 g 100 mL⁻¹ y se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. Para las mezclas Ca:AX, se prepararon seis dispersiones usando diferentes proporciones de las soluciones de CaCl₂ 2H₂O y **AX-c** para obtener las siguientes proporciones Ca:AX: 1:0,7, 1:1, 1:2, 1:10, 1:20. y 1:50. Luego, las dispersiones se agitaron durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, se añadió 1 mL de cada muestra a la cámara de medición. El potencial zeta se midió en el rango de pH de 2,0 a 8,0, utilizando un instrumento de microelectroforesis y dispersión de luz dinámica (Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments Ltd., Reino Unido). El análisis se realizó por triplicado.

V.3.3-Formulación de microcápsulas

Para poder evaluar el efecto de diferentes niveles de calcio en la formulación de microcápsulas, se elaboraron cápsulas con 10, 20 y 40 g CaCl₂ 100g⁻¹ sólidos, correspondientes a niveles de Ca de 2,7, 5,5 y 10,9 g Ca 100g⁻¹ sólidos, respectivamente. El nivel de AX se mantuvo constante en todas las cápsulas (49,5 g **AX-c** 100g⁻¹ sólidos) resultando en una relación de 1:10, 1:5 y 1:2,5 Ca:AX, respectivamente. Se adicionó maltodextrina para completar 100 g sólidos.

Las dispersiones se secaron usando un secador por aspersion de laboratorio (Mini Spray Dryer Yamato ADL311S, Japan) equipado con una boquilla atomizadora de 700 µm de diámetro y en las condiciones propuestas por Cian et al. (2019). Brevemente, las dispersiones se alimentaron a la cámara principal (70 cm de diámetro) a través de una bomba peristáltica y el caudal de alimentación se controló mediante la velocidad de rotación de la bomba (3,1 mL min⁻¹). El caudal de aire de secado fue de 357 L h⁻¹ y la presión del aire del compresor fue de 6–8 bar. La temperatura del aire de entrada y salida fueron de 180 ± 2 °C y 96 ± 8 °C, respectivamente. Las cápsulas secadas por aspersion se recolectaron y almacenaron en recipientes de vidrio color caramelo envueltos con papel de aluminio en la oscuridad a -20°C para su posterior análisis. Las capsulas obtenidas con relación de 1:10, 1:5 y 1:2,5 Ca:AX se denominaron **C1**, **C2** y **C3** respectivamente. Se ensayaron dos réplicas para cada fórmula.

V.3.4-Characterización fisicoquímica de las microcápsulas

V.3.4.1-Composición

Los contenidos de humedad y proteínas de las microcápsulas se determinaron usando métodos de la AOAC (1995). El contenido de carbohidratos totales de las microcápsulas se determinó según Dubois et al. (1956).

V.3.4.2-Contenido de calcio y eficiencia de encapsulación

Para determinar el contenido de calcio, las muestras se mineralizaron por vía seca por calcinación en mufla (Dalvo modelo HT No 2403, Argentina) a 550°C hasta cenizas blancas durante 4 h. Las cenizas fueron levantadas con 10 mL de HCl 1,2 mol L⁻¹. El contenido de calcio se determinó por espectroscopia de absorción atómica utilizando un equipo Perkin Elmer IL 551, Instrumentation Laboratory (Norwood, Massachusetts, EE.UU) en muestras diluidas en solución de cloruro de lantano 0,5 g 100 mL⁻¹ para eliminar interferencias. Se calculó la Eficiencia de Encapsulación (EE) de Calcio como (Ecuación V.1):

$$EE(\%) = \frac{\text{mg Ca en cápsula}}{\text{mg Ca utilizados en la formulación}} * 100 \quad (\text{V.1})$$

V.3.4.3-Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El tamaño de partícula y la morfología de las microcápsulas se evaluaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Los polvos se montaron en trozos de aluminio usando una cinta de doble cara. Las imágenes SEM se adquirieron con un microscopio electrónico de barrido (Phenom Pro-X, PhenomWorld, Holanda) con voltajes de aceleración entre 5 y 15 kV, de acuerdo con Cian et al. (2019).

Para determinar el tamaño de las microcápsulas, las muestras se observaron con aumentos de 1000x. Se usó ImageJ (ImageJ, Institutos Nacionales de Salud, EE. UU.) como procesador de imágenes.

V.3.4.4-Potencial Z

El potencial zeta de las microcápsulas se determinó utilizando un instrumento de microelectroforesis y dispersión de luz dinámica (Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments Ltd., Reino Unido). Para ello, las microcápsulas se dispersaron a 0,1 g 100 mL⁻¹ en agua destilada, se agitaron y se equilibraron durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, se agregó 1 mL de cada muestra a la cámara de medición. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

V.3.4.5-Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

El espectro de FTIR del **AX-c** y las cápsulas **C1**, **C2** y **C3** fueron obtenidos utilizando un espectrómetro FTIR (SHIMADZU, modelo IR Prestige-21). Para la preparación de las muestras, estas fueron secadas por 24 h a 80 °C, luego se diluyeron en KBr (~ 1% de muestra en KBr) y se prepararon pastillas a partir de las mismas, las cuales se colocaron en el porta muestra adecuado. Los datos fueron adquiridos por transmitancia (%T) a una resolución de 4 cm⁻¹. Se registraron 2 espectros por muestra, en el rango de 400 – 4000 cm⁻¹ utilizando el sistema de software del equipo (IR solution, versión 1.3), adquiriendo un background para cada muestra. Las muestras se analizaron por duplicado.

V.3.4.6-Contenido de ácidos fenólicos

Los ácidos derivados del hidroxicinámico libres y ligados del concentrado de **AX-c** fueron extraídos de acuerdo a Garzón et al. (2020b), y cuantificados por HPLC de acuerdo a Garzón et al. (2018). En primer lugar, se pesó 1 g de muestra en frascos con tapa de 50 mL, se adicionaron 15 mL de metanol (80 %) y se agitó en un agitador continuo (Decalab, Argentina) por 60 min. Se centrifugó 5 min a 3000xg y se recolectó el sobrenadante. Se repitió la extracción una segunda vez, y se sumaron los sobrenadantes extraídos. Para los compuestos fenólicos ligados (CF Lig), se tomó el residuo proveniente de las extracciones anteriores, y se realizó una hidrólisis alcalina con NaOH 2 mol L⁻¹ a temperatura ambiente, con el objetivo de liberar los ácidos fenólicos ligados. Luego se realizaron 3 extracciones con hexano para eliminar los lípidos, se extrajeron los ácidos fenólicos liberados con acetato de etilo, se evaporó hasta sequedad el solvente y se re-disolvieron los CF Lig en metanol: agua (50:50).

Las muestras se filtraron a través de un filtro de jeringa con un tamaño de poro de 0,22 µm y se inyectaron para su análisis en HPLC (bomba Shimadzu Series LC-20AT, detector de arreglo de diodos Shimadzu SPD-M20A). Los compuestos fueron separados en una columna C-18 (Gemini 110A, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 5 µm, Phenomenex) con un flujo isocrático de la fase móvil (16 mL 100 mL⁻¹ de acetonitrilo en 1 mL 100 mL⁻¹ de ácido acético) a una velocidad de 0,7 mL min⁻¹ durante 35 min a 25 °C. Los ácidos fenólicos eluidos fueron detectados a 320 nm y el resultado se expresó como µg g⁻¹ b.s. usando curvas de concentración-respuesta de 0-50 µg mL⁻¹. La identificación de los picos se realizó por comparación de los tiempos de retención y las curvas espectrales características con estándares externos (Sigma Aldrich). Los datos

fueron procesados usando el software Shimadzu LC solution.

V.3.5-Bioaccesibilidad gastrointestinal y colónica *in vitro* del calcio y de los ácidos fenólicos.

V.3.5.1-Simulación de la digestión gastrointestinal y fermentación colónica *in vitro*

La digestión gastrointestinal simulada se realizó de acuerdo con Garzón et al. (2020b). Para ello, las microcápsulas dispersadas en agua (10 g sólidos 100 g⁻¹) se ajustaron a pH 2,0 con 1 Eq L⁻¹ de HCl. Luego, se agregaron 0,4 mL de 16 g 100g⁻¹ de suspensión de pepsina recién preparada (preparada en HCl 0,1 mol L⁻¹) y las mezclas se incubaron en un baño de agitación a 37 °C durante 2 h. Al final de la digestión con pepsina, se colocaron bolsas de diálisis (6-8 kDa MWCO) que contenían 10 mL de tampón NaHCO₃ y se incubaron durante 50 min en un baño de agua con agitación a 37 °C. Se calculó la molaridad del tampón NaHCO₃ para obtener un pH final del digerido-dializado de 6,5 ± 0,2. Luego, se adicionó pancreatina (0,4 g 100 mL⁻¹ de solución de pancreatina en 0,1 L de NaHCO₃) a cada vaso y la incubación continuó durante otras 2 h. Después de eso, se retiraron las bolsas de diálisis y se enjuagaron con agua. Los contenidos de las bolsas correspondientes a los dializados y las muestras digeridas se transfirieron a tubos tarados, se pesaron y congelaron a -20 °C hasta su análisis.

Los digeridos obtenidos luego del ensayo de digestión gastrointestinal *in vitro* fueron sometidos al ensayo de fermentación colónica y diálisis, de acuerdo a Garzón et al. (2020b). Para esto, se utilizó el contenido cecal de ratas Wistar hembras (peso corporal 200 ± 5 g) alimentadas con una dieta estándar. Los animales fueron suministrados por el bioterio de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (Universidad Nacional del Litoral). Las ratas se durmieron con éter y se sacrificaron en una cámara con dióxido de carbono. Los ciegos fueron removidos a través de incisiones en la línea media abdominal. Los contenidos cecales se rasparon, se pesaron y se agregaron a un matraz que contenía medio anaeróbico estéril con tioglicolato como indicador (Laboratorios Britania S.A., Argentina) para dar un inóculo de 100 g L⁻¹. El inóculo se mezcló (2 min) en un Agitador Stomacher 80 (Seward Medical, London, UK) y se filtró (1 mm) antes del uso. Los digeridos gastrointestinales se mezclaron en un frasco con 8 mL de medio de fermentación y 2 mL de inóculo. Luego, se colocaron bolsas de diálisis con 10 mL de medio de fermentación en cada frasco. Finalmente, los frascos de fermentación fueron colocados en un sistema contenedor anaeróbico

(GasPak™ EZ), con atmosfera libre de oxígeno saturada en CO₂, y todo el sistema se incubó por 24 h en un baño a 37 °C con agitación. Blancos de la digestión gastrointestinal y con 6 g 100 mL⁻¹ de rafinosa fueron incluidos en el experimento como blancos de muestra y como control positivo de la fermentación, respectivamente. Luego de la incubación, 2,5 mL de NaOH 1 mol L⁻¹ fue adicionado para frenar la fermentación. El contenido de las bolsas de diálisis correspondientes a los dializados de la fase colónica fue transferido a tubos, pesados y almacenados a -20 °C hasta su análisis. Los remanentes en cada frasco luego del proceso de fermentación colónica, correspondientes a los digeridos de la fase de fermentación, fueron pesados y centrifugados a 1000xg por 20 min. Los sobrenadantes y residuos obtenidos fueron pesados y almacenados a -20 °C.

V.3.5.2- Bioaccesibilidad de calcio y ácidos fenólicos

La bioaccesibilidad intestinal (BI%) fue calculada como se muestra en la Ecuación V.2 y se expresó como la fracción dializable del compuesto (calcio o ácido ferúlico) en relación al contenido de compuesto (calcio o ácido fenólico inicial) de la muestra de partida (M).

$$BI_M (\%) = \frac{(\text{mg compuesto dializado})}{(\text{mg compuesto inicial})} \times 100 \quad (\text{V.2})$$

Los compuestos residuales del digerido intestinal (RDI%) fueron calculados como la fracción no dializable del ácido fenólico (solubles y extraídos del residuo) en relación al contenido de compuestos iniciales (Ecuación V.3).

$$RDI(\%) = \frac{(\text{mg compuesto no dializables})}{(\text{mg compuesto iniciales})} \times 100 \quad (\text{V.3})$$

La bioaccesibilidad colónica fue calculada como la fracción dializable de los compuestos en relación al contenido de compuestos del digerido intestinal (solubles y extraídos del residuo), BC_{DI} % (Ecuación V.4), y como la fracción de compuestos en relación a los compuestos iniciales, BC_M % (Ecuación V.5).

$$BC_{DI} (\%) = \frac{(\text{mg compuesto dializados})}{(\text{mg compuesto digerido intestinal})} \times 100 \quad (\text{V.4})$$

$$BC_M (\%) = \frac{(\text{mg compuesto dializados})}{(\text{mg compuesto iniciales})} \times 100 \quad (\text{V.5})$$

Los compuestos residuales del digerido colónico fueron calculados como la fracción de compuestos no dializables (solubles y extraídos del residuo) en relación al contenido de compuestos del digerido intestinal (solubles y extraídos del residuo): $RDC_{DI} \%$ (Ecuación V.6), y en relación al contenido inicial: $RDC_M \%$ (Ecuación V.7).

$$RDC_{DI} (\%) = \frac{(\text{mg compuesto no dializables})}{(\text{mg compuesto digerido intestinal})} \times 100 \quad (\text{V.6})$$

$$RDC_M (\%) = \frac{(\text{mg compuesto no dializables})}{(\text{mg compuesto iniciales})} \times 100 \quad (\text{V.7})$$

La bioaccesibilidad total (BT%) de los compuestos evaluados fue calculada como la suma de $BI_M (\%)$ y $BC_M (\%)$.

V.3.5.3- Fermentación de ácidos fenólicos

Se determinó la fermentación de compuestos fenólicos luego del ensayo de fermentación colónica, evaluando la generación de nuevos metabolitos relacionados a la fermentación del ácido ferúlico y p-cumárico. Los metabolitos evaluados fueron ácido 3,4-dihidroxibenzoico (Sigma 08992), ácido 4-hidroxifenilacetico (Sigma H50004) y ácido 3-(3-Hidroxifenil) propiónico (Sigma 91779), y su presencia y cantidad fue determinada mediante el uso de estándares externos utilizando la técnica de HPLC mencionada.

V.3.6- Análisis estadísticos

Cada determinación se realizó al menos por duplicado. Los resultados se expresaron como media \pm desvío estándar (DE). Los datos fueron analizados por un análisis de varianza de ANOVA de un factor, y las diferencias entre muestras se determinaron por el test de Duncan ($p < 0,05$). Se utilizó para tales efectos el software Statgraphic Centurion XV 15.2.06.

V.4- Resultados y discusión

V.4.1-Potencial zeta de dispersiones Ca:AX

En la **Figura V.1** se pueden ver los resultados de potencial Z en el rango de pH 2-8 para diferentes proporciones de Ca:AX y las distintas microcápsulas. Como se puede apreciar, la carga negativa de los AX aumentó con el pH del medio, alcanzándose el máximo valor de potencial Z a pH 10.0 ($-19,25 \pm 0,01$ mV). Este comportamiento de

potencial Z en función del pH concuerda con el obtenido para otros polisacáridos tales como goma arábica, alginato y pectina (Barbosa et al. 2019).

El incremento de la carga negativa de los AX en función del pH podría atribuirse en gran parte al **AF** presente en la molécula. Como se sabe, este compuesto fenólico es un ácido orgánico débil cuyos valores de pKa son 4,56 (grupo carboxilo) y 9,39 (grupo fenoxilo). Por lo tanto, dependiendo del valor de pH de la solución, el **AF** puede estar en su forma no dissociada o como ion ferulato o ion ferulato-fenolato (Ragnar et al. 2000). Sin embargo, cuando el **AF** forma parte de la molécula de AX, los grupos carboxilo de este compuesto fenólico están esterificados con arabinosa, lo que reduce el impacto de la carga negativa aportada por el ion ferulato. Por lo tanto, los grupos fenoxilo en su forma de ion (fenolato) contribuirían en mayor magnitud con la carga negativa de los AX a pH alcalinos (Pérez-Flores et al. 2019). Resulta oportuno agregar que las proteínas co-extraídas junto con los AX también podrían contribuir con la carga negativa de **AX-c**. Al respecto, se ha reportado que los AX suelen contener proteínas que están fuertemente asociadas o ligadas covalentemente a la estructura del polisacárido (Mendez-Encinas et al. 2018), otorgando carga al complejo macromolecular (Jaguey-Hernández et al. 2022).

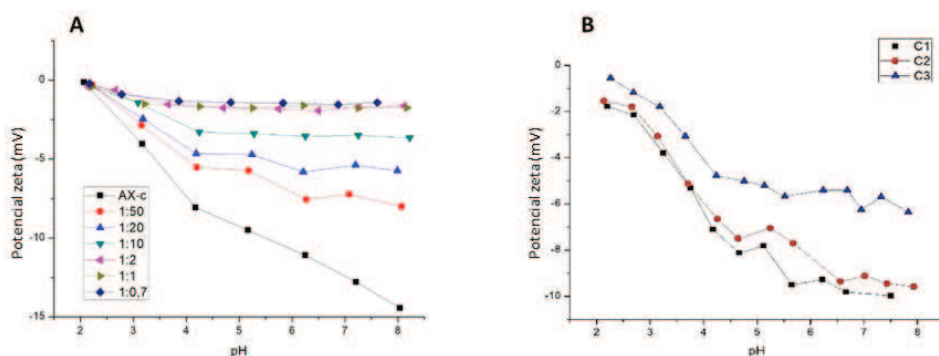


Figura V.1- Potencial Z de las dispersiones Ca:AX (A) y de las microcápsulas (B).

Respecto a las mezclas Ca:AX, la adición de Ca^{2+} a la dispersión **AX-c** produjo una reducción del valor absoluto del potencial zeta (**Figura V.1.A**). Este efecto fue más importante para proporciones altas de Ca:AX, donde la carga neta de las mezclas Ca:AX 1:2, 1:1 y 1:0,7 fue casi cero para todo el rango de pH. Estos resultados podrían indicar una neutralización progresiva de las cargas de AX por el ión Ca^{2+} . Además, no hubo cambios significativos en el perfil del potencial zeta para las mezclas Ca:AX 1:2,

1:1 y 1:0,7, lo que podría indicar un límite de asociación entre el AX y este mineral más allá de la proporción 1:2. En este sentido, You et al. (2020) mostraron que el potencial zeta del alginato cambió de -51,0 a -11,2 mV cuando la concentración de calcio aumentó de 1,5 a 6,0 mmol L⁻¹. Los autores atribuyeron este efecto a la neutralización de la carga superficial negativa de los grupos carboxilo del alginato por los iones Ca²⁺.

V.4.2-Caracterización fisicoquímica de las microcápsulas

La EE del calcio fue de 100% en todos los casos, lo que indica un muy buen rendimiento durante el secado spray. Además, la concentración de CaCl₂ no afectó la EE. La **Figura V.2** muestra las imágenes obtenidas a partir de la microscopía electrónica de barrido de las diferentes microcápsulas.

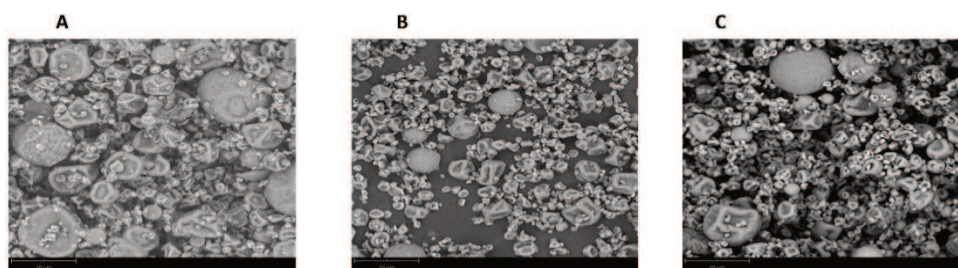


Figura V.2- Imágenes SEM de las microcápsulas obtenidas con las distintas formulaciones conteniendo diferentes relaciones Ca:AX. (A) **C1**: 1:10; (B) **C2**: 1:5 y (C) **C3**: 1:2,5

Como se puede apreciar en la **Figura V.2**, algunas microcápsulas presentaron superficie esférica lisa y otras mostraron concavidades características de los productos obtenidos por secado spray. Las capsulas **C1**, **C2** y **C3** presentaron un tamaño medio (considerando una distribución normal) de 15, 14 y 12,5 μm , respectivamente. Estos valores fueron semejantes a los informados por Kowalska et al. (2021) para microcápsulas de AX provenientes de salvado de arroz y miel obtenidas por secado spray (tamaño promedio 11 μm). Como se aprecia, el menor tamaño medio correspondió a **C3**, lo que indicaría que un mayor contenido de calcio incrementaría el entrecruzamiento con las moléculas de AX, generando estructuras más densas, cohesivas y uniformes. Estas estructuras, a su vez, podrían presentar mayor capacidad de atrapamiento de iones. En este sentido, Anani et al. (2022) informaron que el aumento de la concentración de CaCl₂ de 2 a 6 g 100 mL⁻¹ en formulaciones de alginato (2 g 100 mL⁻¹) redujo el tamaño de las microcápsulas obtenidas de 121,21 \pm 23,12 a 106,65 \pm 51,63 μm . Además, estos autores observaron que a mayor nivel de CaCl₂, menores resultaron los tamaños de partícula obtenidos. Adicionalmente, en **C1** se

encontraron cápsulas colapsadas, lo que podría indicar que cuando la relación Ca:AX disminuye, las paredes de las cápsulas son más débiles y tendrían más facilidad a la ruptura. Así, el aumento de la proporción de calcio en las formulaciones promovió la integridad de las microcápsulas. En este sentido, Yin et al. (2012) reportaron una fuerte interacción entre los iones Ca^{2+} y las moléculas de AX de *Plantago asiatica L.* Estos autores estudiaron la viscosidad y las propiedades gelificantes de diferentes soluciones de AX y Ca^{2+} , y encontraron que la viscosidad aparente de las dispersiones de AX ($2 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$) aumentó cuando el contenido de Ca incrementó de 0 a $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. Además, la viscosidad aparente de las dispersiones de AX se redujo significativamente cuando el ácido ferúlico fue removido de la molécula de AX. Por lo tanto, el Ca^{2+} interactuaría fuertemente con los ácidos glucurónico y ferúlico, lo que promovería interacciones fuertes entre las moléculas de AX y el mineral.

Como puede observarse en la **Figura V.1B**, el valor de potencial Z en el rango de pH de 2-8 para las tres microcápsulas obtenidas dependió del nivel de calcio en la formulación. A mayor contenido de Ca^{2+} en las microcápsulas, menor fue la carga negativa de las mismas, lo cual indica que las cargas superficiales fueron neutralizadas por el agregado del mineral.

En las **Figuras V.3A y V.3B** se exhiben los resultados de FTIR del **AX-c** y las microcápsulas, respectivamente.

Como se indicó anteriormente, las moléculas de AX están formadas por unidades de xilosa unidas por enlaces $\beta(1-4)$. Las unidades de xilosa poseen ramificaciones $\alpha(1-3)$ o $(1-2)$ de arabinosa, las cuales están esterificadas con ácido ferúlico en la posición O-5 (Morales-Ortega et al. 2013). Además, por el tipo de extracción realizada, el **AX-c** puede presentar residuos de proteínas y lignina.

Como se aprecia en la **Figura V.3A**, la banda entre $3600-3200 \text{ cm}^{-1}$ correspondería a las vibraciones de estiramiento características de los grupos hidroxilo presentes en la celulosa y hemicelulosa. Además, el pico a 2922 cm^{-1} correspondería a enlaces C-H pertenecientes a la estructura de dichos polisacáridos (Naibaho et al. 2021). Por otro lado, la banda de absorción en la región de $1500-1700 \text{ cm}^{-1}$ correspondería a vibraciones de los grupos funcionales presentes en el **AF** y las proteínas (Zhang et al. 2019). El pico de 1650 cm^{-1} se debería a vibraciones tanto de los dobles enlaces C=C presentes en el anillo aromático de la lignina como al grupo amida -CONH de las proteínas (Naibaho et al. 2021). La presencia de bandas correspondientes a grupos

funcionales de la lignina y de las proteínas se debe al tipo de extracción utilizada para obtener **AX-c**. Como se indicó en el **Capítulo III**, la extracción alcalina directa co-extrajo proteínas y lignina. Por otra parte, la presencia de bandas de absorción a 1520 y 1530 cm^{-1} se atribuirían al **AF** (Yilmaz-Turan et al. 2020; Lee et al. 2015).

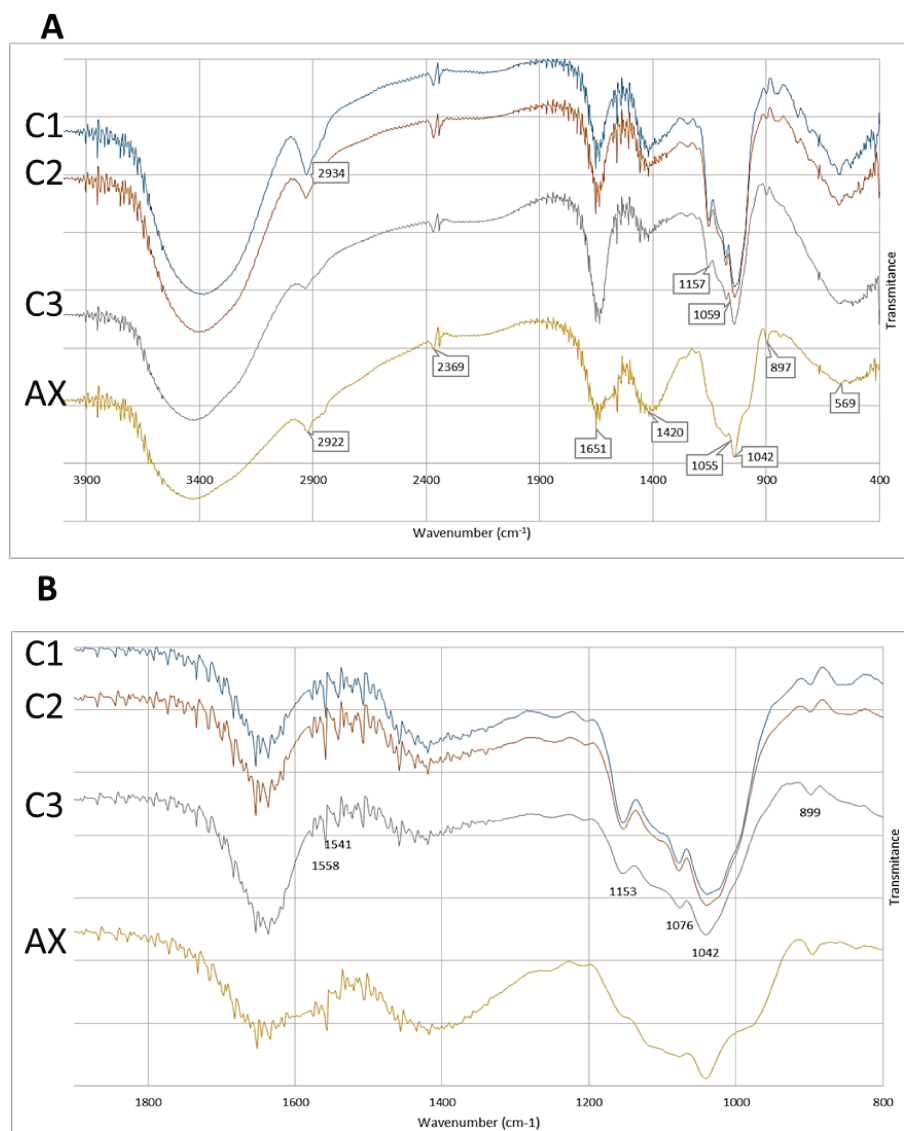


Figura V.3- Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) de **AX-c** y las diferentes microcápsulas en el rango de 4000 - 400 cm^{-1} (**A**) y 2000 - 800 cm^{-1} (**B**).

Por otra parte, la región comprendida entre 700 – 1500 cm^{-1} es considerada como la huella dactilar de los AX (**Figura V.3B**). Al respecto, las bandas entre 1000-700 cm^{-1} corresponden a enlaces β -(1 \rightarrow 4) presentes en el AX, la banda a 1040 cm^{-1} es asignada a la presencia de xilosa, el pico a 1160 cm^{-1} corresponde a residuos de arabinosa y el pico a 900 cm^{-1} se debe a enlaces β -glucosídicos entre los azúcares que forman la cadena principal de AX (Jaguey-Hernández et al. 2022). Además, el pico a

1420 cm^{-1} corresponde al grupo carbonilo C=O de los ácidos urónicos (Jiang et al. 2019), lo que confirma la presencia de los mismos en AX-c. En este sentido, la intensidad del pico a 1420 cm^{-1} en las diferentes microcápsulas es más débil, indicando una posible interacción con los iones calcio formando un complejo electrostático. Estos resultados son similares a los obtenidos con los sistemas de alginato y calcio por Nastaj et al. (2016).

V.4.3-Bioaccesibilidad de calcio

En la **Tabla V.1** se muestran los resultados de la bioaccesibilidad intestinal, colónica y total del calcio para las tres diferentes microcápsulas. Como se puede ver, cuanto mayor fue la relación Ca:AX en la formulación, mayor fue la bioaccesibilidad intestinal y total del mineral. Sin embargo, no se encontraron diferencias a nivel colónico, siendo aproximadamente 9% para todos los casos. Además, el pH después de la fermentación colónica fue en torno a 4,0 para las microcápsulas y de 5,1 para el control positivo, lo que indica que hubo una buena fermentación de los AX presentes en la formulación.

Tabla V.1-Bioaccesibilidad intestinal (BI), colónica (BC) y total (BT) de Ca^{2+}

Microcápsulas	Ca:AX	BI (%)	BC (%)	BT (%)
C1	1:10	18,3±1,0 ^a	8,7±1,2	27,0±2,4 ^a
C2	1:5	21,3±0,2 ^b	8,5±0,9	29,8±0,2 ^b
C3	1:2,5	27,5±0,9 ^c	9,6±0,7	37,1±1,0 ^c

X±DE. Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$).

Resulta importante destacar que a través de este estudio se demostró que el calcio puede ser liberado de las microcápsulas, permitiendo su bioaccesibilidad a nivel intestinal y colónico. Para oligoelementos como el Ca^{2+} , donde los mecanismos homeostáticos complejos regulan no sólo la absorción sino también la retención, las condiciones en la luz intestinal pueden no ser el factor principal para regular su biodisponibilidad. Sin embargo, la información sobre la dializabilidad del calcio que estima su bioaccesibilidad es útil para evaluar la cantidad de Ca soluble y potencialmente absorbible (Drago et al. 2005).

Los valores de BI obtenidos para **C3** son similares a los hallados por Janve y Singhal (2018) para extrudidos de arroz fortificados con diferentes sales de calcio (~33%), y los reportados por Drago et al. (2002) para leche (34,8%). Por otro lado, la menor BI de Ca en **C1** puede deberse a que las microcápsulas obtenidas presentaron estructuras débiles y quebradizas, no siendo así en la formulación **C3** que presentó la estructura más compacta (**Figura V.2A-C**). Esta unión más fuerte del Ca con los AX evitaría su precipitación frente al cambio de pH 2 a 7 en el ambiente gastrointestinal, favoreciendo su solubilidad y bioaccesibilidad. Resultados similares fueron reportados por Arazo-Rusindo et al. (2023), quienes encapsularon Ca con maltodextrina e inulina. Estos autores encontraron que las cápsulas formadas por secado spray fueron efectivas para evitar la precipitación del Ca a pH neutro.

Adicionalmente, se obtuvo un coeficiente de correlación de Pearson de 0,9879 ($p < 0.05$) entre la concentración de Ca y la bioaccesibilidad ($BI (\%) = 8.375 \times 10^{-5} * Ca (\text{ppm}) + 16.618$), lo que indicaría que la bioaccesibilidad de calcio a nivel intestinal está directamente relacionada con su concentración en las microcápsulas. De acuerdo con este resultado, Moraes et al. (2022) hallaron que la bioaccesibilidad de Ca en fórmulas infantiles dependía de su concentración en las fórmulas. Además, estos autores reportaron que, a mayor cantidad de Ca total en las fórmulas infantiles, mayor fue su biodisponibilidad en este tipo de matriz alimentaria.

Como se mencionó anteriormente, no se observaron diferencias significativas en la BC entre las diferentes formulaciones de microcápsulas. Sin embargo, el proceso de fermentación colónica incrementó la bioaccesibilidad total de este oligoelemento. La BT de **C3** fue mayor que la obtenida por las otras microcápsulas. Se sabe que la absorción intestinal representa un sitio significativo para regular el balance corporal total del calcio. Hasta la fecha, la mayor parte de la investigación en el área se ha centrado en el intestino delgado. Esto está justificado dado que, en condiciones de ingesta adecuada de calcio, aproximadamente el 90% de la absorción de este mineral ocurre en esta porción intestinal, particularmente en el íleon (Shkemi y Huppertz, 2022). Sin embargo, estudios recientes sugieren que el colon puede ser un sitio importante de regulación de la secreción y absorción de calcio (Beggs et al. 2022), por lo que resulta interesante estimar la bioaccesibilidad colónica de este oligoelemento.

Por otro lado, el uso de **AX-c** como material de pared resultó eficiente para obtener valores de bioaccesibilidad total elevados. Estos resultados pueden estar asociados con la actividad prebiótica de los AX. Como se mencionó anteriormente, los

dializados de las microcápsulas presentaron menor pH respecto al control, después de la fermentación colónica. Relacionado a esto, se ha visto que prebióticos como los galactooligosacáridos incrementaron la bioaccesibilidad del calcio de 7 a 12%, mediado por cambios en la microbiota intestinal (Whisner et al. 2013). En este sentido, Lynch et al. (2021) han reportado actividad prebiótica de fracciones de AX de hez de malta, incrementando el nivel de *Lactobacillus* al doble, y triplicando el nivel de *Bifidobacteria*. Asociado a este efecto, se ha observado un aumento en la producción de ácidos grasos de cadena corta, particularmente acetato y propionato, poniendo de manifiesto así el potencial prebiótico de estos compuestos (Lynch et al. 2021).

Por último, teniendo en cuenta una ingesta diaria recomendada (IDR) de calcio de 1000 mg día⁻¹, el consumo de 2 g de **C3** por día aportaría un 20% de la IDR y teniendo en cuenta una bioaccesibilidad del 37%, el aporte potencial de calcio sería de 74 mg (7,4% de IDR).

V.4.4-Bioaccesibilidad intestinal y colónica de compuestos fenólicos

Para poder ejercer efectos beneficiosos en el cuerpo, los compuestos fenólicos deben primero liberarse de la matriz para estar disponibles para ser absorbidos (bioaccesibilidad), metabolizados por las células del tracto gastrointestinal y transportados al torrente sanguíneo, donde pueden ejercer sus funciones biológicas (biodisponibilidad) (González-Aguilar et al. 2017). Por otro lado, se ha visto que la fibra dietaria interacciona con los ácidos fenólicos (Chitindingu et al. 2015), lo que genera una fracción indigerible, que pasa al colon y es sustrato de la microflora fermentativa, la cual contribuye a la liberación de los compuestos fenólicos unidos a la fibra y material no digerible y por lo tanto, a su bioaccesibilidad (González-Aguilar et al. 2017), y también a la generación de sus metabolitos (Juániz et al. 2017).

Como se mencionó en el **Capítulo III**, el **AX-c** obtenido a partir de la HM posee dos compuestos fenólicos mayoritarios: **AF** y ácido p-cumárico. Ambos en sus formas libres y ligadas. Cabe recordar que el contenido de **AF** en **AX-c** representó el 84% del total de compuestos fenólicos derivados del ácido hidroxicinámico.

Para estimar la biodisponibilidad potencial de ácido ferúlico y p-cumárico provenientes de **AX-c** y de las diferentes microcápsulas, se midió la bioaccesibilidad total de estos ácidos fenólicos. En la **Tabla V.2 y V.3** se muestran los resultados de bioaccesibilidad intestinal (BI %), colónica (BC %) y total (BT %) de ácido ferúlico y p-cumárico, respectivamente.

Respecto a la bioaccesibilidad intestinal (BI) del **AF** y p-cumárico (**Tablas V.2 y V.3**, respectivamente) se puede observar para ambos casos una dializabilidad entorno al 30%. Al respecto, Chitindingu et al. (2015) estudiaron la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos totales de diversos cereales. Estos autores reportaron valores de BI de los compuestos fenólicos totales entre 18 y 33 %. Adicionalmente, Gong et al. (2019) estudiaron la BI de diferentes ácidos fenólicos de trigo, entre ellos el ácido ferúlico y el p-cumárico, y reportaron valores de BI de 57,7 a 61,9% para esos compuestos. Es importante señalar que se observó una relación inversa entre la BI del **AF** y el nivel de calcio en las microcápsulas ($r: 0,9984$). Este resultado se puede atribuir a la formación de complejos ácido fenólico-minerales mediada por interacciones electrostáticas Ca^{2+} -ácido ferúlico, lo que disminuiría la dializabilidad de este ácido fenólico conforme incrementa el nivel de calcio en la formulación.

Por otro lado, Garzón et al. (2020b) reportaron un incremento de la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos luego de la fermentación microbiana a nivel colónico. Como se indicó anteriormente, los ácidos fenólicos ligados y aquellos que no son bioaccesibles a nivel intestinal pueden continuar hacia el intestino grueso donde son metabolizados y degradados por las enzimas microbianas, pudiendo ejercer sus efectos antioxidantes localmente (Tarko et al. 2013; Malunga et al. 2016). En este trabajo, la fracción no dializada de los digeridos intestinales fue sometida a una fermentación con microbiota fecal de rata. Durante este proceso se simuló la absorción por el epitelio del colon mediante una diálisis simultánea. Como se puede apreciar en la **Tabla V.2**, solo el **AF** proveniente de **AX-c** y **C1** fue bioaccesible a nivel colónico. Por lo tanto, la presencia de calcio en niveles elevados afectó la bioaccesibilidad colónica de este ácido fenólico, no detectándose en el dializado de **C2** y **C3**. Además, para todas las muestras, la BC_{ID} de este ácido fenólico fue menor que la obtenida a nivel intestinal (BI).

A diferencia de lo anterior, el ácido p-cumárico fue bioaccesible a nivel colónico (**Tabla V.3**), obteniéndose el mayor valor de bioaccesibilidad con **C1** ($p < 0,05$). Con excepción de **C1**, los valores de bioaccesibilidad colónica (BC_{ID}) fueron inferiores a los hallados para la bioaccesibilidad intestinal (BI).

La bioaccesibilidad reducida de los ácidos fenólicos después de la fermentación colónica *in vitro* puede deberse a la acción de enzimas microbianas, las cuales pueden degradar estos ácidos fenólicos a nuevos metabolitos a nivel colónico (Zhang et al. 2023, Yang et al. 2022, Rechner et al. 2002). En este sentido, fue posible observar una

degradación del **AF** a nivel colónico, lo que representó una pérdida entre 60-90% (**C2**-**C3**>**C1**-**AX-c**).

Tabla V.2-Bioaccesibilidad intestinal, colónica y total de ácido ferúlico de **AX-c** y de las diferentes microcápsulas

Ácido Ferúlico					
Muestra (Ca:AX)	Contenido ($\mu\text{g g}^{-1}$ sol.)	BI (%)	BC_{ID} (%)	BC (%)	BT (%)
AX-c	298,3±11,7	28,4±1,8 ^a	17,8±0,3	13,4±0,2	41,8±2,0 ^b
C1 (1:10)	119,0±4,7	32,8 ± 0,9 ^b	18,1±1,1	12,9±0,7	45,6±1,6 ^b
C2 (1:5)	118,9±4,8	30,4±1,2 ^{ab}	ND	ND	30,3±1,1 ^a
C3 (1:2,5)	119,1±4,7	27,2±0,9 ^a	ND	ND	27,5±1,2 ^a

X±DE. BI: Bioaccesibilidad intestinal de **AF**; BC_{ID}: bioaccesibilidad colónica de **AF** considerando el **AF** de la muestra intestinal digerida; BC: bioaccesibilidad colónica de **AF** considerando el **AF** de la muestra no digerida; y bioaccesibilidad total (BT) de **AF** calculada como BI + BC. ND: no detectado. Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas entre muestras (p< 0,05).

Tabla V.3-Bioaccesibilidad intestinal, colónica y total de ácido p-cumárico de **AX-c** y de las diferentes microcápsulas

Ácido p-cumárico					
Muestra (Ca:AX)	Contenido ($\mu\text{g g}^{-1}$ sol.)	BI (%)	BC_{ID} (%)	BC (%)	BT (%)
AX-c	56,5±4,8 ^b	32,6±0,9 ^{ab}	27,2±3,4 ^a	31,2±3,8 ^a	63,8±1,7 ^b
C1 (1:10)	22,6±1,9 ^a	33,8±0,6 ^{ab}	58,7±6,1 ^b	56,7±6,2 ^b	90,4±1,6 ^c
C2 (1:5)	22,7±1,8 ^a	31,8±0,8 ^a	19,4±2,5 ^a	22,2±2,9 ^a	53,9±2,2 ^a
C3 (1:2,5)	22,6±1,9 ^a	34,7±1,4 ^b	29,7±0,9 ^a	31,9±1,0 ^a	66,9±0,1 ^b

X±DE. BI: Bioaccesibilidad intestinal de ácido p-cumárico; BC_{ID}: bioaccesibilidad colónica de ácido p-cumárico considerando el ácido p-cumárico de la muestra intestinal digerida; BC: bioaccesibilidad colónica de ácido p-cumárico considerando el ácido p-cumárico de la muestra no digerida; y bioaccesibilidad total (BT) de ácido p-cumárico calculada como BI + BC. ND: no detectado. Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas entre muestras (p< 0,05).

Para el caso del ácido p-cumárico, dicha pérdida fue del 35% para **C2**. En este mismo sentido, Gong et al. (2019) reportaron que la bioaccesibilidad colónica del ácido ferúlico y p-cumárico fue menor que la obtenida a nivel intestinal (22 vs. 58%,

respectivamente), atribuyendo este fenómeno a una degradación de los compuestos durante la fermentación. Adicionalmente, estos autores demostraron que la fermentación del ácido ferúlico está mediada por bacterias de género diferente a las responsables de la fermentación del ácido p-cumárico, explicando las diferencias encontradas en la tasa de degradación de ambos compuestos.

Como se sabe, en el colon existen una gran variedad de microorganismos (1000 bacterias diferentes y 10^{14} unidades formadoras de colonias), los cuales pueden actuar durante la fermentación de la fracción no digerible proveniente de la digestión intestinal (Shahidi y Yeo, 2016). En este sentido, los ácidos fenólicos conjugados pueden liberarse debido a la acción de carbohidrasas, proteasas y otro tipo de enzimas secretadas por la microbiota colónica, favoreciendo posteriormente su absorción (Zhang et al. 2023). Además, los ácidos fenólicos pueden ser metabolizados por los microorganismos, generándose nuevas especies fenólicas. De acuerdo con Yang et al. (2022) y Rechner et al. (2002) los principales metabolitos colónicos generados a partir del **AF** son el ácido 3-(3,4-dihidroxifenil) propiónico, el ácido 3-(3-hidroxifenil) propiónico y el ácido 3-fenilpropiónico. Por otra parte, el ácido 3,4-dihidroxibenzoico puede derivar del metabolismo de varios compuestos fenólicos, y se ha reportado que puede generarse a través del ácido 3-(3-hidroxifenil) propiónico, mediante varias reacciones de decarboxilación y dehidroxilación (Crozier et al. 2010, Kay et al. 2017; Rocchetti et al. 2017). En este sentido, se pudo evidenciar que el **AF** proveniente de **AX-c** y las diferentes microcápsulas fue metabolizado durante la fermentación colónica, generándose ácido 3,4-dihidroxibenzoico y ácido 3-(3-hidroxifenil) propiónico (**Tabla V.4**). Al respecto, en la **Tabla V.4** se muestra la bioaccesibilidad colónica de cada uno de estos metabolitos.

Como se aprecia en la **Tabla V.4**, los metabolitos generados a partir de **AF** durante la fermentación colónica resultaron bioaccesibles. Aunque la mayor degradación del ácido ferúlico se observó en **C2** y **C3**, el mayor contenido de estos dos metabolitos se observó en **AX-c** y **C1**. La fermentación colónica puede continuar con la degradación de estos metabolitos o generar otros compuestos que no pudieron detectarse, lo que explica estos resultados. Además, se sabe que el metabolismo de los compuestos fenólicos ocurre a altas velocidades de reacción, lo que podría generar diferencias entre muestras (Anson et al. 2011). Se deben realizar más estudios con otras técnicas analíticas para determinar todos los productos generados por la fermentación colónica.

Tabla V.4-Bioaccesibilidad colónica de metabolitos generados durante la fermentación del AF

Muestra (Ca:AX)	ácido 3,4-dihidroxibenzoico		ácido 3-(3-hidroxifenil) propiónico	
	$\mu\text{g mL}^{-1}$	BC (%)	$\mu\text{g mL}^{-1}$	BC (%)
AX-c	0,44±0,05 ^a	69,9±0,3 ^c	1,18±0,30 ^b	61,7±5,0
C1 (1:10)	0,98±0,03 ^b	62,4±0,5 ^b	1,32±0,03 ^b	55,9±4,9
C2 (1:5)	0,42±0,03 ^a	55,5±0,2 ^a	0,46±0,02 ^a	ND
C3 (1:2,5)	0,42±0,00 ^a	80,2±0,2 ^d	0,25±0,00 ^a	ND

X±DE. BC: bioaccesibilidad colónica de ácido 3,4-dihidroxibenzoico y ácido 3-(3-hidroxifenil) propiónico considerando el contenido de ácido 3,4-dihidroxibenzoico y ácido 3-(3-hidroxifenil) propiónico en la muestra no digerida. ND: no detectado. Letras diferentes en columnas significan diferencias significativas entre muestras ($p < 0,05$).

Respecto a la bioaccesibilidad total (BT) del AF (Tabla V.2), se pudo observar que un nivel elevado de calcio (C2 y C3) provocó una disminución de la BT. Como se mencionó anteriormente, un aumento en el contenido de calcio en las microcápsulas redujo la bioaccesibilidad de este ácido fenólico a nivel colónico, probablemente debido a la formación de complejos iónicos. Además, se puede sugerir que a proporciones más altas de Ca:AX, existe una mayor facilidad para fermentar el ácido ferúlico por parte de las bacterias del colon, lo que resulta en una mayor degradación y una menor bioaccesibilidad del colon.

De manera similar, C1 presentó valores de bioaccesibilidad más altos para el ácido p-cumárico en comparación con las otras muestras (Tabla V.3). Por lo tanto, la BT de los ácidos ferúlico y p-cumárico dependió del nivel de calcio de las microcápsulas y de su estabilidad frente a las enzimas microbianas. De acuerdo con esto, Serra et al. (2012) informaron que la bioaccesibilidad *in vitro* de los compuestos fenólicos depende de la matriz y del procesamiento del alimento, el contenido y el perfil de compuestos fenólicos en el producto y la microbiota colónica utilizada para las pruebas.

V.4.5-Actividad antioxidante de dializados y digeridos

La actividad antioxidante de los dializados y digeridos se midió mediante la inhibición del radical ABTS⁺ (Tabla V.5). En la fase gastrointestinal, los digeridos tuvieron mayor capacidad de inhibición que los dializados. En todas las muestras, a medida que aumentó el contenido de calcio de las microcápsulas, disminuyó la capacidad de inhibición del radical ABTS⁺. Esto podría deberse al hecho de que el ácido

ferúlico en la microcápsula está involucrado en la interacción del AX con el calcio, y las cantidades crecientes de Ca^{2+} impidieron el contacto con el radical ABTS^+ . Este comportamiento puede estar relacionado con el efecto matriz previamente mencionado para la bioaccesibilidad de los ácidos fenólicos. Sin embargo, esta tendencia no se observó en las muestras después de la fase de fermentación colónica. Además, los dializados presentaron valores de inhibición más altos que los encontrados para los digeridos ($p < 0,05$), lo que podría estar indicando una mayor actividad antioxidante relacionada con los compuestos fenólicos bioaccesibles y sus metabolitos.

Tabla V.5- Capacidad antioxidante de dializados y digeridos obtenidos tras la digestión gastrointestinal simulada seguida de fermentación colónica *in vitro* de **AX-c** y las diferentes microcápsulas

Muestras (Ca:AX ratio)	Inhibición ABTS^+ (%)			
	DG Dializados	DG Digeridos	FC Dializados	FC Digeridos
AX-c	58,69±2,24 ^d	82,27±4,82 ^c	90,01±1,21 ^c	71,66±2,02 ^{bc}
C1 (1:10)	53,14±1,76 ^c	81,91±2,52 ^c	80,25±0,23 ^a	72,76±2,28 ^c
C2 (1:5)	43,17±1,85 ^b	71,31±0,76 ^b	87,51±3,90 ^{bc}	68,46±1,74 ^a
C3 (1:2.5)	26,05±1,26 ^a	55,58±2,57 ^a	84,44±3,35 ^{ab}	69,98±0,81 ^{ab}

X±DE. DG: digestión gastrointestinal; FC: fermentación colónica. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas entre muestras ($p < 0,05$).

Estos resultados indicaron que las microcápsulas de Ca-AX podrían utilizarse no sólo como suplementos de calcio, sino también como suplementos prebióticos, con buena bioaccesibilidad de compuestos fenólicos que aportarían propiedades beneficiosas para la salud.

V.5-Conclusiones parciales

Los arabinosilanos son los principales componentes de la hemicelulosa presente en el HM, un subproducto de la industria cervecera. Dado que se reportaron sus efectos prebióticos, se utilizaron para la formulación de suplementos de calcio. Se sabe que la fermentación de carbohidratos no digeribles en el colon aumenta la absorción de calcio a este nivel. En este contexto, se demostró por primera vez la formación del complejo Ca:AX mediada por interacciones electrostáticas. Luego, se utilizaron tres niveles de calcio para estudiar la formación de las microcápsulas y sus bioaccesibilidades al calcio y al ácido ferúlico. El contenido de calcio aumentó la bioaccesibilidad del mismo, mientras que redujo la bioaccesibilidad del ácido ferúlico. Las microcápsulas con 10,9 g

de calcio 100 g^{-1} presentaron la mayor bioaccesibilidad de calcio total ($\sim 37\%$). Así, se desarrollaron microcápsulas adecuadas para la suplementación de personas con una dieta deficiente en calcio, con el aporte de fibras fermentables y compuestos fenólicos. Este tipo de suplementos podrían ayudar a las personas mayores a alcanzar sus requerimientos de calcio y contribuir con una microbiota saludable. Por otro lado, el aprovechamiento de **AX-c** procedente de HM podría añadir valor a un residuo producido en grandes cantidades en la industria alimentaria.

**VI- EVALUACIÓN DE LOS ARABINOXILANOS COMO AGENTES DE
ENCAPSULACIÓN DE MINERALES. DESARROLLO DE UN FORTIFICANTE
A BASE DE ARABINOXILANOS Y HIERRO Y ESTUDIO DE SU APLICACIÓN
EN UN ALIMENTO EXTRUDIDO**

VI-Evaluación de los arabinosilanos como agentes de encapsulación de minerales. Desarrollo de un fortificante a base de arabinosilanos y hierro y estudio de su aplicación en un alimento extrudido

VI.1-Introducción

El hierro es un oligoelemento esencial en el cuerpo humano, que participa en el transporte y la regulación del oxígeno, el crecimiento celular y muchas otras vías metabólicas (Chen et al. 2022).

La deficiencia de hierro (Fe) y la anemia son problemas de salud pública por sus consecuencias sobre la salud de los individuos y sobre aspectos sociales y/o económicos que afectan en distinto grado a todos los países (S. A. de Pediatría, 2017).

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (2011), más de 2 billones de personas tienen deficiencia de hierro, lo que representa casi el 25% de la población mundial. La anemia está presente en 800 millones de personas, de los cuales 273 millones son niños. La causa más frecuente de anemia en el mundo es la deficiencia de hierro. Su incidencia en países en vías de desarrollo es 2,5 veces mayor que en países desarrollados.

Por otra parte, la fortificación es una estrategia sustentable a largo plazo para resolver la deficiencia de hierro a nivel poblacional. Existen distintas fuentes de fortificación de hierro que varían respecto a su biodisponibilidad y reactividad con la matriz alimentaria. En general, las fuentes más reactivas y de mayor biodisponibilidad son las solubles en agua (Kumari et al. 2022). El sulfato ferroso es una fuente soluble en agua, de bajo costo, de buena biodisponibilidad, pero de alta reactividad (pro oxidante). La oxidación del alimento genera olores, sabores y apariencias desagradables, provocando su deterioro. La encapsulación de este mineral resulta ser una estrategia útil para disminuir la interacción del hierro con la matriz alimentaria, previniendo el deterioro por oxidación del alimento. Además, podría proteger al hierro de interacciones con inhibidores del alimento que reducen su biodisponibilidad (Wardhani et al. 2020). La matriz utilizada como material de encapsulación debe ser de calidad alimentaria, biodegradable y capaz de formar una barrera entre el elemento interno y su entorno (Piskin et al. 2022). Además, no debe afectar su biodisponibilidad. Como se indicó en el **Capítulo V**, la biodisponibilidad es la fracción de una dosis ingerida de una sustancia que llega a la circulación sistémica. Es un fenómeno fisiológico dependiente de factores variables como la edad, el genotipo, el estado nutricional y/o la secreción de ácidos

gástricos que no es posible determinar *in vitro*. Por otro lado, la bioaccesibilidad es la fracción de una dosis ingerida de una sustancia que está disponible para su absorción en el intestino después de la digestión enzimática, y puede ser estimada de manera *in vitro* (Moraes et al. 2022). Los métodos *in vitro* brindan información sobre la bioaccesibilidad de un nutriente potencial con respecto a los efectos de los factores luminales (incluidos el pH y las enzimas), la preparación de alimentos, las prácticas de procesamiento y la naturaleza de la matriz alimentaria (Janve y Singhal, 2018)

La absorción del hierro depende en gran medida de su forma química (ferroso/férrico) y de su especiación (Ems et al. 2023). El hierro férrico se precipita en soluciones con un pH superior a 3,0, mientras que la mayor parte del hierro ferroso permanece soluble a un pH inferior a 5,0. A nivel del tracto gastrointestinal, el hierro primero debe solubilizarse en el estómago y complejarse con otros componentes presentes en los alimentos que lo mantengan soluble en el sitio de absorción (duodeno). Sin embargo, los compuestos complejantes pueden ser potenciadores o inhibidores de la absorción del hierro, dependiendo de su solubilidad (Piskin et al. 2022). Por lo tanto, la composición de la dieta es uno de los principales factores que influyen en la absorción del hierro no hemínico (Sharp 2010).

El hierro ferroso (Fe^{+2}) es la forma de hierro más biodisponible. Se convierte a la forma férrica (Fe^{+3}) por oxidación, que puede ser provocada por condiciones alcalinas, agentes oxidantes como los presentes en el aire, alta humedad y compuestos fenólicos. En general, los alimentos fortificados con compuestos ferrosos que se oxidan presentan una baja biodisponibilidad de hierro, mal sabor y decoloración, lo que reduce la aceptabilidad del consumidor (Siddiqui et al. 2023).

- **Factores promotores e inhibidores de la absorción del hierro**

Dentro de las sustancias promotoras de la absorción del hierro no hemínico se encuentra el ácido ascórbico (Piskin et al. 2022). Es un factor dietético bien conocido que mejora la biodisponibilidad del hierro. Sin embargo, el calcio, los polifenoles y los fitatos reducen la absorción intestinal (Schönfeldt et al. 2016).

La presencia de ácido ascórbico en la dieta aumenta la absorción del hierro no hemínico. Uno de los mecanismos es la formación de un quelato con el hierro férrico (Fe^{3+}) en el pH ácido del estómago, que luego permanece soluble en el pH neutro del duodeno (primera sección del intestino delgado). Además, el ascorbato dona un electrón, actuando como eliminador de radicales libres y reductor del Fe^{3+} a Fe^{2+} , que es más soluble que el Fe^{3+} en los pH gastrointestinales. Hasta la fecha, se han realizado

numerosos estudios relativos al efecto del ácido ascórbico en la absorción de hierro. Recientemente, Sabatier et al. (2020) evaluaron el impacto del ácido ascórbico en la biodisponibilidad de un complejo caseína-hierro, en comparación con el sulfato ferroso y el pirofosfato férrico. Se utilizó una digestión gastrointestinal simulada junto con un modelo de cultivo celular Caco-2. En paralelo se realizaron pruebas de solubilidad y de disociación del complejo caseína-hierro. Estos autores encontraron que la adición de ácido ascórbico mejoró la absorción del hierro tanto del sulfato ferroso como del complejo caseína-hierro, en las células Caco-2.

El efecto potenciador del ácido ascórbico se debe principalmente a la reducción luminal del hierro férrico a ferroso, pero también a su efecto quelante, lo que evita la formación de complejos insolubles, y por lo tanto no absorbibles, del hierro con polifenoles y fitatos (Stoffel et al. 2020).

He et al. (2019) utilizaron un modelo de digestión gastrointestinal *in vitro* y células Caco-2 para investigar los efectos del ácido fítico, el oxalato de sodio y el silicato de sodio sobre la biodisponibilidad del hierro no hemínico, en presencia y ausencia de ácido ascórbico. Los hallazgos revelaron que estos inhibidores restringieron la absorción de hierro ferroso, pero el ácido ascórbico pudo contrarrestar este impacto inhibitorio y mejorar su absorción.

Asimismo, los péptidos de tejidos musculares parcialmente digeridos de carne, pescado y aves mejoran la absorción de hierro y pueden superar hasta cierto punto los efectos negativos del ácido fítico y de los polifenoles (Hurrell 2021). Por lo tanto, la biodisponibilidad del hierro de la dieta depende del equilibrio entre los inhibidores y promotores de la absorción de hierro.

De acuerdo con Husmann et al. (2022), los prebióticos pueden mejorar la absorción colónica de minerales al aumentar la producción de ácidos grasos de cadena corta en el colon proximal, disminuir el pH luminal intestinal y aumentar su disolución. Además, Lynch et al. (2021) encontraron que los AX extraídos de la hez de malta (HM) poseen potencial prebiótico, lo que podría influenciar positivamente en la bioaccesibilidad colónica del hierro. Al respecto, Paganini et al. (2017) realizaron un estudio cuyo objetivo era investigar si la ingesta de prebióticos estaba asociada con una mayor absorción de hierro en niños menores de 5 años. Para ello, cincuenta niños se dividieron aleatoriamente en dos grupos. El primer grupo se alimentó con papilla de maíz fortificada con polvo de micronutrientes (MNP), que contenía fumarato ferroso y NaFeEDTA junto con 7,5 g de galactooligosacáridos (GOS) por día durante 21 días. El

segundo grupo recibió la misma papilla de maíz, pero sin la adición de GOS. Las muestras contenían 5 mg de Fe como $^{57}\text{FeFum} + \text{Na}^{58}\text{FeEDTA}$. La absorción de hierro se midió como la incorporación de isótopos estables a los eritrocitos. Los marcadores de hierro, el pH fecal y los grupos bacterianos se evaluaron al inicio y a las 3 semanas. Los resultados del estudio mostraron que el grupo alimentado con MNP y GOS había mejorado la absorción de hierro en un 62 %, en comparación con el otro grupo, posiblemente debido a una mayor absorción de hierro a nivel colónico. Además, la adición de GOS fue útil para mitigar los efectos adversos del hierro sobre el ambiente intestinal.

Otros estudios también confirmaron los efectos beneficiosos de GOS sobre la absorción fraccional de hierro (AF-Fe) en adultos con anemia. Jeroense et al. (2019) estudiaron el efecto de la adición de 15 g GOS en la AF-Fe en mujeres con deficiencia de hierro. Observaron que, al inicio del estudio, el GOS aumentó en 61% la AF-Fe de fumarato ferrosos (FeFum) cuando se administró con agua y 28% con una comida de prueba. Después de 4 semanas de consumo de GOS, el prebiótico volvió a aumentar 29% la AF-Fe de FeFum en la comida. Sin embargo, en comparación con el inicio del estudio, el consumo de GOS durante 4 semanas no mejoró significativamente la absorción del FeFum agregado en la comida administrada sin GOS. La AF-Fe de FeSO_4 administrado con GOS en una comida después de 4 semanas de consumo de GOS no fue significativamente mayor que la AF-Fe de FeSO_4 en una comida sin GOS al inicio del estudio. Posteriormente, Jeroense et al. (2020) demostraron, en mujeres con deficiencia de hierro, que los GOS no aumentaron la AF-Fe del FeSO_4 o del pirofosfato férrico, pero sí la del FeFum. Por lo tanto, una combinación de FeFum y GOS puede ser una fórmula de buena absorción para los suplementos de hierro.

Giorgetti et al. (2022) estudiaron en mujeres con depleción de hierro (ferritina sérica (FS) $<25 \mu\text{g L}^{-1}$), si la coadministración oral de 15 g de GOS, FOS o goma de acacia aumentaba la AF-Fe de un suplemento de 100 mg de Fe administrado como FeFum. La AF-Fe se evaluó mediante la incorporación isotópica a los eritrocitos 14 días después de la administración. Los datos se analizaron utilizando un modelo lineal de efectos mixtos. Como resultado observaron que la AF-Fe de FeFum administrado con GOS y FOS fue significativamente mayor (45% y 51%, respectivamente) que el control. La goma de acacia no afectó significativamente la AF-Fe del FeFum. En mujeres con deficiencia de hierro, la administración conjunta de GOS y FOS con FeFum aumentó la absorción de hierro en aproximadamente un 50 % a partir de una dosis oral de hierro de

100 mg. Por lo tanto, GOS y FOS pueden ser nuevos potenciadores prometedores de la absorción de hierro suplementario. Por otra parte, en el estudio *in vitro*, la dializabilidad del hierro de FeFum + GOS fue un 46 % mayor y FeFum + FOS un 61,6% menor que la del FeFum solo. El mecanismo detrás del efecto opuesto de GOS y FOS sobre la dializabilidad del hierro es incierto y la discrepancia entre los resultados *in vivo* e *in vitro* para FeFum + FOS también requiere una investigación más profunda. La fibra dietaria puede interactuar con el hierro y los azúcares reductores pueden formar complejos solubles y estables con el mismo, pero los efectos son variables entre los diferentes tipos de fibras. La interacción del hierro libre disociado del FeFum con las unidades reductoras de GOS y FOS podría prevenir la formación de hidróxidos de hierro insolubles, y por lo tanto su precipitación, lo que favorecería la absorción de hierro. La formación y estabilidad de los complejos de carbohidratos $-Fe^{2+}$ o $-Fe^{3+}$ se ven afectados por variables, incluidas el pH, la concentración y la forma química de los ligandos que pueden formar complejos o quelatos con el hierro metálico, la composición de sacáridos de la fibra y su grado de polimerización.

Yap et al. (2005) examinaron el efecto dosis-respuesta de la inulina sobre la absorción de minerales y la concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en heces de lactantes alimentados con fórmulas infantiles. No se observó diferencia significativa en el contenido de AGCC en heces de los lactantes durante el período basal y el período de ingesta ($p < 0,05$). Sin embargo, en los lactantes suplementados con 1 g día^{-1} de inulina se observó un aumento significativo en el porcentaje de absorción aparente $[(\text{mineral ingerido} - \text{mineral en heces}) \times 100] / \text{mineral ingerido}$, el porcentaje de retención aparente $[(\text{mineral ingerido} - \text{mineral en heces} - \text{mineral en orina}) \times 100] / \text{mineral ingerido}$ y la retención neta de hierro $(\text{mineral ingerido} - \text{mineral en heces} - \text{mineral en orina})$. Estos resultados podrían deberse a la capacidad de los prebióticos de reducir el pH del colon, aumentando la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} , así como al proceso de fermentación que mejora la producción de AGCC, lo que puede contribuir a aumentar el área de absorción del colon (Zakrzewska et al. 2022).

Chen et al. (2022) evaluaron el efecto de oligosacáridos prebióticos en la absorción de hierro en un modelo de rata en crecimiento con deficiencia de hierro, desde las perspectivas de la expresión de proteínas y la microbiota intestinal. El modelo con deficiencia de hierro se estableció proporcionando a ratas jóvenes una dieta sin adición de hierro durante 14 días. Posteriormente, las ratas con deficiencia de hierro recibieron alimentos estándar para ratas suplementados con 0%, 3%, 5%, 10% de GOS

y 10% de FOS durante 21 días. Los resultados mostraron que una suplementación con $\geq 5\%$ de GOS en la dieta mejoró el estado del hierro e impactó significativamente en la expresión de las proteínas de unión/transporte de hierro. Además, se determinó un efecto modulador dependiente de la dosis de GOS sobre la microbiota intestinal. Se observó una regulación positiva de las proteínas de transporte y unión del hierro (TfR en el hígado, ferroportina en el duodeno y DMT1 en el colon) en los grupos ID-5% GOS e ID-10% GOS, lo que respalda la idea de que GOS actúa sobre el mecanismo de absorción de hierro, posiblemente a través de la expresión de proteínas.

- **Antecedentes de encapsulación de hierro**

Debido a la reactividad del hierro, y sus defectos relativos a sabor metálico o amargo, se requieren estrategias para proteger este mineral, mejorar su bioaccesibilidad y evitar su reactividad con la matriz alimentaria. Para conseguir estos objetivos, diferentes investigadores han estudiado la encapsulación de hierro. Como antecedentes, Cian et al. (2021) desarrollaron un fortificante de Fe microencapsulado con péptidos de hez de malta, goma garrofín y maltodextrina, logrando una bioaccesibilidad de hierro entre el 15,5 y 30,7% dependiendo de la formulación. Zhang et al. (2021b) fortificaron harina de soja utilizando hierro microencapsulado con alginato, caseinato y una emulsión de aceite de soja y spam 80. Estos autores reportaron que se consiguió disminuir la formación de productos de oxidación de lípidos tales como compuestos carbonílicos, malondialdehído, pentanal y hexanal durante un ensayo de estabilidad acelerada, mejorándose la estabilidad oxidativa y retrasando el deterioro sensorial respecto a la harina de soja con hierro sin encapsular. Filiponi et al. (2019) elaboraron complejos de Fe-péptidos haciendo reaccionar pequeños péptidos de proteínas de suero (<5 kDa) con hierro (sulfato ferroso) en condiciones controladas. Luego elaboraron microcápsulas por secado por aspersion utilizando maltodextrina (MD) y povidona (PD) como materiales de pared. Las microcápsulas de péptidos-Fe presentaron una dializabilidad de hierro 3 veces mayor que la del sulfato ferroso.

Los alimentos a base de cereales, son buenos candidatos para la fortificación, ya que son alimentos básicos en muchas poblaciones de todo el mundo y pueden manipularse en forma sólida para fabricar alimentos enriquecidos con hierro (Blanco-Rojo y Vaquero 2019). Los compuestos de hierro recomendados por la OMS para fortificar los cereales son el sulfato ferroso, el fumarato ferroso, el pirofosfato férrico y el hierro electrolítico. Sin embargo, resulta interesante estudiar el empleo de sulfato

ferroso microencapsulado.

Recientemente se reportó el uso de AX obtenido a partir de diferentes fuentes de cereales, como material encapsulante de diferentes compuestos (Liu et al. 2020a, Paz-Samaniego et al. 2018). Por este motivo, se propone el estudio de los **AX-c** obtenidos a partir de HM para la microencapsulación del hierro.

VI.2-Objetivos

VI.2.1-Objetivo General

El objetivo fue desarrollar microcápsulas de hierro utilizando **AX-c** extraídos de la HM como material encapsulante y ácido ascórbico como promotor de la absorción, para ser utilizadas como fortificante/suplemento.

VI.2.2-Objetivos específicos

- 1- Estudiar el nivel de hierro a adicionar en la formulación de las microcápsulas
- 2- Estudiar la incorporación del fortificante a una matriz alimentaria de cereales.
- 3- Estudiar la bioaccesibilidad gastrointestinal *in vitro* del hierro.

VI.3-Materiales y Métodos

VI.3.1-Materias primas

La hez de Malta (HM) fue suministrada por Cervecería Santa Fe® (Santa Fe, Argentina). La obtención del residuo libre de proteínas (**REP**) y de los arabinosilanos fue descripta anteriormente.

La maltodextrina 15 DE fue obtenida en El bahiense, Buenos Aires, Argentina.

VI.3.2-Potencial Z de AX-c y mezclas Fe:AX-c

Para estudiar el potencial zeta del **AX-c**, se preparó una dispersión de **AX-c** de 0,1 g 100 mL⁻¹, y se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. Para las mezclas Fe:AX, se prepararon seis dispersiones usando diferentes proporciones de FeCl₂ y **AX-c** para obtener las siguientes proporciones Fe:**AX-c**: 1:530, 1:212, 1:70 y 1:22 o (Fe:AX: 1:430, 1:170, 1:57 y 1:17). Luego, las dispersiones se agitaron durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, se añadió 1 mL de cada muestra a la cámara de medición. El potencial zeta se midió en el rango de pH de 2,0 a 8,0, utilizando un instrumento de microelectroforesis y dispersión dinámica de luz (Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments Ltd., Reino Unido). El análisis se realizó por triplicado.

VI.3.3-Formulación y elaboración de las microcápsulas de hierro

Para poder evaluar el efecto de diferentes niveles de hierro usados en la formulación de microcápsulas, se elaboraron cápsulas con 0,7 (C1) y 1,4 (C2) g FeSO₄ g sólidos⁻¹, correspondientes a niveles de Fe de 12,8 y 24,4 mg Fe g sólidos⁻¹, respectivamente. La relación Fe:AX se mantuvo constante en 1:18 en todas las cápsulas (0,45 y 0,90 g AX-c g sólidos⁻¹, para C1 y C2, respectivamente). Se agregó ácido ascórbico como promotor de la absorción de hierro en relación molar AA:Fe de 1,5:1. Se adicionó maltodextrina para completar 10 g sólidos 100 mL⁻¹.

Las dispersiones se secaron por aspersion usando un secador por aspersion de laboratorio (Mini Spray Dryer Yamato ADL311S, Japan) de acuerdo con las condiciones propuestas por Cian et al. (2019). Se ensayaron dos réplicas para cada fórmula.

VI.3.4-Análisis fisicoquímico de las microcápsulas

VI.3.4.1-Composición de las microcápsulas

Los contenidos de humedad y proteínas de las microcápsulas se determinaron usando métodos de la AOAC (1995). El contenido de carbohidratos totales de las microcápsulas se determinó según Dubois et al. (1956).

VI.3.4.2-Contenido de hierro y eficiencia de encapsulación

Las muestras se mineralizaron por vía húmeda. Para ello, 50 mg de microcápsulas se dispersaron en 20 mL de HNO₃ y se digirieron en un equipo de Digestión por Micro-ondas (Milestone Ethos UP Rotor SK-15, Italy). El contenido de hierro de cada formulación de microcápsulas se determinó por espectroscopia de absorción atómica (Perkin Elmer Analyst 300).

Se calculó la Eficiencia de Encapsulación (EE-Fe) de hierro como (Ecuación VI.1):

$$EE - Fe(\%) = \frac{mg\ Fe\ en\ cápsula}{mg\ Fe\ utilizados\ en\ la\ formulación} * 100 \quad (VI.1)$$

VI.3.4.3-Contenido de ácido ascórbico

El contenido de ácido ascórbico de las microcápsulas se determinó según el método de Van de Velde et al. (2012), utilizando una bomba Shimadzu Serie LC-20AT, con un detector de arreglo de diodos Shimadzu SPDM20A, equipado con un 250 × 4,6 mm de diámetro interior columna de fase inversa (Novapack C18, 5 µm; columna

Gemini 110A C-18 Phenomenex). Los datos se procesaron utilizando el software Shimadzu LC Solution® (Shimadzu Co., Kyoto, Japón). El contenido de ácido ascórbico se expresó como g 100 g⁻¹ sólido.

VI.3.4.4-Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El tamaño de partícula y la morfología de las microcápsulas se evaluaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Las imágenes SEM se adquirieron con un microscopio electrónico de barrido (Phenom Pro-X, PhenomWorld, Holanda) con voltajes de aceleración entre 5 y 15 kV, de acuerdo con Cian et al. (2019). Para determinar el tamaño de las microcápsulas, las muestras se observaron con aumentos de 1000x. Se usó ImageJ (ImageJ, Institutos Nacionales de Salud, EE. UU.) como procesador de imágenes.

VI.3.4.5-Potencial Z

El potencial zeta de las microcápsulas se determinó utilizando un instrumento de microelectroforesis y dispersión de luz dinámica (Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments Ltd., Reino Unido). Las microcápsulas se dispersaron a 0,1 g 100 mL⁻¹ en agua destilada, se agitaron y se equilibraron durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se agregó 1 mL de cada muestra a la cámara de medición. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

VI.3.4.6-Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

El espectro FTIR del **AX-c** y de las cápsulas **C1** y **C2** fueron obtenidos utilizando un espectrómetro FTIR (SHIMADZU, modelo IR Prestige-21), bajo las condiciones descritas por Cian et al. (2019). Las muestras se analizaron por duplicado.

VI.3.4.7-Bioaccesibilidad de hierro

Para estimar la bioaccesibilidad de hierro se realizó una digestión gastrointestinal simulada *in vitro* de acuerdo con Drago et al. (2005). Brevemente, las muestras se dispersaron a 10 g 100 mL⁻¹ de agua y se ajustaron a pH 2,0 con HCl 3 mol L⁻¹. Después de agregar 0,8 mL de solución de pepsina (16 g de pepsina en 100 mL⁻¹ de HCl 0,1 mol L⁻¹), las muestras se incubaron a 37 °C durante 2 h en un baño de agua con agitación. Al final de la digestión, se colocaron bolsas de diálisis (corte: 6-8 kDa) que contenían 10 mL de tampón PIPES y se incubaron durante 50 min en un baño de agua con agitación a 37 °C. Luego, se agregaron a cada muestra 6,25 mL de solución de

pancreatina (0,4 g de pancreatina en 100 mL de NaHCO₃ 0,1 mol L⁻¹) y la incubación continuó durante otras 2 h. Los contenidos de las bolsas correspondientes a los dializados y las muestras digeridas se transfirieron a tubos tarados, se pesaron y congelaron a -20 °C hasta su análisis.

La bioaccesibilidad intestinal (BI%) se expresó como la fracción dializable del Fe en relación al contenido de hierro de la muestra de partida.

$$BI - Fe(\%) = \frac{mg\ Fe\ dializado}{mg\ Fe\ de\ la\ muestra} * 100 \quad (VI.2)$$

VI.3.5-Estudio de la fortificación de expandidos de maíz con microcápsulas

VI.3.5.1-Formulación y elaboración de extrudidos

Se elaboraron productos expandidos de maíz fortificados. Para ello, se utilizó harina de maíz de tamaño de partícula <590 µm. Las muestras se acondicionaron 1 hora antes de la extrusión ajustando la humedad al 14%.

Se prepararon 2 kg de cada una de las siguientes muestras: control sin fortificar (E0), y muestras fortificadas al nivel de 30 ppm de Fe utilizando C1 (E1), C2 (E2) y FeSO₄ (E3). La extrusión se llevó a cabo usando un extrusor doble tornillo Jinan Kelid Machinery CO. LTD (China) de cañón cerrado, con cuatro sectores de temperaturas independientes con calefactores eléctricos y enfriamiento por circulación de agua para ajustar los valores en un rango de 80 a 300 °C, diámetro de tornillo: 30 mm, L/D: 20, rpm: 100-500, Boquilla circular de 4,8 mm de diámetro y medidor de la presión en la zona de la boquilla. La temperatura de salida se ajustó a 140°C.

Durante los ensayos se midió la presión, el torque y el caudal de salida. Además, se determinó el Consumo Específico de Energía Mecánica (CEEM) como:

$$CEEM \left(\frac{J}{g}\right) = \frac{Torque\ (J) \times rpm \left(\frac{1}{min}\right)}{caudal\left(\frac{g}{min}\right)} \quad (VI.3)$$

VI.3.5.2-Characterización de los productos extrudidos

Se determinaron la expansión (relación del diámetro del extrudido y el diámetro de la boquilla) y el volumen específico (Volumen/peso b.s, mL/g) de los extrudidos. Además, se determinó el contenido de hierro y la bioaccesibilidad como se mencionó anteriormente. Por último, se midió el contenido de ácido ascórbico de los expandidos como se indicó anteriormente.

VI.3.5.3-Ensayo de estabilidad de los productos extrudidos a temperatura ambiente

Se analizó la estabilidad de los extrudidos frente a la oxidación a temperatura ambiente durante 1 año. Para ello, las muestras se secaron hasta una humedad del 6%, se envasaron en bolsas de polipropileno individuales y se conservaron a temperatura ambiente. Se tomaron muestras a los 0, 1, 2, 5, 8 y 12 meses.

Se determinó el contenido de sustancias reactivas al ácido Tiobarbitúrico (TBA), de acuerdo con la técnica de Siu y Draper (1978).

Además, las muestras se molieron utilizando un molino ciclónico (Cyclotec UDY) con un tamiz de 1 mm y se midió el color utilizando un colorímetro (Minolta CM-508d, Japón), en base al espacio de color definido por la norma CIE (Comisión International d'Eclairage): plano cromático de coordenadas a^* (valores positivos corresponden a tonos rojos y negativos a verdes) y plano cromático de coordenadas b^* (valores positivos tonos amarillos y negativos azules), situándose perpendicular a ellos el eje L^* (luminosidad). Las condiciones de medición fueron: Iluminante D65, ángulo de observación 10° , y componente especular ocluido. Se realizaron 3 réplicas por muestra.

Se determinó la diferencia de color (ΔE^*) entre los extrudidos teniendo en cuenta la muestra al tiempo inicial con respecto a **E0**, y en la evolución a través del tiempo se comparó cada muestra con respecto a su valor inicial, según la Ecuación VI.4.

$$\Delta E^* = \sqrt{\{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2\}} \quad (\text{VI.4})$$

VI.3.6-Análisis estadísticos

Cada determinación se realizó al menos por duplicado. Los resultados se expresaron como media \pm desvío estándar (DE). Los datos fueron analizados por un análisis de varianza de ANOVA de un factor, y las diferencias entre muestras se determinaron por el test de Duncan ($p < 0,05$). Se utilizó para tales efectos el software Statgraphic Centurion XV 15.2.06.

VI.4-Resultados y discusión

VI.4.1-Potencial Z de las dispersiones Fe:AX

En la **Figura VI.1** se muestran los resultados del potencial zeta en el rango de pH 2,0-8,0 para las diferentes proporciones de Fe:AX.

El potencial Z de **AX-c** fue negativo en el rango de pH de 9,0 a 2,0 y tendió a cero al disminuir el pH a 2,0. El máximo valor de potencial Z del **AX-c** se observó a valores de pH básicos ($-12,78 \pm 0,01$ mV). Este perfil se ha observado también en otros polímeros naturales como la goma arábica, alginato y pectina (Barbosa et al. 2019). La carga negativa de AX a pHs altos podría atribuirse a los ácidos glucurónico y ferúlico. También las proteínas coextraídas con AX (Mendez-Encinas et al. 2018) podrían contribuir al valor de dicho potencial, como se mencionó anteriormente. Con el agregado de concentraciones crecientes de hierro, el potencial Z disminuyó en valor absoluto alcanzando valores entre cero y -1 a pHs menores de 6, y valores de carga positivas para valores de pH inferiores de 3 para las relaciones Fe:AX de 1:170, 1:57 y 1:17. La neutralización de las cargas de los AX estaría indicando que existe una interacción entre los iones Fe^{+2} y las moléculas cargadas negativamente de los AX.

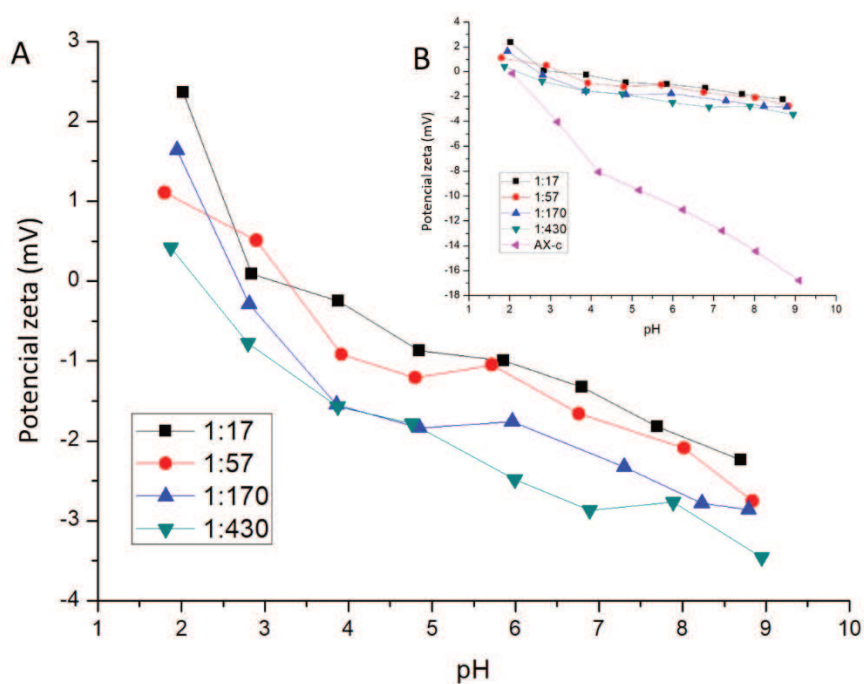


Figura VI.1- Potencial Z de dispersiones Fe-AX a diferentes relaciones Fe:AX (1:17, 1:57, 1:170 y 1:430) (A) y potencial zeta de las dispersiones de **AX-c** y de Fe-AX a diferentes relaciones Fe:AX (B).

En la **Figura VI.2** se muestra el tamaño de las partículas de las dispersiones Fe:AX. Como se puede observar, a pH ácido el tamaño de partícula es elevado (≈ 3000 nm) y visualmente se observaba cierta turbidez. Sin embargo, a valores de pH mayores

a 5, las soluciones se estabilizan y el tamaño de partícula disminuye notablemente, pasando de 3000 a 500. En este sentido el Fe^{+2} es inestable a pH mayor a 5,0 y tiende a precipitar como hidróxido férrico. Esto quiere decir que a pHs mayores a 5,0 la carga negativa de los AX mantiene al ion Fe^{+2} en solución, por interacción electrostática. Este mecanismo se ha visto en complejos proteínas-hierro donde sustancias con capacidad quelante como proteínas, péptidos o galactomananos mantienen el hierro soluble en el ambiente gastrointestinal (Cian et al. 2021, Caetano-Silva et al. 2021; Hamdani y Wani, 2017). En este sentido, la complejación con algunos compuestos orgánicos hace que el hierro sea más estable y menos propenso a interacciones con el entorno químico. Respecto a los galactomananos, se observó que la goma guar y la goma garrofín tenían capacidad quelante de iones ferrosos al formar puentes entre el hierro y los grupos carbonilo de la goma (Hamdani y Wani, 2017). Recientemente, Huang et al. (2018) estudiaron la bioaccesibilidad del hierro de complejos galactomanano-hierro. Estos autores informaron que el hierro se liberaba fácilmente después de la digestión gastrointestinal simulada (pH 2 gástrica y pH 8 intestinal), lo que daba como resultado tasas de liberación de hierro del 88 al 94 % en 300 minutos. Por otro lado, Wang et al. (2020) elaboraron un complejo polisacárido-Fe utilizando un polisacárido sulfatado de la gónada del abulón del Pacífico (AGSP). Para analizar las características de digestión del complejo AGSP-Fe(III), se realizó un ensayo de liberación de hierro en fluido gástrico simulado (pH=2,0) durante 120 min y luego en fluido intestinal simulado (pH=7,0) durante 180 min. El hierro se liberó gradualmente en los primeros 120 minutos y la cantidad de hierro liberado alcanzó el máximo de 36,6 % después de la digestión en líquido gástrico simulado durante 120 minutos.

Por último, se sabe que a pH 5, el hierro férrico es insoluble, mientras que el hierro ferroso sigue siendo parcialmente soluble (Cian et al. 2021, Bryszewska et al. 2019). Por tanto, la utilización de materiales de pared con capacidad quelante y reductora (Cian et al. 2021) podría mantener el hierro soluble y en su estado reducido. En este sentido, Cian et al. (2016) informaron que los péptidos quelantes obtenidos de los hidrolizados de algas rojas *Pyropia columbina* mantenían el hierro en una forma soluble y bioaccesible después de la digestión gastrointestinal.

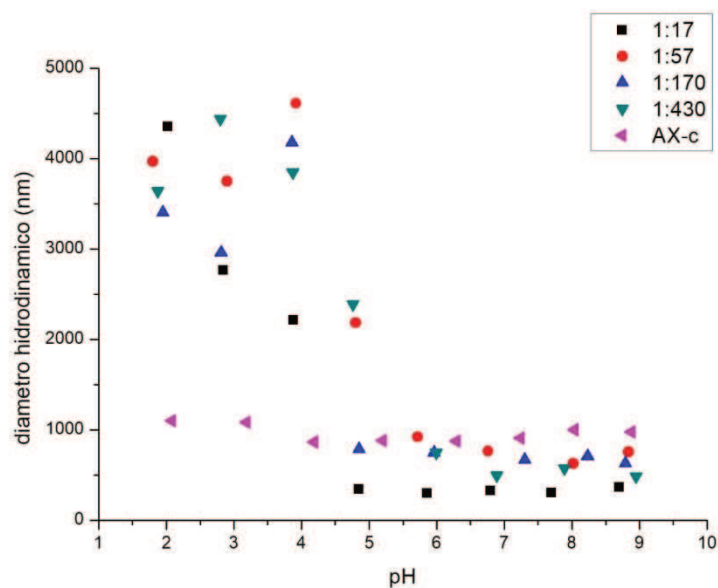


Figura VI.2- Tamaño de partículas de dispersiones Fe-AX a diferentes relaciones Fe:AX (1:17, 1:57, 1:170 y 1:430) y tamaño de partículas de AX-c.

VI.4.2- Caracterización fisicoquímica de las microcápsulas

La EE del hierro fue de $92,2 \pm 0,8$ y $98,2 \pm 1,1\%$ para **C1** y **C2**, respectivamente. Este resultado indicó muy buen rendimiento durante el secado spray. Además, una mayor concentración de FeSO_4 aumentó la EE.

En las **Figuras VI.3A-B** se muestran las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM). Como se puede apreciar, las microcápsulas presentaron un tamaño medio (considerando una distribución normal) de $5,13$ y $4,80 \mu\text{m}$ para **C1** y **C2**, respectivamente. Estos valores estuvieron dentro del rango esperado para microcápsulas producidas mediante secado por aspersion (1–50 μm) (Nesterenko et al. 2013). Las mismas presentaron una forma esférica, con superficie lisa y también con concavidades, características típicas de los productos obtenidos por secado spray. Los valores de tamaño medio obtenidos fueron similares a aquellos reportados por Kowalska et al. (2021), quienes obtuvieron un tamaño promedio de $11 \mu\text{m}$ para microcápsulas formuladas a partir de AX de arroz y miel, con el objetivo de preservar los polifenoles de la miel del secado spray.

Adicionalmente, la formulación utilizada para **C1** resultó en microcápsulas más grandes, sin abolladuras, que lograron mantener su forma. En el caso de **C2**, se observó una menor cantidad de microcápsulas abolladas y con diámetros menores que en **C1**. Estas características indicarían que el espesor de pared y el nivel de Fe utilizado resultaron adecuados en ambos casos. Por otra parte, se notó que la muestra **C2** se

presentó físicamente más aglomerada, y con mayor dificultad para esparcirla, probablemente debido a que no se incluyó maltodextrina en su formulación.

Los resultados del potencial Z en el rango de pH de 2,0-8,0 para las microcápsulas se muestran en la **Figura VI.4**. Como se puede ver, a mayor contenido de Fe de las microcápsulas, menor es el valor absoluto del potencial Z, lo que indicaría una neutralización de la carga superficial de la molécula con el agregado del ion Fe^{+2} . La relación Fe:AX de las microcápsulas fue de 1:18 para ambas formulaciones, pero **C2** no fue formulada con maltodextrina, por lo que su contenido de hierro en peso fue mayor (11774 ± 104 vs. 23985 ± 256 mg Fe kg^{-1} cápsula). Kaul et al. (2022) encapsularon hierro utilizando almidón de papa y maltodextrina, obteniendo microcápsulas que presentaron un potencial Z de 0,181- 0,486 mV, para concentraciones de FeSO_4 que iban desde 3 a 15%, aunque no informaron el pH del sistema. El hecho de utilizar un hidrocoloide ligeramente cargado en **C1** y **C2**, permitió obtener microcápsulas con mayor valor de potencial Z, lo que implicaría una mayor estabilidad coloidal que el reportado por estos autores.

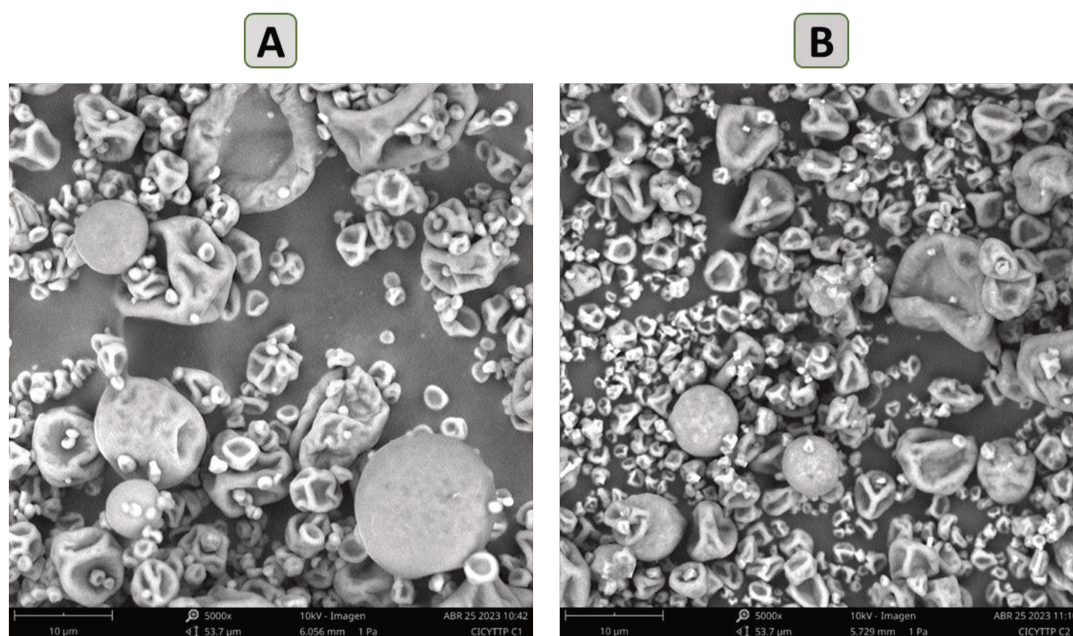


Figura VI.3- Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de las microcápsulas **C1** (11774 ± 104 ppm Fe) (A) y **C2** (23985 ± 256 ppm Fe) (B). Ambas microcápsulas con relación Fe:AX 1:18 y 5000x.

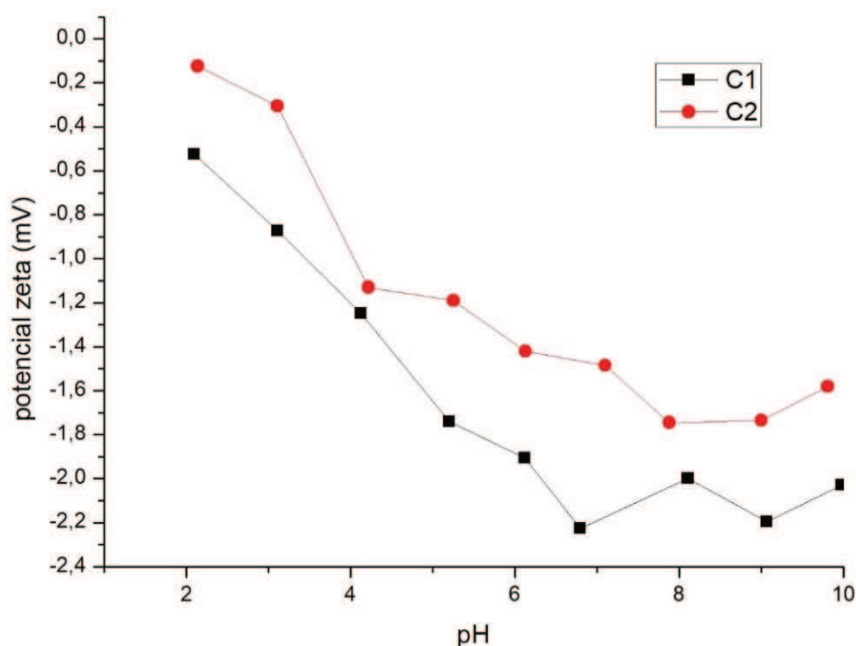


Figura VI.4- Potencial Z de las microcápsulas **C1** (11774 ± 104 ppm Fe) (A) y **C2** (23985 ± 256 ppm Fe) (B). Ambas microcápsulas con relación Fe:AX 1:18.

En la **Figura VI.5 A y B** se muestran los resultados de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) de **AX-c** y las diferentes microcápsulas. Li et al. (2021) ha reportado que las interacciones entre los grupos COO^- y el Fe^{2+} pueden detectarse mediante espectroscopia FTIR a través de la separación de los números de onda correspondientes a las vibraciones de estiramiento asimétricas (*vas*) y simétricas (*vs*) de los grupos COO^- , lo que refleja la posibilidad de unión de los grupos Fe^{2+} y COO^- . Si la separación del número de onda ($\Delta v_{\text{as-s}}$) es $\Delta v_{\text{as-s}} \gg 200 \text{ cm}^{-1}$ indica una unión monodentada del grupo carboxílico (un COO^- se une a un solo átomo de Fe) y $\Delta v_{\text{as-s}} < 200 \text{ cm}^{-1}$ indica uniones quelantes (Hu et al. 2009, Gao et al. 2005). En la **Figura VI.5A y B** se observan los dos picos a 1651 cm^{-1} y 1415 cm^{-1} , que se atribuyen a las vibraciones de estiramiento asimétricas y simétricas de los grupos COO^- en las cadenas AX (Manrique y Lajolo, 2002). En el caso de **C2**, (COO^- : Fe) se observaron dos vibraciones de estiramiento asimétricas *vas* (COO^-) a 1789 y 1651 cm^{-1} , y la vibración de estiramiento simétrica *vs* (COO^-) fue a 1415 cm^{-1} . Con base en estos datos, las separaciones del número de onda ($\Delta v_{\text{as-vs}}$) de **C2** fueron 374 y 236 cm^{-1} , lo que sugirió que el grupo carboxílico solo se unió en forma monodentada entre las moléculas de **C2**. El espectro de **C1** mostró un pico asimétrico solo a 1651 cm^{-1} , lo que también es consistente con la unión monodentada.

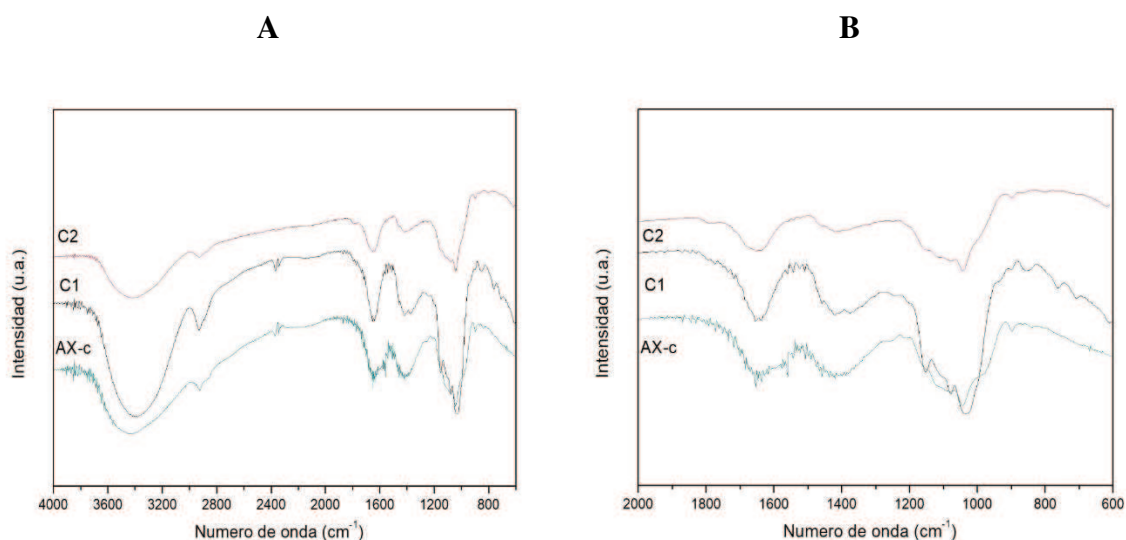


Figura VI.5- FTIR de AX-c y las diferentes microcápsulas en el rango de 4000-800 cm^{-1} (A) y en el rango de 2000-600 cm^{-1} (B).

VI.4.3-Obtención de expandidos y evaluación de sus propiedades físicas

Las cuatro formulaciones ajustadas a 14% de humedad se procesaron en el extrusor, obteniéndose valores de caudales similares: $216,3 \pm 10,2$; $224,7 \pm 2,3$; $225,8 \pm 4,3$ y $225,0 \pm 9,4$ g min^{-1} para **E0**, **E1**, **E2** y **E3** respectivamente. Así mismo, el consumo específico de energía mecánica (CEEM) fue semejante: $956,7 \pm 0,1$; $951,7 \pm 3,2$; $931,6 \pm 4,9$ y $924,2 \pm 19,51$ J g^{-1} para **E0**, **E1**, **E2** y **E3** respectivamente, indicando que la fortificación de la harina de maíz no tuvo efecto en el proceso de extrusión.

En cuanto a las características de los productos extrudidos, en la **Tabla VI.1** se muestran la expansión y el volumen específico (VE). En general, no hubo diferencias significativas en cuanto a VE y expansión entre las muestras adicionadas de los diferentes fortificantes y el control, exceptuando la expansión de **E3**. Estos valores corresponden a muestras extrudidas en condiciones operativas que permiten obtener muy buena expansión y grado de cocción del material amiláceo. Sahu et al. (2022) obtuvieron un rango de expansión desde 2,02 a 3,39 evaluando diferentes variables del proceso de extrusión de maíz y proteína de soja. En otro trabajo, Bajaj y Singhal (2019), obtuvieron extrudidos de arroz fortificados con vitamina B12, utilizando hidrocoloides. El efecto del agregado de goma guar o xántica fue positivo en la expansión y el volumen específico de los productos estuvieron comprendidos entre 3,19-3,22 para la expansión y entre $3,84\text{-}4,54$ $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ para el VE.

Tabla VI.1-Características de los expandidos sin fortificar (**E0**) y fortificados con las microcápsulas **C1 (E1)**, **C2 (E2)** y sulfato ferroso (**E3**)

Muestras	Volumen Específico (cm³ g⁻¹)	Expansión
E0	8,39±0,50	3,46±0,25 ^a
E1	8,17±0,31	3,48±0,10 ^a
E2	8,23±0,21	3,40±0,13 ^a
E3	8,08±0,43	3,61±0,20 ^b

X±DE. Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas entre muestras (p<0,05).

VI.4.4-Contenido y retención de ácido ascórbico

En la **Tabla VI.2** se muestra el contenido de ácido ascórbico en las microcápsulas y en el alimento fortificado.

Tabla VI.2-Contenido y retención de ácido ascórbico

Muestras	mg AAT 100g⁻¹	Retención %	Relación molar AA:Fe
C1	3490,00±75,65	54,16±1,17	0,94±0,02
C2	6823,72±280,36	52,00±2,14	0,90±0,04
E1	1,69±0,03	11,70±0,21	0,11±0,01
E2	1,74±0,07	12,32±0,51	0,11±0,01

X±DE. AAT: ácido ascórbico total. AA: ácido ascórbico.

Las microcápsulas se formularon de manera de tener una relación molar AA:Fe 1,7:1. Sin embargo, durante el secado por aspersión se produjo una pérdida del ácido ascórbico del 46-48%, resultando en una relación molar AA:Fe aproximada a 0,9:1. De acuerdo con Teucher et al. (2004), para alimentos con niveles bajos a medios de inhibidores se requiere la adición de AA en una proporción molar AA:Fe de 2:1. Para promover la absorción en presencia de altos niveles de inhibidores, es necesario agregar AA en una proporción molar superior a 4:1, lo que puede resultar poco práctico. En efecto, la cantidad a agregar de AA en la formulación de las microcápsulas resultaba excesiva y disminuía el contenido de hierro del fortificante.

Por otra parte, en el alimento extrudido no se logró una buena retención de AA, posiblemente debido a la termo-sensibilidad del AA y a las desfavorables condiciones del proceso de extrusión relacionadas con las altas temperaturas (140°C) y esfuerzos de

corte (Riaz et al. 2009). Probablemente la encapsulación con **AX-c** pueda proteger al AA durante procesos térmicos menos drásticos que la extrusión.

VI.4.5-Bioaccesibilidad del hierro de las microcápsulas

La bioaccesibilidad de hierro (BFe%) fue estimada a partir de la dializabilidad de este mineral. Los valores de BFe% fueron similares entre las microcápsulas, con valores de $19,60 \pm 0,78$ y $20,13 \pm 1,04\%$ para **C1** y **C2**, respectivamente. Estos valores pueden considerarse altos y se deberían a que la formulación incluyó ácido ascórbico, que es un promotor de la absorción de hierro, el cual ejerce su efecto tanto por su capacidad reductora como también complejante, manteniendo el hierro en su forma ferrosa que es más soluble y formando complejos de AA-Fe²⁺ y AA-Fe³⁺ solubles (Ems et al. 2023). La absorción del hierro depende en gran medida de su forma química (ferroso/ férrico) y de su especiación (Ems et al. 2023). El hierro férrico se precipita en soluciones con un pH superior a 3,0, mientras que la mayor parte del hierro ferroso permanece soluble a un pH menor de 5,0. A nivel del tracto gastrointestinal, el hierro primero debe solubilizarse en el estómago y complejarse con otros componentes presentes en los alimentos que lo mantengan soluble en el sitio de absorción (duodeno). Sin embargo, los compuestos complejantes pueden ser potenciadores o inhibidores de la absorción del hierro, dependiendo de su solubilidad (Piskin et al. 2022). Por lo tanto, la composición de la dieta es uno de los principales factores que influyen en la absorción del hierro no hemínico (Sharp 2010). Estos resultados son similares a los obtenidos por Cian et al. (2021), que elaboraron microcápsulas de hierro-AA, utilizando péptidos de hez de malta y goma *Locust Bean*, que presentaron una BFe% de entre 15,5 - 30,7%, dependiendo de la formulación utilizada en el material de pared y la proporción AA: Fe utilizada. Como se mencionó anteriormente, el AA mantiene el hierro en su estado ferroso y también actúa como agente quelante, favoreciendo la absorción del hierro (Hurrell y Egli, 2010).

VI.4.6-Bioaccesibilidad de hierro en los productos expandidos

En la **Tabla VI.3** se muestra la bioaccesibilidad y el aporte potencial de hierro de los productos expandidos fortificados.

La BFe% de los expandidos fortificados dependió del fortificante utilizado, siendo mayor en el caso de las microcápsulas **C1**. Como se observa para **C2**,

probablemente, el mayor contenido de hierro en la formulación de las microcápsulas afectó su dializabilidad.

Tabla VI.3-Bioaccesibilidad y aporte potencial de hierro de productos expandidos

Extrudido fortificado	BFe (%)	Aporte potencial Fe (mg)*
E1 (C1)	19,01±0,28 ^a	0,76±0,02 ^a
E2 (C2)	17,10±0,32 ^b	0,68±0,01 ^b
E3 (FeSO₄)	11,68±0,23 ^c	0,47±0,01 ^c

X±DE. Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas entre muestras (p<0,05). *Para una porción de 100 g de extrudido.

Ambos productos fortificados con las microcápsulas presentaron mejor bioaccesibilidad de hierro que la muestra con sulfato ferroso, probablemente debido a la presencia de AA residual y a un posible efecto quelante del material de pared que ayuda a mantener el hierro en estado soluble.

Entre las preparaciones ferrosas, el FeSO₄ sigue siendo el tratamiento estándar y establecido para la deficiencia de hierro dada su tolerabilidad aceptable, alta efectividad y bajo costo (Santiago, 2012). Sin embargo, la bioaccesibilidad del hierro suele verse afectada por factores inhibidores de la absorción presentes en la dieta y que ejercen efectos sobre la solubilidad de esta forma de hierro. Jaiswal y Lakshmi (2022) elaboraron una mezcla de alimentos complementarios (CFM) utilizando trigo, garbanzo decortinado, harinas de semillas oleaginosas y leche desnatada en polvo. Redujeron el ácido fítico mediante la activación de las fitasas endógenas a pH 5,2 y 45°C con posterior inactivación mediante tratamiento térmicos y fortificaron con diferentes sales de hierro (EDTA de hierro y sodio y fumarato ferroso). La bioaccesibilidad del hierro (medida por el método de diálisis y digestión gastrointestinal simulada) fue del 15,7% en CFM fortificada con fumarato ferroso y del 17,2% para la muestra fortificada con NaFeEDTA. Estos últimos resultados alcanzados con un fortificante de alta biodisponibilidad, son similares a los obtenidos en los extrudidos fortificados con las microcápsulas de hierro.

Estos resultados han sido obtenidos utilizando una metodología *in vitro* de digestión gastrointestinal simulada que tiene en cuenta los factores fisicoquímicos que se producen en el lumen gastrointestinal. Sin embargo, en estudios *in vivo*, se ha visto que oligosacáridos con efecto prebiótico pueden incrementar la bioaccesibilidad del hierro.

En este sentido, Lynch et al. (2021) han reportado una actividad prebiótica de fracciones de AX de hez de malta, que incrementaron el nivel de *Lactobacillus* al doble, y triplicaron el nivel de *Bifidobacteria*, con un aumento en la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) acetato y propionato, poniendo así de manifiesto el potencial prebiótico de estos compuestos. Es decir que en otro modelo de estudio donde se sume la etapa de fermentación colónica, o en un estudio *in vivo*, podría verse una mejora en los resultados obtenidos de BFe%.

En la **Tabla VI.4** se muestra la ingesta diaria recomendada (IDR) de hierro según la Oficina de Suplementos Dietéticos del Instituto Nacional de Salud de EEUU, de acuerdo a los distintos grupos etarios.

Además, de acuerdo con el capítulo XVII del Código Alimentario Argentino, la IDR de hierro para un hombre adulto es de 14 mg por día. El consumo de 1 g de **C1** por día aportaría 11,77 mg de Fe, con un aporte potencial de Fe de 2,31 mg (teniendo en cuenta una bioaccesibilidad del 19,60%), lo que corresponde al 12,8 % de la IDR (para una mujer adulta) y 1 g de **C2** aportaría 23,99 mg Fe y un aporte potencial de 4,83 mg (bioaccesibilidad de 20,13 %) lo que corresponde al 26,8 % de la IDR (para una mujer adulta).

Tabla VI.4- Ingesta diaria recomendada (IDR) de hierro

Grupos etarios	Fe (mg día⁻¹)
Niños de 4 a 8 años de edad	10 mg
Niños de 9 a 13 años de edad	8 mg
Adolescentes (varones) de 14 a 18 años de edad	11 mg
Adolescentes (niñas) de 14 a 18 años de edad	15 mg
Hombres adultos de 19 a 50 años de edad	8 mg
Mujeres adultas de 19 a 50 años de edad	18 mg
Adultos de 51 o más años de edad	8 mg

Además, en la **Tabla VI.3** se muestra el aporte potencial de hierro de una porción de 100 g de extrudido fortificado teniendo en cuenta la bioaccesibilidad de hierro de la matriz alimentaria. Puede observarse que la fórmula **C1** fue la que mayor aporte de hierro realizaría al consumir una porción de 100 g de expandido de maíz, que

representa el 76% de lo que necesita absorber un hombre adulto para cubrir sus pérdidas y mantener el equilibrio de hierro (1 mg día⁻¹) (Instituto de Medicina, 2001).

VI.4.6-Estabilidad de los productos extrudidos fortificados

A fin de estudiar la estabilidad de los productos fortificados, se realizó un estudio de medida de rancidez oxidativa a través de la determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Las muestras se envasaron en envases convencionales para *snacks*, y fueron almacenadas a temperatura ambiente, a lo largo de un año. En la **Tabla VI.5** se muestran los resultados obtenidos. Además, en la **Tabla VI.6A** se muestran los resultados del ANOVA multifactor.

Como se puede apreciar en la **Tabla VI.6A**, ambos factores (tiempo y tipo de muestra) y su interacción fueron significativos. Analizando el efecto del tiempo (**Tabla VI.6B**) puede verse que a partir de 150 días comenzaron los procesos oxidativos. Por otra parte, la muestra control fue la que menor contenido de MDA presentó y la muestra fortificada con **C2** fue la de mayor contenido (**Tabla VI.6C**).

Tabla VI.5- Contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en productos extrudidos fortificados con diferentes fuentes de hierro.

TBARS (nmol MDA g ⁻¹ muestra)				
Días	E0	E1	E2	E3
0	4,79±0,27 ^{ab}	4,92±0,39 ^a	5,52±0,14 ^a	5,36±0,60 ^b
30	3,56±0,48 ^a	5,21±0,95 ^a	6,68±0,13 ^b	3,87±0,70 ^a
60	3,99±0,44 ^a	5,69±0,54 ^a	5,31±0,42 ^a	4,55±0,01 ^{ab}
150	5,97±0,83 ^{bc}	6,02±0,60 ^a	5,73±0,29 ^a	5,81±0,49 ^{bc}
240	6,87±0,69 ^c	7,84±0,77 ^b	7,08±0,32 ^b	7,14±0,67 ^c
360	10,51±0,56 ^d	10,49±0,46 ^c	14,67±0,22 ^c	12,66±0,52 ^d

X±DE. MDA: Malondialdehído. Tiempo 0 corresponde al día del envasado realizado un día después de la extrusión; **E0** muestra sin fortificar; **E1**: muestra fortificada con **C1**; **E2**: muestra fortificada con **C2**; **E3**: muestra fortificada con FeSO₄ sin encapsular. Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas entre muestras (p<0,05).

Respecto a los parámetros de color (**Tabla VI.7**), todas las muestras presentaron valores positivos tanto de a* como de b*, siendo el valor de b ≈ 7 veces el valor de a*, indicando que los tonos amarillos fueron los predominantes. La muestra **E0** exhibió valores más bajos de a* y b* y un mayor valor de L*, que el resto de las muestras.

Tabla VI.6A-Análisis de Varianza para contenido de MDA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Efectos Principales					
A:tiempo	463,329	5	92,6657	291,41	0,0000
B:muestra	19,8513	3	6,61709	20,81	0,0000
Interacciones					
AB	37,4238	15	2,49492	7,85	0,0000
Residuos	14,3096	45	0,317992		
Total (corregido)	517,615	68			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual. Suma de Cuadrados Tipo III

Tabla VI.6B- Pruebas de Múltiple Rangos para MDA por tiempo.

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Tiempo</i>	<i>Media LS</i>	<i>Grupos</i>
<i>Homogéneos</i>		
30	4,83158	a
60	4,88385	a
0	5,15185	a
150	5,8809	b
240	7,2921	c
360	12,0845	d

Tabla VI.6C- Pruebas de Múltiple Rangos para MDA por muestra

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Muestra</i>	<i>Media LS</i>	<i>Grupos</i>
<i>Homogéneos</i>		
E0	5,94865	a
E3	6,56405	b
E1	6,69513	b
E2	7,54207	c

En la **Tabla VI.8A** se muestran los resultados del ANOVA multifactor, donde se observa que ambos factores y su interacción fueron significativos en la luminosidad. Al analizar L* por tipo de muestra (**Tabla VI.8B**) se observa que **E0** y **E3** presentaron

mayor luminosidad que los extrudidos fortificados con las microcápsulas. Evidentemente, el color de las microcápsulas impactó en la luminosidad del producto extrudido. Por este motivo y siendo la interacción significativa, el efecto del tiempo no mostró una tendencia clara.

Tabla VI.7-Parámetros de color (L^* a^* y b^*) de los expandidos fortificados con distintas fuentes de hierro a lo largo del tiempo

Días		E0	E1	E2	E3
0	L^*	75,8±0,5	72,7±0,8	73,7±0,2	73,6±0,4
	a^*	4,9±0,1	6,6±0,4	6,2±0,1	6,4±0,3
	b^*	42,1±0,7	46,2±0,7	43,5±0,2	46,3±0,4
30	L^*	75,3±0,4	75,2±0,5	74,2±0,1	75,0±0,3
	a^*	5,4±0,1	5,7±0,4	6,2±0,3	6,1±0,1
	b^*	42,5±0,8	44,8±0,6	45,8±0,1	45,7±1,0
60	L^*	72,3±0,3	75,3±0,4	73,8±0,2	75,3±0,7
	a^*	5,3±0,1	5,7±0,2	5,9±0,1	5,6±0,1
	b^*	43,1±1,0	44,3±0,4	44,0±0,6	44,6±0,1
150	L^*	74,2±0,4	74,5±0,3	73,8±0,7	76,8±0,2
	a^*	4,8±0,1	5,3±0,1	5,5±0,3	4,2±0,1
	b^*	41,7±0,7	42,5±0,3	41,8±0,6	40,4±0,6
240	L^*	75,2±0,5	73,5±0,5	75,7±0,4	75,3±0,8
	a^*	4,1±0,3	3,9±0,1	3,5±0,2	4,0±0,3
	b^*	37,9±0,6	36,8±0,6	35,6±0,2	38,0±0,3
360	L^*	76,1±0,8	72,8±0,7	73,0±0,8	72,6±0,5
	a^*	2,6±0,3	2,8±0,1	2,9±0,1	2,6±0,1
	b^*	33,4±0,5	32,0±0,5	31,4±0,4	34,2±0,7

X±DE. Tiempo 0 corresponde al día del envasado realizado un día después de la extrusión; **E0** muestra sin fortificar; **E1**: muestra fortificada con **C1**; **E2**: muestra fortificada con **C2**; **E3**: muestra fortificada con $FeSO_4$ sin encapsular.

En la **Tabla VI.9A** se muestran los resultados del ANOVA multifactor, donde se observa que ambos factores y su interacción fueron significativos en los valores de a^* . El valor de a^* fue mayor para los extrudidos fortificados con microcápsulas, indicando un color más rojizo para estas muestras (**Tabla VI.9B**). A su vez este valor fue disminuyendo a medida que aumentó el tiempo de almacenamiento.

Tabla VI.8A-Análisis de Varianza para L* - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Efectos Principales					
A:muestra	13,353	3	4,45102	15,74	0,0000
B:tiempo	23,6634	5	4,73268	16,74	0,0000
Interacciones					
AB	76,8014	15	5,12009	18,11	0,0000
Residuos	15,2679	54	0,282738		
Total (corregido)	130,51	77			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Tabla VI.8B- Pruebas de Múltiple Rangos para L* por muestra

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Muestra</i>	<i>Media LS</i>	<i>Grupos</i>
<i>Homogéneos</i>		
E1	73,8831	a
E2	74,0379	a
E3	74,7644	b
E0	74,8164	b

Tabla VI.8C- Pruebas de Múltiple Rangos para L* por tiempo

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Anova multifactor</i>	<i>Media LS</i>	<i>Grupos</i>
<i>color x .tiempo</i>	<i>Homogéneos</i>	
360	73,4867	a
0	73,9381	b
60	74,1521	c
150	74,8225	d
240	74,9121	d
30	74,9412	d

En la **Tabla VI.10A** se muestran los resultados del ANOVA multifactor, donde se observa que ambos factores y su interacción fueron significativos en el valor de b*. El valor de b* fue mayor para los extrudidos fortificados con **C1 (E1)** y FeSO₄ (**E3**) indicando un color más amarillo para estas muestras (**Tabla VI.10 B**). A su vez este

valor fue disminuyendo a medida que aumentó el tiempo de almacenamiento especialmente a partir de los 150 días de almacenamiento.

Tabla VI.9A- Análisis de Varianza para a* - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Efectos Principales					
A:muestra	3,41707	3	1,13902	24,75	0,0000
B:tiempo	104,731	5	20,9462	455,12	0,0000
Interacciones					
AB	8,77319	15	0,584879	12,71	0,0000
Residuos	2,48526	54	0,0460233		
Total (corregido)	121,66	77			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Tabla VI.9B- Pruebas de Múltiple Rangos para a* por muestra

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Muestra</i>	<i>Media LS</i>	<i>Grupos</i>
<i>Homogéneos</i>		
E0	4,49597	a
E3	4,81222	b
E1	4,99306	c
E2	5,04361	c

Tabla VI.9C- Pruebas de Múltiple Rangos para a* por tiempo

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Anova multifactor colorx tiempo</i>	<i>Media LS</i>	<i>Grupos</i>
<i>Homogéneos</i>		
360	2,70792	a
240	3,86833	b
150	4,92333	c
60	5,61458	d
30	5,855	e
0	6,04813	f

Tabla VI.10.A- Análisis de Varianza para b* - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Efectos Principales					
A:muestra	23,5891	3	7,86304	13,80	0,0000
B:tiempo	1392,16	5	278,432	488,83	0,0000
Interacciones					
AB	67,7024	15	4,51349	7,92	0,0000
Residuos	26,7706	47	0,569587		
Total (Corregido)	1519,67	70			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Tabla VI.10B- Pruebas de Múltiple Rangos para b* por muestra

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Muestra</i>	<i>Media LS</i>	<i>Grupos</i>
<i>Homogéneos</i>		
E0	40,069	a
E2	40,3222	a
E1	41,1000	b
E3	41,5144	b

Tabla VI.10C- Pruebas de Múltiple Rangos para b* por tiempo

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Anova multifactor</i>	<i>Media LS</i>	<i>Grupos</i>
<i>color x tiempo</i>	<i>Homogéneos</i>	
360	32,7146	a
240	36,9696	b
150	41,6017	c
60	44,0079	d
0	44,5098	de
30	44,705	e

En cuanto a la diferencia del color (ΔE^*) de las muestras, los resultados se presentan en la **Tabla VI.11**.

Tabla VI.11- Valores de diferencia de color global (ΔE^*) de los expandidos fortificados con distintas fuentes de hierro a lo largo del tiempo

ΔE^*				
Días	E0	E1	E2	E3
0		5,37±0,79	2,90±0,41	4,92±0,50
30	1,17±0,25	3,30±0,68	2,14±0,10	1,86±0,20
60	3,97±0,24	3,25±0,24	1,34±0,68	2,57±0,56
150	1,47±0,18	4,40±0,07	1,69±0,02	7,03±0,52
240	4,37±0,61	9,24±0,55	8,76±0,24	8,86±0,31
360	9,32±0,59	14,16±0,43	12,55±0,93	12,71±0,67

X±DE. ΔE inicial: Respecto a **E0** (muestra sin fortificar); ΔE 30, 60, 150, 240 y 360 días: calculado con respecto a la misma muestra a tiempo inicial. Tiempo 0 corresponde al día del envasado realizado un día después de la extrusión; **E0** muestra sin fortificar; **E1**: muestra fortificada con **C1**; **E2**: muestra fortificada con **C2**; **E3**: muestra fortificada con $FeSO_4$ sin encapsular.

En la **Tabla VI.12A** se muestran los resultados del ANOVA multifactor, donde se observa que ambos factores fueron significativos en la diferencia del color (ΔE^*). Además, se observa que ΔE^* fue menor para la muestra sin fortificar (**E0**) y mayor para los extrudidos fortificados con **C1** (**E1**) y $FeSO_4$ (**E3**) (**Tabla VI.12.B**). Por otro lado, la diferencia de color global fue similar hasta los 150 días de almacenamiento, luego se incrementó para 240 y 360 días, en consonancia con las variaciones de a^* y b^* a través del tiempo.

Tabla VI.12.A- Análisis de Varianza para (ΔE^*) - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Efectos Principales					
A:muestra	75,3997	3	25,1332	15,96	0,0000
B:tiempo	871,238	5	174,248	110,66	0,0000
Residuos	83,4555	53	1,57463		
Total (Corregido)	1003,06	61			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Tabla VI.12.B- Pruebas de Múltiple Rangos para (ΔE^*) por muestra

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Muestra</i>	<i>Media LS</i>	<i>Grupos</i>
<i>Homogéneos</i>		
E0	3,70921	a
E2	4,95937	b
E3	6,34287	c
E1	6,65126	c

Tabla VI.12.C- Pruebas de Múltiple Rangos para (ΔE^*) por tiempo

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Tiempo</i>	<i>Media LS</i>	<i>Grupos</i>
<i>Homogéneos</i>		
30	1,89941	a
60	2,78279	ab
0	3,7898	b
150	3,91781	b
240	7,90461	c
360	12,1997	d

VI.5-Conclusiones parciales

Fue factible la obtención de un fortificante de Fe de buena bioaccesibilidad utilizando **AX-c** de la hez de malta como agente encapsulante. El material de pared logro encapsular hierro y ácido ascórbico, y protegió parcialmente este complejo de la oxidación producto del secado por aspersion, manteniendo al hierro bioaccesible en condiciones ambientales del tracto gastrointestinal.

Al aplicarlo a un alimento de consumo masivo (matriz de cereal precocido), resultó en un producto fortificado de buena bioaccesibilidad de hierro. No se logró obtener una buena protección del ácido ascórbico frente al proceso térmico de extrusión. Sería oportuno evaluar la estabilidad de este compuesto en otro proceso térmico menos drástico que la extrusión.

Por otra parte, los resultados de la evaluación de estabilidad oxidativa en el tiempo indicaron que los extrudidos fortificados con la formulación **C1** fueron ligeramente más estables que aquellos fortificados con $FeSO_4$. Otros estudios deberían realizarse para estudiar la cinética de deterioro bajo condiciones aceleradas y la predicción de vida útil de los extrudidos fortificados con las diferentes fuentes de hierro.

VII-HIDRÓLISIS DE ARABINOXILANOS Y EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y BIOACTIVAS DE LOS HIDROLIZADOS

VII-Hidrólisis de arabinosilanos y evaluación de las propiedades fisicoquímicas y bioactivas de los hidrolizados

VII.1-Introducción

La manera en que se extraen los AX de la pared celular influye en la estructura final del compuesto obtenido, lo que impacta en las propiedades biotecnológicas resultantes (Morales-Ortega et al. 2013). En este sentido, el tratamiento alcalino es una forma eficiente de extraer los AX de los materiales de la pared celular. Sin embargo, cambia sus propiedades al hidrolizar algunos grupos funcionales como el ácido ferúlico, y tiende a dar fracciones de AX de alto peso molecular (100-200 kDa) (Chen et al. 2019a). Por otro lado, los tratamientos enzimáticos aumentan la solubilidad atacando el esqueleto de este heteropolisacárido de una manera diferente, produciendo fracciones de menor peso molecular a las producidas por hidrólisis alcalina (Zhou et al. 2010). El tratamiento enzimático produce fracciones de AX de bajo peso molecular con un menor rendimiento de extracción. No es tan eficiente como la hidrólisis alcalina y da lugar a diferentes funcionalidades (Fadel et al. 2018).

La estructura tiene un gran impacto no sólo en las propiedades fisicoquímicas como la solubilidad y viscosidad, sino también en las propiedades bioactivas (Chen et al. 2019a). En primer lugar, estos carbohidratos no son digeridos por las enzimas del intestino delgado, pero son fermentados por bacterias de la microbiota, con producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), por lo que se consideran con actividad prebiótica (Lynch et al. 2021). Sin embargo, la tasa de fermentación de la microbiota intestinal y la cantidad de AGCC producidos dependen de la estructura de los AX. En general, un menor grado de polimerización se vincula con una mayor fermentabilidad. Así, Vardakou et al. (2008) observaron un incremento en el índice prebiótico de AX tratados con xilanasas.

Otros beneficios del consumo de AX están asociados con las propiedades antioxidantes de los ácidos hidroxicinámicos unidos a estos polímeros (Fadel et al. 2018). Se ha demostrado que los arabinosilanos ferulados y los arabinosiloligosacáridos tienen propiedades antiinflamatorias, contribuyen a inhibir la peroxidación de los lípidos, la oxidación de lipoproteínas de baja densidad, bloquean radicales libres, disminuyen la absorción de grasa y colesterol, y tienen un efecto en el metabolismo de la glucosa a través de diferentes mecanismos (Katapodis et al. 2003, Chen et al. 2019a).

Chen et al. (2019a) aplicaron diferentes métodos para aislar los (AX) del trigo y estudiaron los efectos de los métodos de extracción sobre las propiedades bioactivas de estas moléculas. Estos autores observaron que los AX extraídos con enzimas o agua presentaban pesos moleculares menores que aquellos extraídos con álcalis, y exhibieron un mayor índice de retardo de diálisis de glucosa (*in vitro*) y bloqueo de radicales hidroxilo. En cambio, los AX extraídos con álcalis presentaron mayor capacidad de inhibición de alfa-amilasa, eliminación de radicales DPPH y actividad quelante de metales.

El principio de la modificación por ultrasonido es utilizar ultrasonidos de alta intensidad para cortar ciertos enlaces químicos en las macromoléculas de xilano (Zhang et al. 2021). Este proceso se usa ampliamente en la industria alimentaria y proporciona efectos mecánicos, térmicos y de cavitación que causan la degradación de los polímeros (Zhang et al. 2014). La degradación por cavitación puede ser resultado del colapso de las burbujas de cavitación y de la reacción química entre el polímero y las moléculas de alta energía que promueven su degradación (Li et al. 2016).

El tratamiento con ultrasonido puede producir modificaciones en los polisacáridos y reducir el peso molecular (Liu et al. 2020b), la viscosidad (Mendez-Encinas et al. 2020), aumentar la solubilidad en agua y la actividad antioxidante de los xilanos (Li et al. 2016; Mendez-Encinas et al. 2020). Este tratamiento también puede mejorar las bioactividades de los polisacáridos (Zhou et al. 2018). La aplicación de la tecnología de tratamiento ultrasónico en la modificación de xilanos tiene las ventajas de poseer un control sencillo, un costo operativo bajo, baja contaminación ambiental y una automatización fácil de realizar. El procesamiento ultrasónico es un tipo de tecnología de modificación física con un gran potencial y perspectivas de desarrollo (Zhang et al. 2021).

- **Relación entre la estructura/composición química y las propiedades biofuncionales**

Los grupos hidroxilo y los de ácido urónico de las moléculas de xilanos pueden actuar como donadores de hidrógeno para estabilizar los radicales libres (Chen et al. 2021). Los xilanos con bajo peso molecular tienen una importante actividad eliminadora de radicales debido a su mayor movilidad en solución (Chen et al. 2021). Los xilanos con alto peso molecular son susceptibles a fuerzas intermoleculares e intramoleculares (enlaces de hidrógeno, hidrofóbicos, Van der Waals), que debilitan la actividad de los

grupos hidroxilo y reducen la actividad bloqueante de radicales libres (Mendez-Encinas et al. 2020). La estructura de resonancia de los radicales fenoxi en el ácido ferúlico estabiliza los intermediarios de los radicales libres y pone fin a las reacciones en cadena (Peñarrieta et al. 2014). Zhang et al. (2021c) informaron que la actividad antioxidante de los xilanos mejoró después de que la modificación ultrasónica expusiera los grupos de ácido ferúlico.

VII.2-Objetivos

VII.2.1-Objetivo General

El objetivo fue estudiar la hidrólisis de los **AX** extraídos de la HM y el impacto de esta modificación en las propiedades fisicoquímicas y bioactivas de los hidrolizados.

VII.2.2-Objetivos específicos

- 1- Estudiar dos estrategias de modificación de los **AX**: a través de la hidrólisis enzimática y por ultrasonido en medio ácido.
- 2- Caracterizar desde el punto de vista fisicoquímico a los hidrolizados
- 3- Determinar las propiedades bioactivas (propiedades antioxidantes, hipoglucemiantes e hipolipemiantes) y su efecto prebiótico.

VII.3-Materiales y métodos

VII.3.1-Materias primas

La hez de malta (HM) fue suministrada por Cervecería Santa Fe® (Santa Fe, Argentina). La obtención del residuo libre de proteínas (**REP**) y de los arabinoxilanos fue descrita anteriormente. El concentrado de arabinoxilanos (**AX-c**) presentó un contenido de carbohidratos totales de $70,6 \pm 1,9$ g 100 g⁻¹ b.s. (determinado por Dubois et al. 1956) y una relación A/X de $0,62 \pm 0,06$ (determinado por Bartolomé et al. 2002), contenido de proteínas: $3,0 \pm 0,3$ g 100 g⁻¹ b.s., cenizas: $16,2 \pm 0,4$ g 100 g⁻¹ b.s. y humedad: 19,4 g 100 g⁻¹ (medidos según métodos AOAC 1995).

VII.3.2-Obtención de los hidrolizados

Se prepararon dispersiones del **AX-c** a 5 g de sólidos 100 mL⁻¹ y se plantearon dos tipos de hidrólisis. Por un lado, una hidrólisis ácida asistida por ultrasonido (Ultrasonic cleaner, Arcano®, China) a 70°C, pH 2,0, durante 2 h, con potencia y frecuencia de ultrasonido fijas de 70W y 40KHz, respectivamente. Por el otro, una hidrólisis enzimática utilizando una endo-xilanasas comercial a 60°C, pH 5,0 y relación

E/S 5%. La marca y características de la enzima no se informan por razones de confidencialidad.

El grado de hidrólisis de los arabinosilanos se siguió mediante la medida de azúcares reductores generados durante el proceso utilizando el método de Nelson-Somogyi (1952). El grado de hidrólisis (GH) se expresó como:

$$GH = \frac{mEq \text{ glucosa generados por hidrólisis}}{mEq \text{ totales (g AX} \times \frac{mEq \text{ glucosa}}{gAX})} \times 100 \quad (\text{VII.1})$$

VII.3.3- Caracterización de los hidrolizados

Para evaluar el impacto de la hidrólisis de los arabinosilanos en las propiedades fisicoquímicas y biofuncionales, se tomaron muestras a diferentes tiempos (0, 1 y 2 horas) que fueron evaluadas como se describe a continuación.

VII.3.3.1- Propiedades fisicoquímicas

VII.3.3.1.1- Potencial Z

Con el objetivo de evaluar modificaciones en la carga superficial de las moléculas y en el tamaño, se midió el potencial Z utilizando un instrumento de microelectroforesis y dispersión de luz dinámica (Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments Ltd., Reino Unido). Las mediciones se realizaron a 0,1 g 100 mL⁻¹ de sólidos.

VII.3.3.1.2- Contenido de ácidos fenólicos

Los ácidos derivados del hidroxicinámico libres de la muestra de arabinosilanos fueron cuantificados por HPLC de acuerdo a Garzón et al. (2018). Para tal fin, las muestras se filtraron a través de un filtro de jeringa con un tamaño de poro de 0,22 µm y se inyectaron para su análisis en HPLC (bomba Shimadzu Series LC-20AT, detector de arreglo de diodos Shimadzu SPD-M20A). Los compuestos fueron separados en una columna C-18 (Gemini 110A, 250 mm x 4,6 mm, partícula de 5 µm, Phenomenex) con un flujo isocrático de la fase móvil (16 mL 100 mL⁻¹ de acetonitrilo en 1 mL 100 mL⁻¹ de ácido acético) a una velocidad de 0,7 mL min⁻¹ durante 35 min a 25 °C. Los ácidos fenólicos eluidos fueron detectados a 320 nm y el resultado se expresó como µg b.s.⁻¹ usando curvas de concentración-respuesta de 0-50 µg mL⁻¹. La identificación de los picos se realizó por comparación de los tiempos de retención y las curvas espectrales características con estándares externos (Sigma Aldrich). Los datos fueron procesados

usando el software Shimadzu LC solution.

VII.3.3.1.3-Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

El espectro de FTIR del **AX-c** y de los hidrolizados enzimáticos a 60 y 120 min, fueron obtenidos utilizando un espectrómetro FTIR (SHIMADZU, modelo IR Prestige-21). Para la preparación de las muestras, estas fueron secadas por 24 h a 80 °C, luego se diluyeron en KBr (~ 1% de muestra en KBr) y se prepararon pastillas que se colocaron en el porta muestra adecuado. Los datos fueron adquiridos por transmitancia (%T) a una resolución de 4 cm⁻¹. Se registraron 2 espectros por muestra en el rango de 400 – 4000 cm⁻¹ utilizando el sistema de software del equipo (IR solution, versión 1.3), adquiriendo un *background* para cada muestra. Las muestras se analizaron por duplicado.

VII.3.3.1.4-Generación de aminos libres

Con el objetivo de evaluar el impacto de la hidrólisis en el residuo proteico co-extraído junto con **AX-c**, se midieron los grupos amino libres utilizando o-ftaldialdehído, según Nielsen et al. (2001).

VII.3.3.1.5-Estudios reológicos

Se evaluó la viscosidad de soluciones de 5 g 100 mL⁻¹ de sólidos de **AX-c** y de los hidrolizados obtenidos a 60 y 120 min. Las determinaciones se realizaron utilizando un reómetro rotacional Anton Paar MCR-102 con geometría de platos paralelos con “gap” de 0,5 mm. Las mediciones se llevaron a cabo a 25 °C a diferentes velocidades de corte desde 1 s⁻¹ hasta 100 s⁻¹.

Además, se realizaron ensayos oscilatorios de pequeña amplitud en geometría de platos paralelos, utilizando el mismo equipo mencionado anteriormente. Se realizaron barridos de amplitud para τ entre 0,001 y 2,85 Pa a frecuencia constante de 1 Hz, para determinar el rango de viscoelasticidad lineal (RVL). Una vez determinado el RVL, se realizó un barrido de frecuencias entre 0,1 y 100 Hz a $\tau=0,0365\text{Pa}$ (dentro de RVL) para obtener los espectros mecánicos. Se analizaron los valores del módulo elástico o de almacenamiento (G'), módulo viscoso o de pérdida (G'') y la tangente del ángulo de desfase ($\tan \delta$). El primero representa la componente elástica del material cuando le es aplicado el esfuerzo de corte. El segundo representa, a la componente viscosa de esa respuesta. Ambos módulos son dependientes de la frecuencia (ω) de los esfuerzos de corte aplicados.

Ambos módulos fueron modelados a la ecuación de la ley de la potencia

logarítmicamente linealizada (Ecuación VII.1 y VII.2).

$$\log G'(\omega) = \log a + n \log \omega \quad (\text{VII.2})$$

$$\log G''(\omega) = \log b + m \log \omega \quad (\text{VII.3})$$

Donde: ω es la frecuencia en Hz.

El análisis de los espectros mecánicos a través de estas ecuaciones permite realizar comparaciones en el comportamiento viscoelástico de las muestras. Las pendientes (n o m , según corresponda) pueden interpretarse como una medida de la dependencia de cada módulo (G' o G'') con la frecuencia (ω). Pendientes cercanas a 0 indicarían independencia del módulo respecto a ω , mientras que pendientes de mayor valor sugieren que tal dependencia es significativa. El análisis de las ordenadas al origen ($\log a$ o $\log b$) permite comparar el comportamiento viscoelástico de las muestras, ya que valores mayores de estas ordenadas evidencian mayor comportamiento elástico o viscoso, según corresponda (Izydorczyk y Biliaderis 1995).

A su vez se calculó la viscosidad compleja η^* según Rao (1992) de acuerdo a la ecuación VII.4

$$\eta^* = \frac{G^*}{\omega} \quad (\text{VII.4})$$

VII.3.3.2-Propiedades biofuncionales

VII.3.3.2.1-Inhibición del radical ABTS⁺

La inhibición del radical catiónico ABTS⁺ se midió según Cian et al. (2012). Para estimar la capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC), se realizó una curva de concentración-respuesta para la inhibición de ABTS⁺ en función de la concentración del estándar Trolox (0–2,5 mmol L⁻¹ en 0,01 mmol L⁻¹ de solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4). Luego de la mezcla inicial se midió la absorbancia a 734 nm después de 6 min, utilizando un espectrofotómetro (Spectronic Genesys 5; Milton Roy Company, Warrenton, VA, EE. UU.).

VII.3.3.2.2-Capacidad quelante ligada al Cu⁺²

La capacidad quelante ligada al cobre se determinó mediante el ensayo de auto oxidación del β -caroteno según Megías et al. (2008). Para ello, se mezclaron 200 μ L de β -caroteno (10 g L⁻¹), 10 μ L de CuSO₄ (50 μ mol L⁻¹) y 10 μ L de muestra. La degradación del β -caroteno fue monitoreada por la disminución de la absorbancia a 470

nm. La absorbancia se midió a los 0, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 min. Además, se ensayaron un control positivo (200 μ L de β -caroteno + 10 μ L de CuSO_4 + 10 μ L de tampón fosfato) y un control negativo (200 μ L de β -caroteno + 20 μ L de tampón fosfato).

VII.3.3.2.3-Poder reductor (ferric ion reducing antioxidant power, FRAP)

El poder reductor del ion férrico (FRAP) fue determinado de acuerdo con Benzie y Strain (1996). El método FRAP se fundamenta en la reducción del hierro férrico (Fe^{+3}) presente en el reactivo de FRAP hasta la forma ferrosa (Fe^{+2}) por la presencia de antioxidantes. Se genera una coloración azul intensa (complejo ferroso-TPTZ), proporcional a la capacidad reductora de la muestra, que puede cuantificarse por colorimetría. Para la preparación del reactivo FRAP se utilizó buffer acetato de sodio (pH 3,6), TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina) y FeCl_3 . Para la reacción se utilizaron 10 μ L de muestra o estándar y 190 μ L de reactivo FRAP. Luego de 5 min de reacción se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 620 nm en un lector de placas Asys Hitech modelo UVM340.

La absorbancia final de las muestras se comparó con la curva estándar de Trolox (100-1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$) disuelto con etanol al 75%. Los resultados se expresaron como mmol Trolox 100g^{-1} muestra.

VII.3.3.2.4-Inhibición de las enzimas α -glucosidasa y α -amilasa

El ensayo de inhibición de la enzima α -glucosidasa se realizó de acuerdo con Kim et al. (2010), mientras que para el caso de la enzima α -amilasa se utilizó la técnica propuesta por Donkor et al. (2012)

VII.3.3.2.5-Determinación de la inhibición de las enzimas lipasa pancreática y colesterol esterasa

El ensayo de inhibición de la enzima lipasa pancreática se realizó de acuerdo con Lee et al. (1993), mientras que para el caso de la enzima colesterol esterasa se utilizó la técnica propuesta por Prados et al. (2018).

VII.3.3.2.6-Potencial prebiótico

El potencial prebiótico fue determinado en los laboratorios del Instituto de Lactología Industrial (INLAIN-CONICET-UNL) con el asesoramiento del Dr. Gabriel Vinderola.

VII.3.3.2.6.1-Cepas y condiciones de cultivo

Para evaluar la capacidad prebiótica potencial del **AX-c** y de su hidrolizado a 120 min (AXH) se utilizó *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1, aislado de leche materna (Zacarías et al. 2011) con potenciales propiedades probióticas (Burns et al. 2017). Las cepas, almacenadas a -80 °C, se reactivaron en caldo Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (compuesto de peptonas 20 g L⁻¹, extracto de levadura 5 g L⁻¹, glucosa 20 g L⁻¹, Tween 80 1,08 g L⁻¹, fosfato dipotásico 2 g L⁻¹, acetato de sodio 5 g L⁻¹, citrato de amonio 2 g L⁻¹, sulfato de magnesio 0,2 g L⁻¹ y sulfato de manganeso 0,05 g L⁻¹) con cisteína (0,1% p/v) (Biokar, Beauvais, Francia) a 37 °C, en condiciones anaeróbicas (GasPak, BD diagnostics, Sparks, NV, EE. UU.). Se utilizó un cultivo nocturno para cada experimento. Las cepas similares a patógenos *Escherichia coli* V517, *Staphylococcus aureus* 76 y *Salmonella spp.* OMS-Ca, se cultivaron durante la noche a partir de un inóculo de 1 mL 100 mL⁻¹ en Base de caldo Luria Bertani (Biokar, Beauvais, Francia) a 37 °C.

VII.3.3.2.6.2-Crecimiento del probiótico

Los probióticos se recolectaron por centrifugación (3000xg, 15 min a 4°C), se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato PBS (pH 7,1 ± 0,2) y se resuspendieron en el mismo tampón. Se preparó medio MRS y se sustituyó la glucosa por **AX-c** y AXH (20 g L⁻¹). El medio que contiene glucosa (20 g L⁻¹) se utilizó como control. El crecimiento microbiano se monitoreó por triplicado en condiciones anaeróbicas a 37°C durante 24 h. El recuento de INL1 en el tiempo 0 y después de 24 h de incubación se realizó en placas de agar c-MRS (agar MRS con 0,1% de cisteína). Las placas inoculadas con distintas diluciones se incubaron anaeróbicamente a 37°C durante 48 h. Los resultados se expresaron como log UFC mL⁻¹.

VII.3.3.2.6.3-Crecimiento de patógenos

El crecimiento de cepas similares a patógenos se analizó en Base de caldo Luria Bertani (LB) reconstituido en condiciones aeróbicas a 37 °C durante 24 h. El medio de cultivo contenía cloruro de sodio (0,5 g L⁻¹), triptona (10 g L⁻¹) y extracto de levadura (5 g L⁻¹). El medio de cultivo LB se preparó adicionando la muestra (**AX-c** o AXH) o glucosa (control) a una concentración de 20 g L⁻¹.

VII.3.3.2.6.4-Estimación del potencial prebiótico

El potencial prebiótico se evaluó determinando el crecimiento microbiano (Recuento en placa UFC mL⁻¹) inmediatamente después de la inoculación (tiempo 0 h),

y después de 24 h de incubación a 37 °C (tiempo 24 h), y se calculó la razón de crecimiento relativo (RGR) para cada bacteria evaluada, utilizando la Ecuación VII.10.

$$RGR = \frac{(P24-P0)}{(G24-G0)} \quad (\text{VII.5})$$

Donde P24 es el recuento (UFC mL⁻¹) del medio de muestra a las 24 h de incubación, P0 es el recuento del medio de muestra en el tiempo 0, G24 es el recuento del control de glucosa a las 24 h de incubación y G0 es el recuento del control de glucosa en el tiempo 0. Un valor de RGR mayor que la unidad indica que la muestra analizada ejerce un efecto estimulante del crecimiento sobre *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1, en comparación con la glucosa como fuente de carbono simple (Noori et al. 2017).

VII.3.3.2.6.5-Grado de hidrólisis durante la esterilización

Se evaluó el grado de hidrólisis del AX-c y del AXH (120 min) al ser incorporados al medio de cultivo y esterilizado en autoclave 121°C 15 min, utilizando la técnica de azúcares reductores de Nelson-Somogyi (1952) como se menciona en el punto VII.3.2

VII.3.4-Bioaccesibilidad in-vitro intestinal y colónica de ácidos fenólicos

Se realizó la digestión gastrointestinal y colónica del AX-c y del AXH (120 min) de acuerdo a lo descrito en el capítulo V.3.5.1. Se analizó la bioaccesibilidad de ácidos fenólicos de acuerdo a lo descrito en el punto V.3.5.2, y la fermentación de los mismos de acuerdo al punto V.3.5.3.

VII.3.5-Análisis estadísticos

Cada determinación se realizó al menos por duplicado. Los resultados se expresaron como media ± desvío estándar (DE). Los datos fueron analizados por ANOVA de un factor, y las diferencias entre muestras se determinaron por el test de LSD (p<0,05). Se utilizó para tales efectos el software Statgraphic Centurion XV 15.2.06.

VII.4-Resultados

VII.4.1-Grado de hidrólisis

En la **Figura VII.1** se muestra el grado de hidrólisis obtenido con los diferentes sistemas (ultrasonido-medio ácido o enzimático) a lo largo del tiempo de reacción. Para

el caso de la hidrólisis enzimática se observó un aumento gradual del GH conforme avanzó el tiempo de reacción, obteniéndose un valor de 14,42% a los 120 min de hidrólisis. En contraste a este resultado, el proceso de hidrólisis con ultrasonido arrojó valores de GH muy inferiores a los obtenidos con xilanasa (C), observándose una meseta a los 30 min de reacción. Por lo tanto, el proceso de hidrólisis enzimático resultó más efectivo para degradar las moléculas de AX.

En concordancia con el mayor GH obtenido con la hidrólisis enzimática, los azúcares reductores liberados al cabo de los 120 min de reacción para xilanasa fueron significativamente superiores a los hallados con ultrasonido-medio ácido ($4,10 \pm 0,05$ vs. $0,60 \pm 0,01$ mg azúcares reductores mL^{-1}).

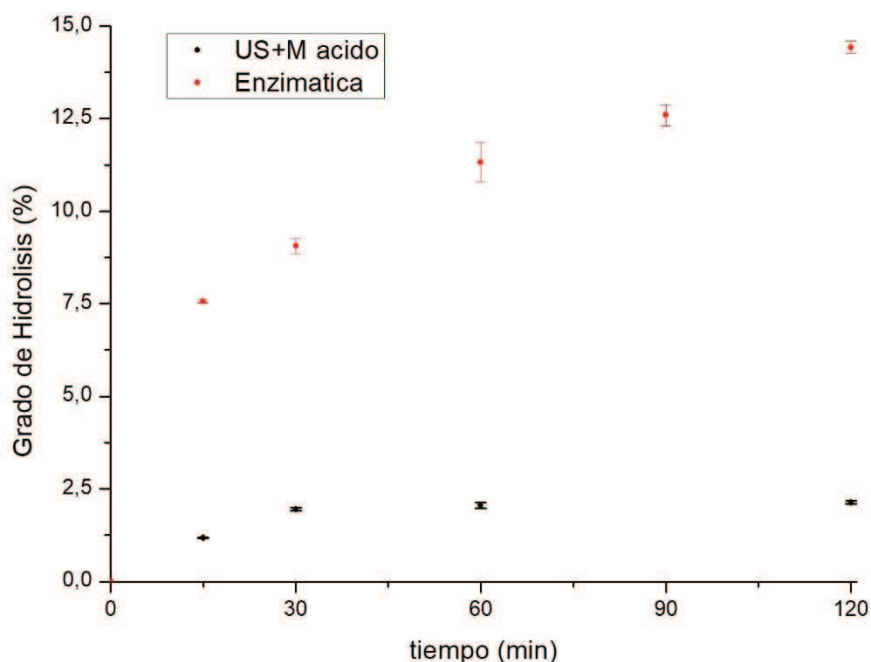


Figura VII.1- Grado de hidrólisis (GH) en función del tiempo obtenido con los diferentes sistemas hidrolíticos (ultrasonido + medio ácido: US+M ácido o enzimática).

Aguedo et al. (2015) estudiaron la extracción de AX de salvado de trigo por métodos enzimáticos y métodos fisicoquímicos y midieron los carbohidratos solubilizados. Para la reacción enzimática utilizaron una endo-xilanasa y luego de 4 h de hidrólisis obtuvieron un 25% de material solubilizado, alcanzando luego la reacción una meseta. El material solubilizado correspondió a cadenas con una relación A/X de 0,2 en promedio, es decir escasamente sustituidos, y sin contenido de monosacáridos. El grado de polimerización obtenido fue entre 2 y 20, aunque con predominio de 4 y 5. Estos autores también evaluaron un tratamiento físico con calor y microondas, donde la máxima solubilización del material se obtuvo a 147°C , 13 min y pH 2, alcanzándose un

50% de solubilización respecto del material inicial, conteniendo el sobrenadante resultante un 60% de azúcares, con relación A/X de 0,49 y el 48% de los AX presentó un grado de polimerización menor a 20. Es decir, el tratamiento fisicoquímico utilizado por estos autores fue más severo que el enzimático, por lo que se obtuvo gran cantidad de material solubilizado, pero con generación de monosacáridos y azúcares de bajo grado de polimerización.

Antov y Dordevic (2017) estudiaron la hidrólisis de paja de trigo pretratada con ultrasonido utilizando endo-xilanasas (dosis de $0,15 \text{ U g}^{-1}$ de material seco pretratado). Lograron un rendimiento de azúcares reductores de $21,76 \pm 1,42 \text{ mg}$ por g de material pretratado luego de 20 h de hidrólisis. En nuestro trabajo se lograron obtener $82,0 \pm 1,0 \text{ mg}$ azúcares reductores por g de **AX-c**, luego de 2 h de hidrólisis enzimática.

Además, Dordevic et al. (2021) estudiaron la hidrólisis de arabinoxilanos extraídos de paja de trigo utilizando xilanasas, arabinofuranosidasa y feruloil esterasa, de forma individual y combinada. Los resultados indicaron que las enzimas aplicadas podían hidrolizar el arabinoxilano polimérico, mientras que sus acciones sinérgicas modificaron con éxito su estructura, lo que se reflejó en una menor viscosidad e incremento de las propiedades biofuncionales (inhibición de los radicales ABTS⁺ y DPPH) del arabinoxilano a más del doble. Además, el empleo de xilanasas y feruloil esterasa de forma conjunta a una dispersión de $2 \text{ g AX } 100 \text{ mL}^{-1}$ aumentó la cantidad de azúcares reductores al cabo de las 24 h de reacción (aproximadamente $3,5 \text{ mg}$ azúcares reductores mL^{-1}). Sin embargo, el empleo de xilanasas sola liberó $3,0 \text{ mg}$ azúcares reductores mL^{-1} para ese mismo intervalo de tiempo. Al respecto, se sabe que la enzima xilanasas hidroliza regiones relativamente no sustituidas de la cadena de xilano, mientras que la adición de feruloil esterasa probablemente permite un mejor acceso después de la des-ramificación parcial del arabinoxilano (Mathew et al. 2017), lo que incrementa la liberación de azúcares reductores. Estos valores son inferiores a los obtenidos en la presente tesis ($4,10 \text{ mg}$ azúcares reductores mL^{-1} , en 2 h de hidrólisis), aunque dichos autores partieron de una dispersión más diluida.

Antov y Dordevic (2017) hidrolizaron con ultrasonido a 25 kHz y 540W una suspensión de $3 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$ de salvado de trigo durante 10 min. Este tratamiento generó una mayor proporción de glucosa en comparación a un pre-tratamiento ensayado a $10 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$. Esto podría explicarse por las diferencias en la estabilidad de los enlaces glicosídicos en los glucanos y xilanos, y porque la potencia aplicada por gramo de paja de trigo fue 3,3 veces mayor para una suspensión de $3 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$ que para una

suspensión de 10 g 100 mL⁻¹ (Vodenicarová et al. 2006). Teniendo en cuenta este criterio, es posible que en el ensayo de hidrólisis con ultrasonido en medio ácido, una menor concentración de la suspensión de **AX-c** hubiera generado una mayor cantidad de azúcares reductores solubilizados.

En resumen, el proceso de modificación utilizando xilanasa comercial generó un mayor GH que el tratamiento con ultrasonido en medio ácido. A su vez, teniendo en cuenta los resultados de bibliografía, se lograron valores de hidrólisis satisfactorios en un tiempo aceptable.

VII.4.2-Potencial Z y tamaño de partículas de los hidrolizados

Los cambios en el potencial Z y el tamaño de los productos de hidrólisis obtenidos a partir de **AX-c** con los diferentes sistemas a lo largo del tiempo de reacción se muestran en la **Figura VII.2**.

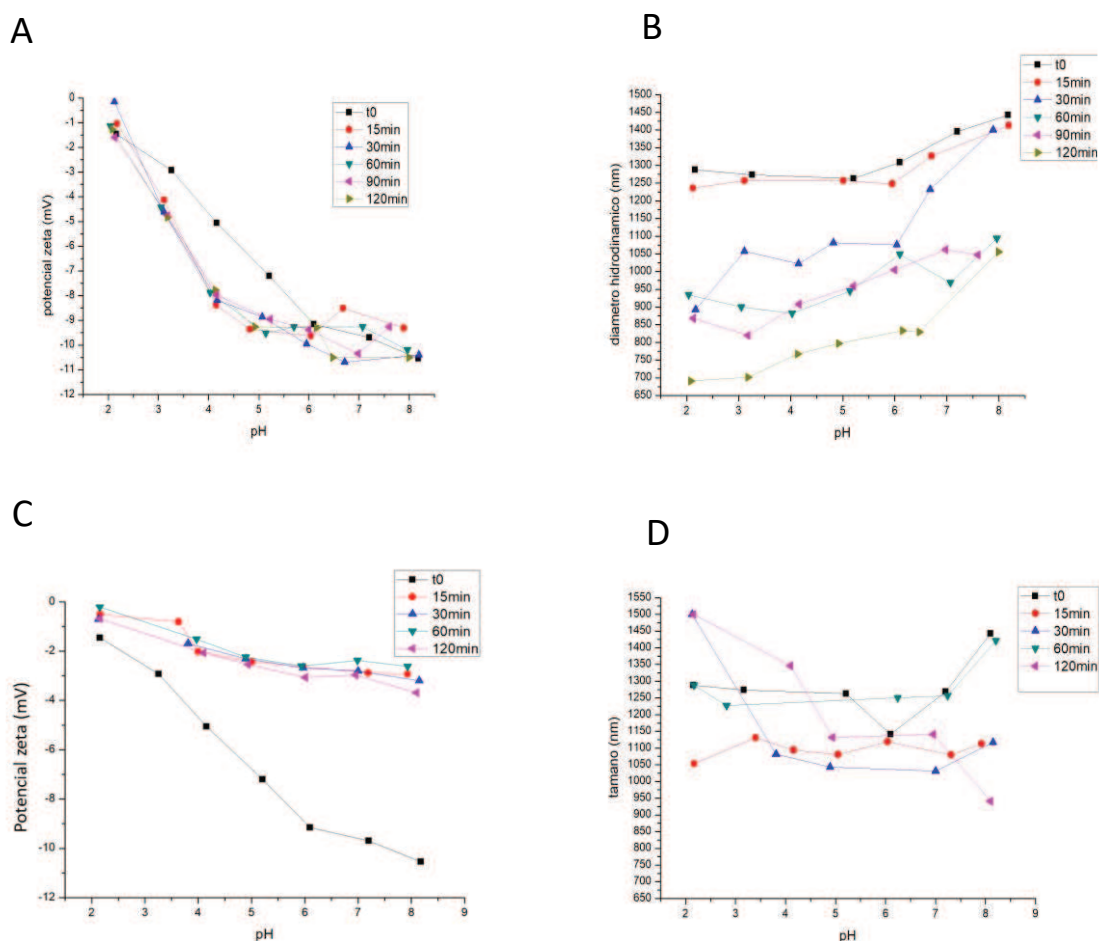


Figura VII.2- Potencial Z (A) y tamaño de partícula (B) de los productos de hidrólisis obtenidos a distintos tiempos de reacción con xilanasa. Potencial Z (C) y tamaño de partícula (D) de los productos de hidrólisis obtenidos a distintos tiempos de reacción con ultrasonido y medio ácido.

Para la muestra sin hidrolizar (tiempo 0) el potencial Z presentó valores en torno a -10 mV entre pH 8,0 y 6,0. Luego a medida que descendió el pH, disminuyó el valor absoluto de este parámetro, tendiendo a la neutralidad a pH 2,0. Este comportamiento también fue observado por López-Maldonado et al. (2021) quienes estudiaron el potencial Z de arabinosilanos de agua residual proveniente del proceso de nixtamalización del maíz. Estos autores observaron que la carga de la molécula puede dividirse en 2 rangos: entre pH 2,0 y 5,5, la carga negativa puede explicarse por el grupo $-\text{COOH}$ ($\text{pK}_a = 3,5$), cuyo valor se incrementa al aumentar la concentración del ion OH^- . Este grupo pertenece al ácido glucurónico anclado a la cadena de AX. Por otro lado, a $\text{pH} > 5,5$, el dominio del potencial Z es atribuido a la ionización de grupos $-\text{OH}$ de los anillos de ácido ferúlico. También las proteínas co-extraídas con **AX-c** podrían contribuir a la carga neta. En este sentido, se informó que los AX suelen contener proteínas que están fuertemente asociadas o ligadas a la estructura de los carbohidratos. Estas interacciones AX-proteína se producen a través de enlaces covalentes entre el polisacárido y los aminoácidos o, entre el ácido ferúlico y los residuos de aminoácidos (Mendez-Encinas et al. 2018).

Con la hidrólisis enzimática (**Figura VII.2A**), el potencial Z se comportó de igual manera que el **AX-c** entre pH 8,0 y 6,0; alcanzando valores en torno a -10mV. Sin embargo, a pHs inferiores a 6,0; se observó un incremento en valor absoluto de dicho potencial. Este aumento en la carga negativa de la molécula respecto a **AX-c** para dicho rango de pH puede explicarse por la escisión enzimática de los enlaces β (1-4) xilano-xilano de las moléculas de xilosa, lo cual promueve la liberación de los grupos $-\text{OH}$, permitiendo la exposición de los grupos cargados (Jaguey-Hernández et al. 2022). A su vez, se observó una reducción en el tamaño conforme avanzó el tiempo de reacción (**Figura VII.2B**). Al respecto, la muestra de partida (tiempo 0) presentó valores de tamaño de 1200 a 1300 nm, mientras que los productos obtenidos a 120 min de reacción presentaron valores de tamaño entre 800 y 700 nm. Esto está estrechamente relacionado con la progresión del GH conforme avanzó la reacción enzimática. Además, se pudo observar que los tamaños fueron en general menores en el rango de pH de 2,0 a 6,0 que los obtenidos a 8,0; lo que podría sugerir la formación de agregados solubles a pH alcalino o una mayor elongación e hidratación de la molécula a esos valores de pH.

El potencial Z de los productos obtenidos con ultrasonido en medio ácido a partir de **AX-c** fue menor en valor absoluto, al hallado para **AX-c** en todo el rango de pH estudiado (**Figura VII.2C**). En general, y a excepción de los 60 min de tratamiento,

el tamaño de los productos obtenidos fue menor al hallado para **AX-c** en el rango de pH entre pH 5,0 y 8,0 (**Figura VII.2D**).

Evidentemente la disminución de la carga superficial estuvo relacionada con asociaciones entre las moléculas (disminución de la superficie expuesta) generando estructuras más grandes o pequeñas dependientes del pH del sistema. Probablemente, la sonicación en medio ácido produjo una agregación de las moléculas a los 60 min de tratamiento.

VII.4.3-Impacto de los tratamientos en el contenido de compuestos fenólicos

En el **AX-c** extraído a partir de la **HM** se identificaron dos compuestos fenólicos mayoritarios: el **AF** y el ácido p-cumárico, ambos en sus formas libres y ligadas. El contenido fue de $203,7 \pm 0,1$ y $94,6 \pm 1,0$ $\mu\text{g AF g}^{-1} \text{AX-c b.s.}$, libre y ligado respectivamente, y de $38,6 \pm 2,0$ y $17,9 \pm 0,5$ $\mu\text{g de ácido p-cumárico g}^{-1} \text{AX-c b.s.}$, libre y ligado respectivamente. Martínez-Encinas et al. (2023) obtuvieron **AX** de la **HM** y reportaron que el contenido de **AF** fue de $0,63 \pm 0,01$ $\text{mg g}^{-1} \text{b.s.}$, siendo no detectados el ácido p-cumárico y el ácido sinápico. Por otro lado, Yilmaz-Turan et al. (2020) estudiaron los compuestos fenólicos de **AX** extraídos a partir de salvado de trigo y encontraron que el **AF** y el ácido sinápico representan el 79,0 % y el 19,9% del total de compuestos fenólicos ($10,3 \pm 0,3$ $\text{mg CF g}^{-1} \text{b.s.}$), respectivamente.

La **Tabla VII.1** muestra los resultados del contenido de compuestos fenólicos libres en función del tiempo de hidrólisis para cada tratamiento. Como se puede apreciar, en la hidrólisis enzimática se observó una disminución de 13 y 16% tanto de **AF** (15 min de reacción) como de p-cumárico (60 min de hidrólisis), respectivamente. Luego, a los 90 y 120 min de hidrólisis con xilanasa se volvieron a alcanzar los valores similares al inicial (0 min). Posiblemente, estos resultados sean el balance entre la ruptura de la estructura de los compuestos fenólicos libres y la liberación de especies fenólicas débilmente ligadas a estructuras monoméricas. Al respecto, las xilanasas hidrolizan regiones relativamente no sustituidas de la cadena de xilano (Dordevic et al. 2021), por lo que los compuestos fenólicos permanecerían ligados a la estructura luego de la reacción. Antov y Dordevic (2017) hallaron que luego de largos períodos de hidrólisis de paja de trigo con xilanasas (24 h), se incrementó la producción de monosacáridos en relación a la de oligosacáridos, es decir, hubo una mayor proporción de xilosa en relación a xilo-oligosacáridos de 2 a 5 unidades. Este proceso resultó en

una disminución en la capacidad antioxidante medida por inhibición del radical ABTS⁺, correlacionando una mayor proporción de monosacáridos/oligosacáridos con una disminución de esta bioactividad. Es probable que esta reducción de la capacidad antioxidante esté relacionada con la disminución de los compuestos fenólicos libres. Por otra parte, otros investigadores evaluaron la actividad prebiótica (Samanta et al. 2015) y la fermentabilidad (Gullón Estévez et al. 2011) de los XOs y concluyeron que estas propiedades dependen del grado de polimerización de la molécula, y la generación de monómeros debe minimizarse porque están asociados a la reducción en estas propiedades.

Tabla VII.1-Evolución del contenido de **AF** y ácido p-cumárico libres durante la hidrólisis enzimática y el tratamiento con ultrasonido en medio ácido

Tiempo (min)	Hidrólisis enzimática		Tratamiento US+M ácido	
	Ác. cumárico ($\mu\text{g g}^{-1}$ sólidos)	Ác. ferúlico ($\mu\text{g g}^{-1}$ sólidos)	Ác. cumárico ($\mu\text{g g}^{-1}$ sólidos)	Ác. ferúlico ($\mu\text{g g}^{-1}$ sólidos)
0 (AX-c)	40,2 \pm 3,5 ^b	276,4 \pm 17,5 ^{cd}	40,2 \pm 3,5 ^c	276,4 \pm 17,5 ^d
15	39,6 \pm 3,0 ^b	240,1 \pm 14,4 ^{ab}	26,6 \pm 2,2 ^b	208,4 \pm 9,9 ^{bc}
30	35,4 \pm 5,3 ^b	232,4 \pm 4,1 ^{ab}	35,6 \pm 0,0 ^c	229,8 \pm 4,0 ^c
60	33,9 \pm 1,4 ^a	212,6 \pm 3,3 ^a	17,4 \pm 1,0 ^a	159,0 \pm 4,5 ^a
90	40,1 \pm 2,3 ^b	286,0 \pm 5,2 ^d	N.D.	N.D.
120	39,7 \pm 0,9 ^b	248,4 \pm 20,7 ^{bc}	20,5 \pm 0,2 ^a	189,8 \pm 7,8 ^b

X \pm DE. Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$). N.D. no determinado.

Para el tratamiento con ultrasonido se observó una degradación de los compuestos fenólicos (**Tabla VII.1**), ya que luego de 120 min de tratamiento, los contenidos de los **AF** y p-cumárico disminuyeron un 49,10 % y 31,34 %, respectivamente. En este sentido, Chen et al. (2021) evaluaron el contenido de fenoles libres y ligados de arabinosilanos extraídos de salvado de trigo. Estos autores reportaron que el tratamiento alcalino utilizado para extraer **AX** produce fenoles libres en la muestra. Además, luego de una hidrólisis ácida, utilizando HCl 0,1 mol L⁻¹ a 85 °C durante 2 h, observaron que el contenido de **AF** ligado disminuyó, posiblemente debido a la degradación de este ácido fenólico durante el tratamiento. Por otro lado, Méndez-Encinas et al. (2020) modificaron por ultrasonido arabinosilanos de bagazo de destilería. Para ello, dispersiones de **AX** de 5 mg mL⁻¹ en agua se expusieron a

diferentes potencias (100W y 200W) durante 15 min. Estos autores observaron una reducción en el peso molecular, lo cual mejoró la solubilidad en agua y bajó la viscosidad debido a la simplificación de la estructura. Además, reportaron que dicho tratamiento ultrasónico no alteró la cantidad de compuesto fenólico en los extractos. Cabe destacar que, en este caso, no se utilizó medio ácido, ni temperatura, lo cual resultó menos perjudicial para los compuestos fenólicos.

VII.4.4-Impacto de los tratamientos en la hidrólisis de proteínas residuales del AX-c

Como se mencionó en el **Capítulo I**, la extracción alcalina directa promueve la solubilización de proteínas, las cuales son co-extraídas con los **AX**. A su vez, los preparados enzimáticos comerciales pueden contener actividad proteolítica. Por tal motivo, se evaluó el contenido de aminos libres como indicador de la hidrólisis proteica durante la reacción con xilanas (Tabla VII.2).

Tabla VII.2-Contenido de aminos libres en función del tiempo de reacción con la enzima xilanas

Tiempo (min)	Aminos libres (mEq L ⁻¹)
0 (AX-c)	1,68±0,15 ^a
15	1,85±0,03 ^b
30	1,74±0,16 ^{ab}
60	1,69±0,01 ^a
90	1,60±0,13 ^a
120	1,94±0,06 ^b

X±DE. Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$).

En general, se puede observar que no hubo diferencias significativas entre las muestras tomadas a diferentes tiempos, por lo que el tratamiento enzimático con xilanas no estaría degradando las proteínas presentes en **AX-c**, lo que indicaría una elevada pureza de la carbohidrasa comercial.

VII.4.5-Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) de los hidrolizados enzimáticos de AX-c

A fin de observar cambios en la estructura molecular durante el proceso enzimático, se analizaron los hidrolizados obtenidos a 60 y 120 min mediante FTIR (**Figura VII.3**). Como se puede ver, el **AX-c** (tiempo 0) y los productos de hidrólisis tienen un espectro similar, lo cual indica una conservación de la estructura en los hidrolizados. La banda ancha alrededor de 3400 cm^{-1} es atribuida a la vibración del estiramiento del grupo $-\text{OH}$, lo que indica la interacción inter/intra hidrógeno en la red de polisacáridos (Chen et al. 2021). Los picos en torno a 1652 y 1550 cm^{-1} corresponden a los grupos fenilo (Zhao et al. 2018). Luego de 60 min de reacción con xilanasa, el espectro se mantiene sin diferencias, lo que podría indicar que el **AF** permanece unido a la estructura. Sin embargo, a los 120 min de reacción se puede observar una señal levemente mayor. No obstante, este cambio sutil no fue evidenciado a partir del análisis del contenido de compuestos fenólicos por HPLC.

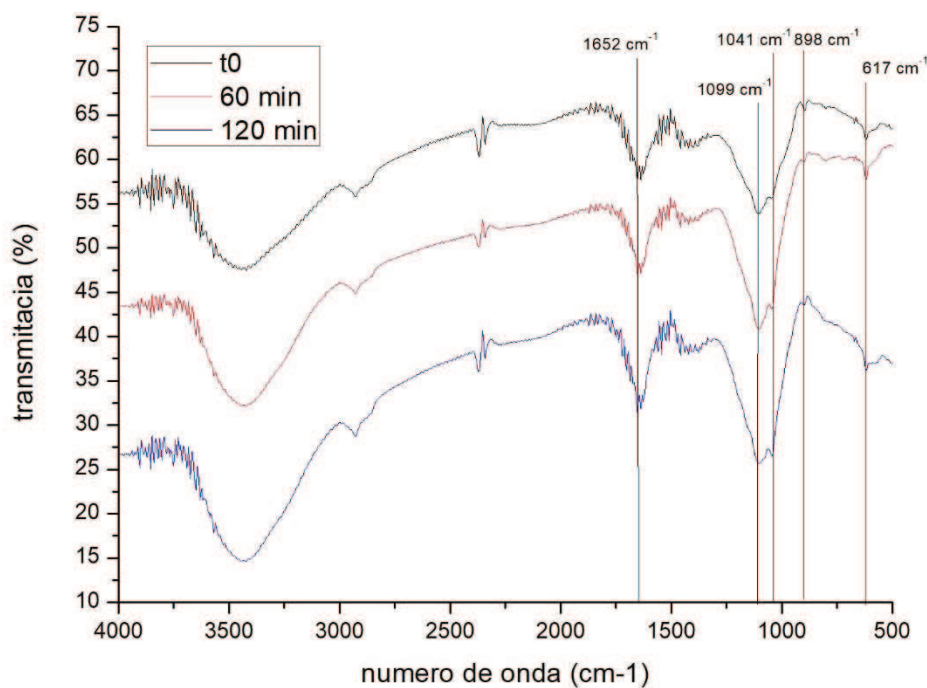


Figura VII.3- Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) de **AX-c** (tiempo 0) y los productos de hidrólisis obtenidos con xilanasa a 60 y 120 min de reacción.

Como se muestra en la **Figura VII.3**, las bandas a 1099 y 1041 cm^{-1} , las cuales indicarían la flexión del enlace C-OH (Chen et al. 2021, Dordevic et al. 2021), se vieron intensificadas en los productos de hidrólisis. Por otra parte, el pico a 898 cm^{-1} correspondiente a los enlaces $\beta(1-4)$ C-C de los AX (Kaur et al. 2021, Iqbal et al. 2011) se vio debilitado en intensidad en los hidrolizados, lo que indicaría que la enzima escindió dicho enlace, generando moléculas más pequeñas. Además, se encontraron dos

picos a 849 cm^{-1} y 617 cm^{-1} asociados a enlaces α (1-4) entre moléculas de xilosa (Kaur et al. 2021) y a la cadena principal del polímero (Iqbal et al. 2011), respectivamente.

VII.4.6-Ensayos reológicos:

Se llevaron a cabo ensayos de flujo (tensión de corte *vs.* velocidad de deformación), y ensayos de reometría oscilatoria. En la **Figura VII.4 A y B** se muestra la curva de viscosidad aparente en función del gradiente de velocidad de una dispersión a $5\text{ g }100\text{ mL}^{-1}$ de **AX-c** y de los hidrolizados a 60 y 120 min, respectivamente. En primer lugar, se observó un comportamiento pseudoplástico, ya que la viscosidad disminuyó al aumentar el gradiente de deformación.

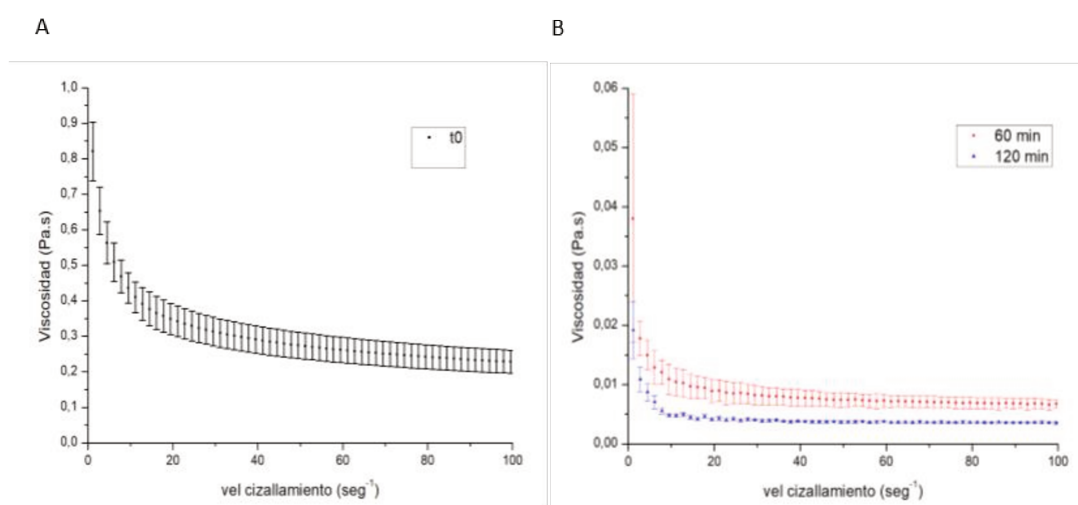


Figura VII.4- Ensayos de flujo de soluciones de **AX-c** y sus hidrolizados. Viscosidad aparente en función del gradiente de velocidad de una dispersión a $5\text{ g }100\text{ mL}^{-1}$ de **AX-c** (A) y de los hidrolizados a 60 y 120 min (B).

La viscosidad está estrechamente relacionada con las características estructurales del polisacárido. De este modo, la viscosidad de los AX se correlaciona directamente con el peso molecular (PM). Al aumentar el PM de los AX aumenta la viscosidad, lo que podría deberse a la disminución de la solubilidad y a una reticulación (Chen et al. 2019b, Kale et al. 2018, Kale et al. 2015). En la **Figura VII.4 B** se observa claramente una menor viscosidad en las muestras hidrolizadas respecto a la muestra sin hidrolizar (**Figura VII.4 A**). Izydorczyk y Biliaderis (1992) han demostrado que la viscosidad de los AX de trigo aumenta con el aumento del tamaño molecular. Además, demostraron que el comportamiento pseudoplástico, una característica de los fluidos no newtonianos, fue más pronunciado en las fracciones AX con mayor PM, pero las fracciones de menor PM exhibían un comportamiento casi newtoniano a baja velocidad de corte.

Respecto a las pruebas de flujo, tanto **AX-c** como los hidrolizados ajustaron al modelo de Ley de potencia “Ostwald de Waele”, el cual se describe a continuación:

$$\zeta = K \cdot \dot{\gamma}^n \quad (\text{VII.6})$$

Donde, ζ es la tensión de corte (Pa), $\dot{\gamma}$ es la velocidad de cizallamiento (1 s^{-1}), **K** la consistencia de flujo y **n** el índice de comportamiento de flujo.

Los valores de los parámetros obtenidos a partir de este modelo se muestran en la **Tabla VII.3**.

Tabla VII.3-Valores del índice de consistencia (k) y el índice de comportamiento de flujo de dispersiones a $5 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$ de **AX-c** y sus hidrolizados

Muestras	K (Pa s ⁿ)	n
t0 (AX-c)	0,7733±0,0702 ^a	0,7342±0,0112 ^c
60 min	0,0157±0,0056 ^b	0,8193±0,0521 ^b
120 min	0,0057±0,0004 ^c	0,8973±0,0062 ^a

X±DE. Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$).

Como se sabe, en el modelo ley de potencia, los valores de “n” menores a 1 indican un comportamiento del tipo pseudoplástico, mientras que para valores iguales a 1, el fluido se considera newtoniano. Tanto para **AX-c** como para los hidrolizados, se obtuvieron valores de “n” menores a 1, lo que indicó un comportamiento pseudoplástico. De acuerdo con Fan et al. (2024), los AX tratados con enzimas presentan menor viscosidad aparente, producto de la disminución del tamaño molecular. Además, todas las viscosidades aparentes de los productos de la hidrólisis enzimática disminuyeron con el aumento de la velocidad de corte, lo que indica que todos los productos del sistema exhibieron el comportamiento típico de los fluidos pseudoplásticos con un comportamiento de adelgazamiento por corte (fluido típico no newtoniano).

En cuanto a los ensayos oscilatorios de pequeña amplitud, en primer lugar se realizaron barridos de esfuerzo entre 0,001 y 2,85 Pa a frecuencia constante de 1 Hz para la determinación del rango de viscoelasticidad lineal (RVL) (**Figura VII.5.A**). Una vez determinado el RVL, se evaluó mediante un protocolo de barrido de frecuencias entre 0,1 y 100 Hz con una amplitud de deformación constante de 0,04 Pa (dentro del RVL) para obtener los espectros mecánicos, los cuales se muestran en la **Figura VII.5A y B**.

Como se puede ver en la **Figura VII.5.B**, el valor del módulo viscoso de **AX-c** fue mayor al del módulo elástico a $5 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$. En concordancia con este resultado, Shelat et al. (2010) obtuvieron un comportamiento viscoso predominante ($G'' > G'$) para AX de trigo a distintas concentraciones ($0,8 - 10 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$). En este sentido, dicho comportamiento es habitual en soluciones diluidas de hidrocoloides, donde predomina el aporte viscoso y la muestra presenta un comportamiento cercano al de un líquido ideal. Por otra parte, no fue posible obtener los espectros mecánicos de las muestras hidrolizadas debido a su muy baja viscosidad a concentraciones de $5 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$.

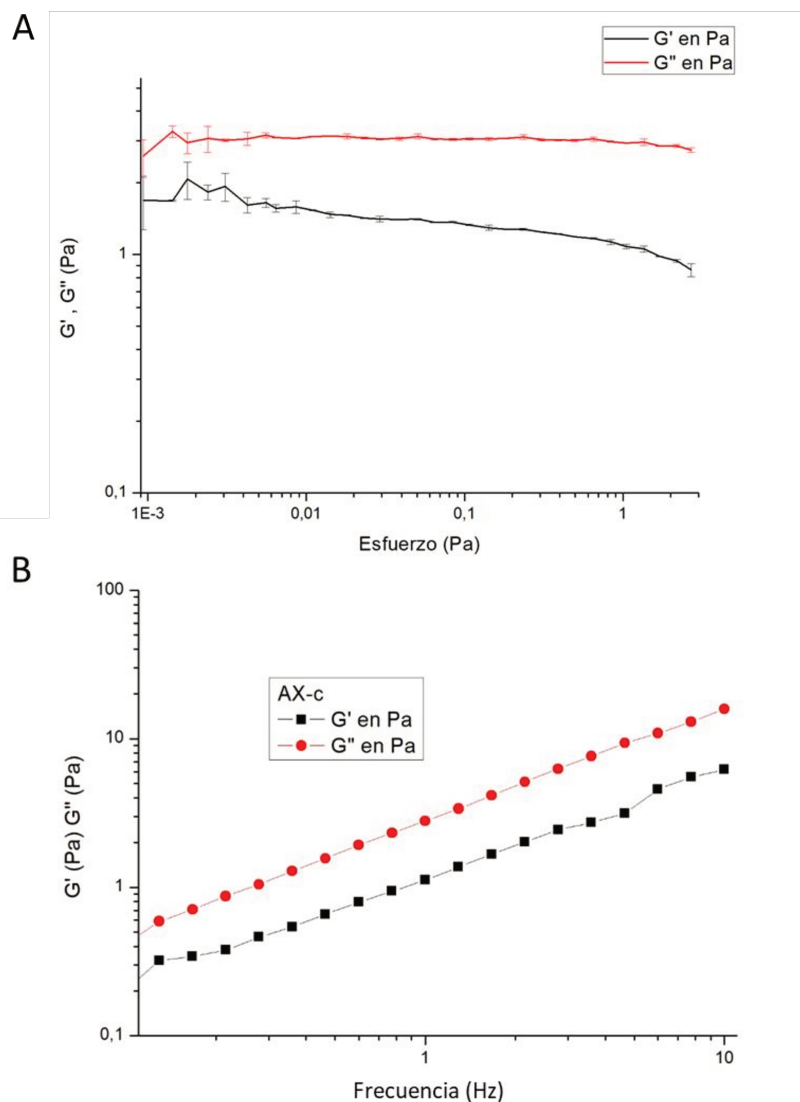


Figura VII.5- Ensayo de amplitud de esfuerzo (A). Espectros mecánicos de soluciones del **AX-c** (B).

A partir de los datos de la **Figura VII.5**, fue posible ajustar los valores, obteniéndose una pendiente y una ordenada al origen. Los resultados se muestran en la **Tabla VII.4**

Tabla VII.4-Valores de pendiente y ordenada al origen para las gráficas de Log G' o G'' vs. Log ω

Muestras	Log a (Pa)*	n (Pa Hz ⁻¹)*	Log b (Pa)**	m (Pa Hz ⁻¹ **
AX-c	0,0859±0,0290	0,7104±0,0083	0,4634±0,0260	0,7566±0,0228

$$X \pm DE. \quad * \log G'(\omega) = \log a + n \log \omega \quad ** \log G''(\omega) = \log b + m \log \omega$$

En cuanto a las pendientes (n - m), valores cercanos a cero indican independencia del módulo (G' - G'') respecto a ω , mientras que valores mayores indican que la dependencia es significativa. Como se puede observar en la **Tabla VII.4**, los valores de las pendientes (n y m) de **AX-c** fueron menores a 1. Esto quiere decir que el valor de los módulos G' y G'' tienen baja dependencia de la frecuencia. Además, del análisis de las ordenadas al origen (Log a o Log b), se aprecia que para **AX-c** el valor de Log b es mayor (5,4 veces aproximadamente) que Log a, indicando un comportamiento viscoso predominante.

La Tan (δ) es una función viscoelástica dinámica que indica la razón entre la componente viscosa (G'') y elástica (G'). Con el objetivo de analizar el peso relativo entre los comportamientos viscoso y elástico de las dispersiones, se evaluó el comportamiento de tan δ en función de la frecuencia ω . Los resultados de la Tan (δ) en función de la ω se muestran en la **Figura VII.6**. Como se puede observar, en la zona de valores bajos de ω se obtuvieron mayores valores de Tan δ hasta aproximadamente una ω de 0,3 Hz, a partir del cual los valores se mantuvieron constantes en frecuencias intermedias, para luego disminuir a aproximadamente ω 5 Hz. Esto sugiere que, a bajas frecuencias, el aumento de la ω de deformación produjo incrementos del módulo viscoso en mayor proporción que los producidos sobre el módulo elástico. Luego el comportamiento de los módulos se mantuvo constante para finalmente disminuir luego de superar valores de $\omega \geq 5$ Hz, donde el módulo elástico comenzó a aumentar a mayor velocidad que el viscoso.

Respecto al ángulo de desfasaje δ , se sabe que para $\delta=90^\circ$ el comportamiento del material es viscoso (esfuerzo y deformación en desfase) mientras que un $\delta=0^\circ$ indica que el material es elástico (esfuerzo y deformación en fase). A su vez un $\delta=45^\circ$, es decir Tan (δ)=1, indica que no se da una preponderancia de la componente elástica sobre la

viscosa y viceversa. Como se aprecia en la **Figura VII.6**, la $\text{Tan}(\delta)$ fue >1 en el rango de frecuencias evaluado, lo cual indica un dominio del componente viscoso por sobre el elástico. Además, los módulos G' y G'' se incrementaron con el aumento de la frecuencia, lo cual parece ser un comportamiento típico de soluciones de **AX**. Un comportamiento similar ($G'' > G'$) fue hallado por Xiao et al. (2022), al evaluar soluciones de AX de salvado de trigo.

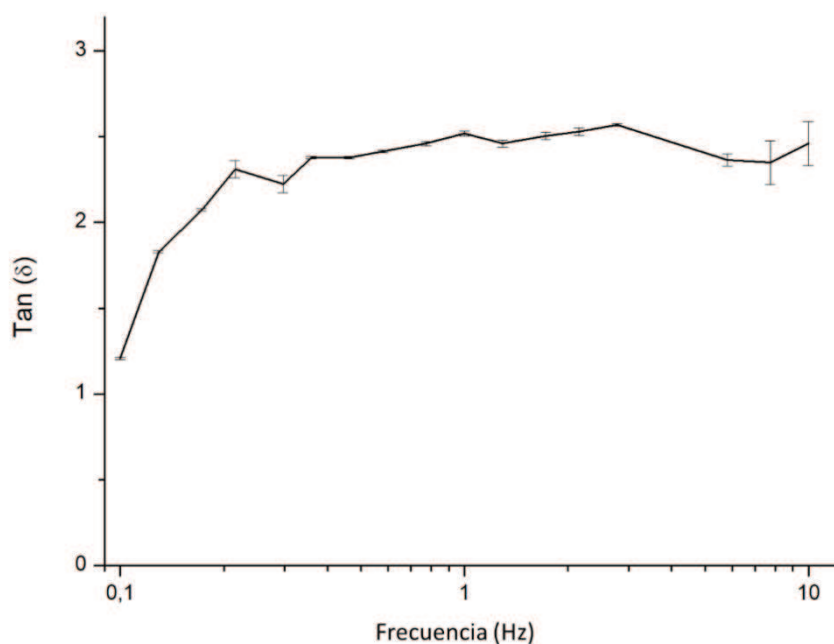


Figura VII.6-Espectro mecánico de la $\text{Tan}(\delta)$ en función de la frecuencia, de la solución de **AX-c**.

Por otra parte, se calculó la viscosidad dinámica de acuerdo a Rao (1992). En la **Figura VII.7**, se muestra la viscosidad estática (η) y compleja (η^*) para una solución de **AX-c** de $5 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$.

Como se aprecia en la **Figura VII.7**, los puntos de las viscosidades se encuentran muy cercanos. Esto obedece a la regla empírica de Cox-Merz, donde los valores de $\eta(\dot{\gamma})$ y $\eta^*(\omega)$ son superponibles. En base a este resultado se puede decir que el sistema no tiene estructuras complejas de largo alcance (Dealy y Wissbrun 2012). Este comportamiento fue similar al evaluado por Shelat et al. (2010) para soluciones de AX de trigo en agua.

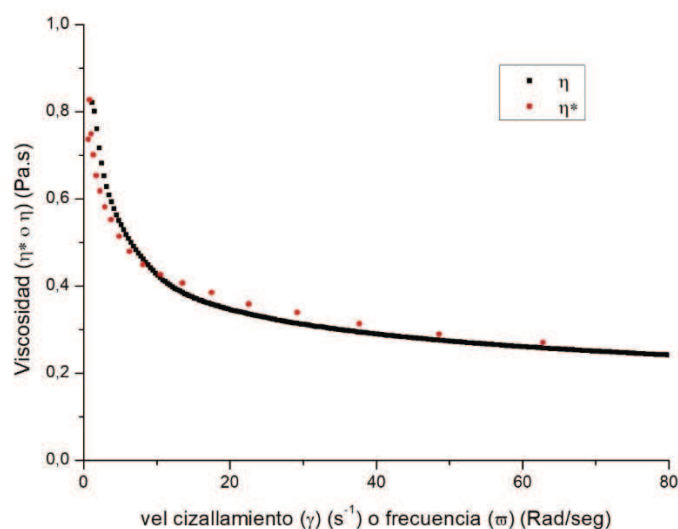


Figura VII.7-Viscosidad compleja (η^*) y estática (η) de la solución de **AX-c**.

VII.4.7-Bioaccesibilidad intestinal y colónica de compuestos fenólicos

Se realizó la digestión gastrointestinal y posterior fermentación colónica del **AX-c** y del hidrolizado enzimático a 120 min de hidrólisis (**AXH**) para estimar la bioaccesibilidad de los ácidos ferúlico y p-cumárico.

En la **Tabla VII.5 y VII.6** se muestran los resultados de bioaccesibilidad intestinal (**BI %**), colónica (**BC %**) y total (**BT %**) de ácido ferúlico y p-cumárico, respectivamente.

Tabla VII.5-Bioaccesibilidad intestinal, colónica y total de ácido ferúlico del **AX-c** y de su hidrolizado enzimático a 120 min

Ácido Ferúlico					
Muestra	Contenido ($\mu\text{g g}^{-1}$ sol.)	BI (%)	BC _{ID} (%)	BC (%)	BT (%)
AX-c	276,4±17,5	28,4±1,8 ^a	17,8±0,3 ^b	13,4±0,2 ^b	41,8±2,0
AXH	248,4±20,7	33,3±0,1 ^b	14,8±0,1 ^a	8,7±0,2 ^a	42,1±0,2

X±DE. BI: Bioaccesibilidad intestinal de **AF**; BC_{ID}: bioaccesibilidad colónica de **AF** considerando el **AF** de la muestra intestinal digerida; BC: bioaccesibilidad colónica de **AF** considerando el **AF** de la muestra no digerida; y bioaccesibilidad total (BT) de **AF** calculada como BI + BC. Letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas entre muestras ($p < 0,05$).

Respecto a la bioaccesibilidad intestinal (BI) del **AF** (**Tabla VII.5**) se pudo observar una dializabilidad mayor del **AXH** respecto a **AX-c**. Sin embargo, la bioaccesibilidad colónica de **AX-c** fue mayor a la de **AXH**, dando como resultado una

BT de **AF** en torno a ~42% para ambas muestras. Como se puede observar en la **Tabla VII.5** no hay diferencias en el contenido inicial de **AF** de las muestras, por lo que la diferencia en dializabilidad intestinal puede deberse al menor tamaño molecular y viscosidad de la muestra AXH, lo cual produce una mayor exposición del **AF** al ambiente gastrointestinal. En este sentido, Drawbridge et al. (2023) hallaron que sólo la forma libre del **AF** es bioaccesible a nivel intestinal, y su liberación depende de la exposición de la matriz alimentaria a las enzimas digestivas.

Tabla VII.6-Bioaccesibilidad intestinal, colónica y total de ácido p-cumárico de **AX-c** y de su hidrolizado enzimático a 120 min

Ácido p-cumárico					
Muestra	Contenido ($\mu\text{g g}^{-1}$ sol.)	BI (%)	BC _{ID} (%)	BC (%)	BT (%)
AX-c	40,2 \pm 3,5	32,6 \pm 0,9 ^b	27,2 \pm 3,4 ^b	31,2 \pm 3,8 ^b	63,8 \pm 1,7 ^b
AXH	39,7 \pm 0,9	23,5 \pm 0,6 ^a	10,3 \pm 0,1 ^a	6,5 \pm 0,1 ^a	30,0 \pm 0,5 ^a

X \pm DE. BI: Bioaccesibilidad intestinal de ácido p-cumárico; BC_{ID}: bioaccesibilidad colónica de ácido p-cumárico considerando el ácido p-cumárico de la muestra intestinal digerida; BC: bioaccesibilidad colónica de ácido p-cumárico considerando el ácido p-cumárico de la muestra no digerida; y bioaccesibilidad total (BT) de ácido p-cumárico calculada como BI + BC. Letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas entre muestras ($p < 0,05$).

Respecto a la bioaccesibilidad del ácido p-cumárico (**Tabla VII.6**), se observó una menor dializabilidad en la muestra hidrolizada tanto a nivel gastrointestinal como colónico, dando como resultado una BT del aproximadamente el doble para el **AX-c** respecto al AXH.

Las diferencias entre las muestras en bioaccesibilidad de los ácidos fenólicos después de la fermentación colónica *in vitro*, puede deberse a la acción de las enzimas microbianas, las cuales pueden degradar estos ácidos fenólicos a nuevos metabolitos a nivel colónico (Zhang et al. 2023, Yang et al. 2022, Rechner et al. 2002). Adicionalmente, Gong et al. (2019) demostraron que la fermentación del ácido ferúlico está mediada por bacterias de género diferente a las responsables de la fermentación del ácido p-cumárico, explicando las diferencias encontradas en la tasa de degradación de ambos compuestos.

Los ácidos fenólicos pueden ser metabolizados por los microorganismos, generándose nuevas especies fenólicas. De acuerdo con Yang et al. (2022) y Rechner et

al. (2002) los principales metabolitos colónicos generados a partir del **AF** son el ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)propiónico, el ácido 3-(3-hidroxifenil)propiónico y el ácido 3-fenilpropiónico. Por otra parte, el ácido 3,4-dihidroxibenzoico puede derivar del metabolismo de varios compuestos fenólicos, y se ha reportado que puede generarse a través del ácido 3-(3-hidroxifenil)propiónico, mediante varias reacciones de decarboxilación y dehidroxilación (Crozier et al. 2010, Kay et al. 2017; Rocchetti et al. 2017). En este sentido, se pudo evidenciar que el **AF** proveniente de **AX-c** y de **AXH** fue metabolizado durante la fermentación colónica, generándose ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido 3-(3-hidroxifenil) propiónico y el ácido 3-fenil propiónico (**Tabla VII.7**). Al respecto, en la **Tabla VII.7** se muestra la bioaccesibilidad colónica de cada uno de estos metabolitos.

Tabla VII.7-Bioaccesibilidad colónica de metabolitos generados durante la fermentación del **AF**

Muestra	ácido 3,4-dihidroxibenzoico		ácido 3-(3-hidroxifenil) propiónico		ácido 3-fenil propiónico	
	$\mu\text{g mL}^{-1}$	BC (%)	$\mu\text{g mL}^{-1}$	BC (%)	$\mu\text{g mL}^{-1}$	BC (%)
AX-c	0,44±0,05 ^b	69,9±0,3 ^b	1,18±0,30	61,7±5,0	ND	ND
AXH	0,37±0,03 ^a	63,1±6,0 ^a	ND	ND	32,51±0,25	27,4±0,1

X±DE. BC: bioaccesibilidad colónica de ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido 3-(3-hidroxifenil) propiónico y ácido fenil propiónico considerando el contenido de ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido 3-(3-hidroxifenil) propiónico y ácido 3-fenil propiónico en la muestra no digerida. ND: no detectado. Letras diferentes en columnas significan diferencias significativas entre muestras ($p < 0,05$).

Como se puede observar en la **Tabla VII.7** para el **AXH** se generó ácido 3-fenil propiónico, del cual un 27% dializó y el 73% restante permaneció en forma libre en el digerido colónico. De acuerdo con Yang et al. (2022) el metabolismo del **AF** en el colon es aproximadamente el siguiente: el **AF** se reduce y se desmetila antes de convertirse en ácido 3,4-dihidroxibenzoico. Dado que el carbono 4 se deshidroxila más fácilmente que el carbono 3, el 3,4-dihidroxibenzoico se metaboliza primero en ácido 3-(3-hidroxifenil) propiónico y luego en ácido 3-fenil propiónico. El metabolito intestinal ácido 3-fenil propiónico es transportado luego al hígado, donde sufre una β -oxidación para formar ácido benzoico y sus sustituyentes. A continuación, el ácido benzoico y sus sustituyentes se excretan principalmente en la orina como ácido úrico (el conjugado de glicina). Evidentemente para la muestra hidrolizada **AXH**, el metabolismo del **AF** a nivel colónico fue mayor, produciéndose el metabolito intestinal ácido 3-fenil

propiónico, mientras que para **AX-c** el metabolismo de **AF** sólo alcanzó productos intermedios y en menor cantidad. En este sentido, Cañas et al. (2025) evaluaron el metabolismo colónico de pulpas de café y de un extracto de estas pulpas, y hallaron que el metabolismo colónico de los compuestos fenólicos en la pulpa de café fue más lento que en el extracto, debido a una posible protección de la matriz fibrosa de la pulpa. Es decir que, en **AX-c**, el mayor tamaño molecular y la mayor viscosidad pueden haber ejercido un efecto protector de los ácidos fenólicos, retardando su metabolismo.

VII.4.8-Propiedades bioactivas de los hidrolizados

VII.4.8.1-Propiedades antioxidantes

VII.4.8.1.1-Inhibición del radical ABTS⁺

En la **Tabla VII.8** se muestran los resultados de inhibición del radical ABTS⁺ obtenido con los distintos sistemas de hidrólisis (enzimática y ultrasonido-medio ácido) en función del tiempo de reacción.

Tabla VII.8- Inhibición del radical ABTS⁺ de los hidrolizados de **AX-c**

Tiempo (min)	Enzimática (mmol trolox 100 g⁻¹ AX-c)	US+Medio ácido (mmol trolox 100 g⁻¹ AX-c)
0 (AX-c)	18,0±1,1 ^a	18,0±1,1 ^c
15	21,5±1,3 ^b	15,4±0,3 ^a
30	24,8±2,2 ^b	16,9±0,7 ^{bc}
60	21,3±0,8 ^b	16,5±0,9 ^{ab}
90	22,3±1,4 ^b	16,2±0,8 ^{ab}
120	23,3±0,3 ^b	15,8±0,6 ^{ab}

X±DE. Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas entre las muestras (p< 0.05). US: Ultrasonido

Respecto a la hidrólisis enzimática, los productos de hidrólisis en función del tiempo presentaron similar inhibición del radical ABTS⁺, no obstante, dichos valores fueron mayores que el obtenido para **AX-c** (tiempo 0). En concordancia con este resultado, Dordevic et al. (2021) hallaron que los AX hidrolizados con xilanasas exhibieron mayor inhibición sobre este radical que el AX de partida. En contraste con este resultado, el tratamiento con ultrasonido en medio ácido provocó una disminución de la capacidad antioxidante frente al radical ABTS⁺. Como se mostró anteriormente, las muestras tratadas con ultrasonido presentaron un mayor tamaño molecular, y una

menor exposición de los compuestos fenólicos, lo cual daría como resultado propiedades bioactivas diferentes.

Dordevic et al. (2021) hallaron que los AX hidrolizados con xilanasas exhibieron mayor inhibición del radical ABTS⁺ que el AX de partida, debido a que un menor PM favorece su solubilidad en agua y se dispersa más fácilmente para participar de la reacción. Sin embargo, Malunga y Beta (2015) hidrolizaron AX de aleurona de trigo con dos tipos de xilanasas, y evaluaron sus propiedades antioxidantes. Estos autores encontraron una correlación directa entre el contenido de ácido ferúlico esterificado y su capacidad antioxidante medida por la inhibición de ABTS⁺, mientras que la influencia del grado de sustitución y el peso molecular no fueron del todo claros. Cuando se trataron mediante endoxilanasas los AX de aleurona de trigo con enzimas de *T. viride* (E.C. 3.2.1.8) no hubo diferencias en la capacidad de inhibición de ABTS⁺ con respecto al AX sin tratar. Sin embargo, para los AX hidrolizados con enzimas provenientes *N. patriciarum* (E.C. 3.1.2.8) se encontró una correlación negativa entre el grado de sustitución y la capacidad de inhibición del ABTS⁺. Esto podría deberse a que en el tratamiento con *T. viride* el hidrolizado contenía 2 veces más ácido ferúlico que en el hidrolizado obtenido con *N. patriciarum*. Es decir, que el efecto de la hidrólisis sobre la capacidad antioxidante no dependió sólo de las condiciones y el tipo de hidrólisis realizada, sino que además influyó el tipo de AX utilizado (Malunga y Beta 2015).

Malunga et al. (2017) estudiaron la capacidad antioxidante de AX de trigo y hallaron que para AX con baja proporción de AF ligado, una reducción del tamaño por hidrólisis enzimática con endo-xilanasas duplicó su inhibición frente al radical ABTS⁺. Entonces una mayor movilidad en solución del AX hidrolizado se tradujo en una mayor actividad antioxidante. Además, estos autores observaron que las moléculas de AX con alta sustitución de AF exhibieron las mayores propiedades antioxidantes.

VII.4.8.1.2-FRAP

En la **Tabla VII.9** se muestran los resultados del poder reductor (FRAP) obtenido con los distintos sistemas de hidrólisis (enzimática y ultrasonido-medio ácido) en función del tiempo de reacción. Respecto a los AX tratados con US en medio ácido, se observó en general una disminución del poder reductor respecto del AX-c (a excepción de 60 min). Sin embargo, en el caso de la hidrólisis enzimática, durante los primeros minutos (15 min) de hidrólisis con xilanasas ya se observó un incremento del

poder reductor respecto a **AX-c**, que se mantuvo constante hasta los 120 min de reacción.

Boonchuay et al. (2021), obtuvieron hidrolizados de AX de elotes de maíz con una endo-xilanas. Estos autores observaron que los hidrolizados contenían buena cantidad de polifenoles totales ($0,315 \text{ g GAE g}^{-1}$), y consecuentemente, una buena actividad antioxidante medida por FRAP ($2,62 \text{ } \mu\text{mol Trolox mg}^{-1}$). Estos resultados fueron atribuidos a las moléculas de arabinofuranosa y al ácido glucurónico unidos al esqueleto del AX. Además, se asoció la actividad reductora a las moléculas de **AF** y ácido p-cumárico, los cuales actúan como agentes reductores (Chen et al. 2019a). Finalmente, la xilanas utilizada en la presente tesis hidrolizó parcialmente la cadena de xilanos, permitiendo que persistan las sustancias activas en dicha molécula.

Tabla VII.9- Poder reductor (FRAP) de los hidrolizados de **AX-c**

Tiempo (min)	Enzimática (mmol trolox 100 g⁻¹AX-c)	US+Medio ácido (mmol trolox 100 g⁻¹AX-c)
0 (AX-c)	1,35±0,01 ^a	1,35±0,01 ^b
15	1,49±0,02 ^c	1,25±0,01 ^a
30	1,50±0,01 ^{bc}	1,27±0,03 ^{ab}
60	1,47±0,02 ^{bc}	1,56±0,06 ^d
90	1,51±0,03 ^b	1,24±0,03 ^a
120	1,50±0,02 ^b	1,20±0,03 ^a

X±DE. Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$). US: Ultrasonido

En base a lo expuesto, la actividad antioxidante de los AX hidrolizados depende del tipo de AX. Si el AX posee alto contenido de sustituyentes activos, especialmente **AF**, no suelen observarse cambios significativos en la capacidad antioxidante de los productos hidrolizados. Sin embargo, si el AX tiene pocos sustituyentes, la hidrólisis mejora su solubilidad y sus propiedades antioxidantes. Adicionalmente, también se atribuye actividad antioxidante a los grupos $-\text{OH}$ y $-\text{COOH}$ libres de las moléculas de menor tamaño (Chen et al. 2021).

VII.4.8.1.3-Capacidad quelante ligada al Cu^{+2}

Este método mide la velocidad de autooxidación del β -caroteno en presencia de Cu^{+2} . Como se sabe, los metales de transición actúan como catalizadores de las reacciones radicalarias. Por lo tanto, si los mismos son quelados se ejerce un efecto

antioxidante indirecto. En la **Tabla VII.10** se muestran los resultados de la capacidad quelante ligada al Cu^{+2} de los hidrolizados obtenidos con los diferentes sistemas de hidrólisis (enzimática y ultrasonido-medio ácido) en función del tiempo de reacción.

Tabla VII.10- Capacidad quelante ligada al Cu^{+2} de los hidrolizados de **AX-c**

Tiempo (min)	Enzimática CQ (%)	US+Medio ácido CQ (%)
0 (AX-c)	41,5±0,6 ^c	41,5±0,6 ^c
15	39,4±1,2 ^b	49,4±1,1 ^d
30	37,3±0,2 ^a	60,6±0,1 ^e
60	51,1±0,2 ^e	34,7±0,6 ^b
90	39,2±1,0 ^{ab}	33,5±0,6 ^b
120	47,9±0,9 ^d	26,6±1,9 ^a

X±DE. Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$). US: Ultrasonido

La mayor CQ se obtuvo a los 60 min de hidrólisis enzimática y a los 30 min de tratamiento con ultrasonido. Este resultado podría estar asociado a los grupos funcionales que son expuestos en los productos de hidrólisis, los cuales poseen capacidad quelante. En este sentido, los compuestos con actividad quelante de iones metálicos generalmente contienen dos o más de los siguientes grupos funcionales: OH, SH, COOH, PO_3H_2 , CO, NR_2 , S y O (Yuan et al. 2005). Al respecto, los AX con ácido glucurónico en su estructura pueden presentar propiedades de quelación de metales (Fernandes y Coimbra 2023). Además de la quelación de metales, los polisacáridos cargados negativamente podrían establecer interacciones con iones metálicos formando complejos de coordinación que permiten la eliminación directa del $\text{OH}\cdot$ generado adyacentemente a la cadena principal del polisacárido (Pristov et al. 2011; Niki, 2010; Gilbert et al. 1984; Hawkins y Davies, 1996).

Xu et al. (2016) informaron que polisacáridos del té con un peso molecular bajo presentaron una mayor capacidad quelante de metales que los de elevado tamaño (Wang et al. 2012). En contraste, Jiang et al. (2013) indicaron que los polisacáridos de la almeja *Cyclina sinensis* de elevado peso molecular poseían mayor capacidad quelante de hierro que los de menor tamaño. Por lo tanto, no se evidencia una relación clara entre el tamaño de los polisacáridos y la capacidad quelante de metales de transición. No obstante, dicha actividad podría estar más relacionada con la exposición de los grupos funcionales capaces de quelar iones metálicos. En este sentido, los procesos hidrolíticos

utilizados en la presente tesis podrían liberar especies con mayor o menor cantidad de grupos funcionales a lo largo del tiempo, lo que impactaría en la capacidad quelante de los productos.

VII.4.9-Potencial Prebiótico

VII.4.9.1-Efecto de la esterilización en autoclave, sobre el grado de hidrólisis de los arabinoxilanos.

Como se mencionó anteriormente en el punto VII.4.1, el AXH tiene un grado de hidrólisis de $14,56 \pm 0,30\%$. Luego de la esterilización en autoclave ($121^{\circ}\text{C} - 15\text{min}$), el GH en el medio de cultivo MRS fue de $14,67 \pm 0,32\%$. Por otro lado, también se midieron los azúcares reductores para el AX-c antes y después de la esterilización, y el valor expresado como grado de hidrólisis cambió de $0,35 \pm 0,01$ a $0,73 \pm 0,01\%$. Es decir, que el proceso de esterilización en autoclave del **AX-c** y del AXH en el medio de cultivo prácticamente no modificó los valores previos al tratamiento térmico.

VII.4.9.2-Evaluación del potencial prebiótico

El potencial prebiótico se midió mediante recuento en placa y comparación del rango de crecimiento relativo (RGR) respecto al control, que contenía glucosa como fuente de carbono (**Tabla VII.11**).

Se puede observar que en el caso del **AX-c**, no hubo buen desarrollo de microorganismos, tanto de INL1 como de los microorganismos similares patógenos. Sin embargo, para AXH se observó un buen desarrollo del probiótico INL1, incluso mejor que el control de glucosa ($\text{RGR}=1,13 \pm 0,03$). A su vez, el crecimiento de patógenos *Salmonella OMS*, *E. coli 517* y *S. aureus 76* fue reducido respecto al control. En este sentido, Rudjito et al. (2023) evaluaron AXOS de trigo con diferentes longitudes de cadena obtenidas por hidrólisis enzimática, y determinaron el crecimiento de *Bifidobacterium adolescentis*, hallando que este microorganismo creció mejor con el hidrolizado con una longitud de cadena media de 5 moléculas de xilosa y tamaño entre 10^3 y 10^4 Da. Por otro lado, dicho probiótico no se pudo desarrollar en el medio con el AX sin hidrolizar, ya que no poseía xilanasas en su batería enzimática, resultado similar al obtenido en nuestro trabajo. De la misma manera, Wang et al. (2020) reportaron que los AXOS con grados de polimerización promedio de 3 a 5 unidades estimulan el crecimiento de bifidobacterias y la producción de butirato. Por el contrario, los AXOS con grados de polimerización promedio de 61 unidades suprimen la fermentación

proteolítica, sin aumentar las concentraciones de butirato en el colon, ni estimulan el desarrollo de bifidobacterias en el ciego. Claramente, una longitud de cadena muy elevada no puede ser aprovechada por estos microorganismos.

Tabla VII.11- Valores de recuento (Log UFC mL⁻¹) y rango de crecimiento relativo

	Log UFC mL ⁻¹							
	Control t0	AX-c t0	AXH t0	Control 24h	AX-c 24h	AXH 24h	RGR AX-c	RGR AXH
<i>B. lactis INLI</i>	5,1±0,2 ^a	5,1±0,2 ^a	5,0±0,2 ^a	9,2±0,3 ^a	5,6±0,2 ^a	9,7±0,3 ^b	0,1±0,0	1,1±0,0 ^b
<i>Salmonella OMS</i>	6,7±0,2 ^b	6,8±0,2 ^b	6,8±0,2 ^b	8,6±0,3 ^a	6,8±0,2 ^b	8,2±0,2 ^a	0,0±0,0	0,7±0,0 ^{ab}
<i>E. coli 517</i>	7,0±0,2 ^b	7,0±0,2 ^b	6,9±0,2 ^b	10,6±0,3 ^b	7,2±0,2 ^b	8,2±0,2 ^a	0,1±0,0	0,4±0,0 ^a
<i>Staphylococcus aureus76</i>	7,3±0,2 ^b	7,5±0,2 ^b	7,0±0,2 ^b	9,8±0,3 ^{ab}	7,5±0,2 ^b	8,3±0,2 ^a	0,0±0,0	0,5±0,0 ^a

X±DE. Control t0: Recuento inicial utilizando como fuente de carbono glucosa. AX-c t0: Recuento inicial utilizando como fuente de carbono AX-c. AXH t0: Recuento inicial utilizando como fuente de carbono AXH. Control 24h: Recuento a las 24h de incubación utilizando como fuente de carbono glucosa. AX-c 24h: Recuento a las 24h de incubación utilizando como fuente de carbono AX-c. AXH: Recuento a las 24h de incubación utilizando como fuente de carbono AXH. RGR AX-c: Grado de crecimiento relativo utilizando como fuente de carbono AX-c. RGR AXH: grado de crecimiento relativo utilizando como fuente de carbono AXH. Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas (p-valor<0,05).

Numerosos estudios muestran un efecto estimulante de los AX sobre las poblaciones de Bifidobacteria (Lynch et al. 2021). Se han observado efectos positivos similares en cultivos puros (Martínez-López et al. 2016), fermentaciones *in vitro* en batch y en modelos intestinales (Hughes et al 2007, Reis et al. 2014), y en estudios de intervención humana (Cloetens et al. 2010, François et al. 2012, Müller et al. 2020), independientemente de factores como las características fisicoquímicas de la fibra y la dosis o la duración del tratamiento.

En cuanto al efecto antimicrobiano sobre microorganismos patógenos, Moreirinha et al. (2020) demostraron el poder antimicrobiano de films elaborados a partir de AX de HM, celulosa nanofibrilada, y con el agregado de ácido ferúlico (75 mg g⁻¹ de film) o AX ferulados (75 mg g⁻¹ de film). Estos films lograron inhibir el crecimiento de *S. aureus* y *E. coli*. Estos resultados fueron corroborados por estudios previos donde las soluciones de AF también demostraron actividad antibacteriana contra

estas dos cepas bacterianas (Borges et al. 2013; Daglia, 2012). Una posible explicación de estos efectos es que el **AF** promueve cambios significativos en las superficies celulares, tales como modificaciones en la hidrofobicidad, la carga y la fuga de K^+ y la posterior muerte celular.

VII.4.10-Conclusiones parciales

La hidrólisis enzimática de los AX influyó en las características fisicoquímicas disminuyendo el tamaño de las moléculas y su viscosidad, aumentando su carga superficial y mejorando su dispersión en agua. Además, si bien no se modificó el contenido de **AF**, los hidrolizados presentaron mejores propiedades antioxidantes, probablemente relacionado con el menor tamaño de las moléculas y un potencial efecto prebiótico.

Respecto al tratamiento con ultrasonido en medio ácido, no resultó un método eficiente de modificación, y los resultados fueron dependientes del tiempo de tratamiento.

Conclusiones

La hez de malta se trata de un subproducto de la industria cervecera de bajo costo, que por su contenido de proteínas, carbohidratos no digeribles y compuestos fenólicos puede aprovecharse para la obtención de biomoléculas con alto valor agregado. Se exploraron diferentes procedimientos, a fin de lograr un proceso de bio-refinería que recupere estos compuestos con un buen rendimiento. Se logró escalar el proceso a nivel laboratorio a escala semi-piloto, demostrando que el proceso es escalable y aplicable.

A partir de la evaluación de las propiedades fisicoquímicas del concentrado de arabinosilanos se determinó que, si bien no presentó propiedades gelificantes, mostró buena solubilidad en agua, capacidad espesante, y puede ser utilizado como material de pared para encapsular péptidos bioactivos ayudando a mantener parcialmente su bioactividad luego de una digestión gastrointestinal *in vitro*. Además, se obtuvieron microcápsulas de calcio y arabinosilanos que no sólo podrían utilizarse como suplementos de calcio, sino también como suplementos prebióticos, con buena bioaccesibilidad de compuestos fenólicos que aportarían propiedades beneficiosas para la salud. Asimismo, se desarrolló un fortificante de hierro que podría aplicarse a matrices de cereales. Por otra parte, el concentrado de arabinosilanos presentó un alto contenido de ácido ferúlico y propiedades antioxidantes y antidiabetogénicas.

Se modificó la estructura a través de la hidrólisis enzimática con lo que se logró disminuir su tamaño y viscosidad, sin modificar el contenido de ácido ferúlico, y mejorando las propiedades antioxidantes y con potencial prebiótico. De esta manera fue posible la modificación estructural de los arabinosilanos generando un nuevo producto con potenciales propiedades beneficiosa para la salud.

Asimismo, las fracciones de compuestos fenólicos y lignina presentaron un alto contenido de ácido ferúlico, principal compuesto fenólico presente en la hez de malta, que tiene un alto potencial de uso como antioxidante en alimentos, en medicina y en cosmética.

Además, se obtuvo celulosa microcristalina a partir del residuo de extracción de arabinosilanos, completándose así un proceso de biorefinería completo de la hez de

malta que permitió la recuperación de las siguientes moléculas: las proteínas, los arabinosilanos, los compuestos fenólicos, la lignina y la celulosa.

Finalmente debe destacarse el potencial de este proceso de biorefinería para recuperar biomoléculas de alto valor, facilitando el uso de residuos en las cervecerías, y creando un proceso industrial más sostenible.

Bibliografía

- Aastrup, S., Outtrup, H., & Erdal, K. (1984). Location of the proanthocyanidins in the barley grain. *Carlsberg Research Communications*, 49, 105-109.
- Abrams, S. A., Griffin, I. J., Hawthorne, K. M., Liang, L., Gunn, S. K., Darlington, G., & Ellis, K. J. (2005). A combination of prebiotic short-and long-chain inulin-type fructans enhances calcium absorption and bone mineralization in young adolescents. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 82(2), 471-476.
- Adom, K. K., & Liu, R. H. (2002). Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 6182-6187.
- Aguedo, M., Ruiz, H. A., & Richel, A. (2015). Non-alkaline solubilization of arabinoxylans from destarched wheat bran using hydrothermal microwave processing and comparison with the hydrolysis by an endoxylanase. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 96, 72-82.
- Ahmad, Z., Rozaizan, N. N., Rahman, R., Mohamad, A. F., & Ismail, W. I. N. W. (2016). Isolation and characterization of microcrystalline cellulose (MCC) from rice husk (RH). In *MATEC Web of Conferences* (Vol. 47, p. 05013). EDP Sciences.
- Alhaji Mohammed, M., Basirun, W. J., Abd Rahman, N. M. M., & Salleh, N. (2022). The effect of particle size of almond shell powders, temperature and time on the extraction of cellulose. *Journal of Natural Fibers*, 19(13), 5577-5587.
- Aliyu, S., & Bala, M. (2011). Brewer's spent grain: A review of its potentials and applications. *African Journal of Biotechnology*, 10(3), 324-331.
- Alves, J. A. A., Dos Santos, M. D. L., Morais, C. C., Ascheri, J. L. R., Signini, R., Dos Santos, D. M. & Ascheri, D. P. R. (2019). Sorghum straw: Pulping and bleaching process optimization and synthesis of cellulose acetate. *International Journal of Biological Macromolecules*, 135, 877-886.
- Anani, J., Noby, H., Zkria, A., Yoshitake, T., & ElKady, M. (2022). Monothetic analysis and response surface methodology optimization of calcium alginate microcapsules characteristics. *Polymers*, 14(4), 709.
- Andrewartha, K. A., Phillips, D. R., & Stone, B. A. (1979). Solution properties of wheat-flour arabinoxylans and enzymically modified arabinoxylans. *Carbohydrate Research*, 77(1), 191-204.
- Anson, N. M., Hemery, Y. M., Bast, A., & Haenen, G. R. (2012). Optimizing the bioactive potential of wheat bran by processing. *Food and Function*, 3(4), 362-375.
- Anson, N., Aura, A. M., Selinheimo, E., Mattila, I., Poutanen, K., Van Den Berg, R., & Haenen, G. R. (2011). Bioprocessing of wheat bran in whole wheat bread increases the bioavailability of phenolic acids in men and exerts antiinflammatory effects ex vivo. *The Journal of Nutrition*, 141(1), 137-143.
- Antonopoulou, I., Sapountzaki, E., Rova, U., & Christakopoulos, P. (2022). Ferulic acid from plant biomass: A phytochemical with promising antiviral properties. *Frontiers in Nutrition*, 8, 777576.

- Antov, M. G., & Dordevic, T. R. (2017). Environmental-friendly technologies for the production of antioxidant xylooligosaccharides from wheat chaff. *Food Chemistry*, *235*, 175-180.
- Aquino, M. E., de Medina, F. S., Drago, S. R., Martínez-Augustin, O., & Cian, R. E. (2024b). Gastrointestinal digestion and colonic fermentation of brewer's spent yeast peptides modulate their antioxidant properties and effect on intestinal barrier. *Food Bioscience*, *60*, 104294.
- Aquino, M. E., Drago, S. R., de Medina, F. S., Martínez-Augustin, O., & Cian, R. E. (2024a). Anti-diabetic properties of brewer's spent yeast peptides. In vitro, in silico and ex vivo study after simulated gastrointestinal digestion. *Food & Function*, *15*(7), 3778-3790.
- Arazo-Rusindo, M., Reaño, G., Pérez-Bravo, F., Castillo-Valenzuela, O., Benavides-Valenzuela, S., Zúñiga, R. N., & Mariotti-Celis, M. S. (2023). Redesign of an instant legume soup for older adults with increased micronutrients bioaccessibility and adequate sensory attributes by using encapsulation. *LWT*, *180*, 114676.
- Aspromonte, S. G., Tavella, M. A., Albarracín, M., & Boix, A. V. (2023). Mesoporous bio-materials synthesized with corn and potato starches applied in CO₂ capture. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *11*(4), 109542.
- Association of Official Analytical Chemists (1995). Official Methods of Analysis, 16th ed. Horwitz W Ed Washington, DC: AOAC.
- Azadfar, M., Gao, A. H., Bule, M. V., & Chen, S. (2015). Structural characterization of lignin: A potential source of antioxidants guaiacol and 4-vinylguaiacol. *International Journal of Biological Macromolecules*, *75*, 58-66.
- Bacic, A., & Stone, B. A. (1981). Isolation and ultrastructure of aleurone cell walls from wheat and barley. *Functional Plant Biology*, *8*(5), 453-474.
- Bajaj, S. R., & Singhal, R. S. (2019). Effect of extrusion processing and hydrocolloids on the stability of added vitamin B12 and physico-functional properties of the fortified puffed extrudates. *LWT*, *101*, 32-39.
- Barbosa, J. A., Abdelsadig, M. S., Conway, B. R., & Merchant, H. A. (2019). Using zeta potential to study the ionisation behaviour of polymers employed in modified-release dosage forms and estimating their pKa. *International Journal of Pharmaceutics: X*, *1*, 100024.
- Barbu, M. C., Montecuccoli, Z., Förg, J., Barbeck, U., Klímek, P., Petutschnigg, A., & Tudor, E. M. (2021). Potential of brewer's spent grain as a potential replacement of wood in pmdi, uf or muf bonded particleboard. *Polymers*, *13*(3), 319.
- Bartolomé, B., Santos, M., Jiménez, J. J., Del Nozal, M. J., & Gómez-Cordovés, C. (2002). Pentoses and hydroxycinnamic acids in brewer's spent grain. *Journal of Cereal Science*, *36*(1), 51-58.
- Bastos, R., Coelho, E., & Coimbra, M. A. (2018). Arabinoxylans from cereal by-products: Insights into structural features, recovery, and applications. *Sustainable Recovery and Reutilization of Cereal Processing by-products*, 227-251. Woodhead Publishing.
- Beaugrand, J., Chambat, G., Wong, V. W., Goubet, F., Rémond, C., Paës, G., & Chabbert, B. (2004). Impact and efficiency of GH10 and GH11 thermostable

- endoxylanases on wheat bran and alkali-extractable arabinoxylans. *Carbohydrate Research*, 339(15), 2529-2540.
- Becraft, P. W., & Yi, G. (2011). Regulation of aleurone development in cereal grains. *Journal of Experimental Botany*, 62(5), 1669-1675.
- Beggs, M. R., Bhullar, H., Dimke, H., & Alexander, R. T. (2022). The contribution of regulated colonic calcium absorption to the maintenance of calcium homeostasis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 220, 106098.
- Benzie IF, Strain JJ. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
- Bergmans, M. E. F., Beldman, G., Gruppen, H., & Voragen, A. G. J. (1996). Optimization of the selective extraction of glucurono-arabinoxylans from wheat bran: Use of barium and calcium hydroxide solutions at elevated temperatures. *Journal of Cereal Science*, 23, 235-245.
- Biely, P., Singh, S., & Puchart, V. (2016). Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: state of the art. *Biotechnology Advances*, 34(7), 1260-1274.
- Blanco-Rojo, R., & Vaquero, M. P. (2019). Iron bioavailability from food fortification to precision nutrition. A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 51, 126-138.
- Bonato, S. V., de Jesus Pacheco, D. A., ten Caten, C. S., & Caro, D. (2022). The missing link of circularity in small breweries’ value chains: Unveiling strategies for waste management and biomass valorization. *Journal of Cleaner Production*, 336, 130275.
- Boonchuay, P., Wongpoomchai, R., Jaturasitha, S., Mahatheeranont, S., Watanabe, M., & Chaiyaso, T. (2021). Prebiotic properties, antioxidant activity, and acute oral toxicity of xylooligosaccharides derived enzymatically from corncob. *Food Bioscience*, 40, 100895.
- Borel, L. D., Lira, T. S., Ribeiro, J. A., Ataíde, C. H., & Barrozo, M. A. (2018). Pyrolysis of brewer’s spent grain: Kinetic study and products identification. *Industrial Crops and Products*, 121, 388-395.
- Borges, A., Ferreira, C., Saavedra, M. J., & Simões, M. (2013). Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 19(4), 256-265.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Bravi, E., Francesco, G. D., Sileoni, V., Perretti, G., Galgano, F., Marconi, O. (2021). Brewing by-product upcycling potential: Nutritionally valuable compounds and antioxidant activity evaluation. *Antioxidants*, 10(2), 165.
- Brennan, M., Shepherd, T., Mitchell, S., Topp, C. F. E., & Hoad, S. P. (2017). Husk to caryopsis adhesion in barley is influenced by pre-and post-anthesis temperatures through changes in a cuticular cementing layer on the caryopsis. *BMC plant biology*, 17, 1-19.

- Brouns, F., Hemery, Y., Price, R., & Anson, N. M. (2012). Wheat aleurone: separation, composition, health aspects, and potential food use. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(6), 553-568.
- Browning, B. L. (1967). The isolation and determination of acetyl and methoxyl groups. *Methods of wood chemistry, vol. II*.
- Bryszewska, M. A., Tomás-Cobos, L., Gallego, E., Villalba, M., Rivera, D., Saa, D. L. T., & Gianotti, A. (2019). In vitro bioaccessibility and bioavailability of iron from breads fortified with microencapsulated iron. *LWT*, 99, 431-437.
- Buffington, J. (2014). The economic potential of brewer's spent grain (BSG) as a biomass feedstock. *Advances in Chemical Engineering and Science*, 2014.
- Burns, P., Alard, J., Hrdý, J., Boutillier, D., Páez, R., Reinheimer, J., Pot, B., Vinderola, G., & Grangette, C. (2017). Spray-drying process preserves the protective capacity of a breast milk-derived *Bifidobacterium lactis* strain on acute and chronic colitis in mice. *Scientific Reports*, 7(1), 43211.
- Caetano-Silva, M. E., Netto, F. M., Bertoldo-Pacheco, M. T., Alegría, A., & Cilla, A. (2021). Peptide-metal complexes: Obtention and role in increasing bioavailability and decreasing the pro-oxidant effect of minerals. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(9), 1470-1489.
- Cañas, S., Tosi, N., Núñez-Gómez, V., Del Rio, D., Mena, P., Martín-Cabrejas, M. A., & Aguilera, Y. (2025). Microbial catabolism of coffee pulp (poly) phenols during in vitro colonic fermentation. *Food Chemistry*, 463, 141354.
- Carrez, D., & Van Leeuwen, P. (2015). Bioeconomy: circular by nature. *The European Files*, 38, 34-35.
- Carvajal-Millan, E., Landillon, V., Morel, M. H., Rouau, X., Doublier, J. L., & Micard, V. (2005). Arabinoxylan gels: Impact of the feruloylation degree on their structure and properties. *Biomacromolecules*, 6(1), 309-317.
- Cassoni, A. C., Costa, P., Vasconcelos, M. W., & Pintado, M. (2022). Systematic review on lignin valorization in the agro-food system: From sources to applications. *Journal of Environmental Management*, 317, 115258.
- Castelluccio, C., Bolwell, G. P., Gerrish, C., & Rice-Evans, C. (1996). Differential distribution of ferulic acid to the major plasma constituents in relation to its potential as an antioxidant. *Biochemical Journal*, 316(2), 691-694.
- Cermeño, M., Stack, J., Tobin, P. R., O'Keeffe, M. B., Harnedy, P. A., Stengel, D. B., & FitzGerald, R. J. (2019). Peptide identification from a *Porphyra dioica* protein hydrolysate with antioxidant, angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV inhibitory activities. *Food & Function*, 10(6), 3421-3429.
- Chávez-Sifontes, M., & Domine, M. E. (2013). Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 4(4), 15-46.
- Chen, H., Chen, Z., Fu, Y., Liu, J., Lin, S., Zhang, Q. & Qin, W. (2019a). Structure, antioxidant, and hypoglycemic activities of arabinoxylans extracted by multiple methods from triticale. *Antioxidants*, 8(12), 584.
- Chen, H., Liu, Y., Yang, T., Chen, D., Xiao, Y., Qin, W., & Huang, Z. (2021). Interactive effects of molecular weight and degree of substitution on biological

activities of arabinoxylan and its hydrolysates from triticale bran. *International Journal of Biological Macromolecules*, 166, 1409-1418.

Chen, J. H., Wang, Y., Pan, J., Lu, L. W., Yu, J., Liu, B., Chen, F., & Deng, H. (2022). Prebiotic Oligosaccharides Enhance Iron Absorption Via Modulation of Protein Expression and Gut Microbiota in a Dose-Response Manner in Iron-Deficient Growing Rats. *Molecular Nutrition & Food Research*, 66(10), 2101064.

Chen, Z., Li, S., Fu, Y., Li, C., Chen, D., & Chen, H. (2019b). Arabinoxylan structural characteristics, interaction with gut microbiota and potential health functions. *Journal of Functional Foods*, 54, 536-551.

Chitindingu, K., Benhura, M. A., & Muchuweti, M. (2015). *In vitro* bioaccessibility assessment of phenolic compounds from selected cereal grains: A prediction tool of nutritional efficiency. *LWT-Food Science and Technology*, 63(1), 575-581.

Christensen, K. L., Hedemann, M. S., Lærke, H. N., Jørgensen, H., Mutt, S. J., Herzig, K. H., & Bach Knudsen, K. E. (2013). Concentrated arabinoxylan but not concentrated β -glucan in wheat bread has similar effects on postprandial insulin as whole-grain rye in porto-arterial catheterized pigs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(32), 7760-7768.

Cian, R. E., Campos-Soldini, A., Chel-Guerrero, L., Drago, S. R., & Betancur-Ancona, D. (2019). Bioactive Phaseolus lunatus peptides release from maltodextrin/gum arabic microcapsules obtained by spray drying after simulated gastrointestinal digestion. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(6), 2002-2009.

Cian, R. E., Garzón, A. G., Ancona, D. B., Guerrero, L. C., & Drago, S. R. (2015). Hydrolyzates from Pyropia columbina seaweed have antiplatelet aggregation, antioxidant and ACE I inhibitory peptides which maintain bioactivity after simulated gastrointestinal digestion. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 881-888.

Cian, R. E., Garzón, A. G., Martínez-Augustin, O., Botto, C. C., Drago, S. R. (2018a). Antithrombotic activity of brewers' spent grain peptides and their effects on blood coagulation pathways. *Plant Foods for Human Nutrition*, 73(3), 241-246

Cian, R. E., Hernández-Chirlaque, C., Gómez-Belmonte, R., Drago, S. R., Sánchez de Medina, F., Martínez-Augustin, O. (2018b). Green alga Ulva spp. hydrolysates and their peptide fractions regulate cytokine production in splenic macrophages and lymphocytes involving the TLR4-NF κ B/MAPK pathways. *Marine Drugs*, 7, 235.

Cian, R. E., Martínez-Augustin, O., & Drago, S. R. (2012). Bioactive properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis from protein byproducts of Porphyra columbina. *Food Research International*, 49(1), 364-372.

Cian, R. E., Nardo, A. E., Garzón, A. G., Añon, M. C., & Drago, S. R. (2022). Identification and in silico study of a novel dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptide derived from green seaweed Ulva spp. hydrolysates. *LWT*, 154, 112738.

Cian, R. E., Proaño, J. L., Salgado, P. R., Mauri, A. N., & Drago, S. R. (2021). High iron bioaccessibility from co-microencapsulated iron/ascorbic acid using chelating polypeptides from brewers' spent grain protein as wall material. *LWT*, 139, 110579.

Cian, R. E., Salgado, P. R., Mauri, A. N., & Drago, S. R. (2020). Pyropia columbina phycocolloids as microencapsulating material improve bioaccessibility of brewers' spent grain peptides with ACE-I inhibitory activity. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(3), 1311-1317.

- Clifford, M. N. (1999). Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(3), 362-372.
- Cloetens, L., Broekaert, W. F., Delaedt, Y., Ollevier, F., Courtin, C. M., Delcour, J. A., Rutgeerts, P., & Verbeke, K. (2010). Tolerance of arabinoxylan-oligosaccharides and their prebiotic activity in healthy subjects: a randomised, placebo-controlled cross-over study. *British Journal of Nutrition*, 103(5), 703-713.
- Codina-Torrella, I., Rodero, L., & Almajano, M. P. (2021). Brewing by-products as a source of natural antioxidants for food preservation. *Antioxidants*, 10(10), 1512.
- Connolly, A., Cermeño, M., Alashi, A. M., Aluko, R. E., & FitzGerald, R. J. (2021). Generation of phenolic-rich extracts from brewers' spent grain and characterisation of their in vitro and in vivo activities. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 68, 102617.
- Crozier, A., Del Rio, D., & Clifford, M. N. (2010). Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(6), 446-467.
- Curtis, E. M., Moon, R. J., Dennison, E. M., Harvey, N. C., & Cooper, C. (2016). Recent advances in the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Clinical Medicine*, 16(4), 360.
- Cyran, M., Courtin, C. M., & Delcour, J. A. (2004). Heterogeneity in the fine structure of alkali-extractable arabinoxylans isolated from two rye flours with high and low breadmaking quality and their coexistence with other cell wall components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(9), 2671-2680.
- Czubaszek, A., Wojciechowicz-Budzisz, A., Szychaj, R., & Kawa-Rygielska, J. (2021). Baking properties of flour and nutritional value of rye bread with brewer's spent grain. *LWT*, 150, 111955.
- da Silva, E. D. N., de Farias, L. O., & Cadore, S. (2018). The total concentration and bioaccessible fraction of nutrients in purées, instant cereals and infant formulas by ICP OES: A study of Dietary Recommended Intakes and the importance of using a standardized in vitro digestion method. *Journal of Food Composition and Analysis*, 68, 65-72.
- Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 174-181.
- de Jong, E., Higson, A., Walsh, P., & Wellisch, M. (2012). Bio-based chemicals value added products from biorefineries. *IEA Bioenergy, Task42 Biorefinery*, 34, 1-33.
- De Koker, S., De Cock, L. J., Rivera-Gil, P., Parak, W. J., Velty, R. A., Vervaet, C., & De Geest, B. G. (2011). Polymeric multilayer capsules delivering biotherapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(9), 748-761.
- de la Rosa, L. A., Moreno-Escamilla, J. O., Rodrigo-García, J., & Alvarez-Parrilla, E. (2019). Phenolic compounds. *Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables* (pp. 253-271). Woodhead publishing.
- Dealy, J. M., & Wissbrun, K. F. (2012). Melt rheology and its role in plastics processing: theory and applications. *Springer Science & Business Media*.
- Debiagi, F., Madeira, T. B., Nixdorf, S. L., & Mali, S. (2020). Pretreatment efficiency using autoclave high-pressure steam and ultrasonication in sugar production from liquid

hydrolysates and access to the residual solid fractions of wheat bran and oat hulls. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 190, 166-181.

Debnath, B., Haldar, D., & Purkait, M. K. (2021). A critical review on the techniques used for the synthesis and applications of crystalline cellulose derived from agricultural wastes and forest residues. *Carbohydrate Polymers*, 273, 118537.

Dehnavi, G. Z., Laucerica, J. L., Rodriguez, D., Beaton, M., Taherzadeh, M. J., & Martin, C. (2011). Fractionation of the main components of barley spent grains from a microbrewery. *Cellulose Chemistry and Technology*, 45(5), 339.

Del Río, J. C., Marques, G., Rencoret, J., Martínez, Á. T., & Gutiérrez, A. (2007). Occurrence of naturally acetylated lignin units. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(14), 5461-5468.

Doner, L. W., & Hicks, K. B. (1997). Isolation of hemicellulose from corn fiber by alkaline hydrogen peroxide extraction. *Cereal Chemistry*, 74(2), 176-181.

Donkor, O. N., Stojanovska, L., Ginn, P., Ashton, J., & Vasiljevic, T. (2012). Germinated grains—Sources of bioactive compounds. *Food Chemistry*, 135(3), 950-959.

Dordevic, T., Milosević, M., & Antov, M. (2021). Advance diversity of enzymatically modified arabinoxylan from wheat chaff. *Food Chemistry*, 339, 128093.

Drago, S. R., & Valencia, M. E. (2002). Effect of Fermentation on Iron, Zinc, and Calcium Availability from Iron-fortified Dairy Products. *Journal of Food Science*, 67(8), 3130-3134.

Drago, S. R., Binaghi, M., & Valencia, M. E. (2005). Effect of gastric digestion pH on iron, zinc, and calcium dialyzability from preterm and term starting infant formulas. *Journal of Food Science*, 70(2), S107-S112.

Dragone, G., Almeida e Silva, J. B., Silva, D. P., & Santos, L. (2002). Elaboración de cervezas en Brasil: proceso de altas densidades. *Industria de Alimentos*, 5, 44-46.

DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356.

Ems T, St Lucia K, Huecker MR., (2023) Biochemistry, Iron Absorption. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). PMID: 28846259.

Etcheverry, P., Grusak, M. A., & Fleige, L. E. (2012). Application of in vitro bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B6, B12, D, and E. *Frontiers in Physiology*, 3, 317.

Eugenio, M. E., Martín-Sampedro, R., Santos, J. I., Wicklein, B., & Ibarra, D. (2021). Chemical, thermal and antioxidant properties of lignins solubilized during Soda/AQ pulping of orange and olive tree pruning residues. *Molecules*, 26(13), 3819.

European Commission, 2015. Closing the Loop - an EU Action Plan for the Circular Economy. European Commission, Brussels.

European Commission, 2012. Innovating for Sustainable Growth: A Bioeconomy for Europe. European Commission: Brussels, Belgium.

Evers, A. D., O'brien, L., & Blakeney, A. B. (1999). Cereal structure and composition. *Australian Journal of Agricultural Research*, 50(5), 629-650.

- Evers, T., & Millar, S. (2002). Cereal grain structure and development: some implications for quality. *Journal of Cereal Science*, *36*(3), 261-284.
- Fadel, A., Mahmoud, A. M., Ashworth, J. J., Li, W., Ng, Y. L., & Plunkett, A. (2018). Health-related effects and improving extractability of cereal arabinoxylans. *International Journal of Biological Macromolecules*, *109*, 819-831.
- Fan, J., Jin, Y., Liu, J., & Fei, X. (2024). Studies on the degradation pattern of wheat malt endo-1, 4- β -xylanase on wheat-derived arabinoxylans. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
- Faulds, C. B., Collins, S., Robertson, J. A., Treimo, J., Eijsink, V. G., Hinz, S. W., Schols, H. A., Buchert, J., & Waldron, K. W. (2009). Protease-induced solubilisation of carbohydrates from brewers' spent grain. *Journal of Cereal Science*, *50*(3), 332-336.
- Feofilova, E. P., & Mysyakina, I. S. (2016). Lignin: Chemical structure, biodegradation, and practical application (a review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, *52*, 573-581.
- Fernandes, P. A., & Coimbra, M. A. (2023). The antioxidant activity of polysaccharides: A structure-function relationship overview. *Carbohydrate Polymers*, 120965.
- Filiponi, M. P., Gaigher, B., Caetano-Silva, M. E., Alvim, I. D., & Pacheco, M. T. B. (2019). Microencapsulation performance of Fe-peptide complexes and stability monitoring. *Food Research International*, *125*, 108505.
- Fincher, G. B., & Stone, B. A. (1986). Cell walls and their components in cereal grain technology. *Advances in Cereal Science and Technology*, *8*, 207-295.
- François, I. E., Lescroart, O., Veraverbeke, W. S., Marzorati, M., Possemiers, S., Evenepoel, P., Hamer, H., Houben, E., Windey, K., Welling, G. W., Delcour, J. A., Courtin, C. M., Verbeke, K., & Broekaert, W. F. (2012). Effects of a wheat bran extract containing arabinoxylan oligosaccharides on gastrointestinal health parameters in healthy adult human volunteers: a double-blind, randomised, placebo-controlled, cross-over trial. *British Journal of Nutrition*, *108*(12), 2229-2242.
- French, A. D. (2017). Glucose, not cellobiose, is the repeating unit of cellulose and why that is important. *Cellulose*, *24*, 4605-4609.
- French, A. D., Concha, M., Dowd, M. K., & Stevens, E. D. (2014). Electron (charge) density studies of cellulose models. *Cellulose*, *21*, 1051-1063.
- French, A. D., Montgomery, D. W., Prevost, N. T., Edwards, J. V., & Woods, R. J. (2021). Comparison of cellooligosaccharide conformations in complexes with proteins with energy maps for cellobiose. *Carbohydrate Polymers*, *264*, 118004.
- Gao, H. L., Ding, B., Yi, L., Cheng, P., Liao, D. Z., Yan, S. P., & Jiang, Z. H. (2005). Syntheses and structures of 1D and 2D coordination polymers derived from pyridine-2, 4, 6-tricarboxylic acid. *Inorganic Chemistry Communications*, *8*(2), 151-154.
- García, A., Spigno, G., & Labidi, J. (2017). Antioxidant and biocide behaviour of lignin fractions from apple tree pruning residues. *Industrial Crops and Products*, *104*, 242-252.
- García-García, G., Woolley, E., Rahimifard, S., Colwill, J., White, R., & Needham, L. (2017). A methodology for sustainable management of food waste. *Waste and Biomass Valorization*, *8*(6), 2209-2227.

- García-Vaquero, M., & Hayes, M. (2016). Red and green macroalgae for fish and animal feed and human functional food development. *Food Reviews International*, 32(1), 15-45.
- García-Vaquero, M., Mora, L., & Hayes, M. (2019). In vitro and in silico approaches to generating and identifying angiotensin-converting enzyme I inhibitory peptides from green macroalga *Ulva lactuca*. *Marine Drugs*, 17(4), 204.
- Garzón, A. G., & Drago, S. R. (2018). Free α -amino acids, γ -Aminobutyric acid (GABA), phenolic compounds and their relationships with antioxidant properties of sorghum malted in different conditions. *Journal of Food Science and Technology*, 55, 3188-3198.
- Garzón, A. G., Cian, R. E., Aquino, M. E., & Drago, S. R. (2020a). Isolation and identification of cholesterol esterase and pancreatic lipase inhibitory peptides from brewer's spent grain by consecutive chromatography and mass spectrometry. *Food & Function*, 11, 4994.
- Garzón, A. G., Cian, R. E., & Drago, S. R. (2023). Effects of agar-carrageenan wall materials and core-to-wall material ratio on physicochemical properties and in vitro bioaccessibility of microencapsulated bioactive peptides. *Food Hydrocolloids*, 139, 108570.
- Garzón, A. G., Pontoni, S. M., Mamone, G., Drago, S. R., & Cian, R. E. (2024). Xanthan gum and pectin as beverage stabilizers reduce the digestive enzyme hydrolysis of antioxidant and antihypertensive peptides obtained from a brewery byproduct. *Food Research International*, 177, 113836.
- Garzón, A. G., Van de Velde, F., & Drago, S. R. (2020b). Gastrointestinal and colonic in vitro bioaccessibility of γ -aminobutyric acid (GABA) and phenolic compounds from novel fermented sorghum food. *LWT*, 130, 109664.
- Gellerstedt, G., & Henriksson, G. (2008). Lignins: major sources, structure and properties. *Monomers, Polymers and Composites From Renewable Resources*, 201-224.
- Gemen, R., de Vries, J. F., & Slavin, J. L. (2011). Relationship between molecular structure of cereal dietary fiber and health effects: focus on glucose/insulin response and gut health. *Nutrition Reviews*, 69(1), 22-33.
- Geng, L., Li, M., Zhang, G., & Ye, L. (2022). Barley: a potential cereal for producing healthy and functional foods. *Food Quality and Safety*, 6, fya012.
- Gilbert, B. C., King, D. M., & Thomas, C. B. (1984). The oxidation of some polysaccharides by the hydroxyl radical: an ESR investigation. *Carbohydrate Research*, 125(2), 217-235.
- Giorgetti, A., Husmann, F. M., Zeder, C., Herter-Aeberli, I., & Zimmermann, M. B. (2022). Prebiotic galacto-oligosaccharides and fructo-oligosaccharides, but not acacia gum, increase iron absorption from a single high-dose ferrous fumarate supplement in iron-depleted women. *The Journal of Nutrition*, 152(4), 1015-1021.
- Gírio, F. M., Carvalheiro, F., Duarte, L. C., & Bogel-Lukasik, R. (2012). Deconstruction of the hemicellulose fraction from lignocellulosic materials into simple sugars. *D-Xylitol: Fermentative Production, Application and Commercialization*, 3-37.
- Gnanasekharan, V., Shewfelt, R. L., & Chinnan, M. S. (1992). Detection of color changes in green vegetables. *Journal of Food Science*, 57(1), 149-154.

- Gong, L., Chi, J., Zhang, Y., Wang, J., & Sun, B. (2019). In vitro evaluation of the bioaccessibility of phenolic acids in different whole wheats as potential prebiotics. *LWT*, *100*, 435-443.
- González-Aguilar, G. A., Blancas-Benítez, F. J., & Sáyago-Ayerdi, S. G. (2017). Polyphenols associated with dietary fibers in plant foods: Molecular interactions and bioaccessibility. *Current Opinion in Food Science*, *13*, 84-88.
- Gruppen, H., Hamer, R. J., & Voragen, A. G. J. (1991). Barium hydroxide as a tool to extract pure arabinoxylans from water-insoluble cell wall material of wheat flour. *Journal of Cereal Science*, *13*(3), 275-290.
- Gullón Estévez, P., Salazar, N., González Muñoz, M. J., Gueimonde Fernández, M., Ruas-Madiedo, P., González de los Reyes-Gavilán, C., & Parajó, J. C. (2011). Assessment on the fermentability of xylooligosaccharides from rice husks. *Bioresources* *6*(3), 3096-3114.
- Hamdani, A. M., & Wani, I. A. (2017). Guar and Locust bean gum: Composition, total phenolic content, antioxidant and antinutritional characterisation. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, *11*, 53-59.
- Hawkins, C. L., & Davies, M. J. (1996). Direct detection and identification of radicals generated during the hydroxyl radical-induced degradation of hyaluronic acid and related materials. *Free Radical Biology and Medicine*, *21*(3), 275-290.
- Hayakari, M., Kondo, Y., & Izumi, H. (1978). A rapid and simple spectrophotometric assay of angiotensin-converting enzyme. *Analytical Biochemistry*, *84*(2), 361-369.
- He, W., Li, X., Ding, K., Li, Y., & Li, W. (2019). Ascorbic acid can reverse the inhibition of phytic acid, sodium oxalate and sodium silicate on iron absorption in Caco-2 cells. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, *88*(1-2), 65-72.
- Heaney, R. P. (2013). Dairy intake, dietary adequacy, and lactose intolerance. *Advances in Nutrition*, *4*(2), 151-156.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *13*(10), 572-584.
- Hernanz, D., Nuñez, V., Sancho, A. I., Faulds, C. B., Williamson, G., Bartolomé, B., & Gómez-Cordovés, C. (2001). Hydroxycinnamic acids and ferulic acid dehydrodimers in barley and processed barley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(10), 4884-4888.
- Hetemäki, L., Hanewinkel, M., Muys, B., Ollikainen, M., Palahí, M., Trasobares, A., & Potočník, J. (2017). *Leading the way to a European circular bioeconomy strategy* (Vol. 5, p. 52). Joensuu, Finland: European Forest Institute.
- Hirschler, R. (2012). Whiteness, yellowness, and browning in food colorimetry: A Critical Review. *Color in Food: Technological and Psychophysical Aspects. Editorial JL Caivano & Buera MP EE. UU*, 93-104.
- Holtkjølen, A. K., Kinitz, C., & Knutsen, S. H. (2006). Flavanol and bound phenolic acid contents in different barley varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(6), 2253-2260.
- Hu, X., Guo, J., Wang, Y., & Liu, C. (2009). Synthesis, infrared spectra, thermal analyses and structural studies of half-sandwich Fe (III)/Fe (II) complex containing

- pyridine-2, 6-dicarboxylate and 1, 10-phenanthroline. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 74(1), 48-51.
- Huang, C., Tao, Y., Li, M., Zhang, W., Fan, Y., & Yong, Q. (2018). Synthesis and characterization of an antioxidative galactomannan–iron (III) complex from *Sesbania* seed. *Polymers*, 11(1), 28.
- Hughes, S. A., Shewry, P. R., Li, L., Gibson, G. R., Sanz, M. L., & Rastall, R. A. (2007). In vitro fermentation by human fecal microflora of wheat arabinoxylans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(11), 4589-4595.
- Hurrell, R. F. (2021). Iron fortification practices and implications for iron addition to salt. *The Journal of Nutrition*, 151, 3S-14S.
- Hurrell, R., & Egli, I. (2010). Iron bioavailability and dietary reference values. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91(5), 1461-1467.
- Husmann, F. M., Zimmermann, M. B., & Herter-Aeberli, I. (2022). The effect of prebiotics on human iron absorption: a review. *Advances in Nutrition*, 13(6), 2296-2304.
- Institute of Medicine (US) Panel on Micronutrients. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Washington (DC): National Academies Press (US); 2001. 9, Iron. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK222309/>
- Iqbal, M. S., Akbar, J., Hussain, M. A., Saghir, S., & Sher, M. (2011). Evaluation of hot-water extracted arabinoxylans from ispaghula seeds as drug carriers. *Carbohydrate polymers*, 83(3), 1218-1225.
- Ivanova, K., Denkova, R., Kostov, G., Petrova, T., Bakalov, I., Ruscova, M., & Penov, N. (2017). Extrusion of brewers' spent grains and application in the production of functional food. Characteristics of spent grains and optimization of extrusion. *Journal of the Institute of Brewing*, 123(4), 544-552.
- Izydorczyk, M. S. (2009). Arabinoxylans. *Handbook of Hydrocolloids*; Phillips, GO; Williams, 653-692.
- Izydorczyk, M. S., & Biliaderis, C. G. (1992). Effect of molecular size on physical properties of wheat arabinoxylan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(4), 561-568.
- Izydorczyk, M. S., & Biliaderis, C. G. (1995). Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers*, 28(1), 33-48.
- Jadhav, S. J., Lutz, S. E., Ghorpade, V. M., & Salunkhe, D. K. (1998). Barley: chemistry and value-added processing. *Critical Reviews in Food Science*, 38(2), 123-171.
- Jaguey-Hernández, Y., Tapia-Ignacio, C., Aguilar-Arteaga, K., González-Olivares, L. G., Castañeda-Ovando, E. P., Cruz-Cansino, N., & Castañeda-Ovando, A. (2022). Thermoplastic biofilms obtained from an arabinoxylan-rich fraction from brewers' spent grain: physicochemical characterization and thermal analysis. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-13.

- Jaiswal, A., & Lakshmi, A. J. (2022). Maximising the bioaccessibility of iron and zinc of a complementary food mix through multiple strategies. *Food Chemistry*, *372*, 131286.
- Janve, M., & Singhal, R. S. (2018). Fortification of puffed rice extrudates and rice noodles with different calcium salts: Physicochemical properties and calcium bioaccessibility. *LWT*, *97*, 67-75.
- Jeroense, F. M., Michel, L., Zeder, C., Herter-Aeberli, I., & Zimmermann, M. B. (2019). Consumption of galacto-oligosaccharides increases iron absorption from ferrous fumarate: a stable iron isotope study in iron-depleted young women. *The Journal of nutrition*, *149*(5), 738-746.
- Jeroense, F. M., Zeder, C., Zimmermann, M. B., & Herter-Aeberli, I. (2020). Acute consumption of prebiotic galacto-oligosaccharides increases iron absorption from ferrous fumarate, but not from ferrous sulfate and ferric pyrophosphate: stable iron isotope studies in iron-depleted young women. *The Journal of nutrition*, *150*(9), 2391-2397.
- Jiang, C., Xiong, Q., Gan, D., Jiao, Y., Liu, J., Ma, L., & Zeng, X. (2013). Antioxidant activity and potential hepatoprotective effect of polysaccharides from *Cyclina sinensis*. *Carbohydrate Polymers*, *91*(1), 262-268.
- Jiang, Y., Bai, X., Lang, S., Zhao, Y., Liu, C., & Yu, L. (2019). Optimization of ultrasonic-microwave assisted alkali extraction of arabinoxylan from the corn bran using response surface methodology. *International Journal of Biological Macromolecules*, *128*, 452-458.
- Johar, N., Ahmad, I., & Dufresne, A. (2012). Extraction, preparation and characterization of cellulose fibres and nanocrystals from rice husk. *Industrial Crops and Products*, *37*(1), 93-99.
- Ju, X., Bowden, M., Brown, E. E., & Zhang, X. (2015). An improved X-ray diffraction method for cellulose crystallinity measurement. *Carbohydrate Polymers*, *123*, 476-481.
- Juániz, I., Ludwig, I. A., Bresciani, L., Dall'Asta, M., Mena, P., Del Rio, D., & de Pena, M. P. (2017). Bioaccessibility of (poly) phenolic compounds of raw and cooked cardoon (*Cynara cardunculus* L.) after simulated gastrointestinal digestion and fermentation by human colonic microbiota. *Journal of Functional Foods*, *32*, 195-207.
- Kai, D., Tan, M. J., Chee, P. L., Chua, Y. K., Yap, Y. L., & Loh, X. J. (2016). Towards lignin-based functional materials in a sustainable world. *Green Chemistry*, *18*(5), 1175-1200.
- Kale, M. S., Yadav, M. P., Chau, H. K., & Hotchkiss Jr, A. T. (2018). Molecular and functional properties of a xylanase hydrolysate of corn bran arabinoxylan. *Carbohydrate Polymers*, *181*, 119-123.
- Kale, M.S., Yadav, M.P., Hicks, K.B., Hanah, K.A. (2015) COncentration and shear rate dependence of solution viscosity for arabinoxylans from different sources. *Food Hydrocolloids*, *47*, 178-183.
- Kang, Y. A., Kim, Y. J., Jin, S. K., & Choi, H. J. (2023). Antioxidant, collagenase inhibitory, and antibacterial effects of bioactive peptides derived from enzymatic hydrolysate of *Ulva australis*. *Marine Drugs*, *21*(9), 469.

- Katapodis P, Vardakou M, Kalogeris E, Kekos D, Macris B, Christakopoulos P (2003) Enzymatic production of a feruloylated oligosaccharide with antioxidant activity from wheat flour arabinoxylans. *European Journal of Nutrition*, 42, 55-60
- Kaul, S., Kaur, K., Mehta, N., Dhaliwal, S. S., & Kennedy, J. F. (2022). Characterization and optimization of spray dried iron and zinc nanoencapsules based on potato starch and maltodextrin. *Carbohydrate Polymers*, 282, 119107.
- Kaur, A., Singh, B., Yadav, M. P., Bhinder, S., & Singh, N. (2021). Isolation of arabinoxylan and cellulose-rich arabinoxylan from wheat bran of different varieties and their functionalities. *Food Hydrocolloids*, 112, 106287.
- Kay, C. D., Pereira-Caro, G., Ludwig, I. A., Clifford, M. N., & Crozier, A. (2017). Anthocyanins and flavanones are more bioavailable than previously perceived: A review of recent evidence. *Annual Review of Food Science and Technology*, 8(1), 155-180.
- Kemppainen, K., Rommi, K., Holopainen, U., & Kruus, K. (2016). Steam explosion of Brewer's spent grain improves enzymatic digestibility of carbohydrates and affects solubility and stability of proteins. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 180, 94-108.
- Kim, M. J., Hyun, J. N., Kim, J. A., Park, J. C., Kim, M. Y., Kim, J. G., Lee, J. S., Chun, S. C & Chung, I. M. (2007). Relationship between phenolic compounds, anthocyanins content and antioxidant activity in colored barley germplasm. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(12), 4802-4809.
- Kim, S. K., & Wijesekara, I. (2010). Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *Journal of Functional Foods*, 2(1), 1-9.
- Kim, T. H., Kwak, H., Kim, T. H., & Oh, K. K. (2020). Extraction behaviors of lignin and hemicellulose-derived sugars during organosolv fractionation of agricultural residues using a bench-scale ball milling reactor. *Energies*, 13(2), 352.
- Kircher, M. (2012). The transition to a bio-economy: national perspectives. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 6(3), 240-245.
- Kirchherr, J., Reike, D., & Hekkert, M. (2017). Conceptualizing the circular economy: An analysis of 114 definitions. *Resources, Conservation and Recycling*, 127, 221-232.
- Kowalska, G., Rosicka-Kaczmarek, J., Miśkiewicz, K., Wiktorska, M., Gumul, D., Orczykowska, M., & Dędek, K. (2021). Influence of rye bran heteropolysaccharides on the physicochemical and antioxidant properties of honeydew honey microcapsules. *Food and Bioproducts Processing*, 130, 171-181.
- Kral, U., Morf, L. S., Vyzinkarova, D., & Brunner, P. H. (2019). Cycles and sinks: two key elements of a circular economy. *Journal of Material Cycles and Waste Management*, 21, 1-9.
- Kumar, N., & Goel, N. (2019). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports*, 24, e00370.
- Kumari, A., & Chauhan, A. K. (2022). Iron nanoparticles as a promising compound for food fortification in iron deficiency anemia: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 59(9), 3319-3335.

- Lafarga, T., Ación-Fernández, F. G., & Garcia-Vaquero, M. (2020). Bioactive peptides and carbohydrates from seaweed for food applications: Natural occurrence, isolation, purification, and identification. *Algal Research*, *48*, 101909.
- Lafay, S., & Gil-Izquierdo, A. (2008). Bioavailability of phenolic acids. *Phytochemistry Reviews*, *7*, 301-311.
- Lavoine, N., Desloges, I., Dufresne, A., & Bras, J. (2012). Microfibrillated cellulose—Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. *Carbohydrate polymers*, *90*(2), 735-764.
- Lee, C. J., Nah, C. S., Teng, C. S., Jun, W. W., & Saravanan, M. (2015). Spray dried calcium gelled arabinoxylan microspheres: A novel carrier for extended drug delivery. *Chemical Papers*, *69*, 1325-1330.
- Lee, P. C., Borysewicz, R., Struve, M., Raab, K., & Werlin, S. L. (1993). Development of lipolytic activity in gastric aspirates from premature infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *17*(3), 291-297.
- Leitao, C., Marchioni, E., Bergaentzlé, M., Zhao, M., Didierjean, L., Taidi, B., & Ennahar, S. (2011). Effects of processing steps on the phenolic content and antioxidant activity of beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(4), 1249-1255.
- Li, J., Lu, Z., Chen, Z., Li, C., Du, Y., Chen, C., Wang, L. & Yu, P. (2021). Preparation and characterization of pH-responsive microgel using arabinoxylan from wheat bran for BSA delivery. *Food Chemistry*, *342*, 128220.
- Li, J., Xu, X., Chen, Z., Wang, T., Wang, L. & Zhong, Q. (2018). Biological macromolecule delivery system fabricated using zein and gum arabic to control the release rate of encapsulated tocopherol during in vitro digestion. *Food Research International*, *114*, 251-257
- Li, L., Ma, S., Fan, L., Zhang, C., Pu, X., Zheng, X., & Wang, X. (2016). The influence of ultrasonic modification on arabinoxylans properties obtained from wheat bran. *International Journal of Food Science & Technology*, *51*(11), 2338-2344.
- Li, M., Guo, Q., Lin, Y., Bao, H., & Miao, S. (2023). Recent progress in microencapsulation of active peptides wall material, preparation, and application: a review. *Foods*, *12*(4), 896.
- Linko, M., Haikara, A., Ritala, A., & Penttilä, M. (1998). Recent advances in the malting and brewing industry. *Journal of Biotechnology*, *65*(2-3), 85-98.
- Liu, H., Xie, M., & Nie, S. (2020a). Recent trends and applications of polysaccharides for microencapsulation of probiotics. *Food Frontiers*, *1*(1), 45-59.
- Liu, L., Liang, Y., Song, Q., & Li, J. (2017). A review of waste prevention through 3R under the concept of circular economy in China. *Journal of Material Cycles and Waste Management*, *19*, 1314-1323.
- Liu, R. H. (2007). Whole grain phytochemicals and health. *Journal of Cereal Science*, *46*(3), 207-219.
- Liu, Y., Wang, S., Kang, J., Wang, N., Xiao, M., Li, Z., & Hu, X. (2020b). Arabinoxylan from wheat bran: Molecular degradation and functional investigation. *Food Hydrocolloids*, *107*, 105914.
- López-Maldonado, E. A., & Oropeza-Guzmán, M. T. (2021). Nejayote biopolyelectrolytes multifunctionality (glucurono ferulauted arabinoxylans) in the

- separation of hazardous metal ions from industrial wastewater. *Chemical Engineering Journal*, 423, 130210.
- Lu, F., & Ralph, J. (2010). Chapter 6-Lignin, Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels. *Amsterdam: Elsevier*, 169-207.
- Lynch, K. M., Steffen, E. J., & Arendt, E. K. (2016). Brewers' spent grain: a review with an emphasis on food and health. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(4), 553-568.
- Lynch, K. M., Strain, C. R., Johnson, C., Patangia, D., Stanton, C., Koc, F., Gil-Martinez, J., O'Riordan, P., Sahin, A. W., Ross, R. P. & Arendt, E. K. (2021). Extraction and characterisation of arabinoxylan from brewers spent grain and investigation of microbiome modulation potential. *European Journal of Nutrition*, 60(8), 4393-4411.
- Madhujith, T., & Shahidi, F. (2009). Antioxidant potential of barley as affected by alkaline hydrolysis and release of insoluble-bound phenolics. *Food Chemistry*, 117(4), 615-620.
- Madhujith, T., Izydorczyk, M., & Shahidi, F. (2006). Antioxidant properties of pearled barley fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(9), 3283-3289.
- Malunga, L. N., & Beta, T. (2015). Antioxidant capacity of arabinoxylan oligosaccharide fractions prepared from wheat aleurone using *Trichoderma viride* or *Neocallimastix patriciarum* xylanase. *Food Chemistry*, 167, 311-319.
- Malunga, L. N., Eck, P., & Beta, T. (2016). Inhibition of intestinal α -glucosidase and glucose absorption by feruloylated arabinoxylan mono- and oligosaccharides from corn bran and wheat aleurone. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2016(1), 1932532.
- Malunga, L. N., Izydorczyk, M., & Beta, T. (2017). Effect of water-extractable arabinoxylans from wheat aleurone and bran on lipid peroxidation and factors influencing their antioxidant capacity. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 10, 20-26.
- Manrique, G. D., & Lajolo, F. M. (2002). FT-IR spectroscopy as a tool for measuring degree of methyl esterification in pectins isolated from ripening papaya fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 25(1), 99-107.
- Mantovan, J., Giraldo, G. A. G., Marim, B. M., Garcia, P. S., Baron, A. M., & Mali, S. (2021). Cellulose-based materials from orange bagasse employing environmentally friendly approaches. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-12.
- Martínez-Encinas, E. G., Carvajal-Millán, E., Calderón de la Barca, A. M., Rascón-Chu, A., Martínez-Porchas, M., Márquez-Escalante, J. A., & Islas-Rubio, A. R. (2023). Extraction and characterization of arabinoxylans obtained from nixtamalized brewers' spent grains. *Food Science and Technology International*, 29(1), 40-49.
- Martínez-López, A. L., Carvajal-Millan, E., Micard, V., Rascón-Chu, A., Brown-Bojorquez, F., Sotelo-Cruz, N., López-Franco, Y., L., & Lizardi-Mendoza, J. (2016). In vitro degradation of covalently cross-linked arabinoxylan hydrogels by bifidobacteria. *Carbohydrate Polymers*, 144, 76-82.
- Mathew, S., Karlsson, E. N., & Adlercreutz, P. (2017). Extraction of soluble arabinoxylan from enzymatically pretreated wheat bran and production of short xylo-oligosaccharides and arabinoxyloligosaccharides from arabinoxylan by glycoside

hydrolase family 10 and 11 endoxylanases. *Journal of Biotechnology*, 260(March), 53–61.

McCarthy, A. L., O'Callaghan, Y. C., Piggott, C. O., FitzGerald, R. J., & O'Brien, N. M. (2013). Brewers' spent grain; bioactivity of phenolic component, its role in animal nutrition and potential for incorporation in functional foods: a review. *Proceedings of the Nutrition Society*, 72(1), 117-125.

McCormick, K., & Kautto, N. (2013). The bioeconomy in Europe: An overview. *Sustainability*, 5(6), 2589-2608.

McMurrough, I., Kelly, R., Byrne, J., & O'Brien, M. (1992). Effect of the removal of sensitive proteins and proanthocyanidins on the colloidal stability of lager beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 50(2), 67-76.

Megías, C., Pedroche, J., Yust, M. M., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F., & Vioque, J. (2008). Production of copper-chelating peptides after hydrolysis of sunflower proteins with pepsin and pancreatin. *LWT-Food Science and Technology*, 41(10), 1973-1977.

Mendez-Encinas, M. A., Carvajal-Millan, E., Ortega-García, J., Santiago-Gómez, L. B., De Anda-Flores, Y., Martínez-Robinson, K. G., & Valencia-Rivera, D. E. (2020). Effect of ultrasound-treated arabinoxylans on the oxidative stability of soybean oil. *Antioxidants*, 9(2), 147.

Mendez-Encinas, M. A., Carvajal-Millan, E., Rascon-Chu, A., Astiazaran-Garcia, H. F., & Valencia-Rivera, D. E. (2018). Ferulated arabinoxylans and their gels: Functional properties and potential application as antioxidant and anticancer agent. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018.

Meneses, N. G., Martins, S., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2013). Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains. *Separation and Purification Technology*, 108, 152-158.

Meschino, J. (2002). Calcium: requirements, bioavailable forms, physiology and clinical aspects. *Dynamic Chiropractic*, 20, 18.

Mohan, A., Rajendran, S. R., He, Q. S., Bazinet, L., & Udenigwe, C. C. (2015). Encapsulation of food protein hydrolysates and peptides: A review. *Rsc Advances*, 5(97), 79270-79278.

Molina-Ortiz, S., Mauri, A., Monterrey-Quintero, E. S., Trindade, M. A., Santana, A. S. & Favaro-Trindade, C. S. (2009). Production and properties of casein hydrolysate microencapsulated by spray drying with soybean protein isolate. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 919–923

Moraes, M. R. D., do Nascimento da Silva, E., Sanches, V. L., Cadore, S., & Godoy, H. T. (2022). Bioaccessibility of some minerals in infant formulas. *Journal of Food Science and Technology*, 59(5), 2004-2012.

Morales-Ortega, A., Carvajal-Millan, E., López-Franco, Y., Rascón-Chu, A., Lizardi-Mendoza, J., Torres-Chavez, P., & Campa-Mada, A. (2013). Characterization of water extractable arabinoxylans from spring wheat flour: rheological properties and microstructure. *Molecules*, 18(7), 8417-8428.

Moreirinha, C., Vilela, C., Silva, N. H., Pinto, R. J., Almeida, A., Rocha, M. A. M., Coelho, E., Coimbra, M. A., Silvestre A. J.D. & Freire, C. S. (2020). Antioxidant and antimicrobial films based on brewers spent grain arabinoxylans, nanocellulose and feruloylated compounds for active packaging. *Food Hydrocolloids*, 108, 105836.

- Müller, M., Hermes, G. D., Emanuel E, C., Holst, J. J., Zoetendal, E. G., Smidt, H., Troost, F., Schaap, F. G., Damink, O. S., Jocken, J. W. E., Lenaerts, K., Masclee, A. M., & Blaak, E. E. (2020). Effect of wheat bran derived prebiotic supplementation on gastrointestinal transit, gut microbiota, and metabolic health: a randomized controlled trial in healthy adults with a slow gut transit. *Gut Microbes*, *12*(1), 1704141.
- Mussatto, S. I., Dragone, G., & Roberto, I. C. (2006). Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. *Journal of Cereal Science*, *43*(1), 1-14.
- Mussatto, S. I., Rocha, G. J., & Roberto, I. C. (2008). Hydrogen peroxide bleaching of cellulose pulps obtained from brewer's spent grain. *Cellulose*, *15*, 641-649.
- Naibaho, J., & Korzeniowska, M. (2021). Brewers' spent grain in food systems: Processing and final products quality as a function of fiber modification treatment. *Journal of Food Science*, *86*(5), 1532-1551.
- Naibaho, J., Korzeniowska, M., Wojdyło, A., Ayunda, H. M., Foste, M., & Yang, B. (2022). Techno-functional properties of protein from protease-treated brewers' spent grain (BSG) and investigation of antioxidant activity of extracted proteins and BSG residues. *Journal of Cereal Science*, *107*, 103524.
- Nastaj, J., Przewłocka, A., & Rajkowska-Myśliwiec, M. (2016). Biosorption of Ni (II), Pb (II) and Zn (II) on calcium alginate beads: equilibrium, kinetic and mechanism studies. *Polish Journal of Chemical Technology*, *18*(3), 81-87.
- Nesterenko, A., Alric, I., Silvestre, F., & Durrieu, V. (2013). Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. *Industrial Crops and Products*, *42*, 469-479.
- Nielsen, P., Petersen, D. & Dambmann, C. (2001). Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science*, *66*, 642-646
- Niemi, P., Aura, A. M., Maukonen, J., Smeds, A. I., Mattila, I., Niemelä, K., & Poutanen, K. (2013b). Interactions of a lignin-rich fraction from brewer's spent grain with gut microbiota in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(27), 6754-6762.
- Niemi, P., Martins, D., Buchert, J., & Faulds, C. B. (2013a). Pre-hydrolysis with carbohydrases facilitates the release of protein from brewer's spent grain. *Bioresource Technology*, *136*, 529-534.
- Niemi, P., Tamminen, T., Smeds, A., Viljanen, K., Ohra-aho, T., Holopainen-Mantila, U., & Buchert, J. (2012). Characterization of lipids and lignans in brewer's spent grain and its enzymatically extracted fraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(39), 9910-9917.
- Niki, E. (2010). Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, *49*(4), 503-515.
- Noori, N., Hamed, H., Kargozari, M., & Shotorbani, P. M. (2017). Investigation of potential prebiotic activity of rye sprout extract. *Food Bioscience*, *19*, 121-127.
- Olajire, A. A. (2020). The brewing industry and environmental challenges. *Journal of Cleaner Production*, *256*, 102817.
- Paganini, D., Uyoga, M. A., Cercamondi, C. I., Moretti, D., Mwasi, E., Schwab, C., Bechtler, S., Mutuku, F.M., Galetti, V., Lacroix C., Karanja, S. & Zimmermann, M. B. (2017). Consumption of galacto-oligosaccharides increases iron absorption from a

- micronutrient powder containing ferrous fumarate and sodium iron EDTA: a stable-isotope study in Kenyan infants. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 106(4), 1020-1031.
- Pan, G. X., Bolton, J. L., & Leary, G. J. (1998). Determination of ferulic and p-coumaric acids in wheat straw and the amounts released by mild acid and alkaline peroxide treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(12), 5283-5288.
- Pazo-Cepeda, M. V., Nastasiienko, N. S., Kulik, T. V., Palianytsia, B. B., Alonso, E., & Aspromonte, S. G. (2023). Adsorption and thermal transformation of lignin model compound (ferulic acid) over HY zeolite surface studied by temperature programmed desorption mass-spectrometry, FTIR and UV-Vis spectroscopy. *Microporous and Mesoporous Materials*, 348, 112394.
- Paz-Samaniego, R., Rascón-Chu, A., Brown-Bojorquez, F., Carvajal-Millan, E., Pedroza-Montero, M., Silva-Campa, E., & Lizardi-Mendoza, J. (2018). Electrospray-assisted fabrication of core-shell arabinoxylan gel particles for insulin and probiotics entrapment. *Journal of Applied Polymer Science*, 135(26), 46411.
- Peñarrieta, J. M., Tejada, L., Mollinedo, P., Vila, J. L., & Bravo, J. A. (2014). Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. *Revista Boliviana de Química*, 31(2), 68-81.
- Peng, F., Peng, P., Xu, F., & Sun, R. C. (2012). Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. *Biotechnology Advances*, 30(4), 879-903.
- Pereira, D. M., Valentão, P., Pereira, J. A., & Andrade, P. B. (2009). Phenolics: From chemistry to biology. *Molecules*, 14(6), 2202-2211.
- Pérez-Flores, J. G., Contreras-López, E., Castañeda-Ovando, A., Pérez-Moreno, F., Aguilar-Arteaga, K., Álvarez-Romero, G. A., & Téllez-Jurado, A. (2019). Physicochemical characterization of an arabinoxylan-rich fraction from brewers' spent grain and its application as a release matrix for caffeine. *Food Research International*, 116, 1020-1030.
- Petrón, M. J., Andrés, A. I., Esteban, G., & Timón, M. L. (2021). Study of antioxidant activity and phenolic compounds of extracts obtained from different craft beer by-products. *Journal of Cereal Science*, 98, 103162.
- Pilosof, A. M. R. (2000). Propiedades de hidratación. En: Caracterización funcional y estructural de proteínas. Ed. Eudeba. Editores: Pilosof AMR y Bartholomai GB. CYTED Editorial Universitaria de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
- Piskin, E., Cianciosi, D., Gulec, S., Tomas, M., & Capanoglu, E. (2022). Iron absorption: factors, limitations, and improvement methods. *ACS omega*, 7(24), 20441-20456.
- Prados, I. M., Marina, M. L., & García, M. C. (2018). Isolation and identification by high resolution liquid chromatography tandem mass spectrometry of novel peptides with multifunctional lipid-lowering capacity. *Food Research International*, 111, 77-86.
- Pristov, J. B., Mitrović, A., & Spasojević, I. (2011). A comparative study of antioxidative activities of cell-wall polysaccharides. *Carbohydrate research*, 346(14), 2255-2259.
- Proaño, J. L., Salgado, P. R., Cian, R. E., Mauri, A. N., & Drago, S. R. (2020). Physical, structural and antioxidant properties of brewer's spent grain protein films. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(15), 5458-5465.

- Qazanfarzadeh, Z., Masek, A., Chakraborty, S., & Kumaravel, V. (2024). Development of brewer's spent grain-derived bio nanocomposites through a multiproduct biorefinery approach for food packaging. *Industrial Crops and Products*, 220, 119226.
- Qian, B., Zhao, X., Yang, Y., & Tian, C. (2020). Antioxidant and anti-inflammatory peptide fraction from oyster soft tissue by enzymatic hydrolysis. *Food Science & Nutrition*, 8(7), 3947-3956.
- Ragae, S., Guzar, I., Abdel-Aal, E. M., & Seetharaman, K. (2012). Bioactive components and antioxidant capacity of Ontario hard and soft wheat varieties. *Canadian Journal of Plant Science*, 92(1), 19-30.
- Ragae, S., Seetharaman, K., & Abdel-Aal, E. S. M. (2014). The impact of milling and thermal processing on phenolic compounds in cereal grains. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(7), 837-849.
- Ragnar, M., Lindgren, C. T., & Nilvebrant, N. O. (2000). pKa-values of guaiacyl and syringyl phenols related to lignin. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 20(3), 277-305.
- Raj, R., Shams, R., Pandey, V. K., Dash, K. K., Singh, P., & Bashir, O. (2023). Barley phytochemicals and health promoting benefits: A comprehensive review. *Journal of Agriculture and Food Research*, 14, 100677.
- Ralet, M. C., Thibault, J. F., & Della Valle, G. (1990). Influence of extrusion-cooking on the physico-chemical properties of wheat bran. *Journal of Cereal Science*, 11(3), 249-259.
- Ramaswamy, U. R., Kabel, M. A., Schols, H. A., & Gruppen, H. (2013). Structural features and water holding capacities of pressed potato fibre polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 93(2), 589-596.
- Ran, T., Jin, L., Abeynayake, R., Saleem, A. M., Zhang, X., Niu, D., & Yang, W. (2021). Effects of brewers' spent grain protein hydrolysates on gas production, ruminal fermentation characteristics, microbial protein synthesis and microbial community in an artificial rumen fed a high grain diet. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 12, 1-14.
- Rao, M. A. (1992). Measurement of viscoelastic properties of fluid and semisolid foods. *Viscoelastic Properties of Foods*, 207-231.
- Rechner, A. R., Kuhnle, G., Hu, H., Roedig-Penman, A., van den Braak, M. H., Moore, K. P., & Rice-Evans, C. A. (2002). The metabolism of dietary polyphenols and the relevance to circulating levels of conjugated metabolites. *Free Radical Research*, 36(11), 1229-1241.
- Reis, S. F., Gullón, B., Gullón, P., Ferreira, S., Maia, C. J., Alonso, J. L., Domingues, F. C., & Abu-Ghannam, N. (2014). Evaluation of the prebiotic potential of arabinoxylans from brewer's spent grain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 9365-9373.
- Rencoret, J., Prinsen, P., Gutiérrez, A., Martínez, A. T., & del Río, J. C. (2015). Isolation and structural characterization of the milled wood lignin, dioxane lignin, and cellulolytic lignin preparations from brewer's spent grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(2), 603-613.
- Riaz, M. N., Asif, M., & Ali, R. (2009). Stability of vitamins during extrusion. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(4), 361-368.

- Ricciardi, P., Cillari, G., Carnevale Miino, M., & Collivignarelli, M. C. (2020). Valorization of agro-industry residues in the building and environmental sector: A review. *Waste Management & Research*, *38*(5), 487-513.
- Rigamonti, L., Biganzoli, L., & Grosso, M. (2019). Packaging re-use: a starting point for its quantification. *Journal of Material Cycles and Waste Management*, *21*, 35-43.
- Robbins, R. J. (2003). Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(10), 2866-2887.
- Robertson, J. A., l'Anson, K. J., Treimo, J., Faulds, C. B., Brocklehurst, T. F., Eijsink, V. G., & Waldron, K. W. (2010). Profiling brewers' spent grain for composition and microbial ecology at the site of production. *LWT-Food Science and Technology*, *43*(6), 890-896.
- Rocchetti, G., Lucini, L., Chiodelli, G., Giuberti, G., Gallo, A., Masoero, F., & Trevisan, M. (2017). Phenolic profile and fermentation patterns of different commercial gluten-free pasta during in vitro large intestine fermentation. *Food Research International*, *97*, 78-86.
- Rocha, S., Cardoso, I., Börner, H., Pereira, M. C., Saraiva, M. J., & Coelho, M. (2009). Design and biological activity of β -sheet breaker peptide conjugates. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *380*(2), 397-401.
- Rossberg, C., Bremer, M., Machill, S., Koenig, S., Kerns, G., Boeriu, C., & Fischer, S. (2015). Separation and characterisation of sulphur-free lignin from different agricultural residues. *Industrial Crops and Products*, *73*, 81-89.
- Rubin, E. M. (2008). Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*, *454*(7206), 841-845.
- Rudjito, R. C., Jiménez-Quero, A., Muñoz, M. D. C. C., Kuil, T., Olsson, L., Stringer, M. A., & Vilaplana, F. (2023). Arabinoxylan source and xylanase specificity influence the production of oligosaccharides with prebiotic potential. *Carbohydrate Polymers*, *320*, 121233.
- Ruiz-Ruiz, J., Dávila-Ortíz, G., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2013). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory and antioxidant peptide fractions from hard-to-cook bean enzymatic hydrolysates. *Journal of Food Biochemistry*, *37*(1), 26-35.
- S. A. de Pediatría, & Subcomisiones (2017). Deficiencia de hierro y anemia ferropénica. Guía para su prevención, diagnóstico y tratamiento. *Arch Argent Pediatr*, *115*(4), s68-s82.
- Sabatier, M., Rytz, A., Husny, J., Dubascoux, S., Nicolas, M., Dave, A., Singh, H., Bodis, M. & Glahn, R. P. (2020). Impact of ascorbic acid on the in vitro iron bioavailability of a casein-based iron fortificant. *Nutrients*, *12*(9), 2776.
- Sahu, C., Patel, S., & Tripathi, A. K. (2022). Effect of extrusion parameters on physical and functional quality of soy protein enriched maize based extruded snack. *Applied Food Research*, *2*(1), 100072.
- Salem, K. S., Kasera, N. K., Rahman, M. A., Jameel, H., Habibi, Y., Eichhorn, S. J., French, A. D., Pal, L. & Lucia, L. A. (2023). Comparison and assessment of methods for cellulose crystallinity determination. *Chemical Society Reviews*, *52*, 6417-6446
- Samanta, A. K., Jayapal, N., Jayaram, C., Roy, S., Kolte, A. P., Senani, S., & Sridhar, M. (2015). Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products: Production and applications. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, *5*(1), 62-71.

- Santiago, P. (2012). Ferrous versus ferric oral iron formulations for the treatment of iron deficiency: a clinical overview. *The Scientific World Journal*, 2012(1), 846824.
- Sarabandi, K., Mahoonak, A. S., Hamishekar, H., Ghorbani, M., & Jafari, S. M. (2018). Microencapsulation of casein hydrolysates: Physicochemical, antioxidant and microstructure properties. *Journal of Food Engineering*, 237, 86-95.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(4), 287-306.
- Schmitt, C., Moitzi, C., Bovay, C., Rouvet, M., Bovetto, L., Donato, L., Leser M.E., & Stradner, A. (2010). Internal structure and colloidal behaviour of covalent whey protein microgels obtained by heat treatment. *Soft Matter*, 6(19), 4876-4884.
- Schönfeldt, H. C., Pretorius, B., & Hall, N. (2016). Bioavailability of nutrients. *The Encyclopedia of Food and Health*, 1, 401-406.
- Serra, A., Macià, A., Romero, M. P., Reguant, J., Ortega, N., & Motilva, M. J. (2012). Metabolic pathways of the colonic metabolism of flavonoids (flavonols, flavones and flavanones) and phenolic acids. *Food Chemistry*, 130(2), 383-393.
- Shahidi, F., & Yeo, J. (2016). Insoluble-bound phenolics in food. *Molecules*, 21(9), 1216.
- Sharp, P. A. (2010). Intestinal iron absorption: regulation by dietary & systemic factors. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 80(4-5), 231-242.
- Shelat, K. J., Vilaplana, F., Nicholson, T. M., Wong, K. H., Gidley, M. J., & Gilbert, R. G. (2010). Diffusion and viscosity in arabinoxylan solutions: Implications for nutrition. *Carbohydrate Polymers*, 82(1), 46-53.
- Sheridan, K. (2016). Making the bioeconomy circular: the biobased industries' next goal?. *Industrial Biotechnology*, 12(6), 339-340.
- Shirley, B. W. (1998). Flavonoids in seeds and grains: physiological function, agronomic importance and the genetics of biosynthesis. *Seed Science Research*, 8(4), 415-422.
- Shkempi, B., & Huppertz, T. (2022). Calcium Absorption from Food Products: Food Matrix Effects. *Nutrients*, 14(1).
- Siddiqui, J., McGee, E. J. T., Mhasavade, D., Palagiri, S., Balamurugan, V., & Diosady, L. L. (2023). Spray Encapsulation of Iron in Chitosan Biopolymer for Tea Fortification. *Journal of Food Quality*, 2023(1), 4127663.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in Enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178). Academic press.
- Siu, G. M. and Draper H. H. (1978). A survey of the malonaldehyde content of retail meats and fish. *Journal of Food Science*, 43(4), 1147-1149.
- Sociedad Argentina de Pediatría y Subcomisiones. (2017). Deficiencia de hierro y anemia ferropénica. Guía para su prevención, diagnóstico y tratamiento. Revista en internet, 115(4), 68-82.
- Somogyi M. (1952) Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry* 195, 19-23

- Srinivasan, M., Sudheer, A. R., & Menon, V. P. (2007). Ferulic acid: therapeutic potential through its antioxidant property. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, *40*(2), 92-100.
- Stegmann, P., Londo, M., & Junginger, M. (2020). The circular bioeconomy: Its elements and role in European bioeconomy clusters. *Resources, Conservation & Recycling: X*, *6*, 100029.
- Steiner, J., Procopio, S., & Becker, T. (2015). Brewer's spent grain: Source of value-added polysaccharides for the food industry in reference to the health claims. *European Food Research and Technology*, *241*, 303-315.
- Stelick, A., Sogari, G., Rodolfi, M., Dando, R., & Paciulli, M. (2021). Impact of sustainability and nutritional messaging on Italian consumers' purchase intent of cereal bars made with brewery spent grains. *Journal of Food Science*, *86*(2), 531-539.
- Stoffel, N. U., von Siebenthal, H. K., Moretti, D., & Zimmermann, M. B. (2020). Oral iron supplementation in iron-deficient women: How much and how often?. *Molecular aspects of medicine*, *75*, 100865.
- Su, Y., Wenzel, M., Paasch, S., Seifert, M., Böhm, W., Doert, T., & Weigand, J. J. (2021). Recycling of brewer's spent grain as a biosorbent by nitro-oxidation for uranyl ion removal from wastewater. *ACS omega*, *6*(30), 19364-19377.
- Sun, S., Xu, X., Sun, X., Zhang, X., Chen, X., & Xu, N. (2019). Preparation and identification of ACE inhibitory peptides from the marine macroalga *Ulva intestinalis*. *Marine Drugs*, *17*(3), 179.
- Sun, X. F., Xu, F. Q., Sun, R. C., Geng, Z. C., Fowler, P., & Baird, M. S. (2005). Characteristics of degraded hemicellulosic polymers obtained from steam exploded wheat straw. *Carbohydrate Polymers*, *60*(1), 15-26.
- Tarko, T., Duda-Chodak, A., & Zajac, N. (2013). Digestion and absorption of phenolic compounds assessed by in vitro simulation methods. A review. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, *64*(2).
- Temmes, A., & Peck, P. (2020). Do forest biorefineries fit with working principles of a circular bioeconomy? A case of Finnish and Swedish initiatives. *Forest Policy and Economics*, *110*, 101896.
- Teucher, Olivares, & Cori. (2004). Enhancers of iron absorption: ascorbic acid and other organic acids. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, *74*(6), 403-419.
- Thuanthong, M., De Gobba, C., Sirinupong, N., Youravong, W., & Otte, J. (2017). Purification and characterization of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatine produced by an enzymatic membrane reactor. *Journal of Functional Foods*, *36*, 243-254.
- Tomás-Barberán, F. A., & Clifford, M. N. (2000). Dietary hydroxybenzoic acid derivatives—nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*(7), 1024-1032.
- Tsao, R., & Deng, Z. (2004). Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *Journal of Chromatography B*, *812*(1-2), 85-99.
- Ulagesan, S., Eom, T., Nam, T. J., & Choi, Y. H. (2022). Antioxidant and chemoprotective peptides from simulated gastrointestinal digested (SGID) protein

- hydrolysate of *Pyropia yezoensis* against acetaminophen-induced HepG2 cells. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 45(10), 1645-1660.
- Van de Velde, F., Pirovani, M. E., Cámara, M. S., Güemes, D. R., & Bernardi, C. M. D. H. (2012). Optimization and validation of a UV–HPLC method for vitamin C determination in strawberries (*Fragaria ananassa* Duch.), using experimental designs. *Food Analytical Methods*, 5, 1097-1104.
- Vanreppelen, K., Vanderheyden, S., Kuppens, T., Schreurs, S., Yperman, J., & Carleer, R. (2014). Activated carbon from pyrolysis of brewer's spent grain: Production and adsorption properties. *Waste Management & Research*, 32(7), 634-645.
- Vardakou M, Palop C, Christakopoulos P, Faulds C, Gasson M, and Narbad A (2008) Evaluation of the prebiotic properties of wheat arabinoxylan fractions and induction of hydrolase activity in gut microflora. *Journal of Food Microbiology*, 123, 166–170
- Vieira, E., Rocha, M. A. M., Coelho, E., Pinho, O., Saraiva, J. A., Ferreira, I. M., & Coimbra, M. A. (2014). Valuation of brewer's spent grain using a fully recyclable integrated process for extraction of proteins and arabinoxylans. *Industrial Crops and Products*, 52, 136-143.
- Vodenicarová, M., Dřimalová, G., Hromádková, Z., Malovíková, A., & Ebringerová, A. (2006). Xyloglucan degradation using different radiation sources: a comparative study. *Ultrasonics Sonochemistry*, 13(2), 157-164.
- Wang, G., Xia, Y., Liang, B., Sui, W., & Si, C. (2018). Successive ethanol–water fractionation of enzymatic hydrolysis lignin to concentrate its antimicrobial activity. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 93(10), 2977-2987.
- Wang, L., Wang, L., Su, C., Wen, C., Gong, Y., You, Y., Zhao, J., Han, Y., Song, S. & Xiao, H. (2020). Characterization and digestion features of a novel polysaccharide-Fe (III) complex as an iron supplement. *Carbohydrate Polymers*, 249, 116812.
- Wang, M., Hamer, R. J., van Vliet, T., & Oudgenoeg, G. (2002). Interaction of water extractable pentosans with gluten protein: effect on dough properties and gluten quality. *Journal of Cereal Science*, 36(1), 25-37.
- Wang, T. Y., Hsieh, C. H., Hung, C. C., Jao, C. L., Lin, P. Y., Hsieh, Y. L., & Hsu, K. C. (2017). A study to evaluate the potential of an in silico approach for predicting dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity in vitro of protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 234, 431
- Wang, Y., Yang, Z., & Wei, X. (2012). Antioxidant activities potential of tea polysaccharide fractions obtained by ultra filtration. *International journal of biological macromolecules*, 50(3), 558-564.
- Wardhani, D. H., Wardana, I. N., Ulya, H. N., Cahyono, H., Kumoro, A. C., & Aryanti, N. (2020). The effect of spray-drying inlet conditions on iron encapsulation using hydrolysed glucomannan as a matrix. *Food and Bioprocess Processing*, 123, 72-79.
- Whisner, C. M., Martin, B. R., Schoterman, M. H., Nakatsu, C. H., McCabe, L. D., McCabe, G. P., & Weaver, C. M. (2013). Galacto-oligosaccharides increase calcium absorption and gut bifidobacteria in young girls: a double-blind cross-over trial. *British Journal of Nutrition*, 110(7), 1292-1303.
- Woranuch, S., & Yoksan, R. (2013). Preparation, characterization and antioxidant property of water-soluble ferulic acid grafted chitosan. *Carbohydrate polymers*, 96(2), 495-502.

- Xiros, C., Topakas, E., Katapodis, P., & Christakopoulos, P. (2008). Evaluation of *Fusarium oxysporum* as an enzyme factory for the hydrolysis of brewer's spent grain with improved biodegradability for ethanol production. *Industrial Crops and Products*, 28(2), 213-224.
- Xu, F., Liu, C. F., Geng, Z. C., Sun, J. X., Sun, R. C., Hei, B. H., Lin, L., Wu, S. B., & Je, J. (2006). Characterisation of degraded organosolv hemicelluloses from wheat straw. *Polymer Degradation and Stability*, 91(8), 1880-1886.
- Xu, Z., Li, X., Feng, S., Liu, J., Zhou, L., Yuan, M., & Ding, C. (2016). Characteristics and bioactivities of different molecular weight polysaccharides from camellia seed cake. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 1025-1032.
- Yan, J., Yin, L., Qu, Y., Yan, W., Zhang, M., Su, J., & Jia, X. (2022). Effect of calcium ions concentration on the properties and microstructures of doubly induced sorghum arabinoxylan/soy protein isolate mixed gels. *Food Hydrocolloids*, 133, 107997.
- Yang, W., Xia, W., Zheng, B., Li, T., & Liu, R. H. (2022). DAF-16 is involved in colonic metabolites of ferulic acid-promoted longevity and stress resistance of *Caenorhabditis elegans*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(15), 7017-7029.
- Yap, K. W., Mohamed, S., Yazid, A. M., Maznah, I., & Meyer, D. M. (2005). Dose-response effects of inulin on the faecal short-chain fatty acids content and mineral absorption of formula-fed infants. *Nutrition & Food Science*, 35(4), 208-219.
- Yeasmin, M. S., & Mondal, M. I. H. (2015). Synthesis of highly substituted carboxymethyl cellulose depending on cellulose particle size. *International Journal of Biological Macromolecules*, 80, 725-731.
- Yilmaz-Turan, S., Jiménez-Quero, A., Menzel, C., de Carvalho, D. M., Lindström, M. E., Sevastyanova, O., Moriana, R. & Vilaplana, F. (2020). Bio-based films from wheat bran feruloylated arabinoxylan: Effect of extraction technique, acetylation and feruloylation. *Carbohydrate Polymers*, 250, 116916.
- Yin, J. Y., Nie, S. P., Li, J., Li, C., Cui, S. W., & Xie, M. Y. (2012). Mechanism of Interactions between Calcium and Viscous Polysaccharide from the Seeds of *Plantago asiatica* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(32), 7981-7987.
- Yoo, J. H., Luyima, D., Lee, J. H., Park, S. Y., Yang, J. W., An, J. Y., & Oh, T. K. (2021). Effects of brewer's spent grain biochar on the growth and quality of leaf lettuce (*Lactuca sativa* L. var. *crispa*). *Applied Biological Chemistry*, 64, 1-10.
- You, X., Teng, J., Chen, Y., Long, Y., Yu, G., Shen, L., & Lin, H. (2020). New insights into membrane fouling by alginate: Impacts of ionic strength in presence of calcium ions. *Chemosphere*, 246, 125801.
- Yuan, Y. V., Bone, D. E., & Carrington, M. F. (2005). Antioxidant activity of dulse (*Palmaria palmata*) extract evaluated in vitro. *Food Chemistry*, 91(3), 485-494.
- Yun, J., Wei, L., Li, W., Gong, D., Qin, H., Feng, X. & Yin, B. (2021). Isolating high antimicrobial ability lignin from bamboo kraft lignin by organosolv fractionation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 683796.
- Yuwang, P., Sulaeva, I., Hell, J., Henniges, U., Böhmendorfer, S., Rosenau, T. & Tongta, S. (2018). Phenolic compounds and antioxidant properties of arabinoxylan hydrolysates from defatted rice bran. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(1), 140-146.

- Zacarías, M. F., Binetti, A., Laco, M., Reinheimer, J., & Vinderola, G. (2011). Preliminary technological and potential probiotic characterisation of bifidobacteria isolated from breast milk for use in dairy products. *International Dairy Journal*, *21*(8), 548-555.
- Zakrzewska, Z., Zawartka, A., Schab, M., Martyniak, A., Skoczeń, S., Tomasik, P. J., & Wędrychowicz, A. (2022). Prebiotics, probiotics, and postbiotics in the prevention and treatment of anemia. *Microorganisms*, *10*(7), 1330.
- Zeko-Pivac, A., Tisma, M., Znidarsic-Plazl, P., Kulisic, B., Sakellaris, G., Hao, J., Planinic, M. (2022). The Potential of Brewer's Spent Grain in the Circular Bioeconomy: State of the Art and Future Perspectives. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *10*, 870744.
- Zhang, K., Yao, X., Gao, Y., Liu, N., Qiu, J., Li, S., Liu, X. & He, Y. (2021b). Improvement on storage stability of iron-fortified soybean powder by microencapsulation. *Journal of Food Science*, *86*(3), 996-1003.
- Zhang, L., Wu, T., Zhang, Y., Chen, Y., Ge, X., Sui, W., & Zhang, M. (2023). Release of bound polyphenols from wheat bran soluble dietary fiber during simulated gastrointestinal digestion and colonic fermentation in vitro. *Food Chemistry*, *402*, 134111.
- Zhang, M., Zhan, A., Ye, Y., Liu, C., Hang, F., Li, K., & Li, J. (2021c). Molecular modification, structural characterization, and biological activity of xylans. *Carbohydrate Polymers*, *269*, 118248.
- Zhang, X., Chen, T., Lim, J., Gu, F., Fang, F., Cheng, L., Campanella, O.H. & Hamaker, B. R. (2019). Acid gelation of soluble laccase-crosslinked corn bran arabinoxylan and possible gel formation mechanism. *Food Hydrocolloids*, *92*, 1-9.
- Zhang, Y., & Naebe, M. (2021a). Lignin: A review on structure, properties, and applications as a light-colored UV absorber. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, *9*(4), 1427-1442.
- Zhang, Z., Kong, F., Ni, H., Mo, Z., Wan, J. B., Hua, D., & Yan, C. (2016). Structural characterization, α -glucosidase inhibitory and DPPH scavenging activities of polysaccharides from guava. *Carbohydrate Polymers*, *144*, 106-114.
- Zhang, Z., Smith, C., & Li, W. (2014). Extraction and modification technology of arabinoxylans from cereal by-products: A critical review. *Food Research International*, *65*, 423-436.
- Zhao, L., Wang, Y., Wang, Q., Liu, S., & Ji, X. (2023). Lignin Nanoparticles Produced from Wheat Straw Black Liquor Using γ -Valerolactone. *Polymers*, *16*(1), 49.
- Zhao, W., Chen, H., Wu, L., Ma, W., & Xie, Y. (2018). Antioxidant properties of feruloylated oligosaccharides of different degrees of polymerization from wheat bran. *Glycoconjugate Journal*, *35*, 547-559.
- Zheng, L., Lu, G., Pei, W., Yan, W., Li, Y., Zhang, L. & Jiang, Q. (2021). Understanding the relationship between the structural properties of lignin and their biological activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, *190*, 291-300.
- Zheng, Y., & Wang, Z. (2014). Protein accumulation in aleurone cells, sub-aleurone cells and the center starch endosperm of cereals. *Plant Cell Reports*, *33*, 1607-1615.

Zhou, K., Yin, J. J., & Yu, L. L. (2006). ESR determination of the reactions between selected phenolic acids and free radicals or transition metals. *Food Chemistry*, 95(3), 446-457.

Zhou, N., Thilakarathna, W. W., He, Q. S., & Rupasinghe, H. V. (2022). A review: depolymerization of lignin to generate high-value bio-products: opportunities, challenges, and prospects. *Frontiers in Energy Research*, 9, 758744.

Zhou, S., Liu, X., Guo, Y., Wang, Q., Peng, D., & Cao, L. (2010). Comparison of the immunological activities of arabinoxylans from wheat bran with alkali and xylanase-aided extraction. *Carbohydrate Polymers*, 81(4), 784-789.

Zhou, T., Xue, Y., Ren, F., & Dong, Y. (2018). Antioxidant activity of xylooligosaccharides prepared from *Thermotoga maritima* using recombinant enzyme cocktail of β -xylanase and α -glucuronidase. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 37(4), 210-224.