



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Industrias

"Caracterización química, fisicoquímica y funcional de productos enriquecidos en pectina e inulina y provenientes de *Cynara cardunculus* var. *scolymus* "

**Tesis presentada para optar al título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires en el área de Química Industrial**

Lic. Cinthia Santo Domingo

Director de tesis: Dra. Lía Noemí Gerschenson

Director Asistente: Dra Eliana Noemí Fissore

Consejero de Estudios: Dra. Lía Noemí Gerschenson

Lugar de trabajo: Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2017

Fecha de defensa: 22 de diciembre de 2017

Caracterización química, fisicoquímica y funcional de productos enriquecidos en pectina e inulina y provenientes de *Cynara cardunculus* var. *scolymus*.

RESUMEN

Los residuos agroindustriales del alcaucil (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*) tales como brácteas externas, tallos y hojas, constituyen un 80% de la planta. El objetivo general de esta investigación fue la recuperación de parte de la biomasa residual de estos residuos, agregándole valor al convertirlos en productos de interés industrial mediante tecnologías amigables con el medio ambiente. De este modo, se evaluó el aislamiento de fracciones enriquecidas en fibra dietaria soluble a partir de brácteas y tallos del alcaucil utilizando dos métodos de calentamiento (convectivo o con microondas) en la obtención del residuo insoluble en alcohol (AIR). Se utilizó un diseño experimental en el cual se trabajó con una solución de buffer citrato de sodio con y sin presencia de las enzimas proteasa y/o hemicelulasa para la producción de las fracciones a partir del AIR. Una vez que dichas fracciones fueron aisladas, se caracterizó su composición química, peso molecular y comportamiento reológico. Su funcionalidad como antioxidante y la identificación de los compuestos polifenólicos también fue abordada. Se realizaron análisis microbiológicos para determinar la actividad prebiótica de las fracciones y se estudió su actividad antiviral.

Se concluye que las fracciones poseen potencialidad como ingredientes y/o aditivos para la industria de alimentos debido a su contenido de fibras solubles, antioxidantes, comportamiento reológico, capacidad antiviral y actividad prebiótica.

Palabras claves: Fibra dietaria, alcaucil (*Cynara Scolimus* L.), pectina, inulina, propiedades funcionales.

Chemical, physico-chemical and functional characterization of products enriched in pectin and inulin and obtained from *Cynara cardunculus* var. *scolymus*.

ABSTRACT

Agro-industrial residues from artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*), such as external bracts, stems and leaves constitute 80% of the plant. The general objective of this research was the recovery of part of the residual biomass of these left-overs, adding value to them through their conversion in products of industrial interest by means of environmental friendly technologies. In this way, it was evaluated the isolation of fractions enriched in soluble dietary fiber from artichoke bracts and stems using two heating methods (convection or microwaves) in the obtention of the alcohol insoluble residue (AIR). An experimental design involving the use of sodium citrate buffer with and without the presence of protease and / or hemicellulase enzymes was applied for the production of the fiber fractions from the AIR. Once the fractions were isolated, their chemical composition, molecular mass and rheological behavior were characterized. Their functionality as antioxidants and the identification of polyphenolic compounds was also evaluated. Microbiological analyses were performed to determine their prebiotic and antiviral activities.

It is concluded that the fractions have potential as ingredients and/or additives for the food industry due to their content of soluble fibers, antioxidants, rheological behavior, antiviral capacity and prebiotic activity.

Keywords: Dietary fiber, artichoke (*Cynara Scolymus* L.), pectin, inulin, functional properties.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no se hubiese materializado sin el aporte de muchas personas, quienes colaboraron en mi formación profesional.

A la Dra. Lía Noemí Gerschenson, directora de tesis, quiero agradecerle por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio. Además por su apoyo, acompañamiento y compromiso durante todo el proceso de elaboración de la tesis. Por estar siempre presente demostrando generosidad y paciencia.

A la Dra. Eliana Fissore, codirectora de la tesis, por la gran ayuda brindada y los valiosos aportes durante el desarrollo de mi tesis. Por los tiempos compartidos.

A la Dra. Leda Gianuzzi, por permitirme la posibilidad de trabajar en su laboratorio del CIDCA y su gran dedicación durante mi estadía en su laboratorio.

A la Dra. Damonte y al Dr. Pujol por su valiosa colaboración en este trabajo.

Al maravilloso grupo de personas que conocí estos años, por su valiosa amistad, compañerismo y tiempo compartido.

Al Departamento de Industrias de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, a la Agencia Nacional de Promoción Científica y

Tecnológica (ANPCyT), al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por la ayuda financiera brindada para la realización de esta tesis.

A mi familia, por comprender y acompañar.

Índice

CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN	2
I.1. Utilización de residuos provenientes de Industrias procesadoras de vegetales.....	2
I.2. Alcaucil (<i>Cynara cardunculus</i> var. <i>scolymus</i>)	6
1.2.1. Situación de la producción de alcaucil a nivel mundial.....	7
1.2.2. Situación de la producción a nivel nacional.....	8
1.2.3. Propiedades y composición del alcaucil.....	10
I.3. Pared celular	11
1.3.1. Componentes de la pared celular	12
I.4. Polisacárido de reserva del alcaucil.....	19
I.5. Fibra dietaria o dietética	20
1.5.1. Recomendaciones nutricionales para Fibra Dietaria	24
1.5.2. Composición de la fibra dietaria y funcionalidad.....	24
1.5.3. Efectos de la fibra dietaria.....	27
I.6. Tratamiento de los tejidos vegetales para la obtención de fibra dietaria	28
I.7. Funciones de la microbiota y degradación de la FD.....	31
1.7.1. Probióticos	32
1.7.2. Prebióticos	34
1.7.3. Efecto Prebióticos de la FD	35
I.8. Compuestos Antioxidantes	36
I.9. Actividad Antiviral del alcaucil	42
1.9.1. Cultivo celular	42
1.9.2. Líneas celulares.....	42
1.9.3. Ensayos de citotoxicidad.....	43
1.9.4. Método MTT	43
I.10. Familia <i>Herpesviridae</i>.....	44
1.10.1. Virus herpes simplex	45
I.11. Reología.....	46
1.11.1. Comportamiento reológico de los alimentos.....	46
1.11.2. Evaluación instrumental de las propiedades reológicas.....	52
1.11.3. Modelado del comportamiento viscoelástico.....	53

CAPÍTULO II	56
II.1. Objetivo General.....	57
II.2. Objetivos específicos	57
CAPÍTULO III	58
MATERIALES Y MÉTODOS	59
III.1. Obtención de polvo enriquecido en material de pared celular (CWM).....	59
III.2. Obtención del residuo insoluble en alcohol (AIR). Tratamiento convectivo	59
III.3. Obtención del residuo insoluble en alcohol (AIR). Tratamiento Microondas.....	60
III.4. Obtención de las fracciones enriquecidas en pectina e inulina.....	61
III.5. Las enzimas utilizadas: Hemicelulasa (H) y Proteasa (P)	62
III.6. Diseño experimental y análisis estadísticos	63
<i>III.6.1. Pre-tratamiento con calor y diseño experimental reducido.....</i>	<i>64</i>
III.7. Fracciones de fibra soluble obtenidas de tallo y brácteas	64
III.8. Evaluación del rendimiento de las distintas fracciones	66
III.9. Análisis Químicos	66
<i>III.9.1. Humedad</i>	<i>66</i>
<i>III.9.2. Caracterización química del AIR y del CWM</i>	<i>67</i>
<i>III.9.3. Técnicas analíticas utilizadas para la caracterización química de las fracciones aisladas</i>	<i>68</i>
III.10. Determinación del color	85
III.11. Reología	86
<i>III.11.1. Sistemas acuosos con calcio</i>	<i>86</i>
<i>III.11.2. Ensayos Realizados</i>	<i>86</i>
III.11.2.1. Ensayos de Flujo.....	86
<i>a) Modelo tipo Ley de la Potencia</i>	<i>88</i>
<i>b) Modelo generalizado de Maxwell</i>	<i>88</i>
III.12. Actividad prebiótica	89
<i>III.12.1. Activación de las cepas bacterianas</i>	<i>89</i>
<i>III.12.2. Protocolo de trabajo</i>	<i>90</i>
III.13. Actividad antiviral	93
<i>III.13.1. Líneas celulares.....</i>	<i>93</i>
<i>III.13.2 Virus</i>	<i>93</i>
<i>III.13.3. Ensayo de plaqueo directo.....</i>	<i>93</i>
<i>III.13.4. Ensayo de citotoxicidad</i>	<i>94</i>

III.13.5. Determinación de la actividad antiviral.....	94
III.13.6. Expresión de la actividad antiviral.....	95
III.14. Modelado de los Datos y Análisis Estadístico	95
CAPÍTULO IV	97
RESULTADOS y DISCUSIÓN.....	98
IV.1. Obtención del material de la pared celular (CWM) y del residuo insoluble en alcohol (AIR)	98
IV.2. Caracterización química del CWM de brácteas y tallos y de los AIR-C y AIR-M de ambos tejidos .98	
IV.3. Caracterización de fracciones enriquecidas en fibra dietaria y aisladas a partir de AIR-C de acuerdo al diseño experimental.....	102
IV.3.1. Análisis de regresión del diseño experimental para las fracciones aisladas de AIR-C.....	107
IV.3.2. Correlación de Pearson para las fracciones aisladas a partir de AIR-C	108
IV.3.3. Análisis de las fracciones aisladas a través de los tratamientos 1-4 y estudio de los efectos de un paso de pre-calentamiento sobre el rendimiento y composición	110
IV.4. Caracterización del color para el AIR-C de tallo y brácteas de alcaucil y para las fracciones obtenidas a partir de ellos previo paso de precalentamiento	116
IV.5. Identificación de polifenoles en las fracciones aisladas a partir de AIR-C, previo paso de precalentamiento	117
IV.6. Distribución de la masa molecular de las fracciones aisladas enzimáticamente a partir de AIR-C de tallo y brácteas, previo paso de pre-calentamiento	121
IV.7. Comportamiento reológico de las fracciones aisladas enzimáticamente a partir de AIR-C de tallo y brácteas, previo paso de pre-calentamiento.....	124
IV.7.1. Comportamiento de flujo de las fracciones aisladas de AIR-C.....	125
IV.7.2. Propiedades reológicas oscilatorias para las fracciones aisladas de AIR-C.....	130
IV.7.3. Ajuste a un modelo tipo Ley de la Potencia de los datos experimentales correspondientes a los espectros mecánicos.....	135
IV.7.4. Ajuste al Modelo de Maxwell de los datos experimentales correspondientes a los espectros mecánicos.....	136
IV.8. Conclusiones sobre las características químicas, físico-químicas y reológicas de las fracciones aisladas a partir de AIR-C	139
IV.9. Composición química y rendimiento de las fracciones aisladas a partir del residuo insoluble en alcohol obtenido con asistencia de calentamiento por microondas (AIR-M) de brácteas o tallos de alcaucil.....	140
IV.10. Determinación de color de las fracciones obtenidas a partir de AIR-M	144
IV.11. Identificación de compuestos polifenólicos en las fracciones aisladas a partir de AIR-M	145
IV.12. Distribución de la masa molecular de las fracciones aisladas a partir de AIR-M.....	149
IV.13. Comportamiento reológico de las fracciones aisladas a partir de AIR-M.....	151
IV.13.1. Comportamiento de flujo de las fracciones aisladas a partir de AIR-M	151

<i>IV.13.2. Propiedades reológicas oscilatorias para las fracciones aisladas de AIR-M.....</i>	<i>155</i>
<i>IV.13.3. Ajuste a un modelo tipo Ley de la Potencia de los datos experimentales correspondientes a los espectros mecánicos.....</i>	<i>157</i>
<i>IV.13.4. Ajuste al Modelo de Maxwell de los datos experimentales correspondientes a los espectros mecánicos.....</i>	<i>159</i>
IV.14. Conclusiones sobre las características químicas, físico-químicas y reológicas de las fracciones aisladas a partir de AIR-M.....	162
IV.15. Actividad antioxidante de las fracciones obtenidas a partir de AIR-M y AIR-C	162
IV.16. Actividad prebiótica de las fracciones aisladas de AIR-C y AIR-M.....	165
IV.17. Actividad antiviral de las fracciones aisladas de AIR-C y AIR-M.....	169
IV.18. Conclusiones sobre la actividad antioxidante, antiviral y prebiótica de las fracciones aisladas a partir de AIR-C y AIR-M.....	172
CAPÍTULO V	174
V. Conclusiones generales.....	175
BIBLIOGRAFÍA	180
ANEXO	210
Identificación por HPLC.....	211
<i>Fracciones obtenidas a partir de AIR-C.....</i>	<i>211</i>
<i>Fracciones obtenidas a partir de AIR-M.....</i>	<i>215</i>

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

I.1. Utilización de residuos provenientes de Industrias procesadoras de vegetales.

De acuerdo a los cambios culturales surgidos en los últimos tiempos se ha producido una variación en los hábitos alimenticios, que lleva a consumir cada vez más productos procesados con una mayor vida útil, fácil preparación y consumo.

Actualmente podemos encontrar una variedad infinita de productos procesados provenientes de frutas y vegetales, tales como conservas, zumos, concentrados, mermeladas, jaleas, purés, vegetales mínimamente procesados, etc.

La producción mundial primaria de hortalizas (Figura I.1) es liderada por la región de Asia con un 72,6% del total, promedio 1993-2013 (FAOSTAT, 2012). Sin embargo, cuando observamos el gráfico de la producción de hortalizas preparadas, se observa que es Europa la que tuvo una mayor producción (53,9%). Este hecho refleja que en aquellos lugares donde se encuentra un mayor desarrollo tecnológico es donde prevalece la producción de productos procesados. El procesamiento de estos productos conlleva a una pérdida significativa de material que podría ser reutilizado.

La disminución de la masa de alimentos para el consumo humano en cualquier punto de la cadena productiva se conoce como pérdida de alimentos. Las pérdidas suceden principalmente durante la producción, poscosecha, almacenamiento y transporte. Los desperdicios ocurren durante la distribución y consumo, en relación directa con el comportamiento de vendedores mayoristas y minoristas, servicios de venta de comida y consumidores que deciden desechar los alimentos que aún tienen valor (FAO, 2016).

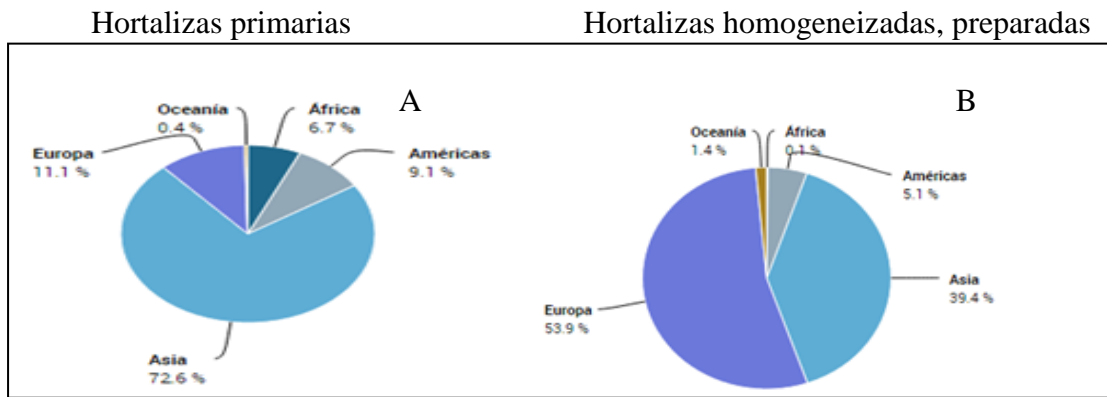


Figura I.1. Valores de producción de hortalizas primarias (panel A). Valores de producción de hortalizas preparadas (panel B). Promedio 1993-2013 según base de datos electrónica FAOSTAT (2012).

De acuerdo a resultados publicados por FAO en el año 2012, alrededor de un tercio de la producción de los alimentos destinados al consumo humano se pierde o desperdicia en todo el mundo, lo que equivale aproximadamente a 1300 millones de toneladas al año. Esto nos indica que no sólo el alimento se pierde, sino también los recursos utilizados para su producción, como tierra, agua y energía, incrementando las emisiones de gases de efecto invernadero. En la Figura I.2, a modo de ejemplo, se pueden observar los porcentajes de pérdida y desperdicios de frutas y verduras en cada etapa de su producción.

Con cierta frecuencia se utiliza en forma indistinta los términos: subproductos, residuos y desechos, sin importar la diferencia conceptual entre ellos. Un “subproducto” es un producto secundario, bien conocido, generalmente útil, comercializable y por lo tanto con valor agregado, que resulta de un proceso industrial. El término “residuos”, se aplica a aquellos que pueden tener o no un valor comercial, porque son poco comunes o porque se generan en bajas cantidades, sin embargo, algunos de sus constituyentes aunque se encuentren en baja proporción, pueden otorgar algún interés para su utilización.

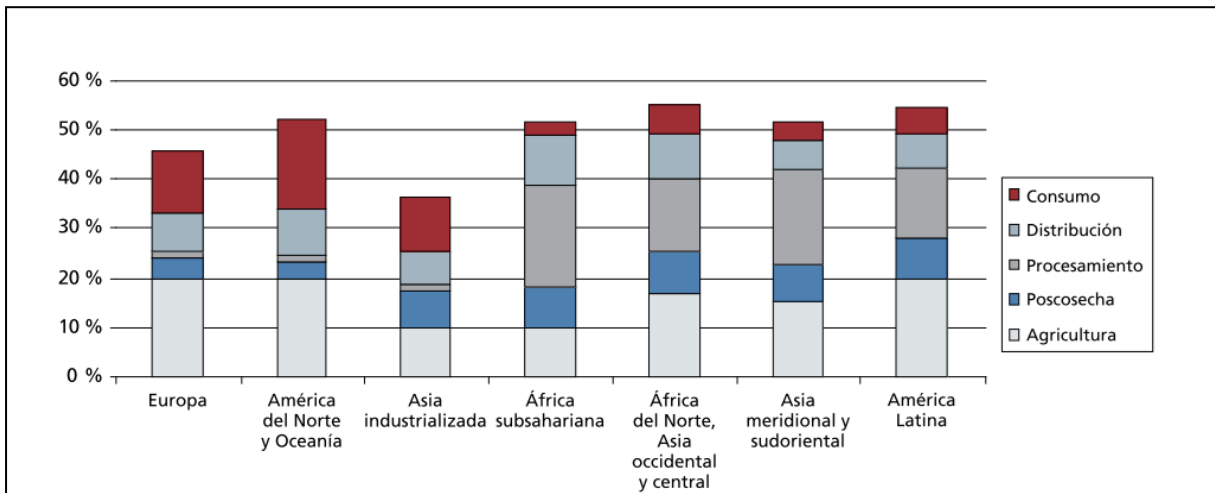


Figura I.2. Porcentajes de pérdidas y desperdicios de frutas y verduras en distintas etapas de la cadena de suministros de alimentos en distintas regiones (FAO, 2012).

De acuerdo a esto, los términos “subproducto” y “residuo” podrían utilizarse como sinónimos, no así el término “desecho”, que son aquellos materiales que no tienen valor comercial, ni poseen atributos de interés para ser utilizados en algún proceso, por lo que se consideran como basura y se les debe dar una disposición final.

En general, las características de los residuos agroindustriales son muy variadas, dependen de la materia prima y del proceso que los generó. No obstante, la principal característica es el contenido de materia orgánica, constituida por diferentes porcentajes de celulosa, lignina, hemicelulosa y pectina. Por ser la materia orgánica su principal componente, en la práctica se los denomina “residuos orgánicos”; dentro de este rubro, se incluyen otros residuos, como los lodos de tratamiento de aguas residuales, las hojas y césped de parques y jardines, así como los residuos domésticos y residuos sólidos municipales (Valdez-Vazquez y col., 2010).

En el pasado éstos residuos eran arrojados a volquetes o usados para alimentar animales sin un tratamiento previo o como fertilizantes (Schieber y col., 2001). Hace algunos años, debido a una preocupación por problemas tales como la contaminación ambiental, motivos económicos de deposición de los mismos, y la necesidad de conservar la

energía, se han desarrollado nuevos métodos y políticas para el manejo y tratamientos de los mismos (Schieber y col., 2001; Launferberg, y col., 2003). La transformación de estos desechos puede reducir problemas de contaminación severos tales como la polución. Si estos desechos contienen cantidades importantes de material orgánico tales como proteínas y carbohidratos, la reutilización de los mismos podría no sólo reducir la contaminación sino también, permitir la obtención de productos de mayor valor agregado (Kroyer, 1995; Launferberg y col., 2003).

Los residuos vegetales contienen cantidades considerables de componentes potencialmente interesantes para ser utilizados como ingredientes o aditivos, a modo de ejemplo:

- Fibra dietaria, que podría usarse como matriz de encapsulación de sabores, colorantes o antioxidantes o como ingrediente nutritivo.
- Pectinas y agentes gelificantes que podrían ser usados como aditivos modificadores de la textura en panes, bebidas u otros alimentos.
- Sabores naturales que podrían usarse para reemplazar los compuestos potencialmente tóxicos en uso.
- Absorbentes naturales de bajo costos y alta efectividad, los cuales pueden ser fácilmente desorbidos o biodegradados después de su uso.

Vemos así que surge el desafío de obtener, a partir de los residuos, ingredientes o aditivos estables microbiológicamente para la industria alimentaria (Larrauri, 1999; Laufenberg y col., 2003) o auxiliares de la industria con interesante actividad tecnológica.

Es necesaria la caracterización de los residuos para conocer su composición, la calidad de sus componentes y la cantidad que se genera, con lo cual se podría definir las tecnologías más apropiadas para su aprovechamiento y posterior tratamiento. Después

de la utilización de un residuo probablemente se genere un nuevo residuo más agotado que podría tener otra aplicación o bien, convertirse en un desecho. En la búsqueda por el aprovechamiento de los residuos, los profesionales deberán considerar la aplicación de procesos que respeten el ambiente (Hermida, 1993).

Actualmente, los consumidores se interesan por una dieta más balanceada y natural y con mayores beneficios para la salud. Todo ello sin dejar de tener en cuenta la adecuada calidad sensorial que contribuya a la aceptabilidad del producto. Por lo tanto, la obtención de ingredientes y aditivos a partir de residuos puede no sólo contribuir a agregar valor a los mismos si no también a satisfacer esta demanda de los consumidores por productos más naturales.

I.2. Alcaucil (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*)

El alcaucil (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*, Linnaeus), es una planta cultivada como alimento en climas templados. Es originaria de la Europa mediterránea y hoy se encuentra cultivada alrededor del mundo (Ávila, 1987). Perteneció al género *Cynara* dentro de la familia Asteraceae.

El alcaucil es similar al cardo en su aspecto, por ello las puntas de sus hojas suelen ser espinosas. La planta puede medir entre 1,00 m y 1,50 m y lo comestible es su flor. Es bianual, comportándose a veces como trienal. Presenta un sistema radicular penetrante, y, aún cuando se adapta a distintos tipos de suelo, prolifera mejor en los profundos, arenosos, fértiles y bien drenados.

La porción comestible es una pequeña porción del pedúnculo, el “corazón” y la base de las brácteas, del capítulo floral inmaduro (Figura I.3). A las flores se las conoce como pelusas o pelos y son desechadas al momento de su consumo. El capítulo floral debe ser inmaduro pero del máximo tamaño posible, compacto y con brácteas tiernas (Rodríguez López, 2009).

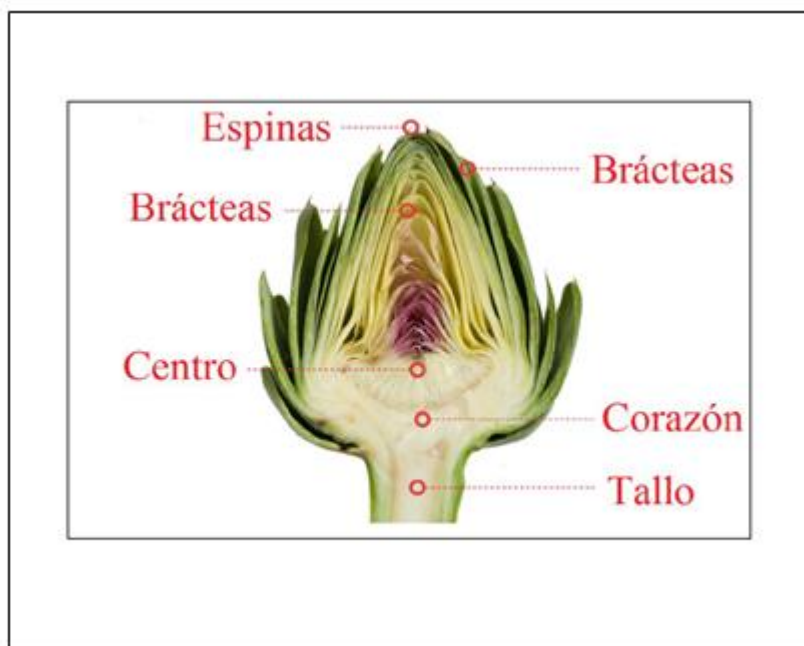


Figura I.3. Vista longitudinal de una inflorescencia de alcaucil.

1.2.1. Situación de la producción de alcaucil a nivel mundial

El principal productor de alcaucil a nivel mundial es Italia con 478.150 toneladas por año, siendo la Argentina el cuarto productor con 84.288 toneladas por año (Figura I.4).

De acuerdo a un informe de la FAO (2013), la Argentina es el país con los rendimientos más altos, 198.777 Hg/Ha seguido por Egipto (Figura I.5).

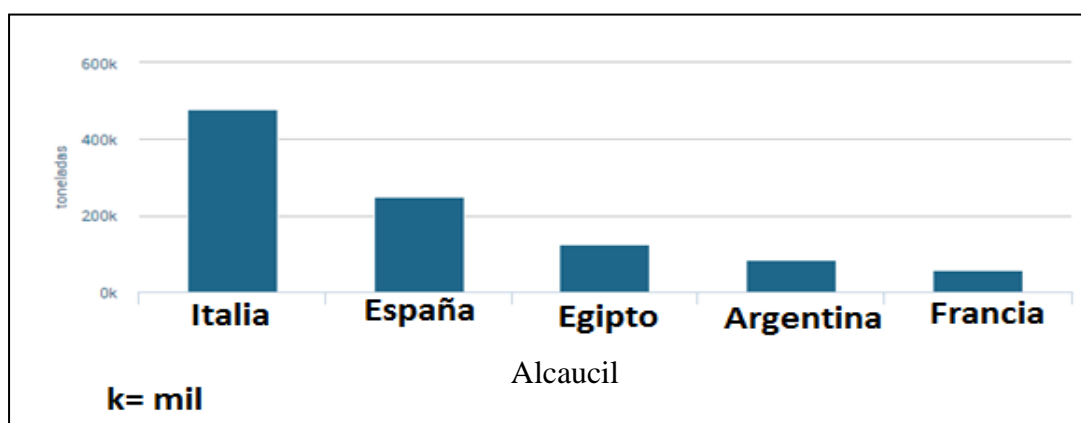


Figura I.4. Los 5 principales productores de alcaucil. FAO (2013).

El consumo de alcaucil en la Unión Europea ha decrecido pero sigue siendo un producto de alto consumo en su forma de conserva (Castagnino, 2009). La producción de conservas de alcaucil genera grandes cantidades de residuos ya que solo se utiliza el corazón de la inflorescencia, descartando el tallo y brácteas. Se estima que un 70 % del peso del alcaucil corresponde a deshechos (López-Molina y col., 2005; Firpo y col., 2007). Dichos residuos representan una prometedora fuente de componentes de valor agregado.

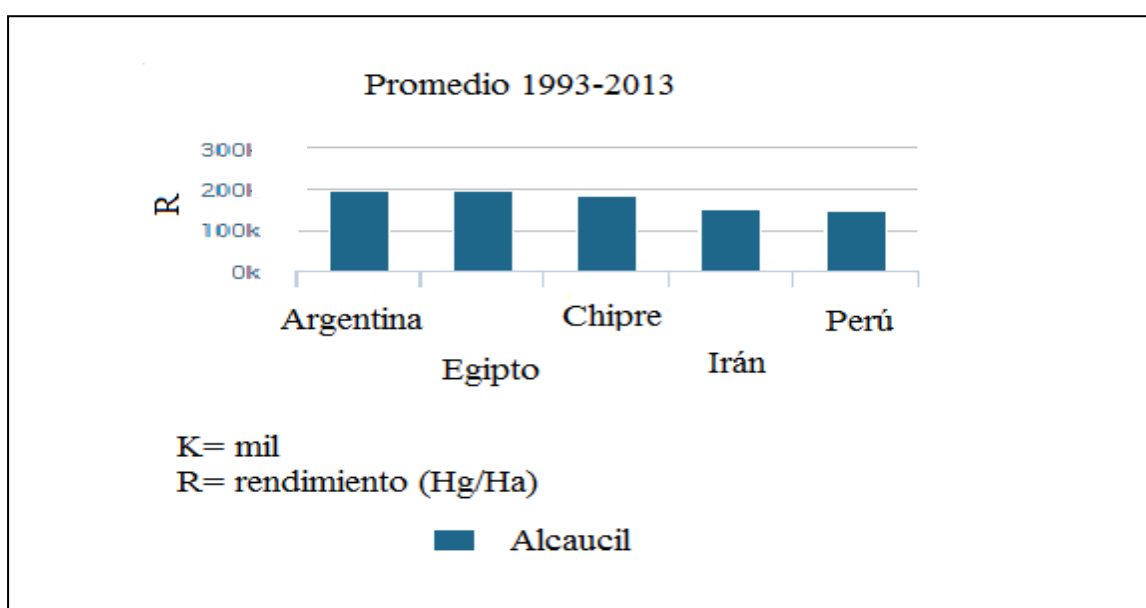


Figura I.5. Los 5 países con mayor rendimiento promedio de producción de alcaucil entre 1993 y 2013 (FAO, 2013).

I.2.2. Situación de la producción a nivel nacional

En la Argentina, el consumo de alcaucil comenzó con la llegada de los inmigrantes italianos. De acuerdo al IX Simposio Internacional de la Alcachofa, Cardo y sus variantes silvestres (2015), la mayor área de producción está en la ciudad de La Plata (Provincia de Buenos Aires) que representa el 64% de la producción nacional. En segundo lugar se encuentra Rosario (provincia de Santa Fe) con el 14% y Cuyo

(provincias de Mendoza y San Juan) con el 19% de la producción nacional (Cravero, 2000). En la Tabla I.1 se pueden observar las principales variedades de alcaucil sembradas en Argentina y sus características.

Argentina consume la mayor parte de su producción, siendo Chile el mayor exportador del hemisferio sur.

Tabla I.1. Cultivares y características de alcauciles sembrados en la Argentina. IX Simposio Internacional de la Alcachofa, Cardo y sus variantes silvestres (2015).

Cultivar	Propagación	Cosecha	Rendimiento (t.ha ⁻¹)	Peso Medio	Forma del capítulo	Color del capítulo	Espinas
Romanesco (syn. Francés)	Asexual (hijuelos)	Otoño Primavera	7	200-250	Troncocónico	Violeta-Verde	No
Blanco (syn. Blanco de San Juan)	Asexual (estacas)	Otoño Primavera	10	140-160	Troncocónico	Verde	No
Oro Verde FCA ¹	Asexual (hijuelos)	Primavera	11	250	Semiesférico	Verde grisáceo	No
Gauchito FCA	Asexual (hijuelos)	Primavera	17	250	Troncocónico	Verde	No
Guri FCA	Asexual (hijuelos)	Primavera	15	250	Troncocónico	Violeta-Verde	No
Opal	Sexual (F ₁ Híbrido)	Otoño-Primavera	12	200-220	Troncocónico	Violeta-Verde	No
Concerto	Sexual (F ₁ Híbrido)	Primavera	15	250-280	Troncocónico	Violeta	No
Symphony	Sexual (F ₁ Híbrido)	Otoño-Primavera	14	200-220	Troncocónico	Verde	No
Madrigal	Sexual (F ₁ Híbrido)	Primavera	18	200-240	Troncocónico	Verde	No

¹FCA: Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario.

I.2.3. Propiedades y composición del alcaucil

Desde tiempos muy antiguos se conocen propiedades preventivas del alcaucil contra diversas enfermedades, por ejemplo, ayuda a regular diversas funciones hepáticas, enfermedades gástricas como la dispepsia funcional, e inhibe la biosíntesis del colesterol y la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) responsables de enfermedades coronarias y arterioescleróticas (Hammouda y Seif-El-Nars, 1993; Lattanzio y col., 2009).

De acuerdo a la base de Datos Nacionales de Nutrientes del Departamento de Agricultura de los EE.UU. (USDA, National nutrient data base, 2016) el alcaucil es bajo en calorías y grasa y es una rica fuente de fibra dietaria y antioxidantes (Tabla I.2). Contiene principios amargos, cinarina y lactonas sesquiterpénicas que son los encargados de la reducción global de los niveles de colesterol total en la sangre. Es una excelente fuente de vitaminas y de ácido fólico y es una buena fuente de antioxidantes como la silimarina, ácido cafeico y ácido ferúlico, que ayudan al cuerpo a protegerse de los agentes de radicales libres dañinos. También es rico en el complejo del grupo B de vitaminas como la niacina, vitamina B-6 (piridoxina), tiamina y ácido pantoténico, que son esenciales para las funciones metabólicas celulares óptimas. Además, es una fuente rica de minerales como cobre, calcio, potasio, hierro, manganeso y fósforo y contiene pequeñas cantidades de compuestos flavonoides antioxidantes como caroteno betacaroteno, luteína, y zeaxantina (Tabla I.2).

Tabla I.2. Valores nutricionales de la porción comestible del alcaucil crudo (*cynara scolymus* L.) cada 100g. (USDA, National nutrient database, 2016).

Componentes	Composición
Carbohidratos	10,51 g
Proteínas	3,27 g
Grasas totales	0,15 g
Colesterol	0 mg
Fibra dietaria	5,4 g
Valor nutricional	47 Kcal
Vitaminas	
Folatos	68 µg
Niacina	1,046 mg
Ácido pantoténico	0,338 mg
Piridoxina	0,116 mg
Riboflavina	0,066 mg
Tiamina	0,072 mg
Vitamina C	11,7 mg
Vitamina A	13 UI
Vitamina E	0,19 mg
Vitamina k	14,8 µg
Electrolitos	
sodio	94 mg
potasio	370 mg
Minerales	
Calcio	44 mg
Cobre	0,231 mg
Hierro	1,28 mg
Magnesio	60 mg
Manganeso	0,256 mg
Fósforo	90 mg
Selenio	0,2 µg
Zinc	0,49 mg
Fitonutrientes	
Caroteno-α	8 µg
Luteína-zeaxantina	464 µg

I.3. Pared celular.

La pared celular es una estructura compleja y dinámica, que rodea las células vegetales, compuestas principalmente por polisacáridos de alto peso molecular, proteínas altamente glicosiladas y eventualmente, lignina (Somerville y col., 2004). Posee la capacidad de determinar la estructura, dar estabilidad mecánica, mantener unidas las

células del tejido, modular el crecimiento celular y constituir una barrera ante la invasión de patógenos (Jarvis, 2011). La composición y propiedades de la pared celular van cambiando a lo largo de la vida de la célula. Las paredes celulares nuevas, denominadas primarias, son originadas durante la división celular y aumentan su área superficial a medida que ocurre la expansión celular. La pared es una estructura compleja que contiene celulosa, hemicelulosa, pectinas y proteínas estructurales. Está formada principalmente por microfibrillas de celulosa en una matriz de pectinas y hemicelulosa entrecruzada. Separando células contiguas se encuentra la laminilla media que representa la capa exterior que actúa como elemento de unión entre las células contiguas y están formadas principalmente por pectinas. Por último, en algunas células se forma la pared secundaria, que se encuentra entre la membrana plasmática y la pared primaria. Esta clase de pared está asociada a la especialización que sufren las células y su composición varía según el tipo de célula. Tiene mayor peso y rigidez debido a la presencia de lignina y proteínas solubles, incluyendo enzimas (Carpita y McCann, 2000) (Figura I.6).

I.3.1. Componentes de la pared celular

I.3.1.1. Celulosa

La **celulosa** es el polisacárido de mayor abundancia en la Tierra. Se encuentra en la naturaleza casi exclusivamente en las paredes celulares vegetales, aunque algunos animales y pocas bacterias la producen (Lynd y col., 2002).

Se encuentra formada por cadenas lineales de β -1,4-glucanos, conformando microfibrillas de alrededor de 3 nm de diámetro, lo que la hace insoluble y resistente a la digestión de enzimas humanas. La zona interna de las microfibrillas tiene una

estructura cristalina que excluye las moléculas de agua, mientras que las capas externas son amorfas y permitirían el entrecruzamiento de los demás componentes que la integran (Pauly y col., 1999). Tiene un grado de polimerización de entre 2.000 y 6.000 en paredes celulares primarias y más de 10.000 en las paredes secundarias (Waldron y col., 2003).

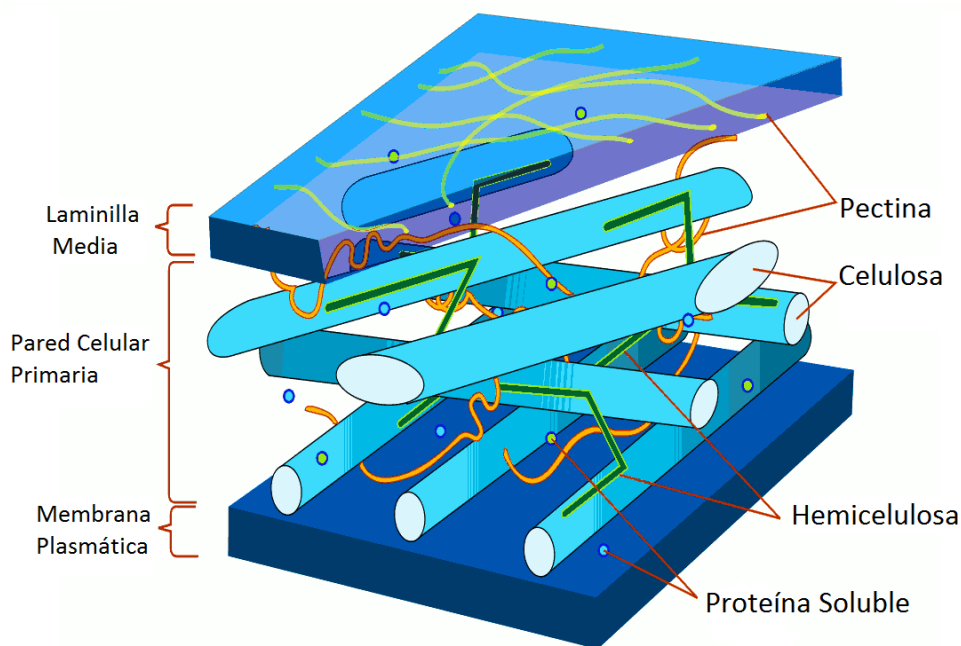


Figura I.6. Modelo aceptado de la pared celular, MacDougall y Ring (2004). Hemicelulosas (líneas de color verde) entrecruzando a las microfibrillas de celulosa (cilindros de color celeste). Pectinas (líneas irregulares de color amarillo) ocupando los espacios entre la red celulosa-hemicelulosa. Proteínas Solubles (círculos celestes y amarillos). Sobre la pared celular primaria se encuentra la laminilla media.

I.3.1.2. Hemicelulosa

Las **hemicelulosas** fueron denominadas con este nombre debido a su parecido con la estructura de la celulosa (Carpita y McCann, 2000; Scheller y Ulvskov, 2010). Se encuentran presentes a lo largo de toda la pared asociadas a las microfibrillas de

celulosa, formando una matriz entrecruzada. Son neutras o levemente ácidas, formadas por azúcares neutros y no poseen ácido galacturónico. Normalmente son insolubles, pero pueden ser también parcialmente solubles. Su estructura puede responder a una amplia diversidad de polímeros, que pueden contener además proteínas y fenoles (Hoseney, 1986; Dreher, 1987). Son polisacáridos que contienen habitualmente glucosa, manosa y/o xilosa con enlaces β -1,4 glucanos, que presentan una cadena principal relativamente larga con ramificaciones cortas (Lasheras, 2004; Wyman y col., 2005). Se clasifican de acuerdo al monómero del carbohidrato con mayor predominio. Dependiendo de la etapa de desarrollo, la especie vegetal y el tipo de tejido, pueden encontrarse subclases que dependen de los monosacáridos presentes en las ramificaciones y de otros componentes estructurales. De acuerdo al subtipo, se las agrupa a las hemicelulosas en dos categorías generales basadas en la hidratación de las fibras. Aquellos que estabilizan la pared celular a través de interacciones puente hidrógeno con la celulosa e interacciones covalentes con la lignina, éstas son hemicelulosas de baja hidratación (arabinoxilanos, glucuronoxilanos, xiloglucanos y mananos libres). El otro subtipo es utilizado principalmente como fuente de energía extracelular y como mecanismo de retención de agua en semillas y está constituido por hemicelulosas entrecruzantes (galactoglucomananos, glucomananos, galactomananos y β -glucanos) (Brummell, 2006).

I.3.1.3. Lignina

La **lignina** es un polímero aromático amorfo de alto peso molecular compuesto por residuos de fenil-propano (alcoholes hidroxicinámicos, coniferílico, sinapílico y p-cumarílico) (Dreher, 1987; Vanholme y col., 2010). Es la sustancia más abundante en la pared celular secundaria de las plantas leñosas. Debido a su carácter hidrofóbico, desplaza al agua de las paredes celulares secundarias, aumentando la resistencia química

y la rigidez de la pared (Brett y Waldron, 1996; Lasheras, 2004). De acuerdo a sus propiedades funcionales se destaca su capacidad antioxidante en presencia de aceites vegetales (Catignani y Carter, 1982).

I.3.1.4. Pectina

Las **pectinas** son polímeros heterogéneos ricos en ácido D-galacturónico, unidos principalmente por enlaces α (1 \rightarrow 4) (Carpita y McCann, 2000). Son constituyentes de la matriz viscosa que permiten el desplazamiento o arrastre de las fibrillas de celulosa o de celulosa-hemicelulosa. Se encuentran principalmente en la laminilla media y su concentración disminuye gradualmente desde la pared celular primaria hacia la membrana plasmática, ejerciendo la función de cemento intercelular (Nwanekezi y col., 1994; Ridley y col., 2001).

Las pectinas tienen la propiedad de absorber grandes cantidades de agua. Se han reportado diversas funciones relacionadas a sus grupos funcionales cargados (carboxilo), como la porosidad de la pared celular, la modulación del pH y el balance iónico (equilibrio de Gibbs-Donnan). Además, activan la ruta de defensa de la planta ante un eventual ataque de patógenos e insectos (Carpita y McCann, 2000; Caffall y Mohen, 2009).

Los principales constituyentes de la pectina son el homogalacturonano (HG), el ramnogalacturonano tipo I (RG I) y los galacturonanos sustituidos (Brett y Waldron, 2006).

El HG es una cadena lineal de ácido D-galacturónico con uniones α -(1 \rightarrow 4). Pueden presentar metil-esterificación en C-6, C-2 y C-3 y, eventualmente, acetilación en C-3 o en C-4 (Ridley y col., 2001; Izydorczyc y col., 2005) (Figura I.7). Los residuos no esterificados se encuentran cargados negativamente a pH fisiológico y pueden

modelos las cadenas de arabinanos y galactanos se unen covalentemente a RG I (Coenen y col., 2007).

La funcionalidad de la pectina puede estar explicada por su estructura química fina, grado de metilación y/o acetilación (Willats y col., 2006). Además de la cantidad y variedad de azúcares neutros. El Grado de metilación (GM) de las pectinas se expresa como moles de metanol presentes por cada cien moles de ácido galacturónico. Según su GM se las clasifica en: pectinas de alto metoxilo (HM), si GM es mayor al 50%, y pectinas de bajo metoxilo (LM), si GM es menor al 50% (Schols y Voragen, 2003). Además, la composición, estructura y propiedades fisiológicas de las pectinas están influenciadas por las condiciones de extracción, la fuente, lugar de desarrollo, entre otros. Por lo tanto, habrá una variabilidad en sus pesos moleculares, diversidad de tamaños y estructuras químicas (MacDougall y Ring, 2004). El peso molecular promedio de acuerdo con Izydorczyk y col. (2005) es del orden de 104-105 Dalton.

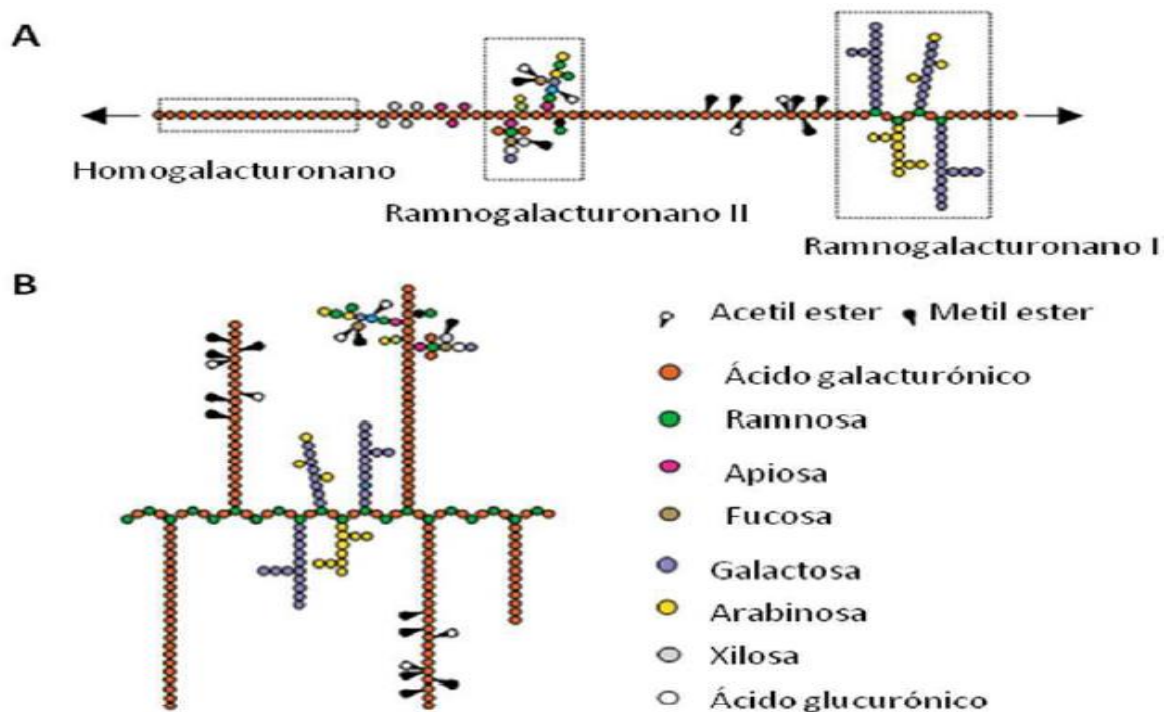


Figura I.10. Modelos estructurales de las pectinas. A) Modelo de Schols y Voragen B) Modelo de Vincken (Willats, 2006).

I.3.1.5 Otros componentes presentes en la pared celular

En la pared celular se encuentran otros componentes, tales como biopolímeros complejos como proteínas estructurales, enzimas, compuestos fenólicos y lignina (Carpita y McCann, 2000; Taiz y Zeiger, 2002; Goulao y Oliveira, 2008). Los ácidos ferúlico y cumárico suelen encontrarse esterificados a la arabinosa y/o galactosa de las pectinas (McNeil y col., 1980). Las principales proteínas se caracterizan por ser glicoproteínas ricas en ciertos aminoácidos, hidroxiprolina, prolina y glicina (Carpita y McCann, 2000). Además, están presentes enzimas como peroxidasas, fosfatasas, glicosilhidrolasas y deshidrogenasas (Brownleader y col., 1999).

I.4. Polisacárido de reserva del alcaucil

A diferencia de la mayoría de los vegetales, la familia de las Asteraceas acumula sus carbohidratos en las vacuolas en forma de inulina. La inulina es un carbohidrato polidisperso. Es un sacárido no digerible derivado de la sacarosa, constituido principalmente por unidades de D-fructosa unidos linealmente por enlaces β -(2 \rightarrow 1) y en sus extremos tiene moléculas de D-glucosa unidos a fructosa por enlaces α -(1 \rightarrow 2) (Franck y DeLeenheer, 2005). Además, existen dos alomorfos de inulina cristalina: una semihidratada y una hidratada.

La inulina es extraída de diversas fuentes, tales como cereales, vegetales, frutas, hongos y bacterias, teniendo un grado de polimerización (GP) máximo de 200 en plantas (Giannouli y col., 2004). Se la caracteriza por su grado de polimerización promedio GP_n. La inulina obtenida del alcaucil tiene GP_n = 46, valor alto al compararlo con inulinas de diferentes fuentes (GP_n= 26, 24 y 43 para topinambur, radicheta y Dalia, respectivamente) (López-Molina y col., 2005). De acuerdo con Biedrzycka y Bielecka (2004), los GP para inulina pueden variar entre 2 y 60 unidades de fructosa. Todo ello

permite observar una amplia variación en el GP y, por ende, obtener inulina con distintos atributos funcionales. Por ejemplo, si su GP es alto, la inulina poseerá menor solubilidad y capacidad de formar micro-cristales, confiriendo una textura suave y cremosa al alimento por lo cual se emplea en alimentos como sustituto de grasas (López-Molina y col., 2005). La inulina también es utilizada como gelificante, emulsionante o estabilizador de emulsiones (Zambrano y Gallardo, 2002). Hace algún tiempo, la inulina era considerada una molécula lineal pero a través de análisis de permetilación fue posible demostrar un pequeño grado de ramificación (1-2%) en aquella proveniente de Dalias y radichetas (DeLeenheer y Hoebregs, 1994). La inulina tiene una viscosidad intrínseca pequeña, en general, adoptando una forma compacta y globular más que helicoidal (Frank y DeLeenheer, 2005).

I.5. Fibra dietaria o dietética

Hipsley (1953) fue quien designó el término de “fibra dietaria” (FD) para referirse a los constituyentes no digeribles de la pared celular vegetal.

A partir de mediados de 1970 se llevaron a cabo importantes investigaciones sobre la FD produciendo una considerable atención pública (Abdul-Hamid y Luan, 2000). A través de los años, se han realizado variaciones en la definición de “fibra dietaria”. El principal problema para su definición ha sido el encontrar un equilibrio entre el conocimiento de los efectos fisiológicos y nutricionales, y métodos analíticos disponibles para su determinación. Es de gran importancia una definición válida para el análisis nutricional de los alimentos, su naturaleza química y la disponibilidad de métodos de laboratorios reproducibles que permitan obtener resultados para la correcta rotulación de los alimentos. La definición actual para el término fibra dietaria o dietética

se dio en el año 2009, por parte de la comisión del Codex Alimentarius (Comisión de Codex Alimentarius, 2009), programa conjunto con la FAO/OMS sobre normas alimentarias, donde se establecieron los siguientes parámetros para clasificar a los componentes que estarán definidos como fibra dietaria:

“Se entenderá por fibra dietaria los polímeros de hidratos de carbono con diez o más unidades monoméricas, que no son hidrolizados por las enzimas endógenas del intestino delgado humano y que pertenecen a las categorías siguientes:

polímeros de carbohidratos comestibles que se encuentran naturalmente en los alimentos en la forma en que se consumen;

polímeros de carbohidratos obtenidos de materia prima alimentaria por medios físicos, enzimáticos o químicos, y que se haya demostrado que tienen un efecto fisiológico beneficioso para la salud mediante pruebas científicas generalmente aceptadas aportadas a las autoridades competentes;

polímeros de carbohidratos sintéticos que se haya demostrado que tienen un efecto fisiológico beneficioso para la salud mediante pruebas científicas generalmente aceptadas aportadas a las autoridades competentes”.

Las notas al pie en la definición de fibra dietaria del año 2009 fueron modificadas en el año 2010 (Comisión de Codex Alimentarius, 2010) y dicen:

“La fibra dietaria, si es de origen vegetal, puede incluir fracciones de lignina y/u otros compuestos asociados con los polisacáridos de la pared celular vegetal y si tales compuestos se han cuantificado mediante los métodos de la AOAC para el análisis de fibra dietaria, estas sustancias quedan incluidas en la definición de fibra por cuanto están efectivamente asociadas con la fracción polisacarídica u oligosacarídica de la fibra”.

La decisión sobre si se deben incluir los carbohidratos entre tres y nueve unidades monoméricas debe recaer en las autoridades nacionales.

En el Código alimentario Argentino, en el capítulo XVII correspondiente a los ALIMENTOS DE RÉGIMEN DIETÉTICO - Artículo 1385 - (Resolución Conjunta SPReI N°95/2008 y SAGPyA N° 358/2008), se realiza la siguiente definición:

“Se entiende por Fibra Alimentaria a cualquier material comestible que no sea hidrolizado por las enzimas endógenas del tracto digestivo humano. Incluye polisacáridos no almidón, pectinas, almidón resistente, inulina, oligofruktosa, polidextrosa, maltodextrinas resistentes, fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS), transgalactooligosacáridos (TOS), y todos los que en el futuro incorpore la Autoridad Sanitaria Nacional” (Codex Alimentarius, 2009; CAA, 2013 a).

“Se entiende por Fructooligosacáridos (FOS) a los oligosacáridos de fructosa con uniones β -2,1 de origen natural o sintético. Se entiende por Inulina el fructano natural constituido por unidades de fructosil con uniones β -2,1 terminado en una unidad de glucosa. La longitud de la cadena es generalmente de 2 a 60 unidades. Se entiende por Oligofruktosa natural el producto constituido por 3 a 5 unidades de fructosa con una unidad terminal de glucosa. La oligofruktosa sintética contiene β -2,1 cadenas de fructosa con o sin unidades de glucosa terminales. Las cadenas varían de 2 a 8 residuos de monosacáridos. Se entiende por Fructooligosacáridos (FOS) sintéticos el producto de la hidrólisis enzimática (enzima fructofuranosidasa fúngica) de la inulina o de la síntesis o de la transfructosilación de la sacarosa. Los FOS sintéticos poseen la misma composición química y estructural que la oligofruktosa, excepto que el promedio de los grados de polimerización es de 2 a 4. Se entiende por Galactooligosacáridos (GOS) el oligosacárido no digerible (3 a 10 grados de polimerización) compuesto por unidades de

galactosa. Se entiende por Transgalactooligosacáridos (TOS o TGOS) el producto de la transgalactosilación enzimática de la lactosa. Los oligómeros son lineales y consisten en moléculas de lactosa con varias galactosas con uniones β -1,6 y β -1,4” (CAA, 2013 a).

Larrauri (1999) describió la "fibra perfecta" como aquella que posee las siguientes características:

- No debe tener ningún componente que sea ofensivo nutricionalmente.
- Ser lo más concentrado posible para obtener un máximo efecto fisiológico con mínima cantidad.
- No debe aportar gusto, olor, color o textura negativos.
- Debe contener un equilibrio entre fibra soluble e insoluble, y cantidades adecuadas de compuestos bioactivos asociados.
- No afectar negativamente a la vida útil del alimento al que se la agrega.
- Ser compatible con el procesamiento del alimento.
- Debe tener una imagen positiva para los consumidores.
- Debe generar los efectos fisiológicos esperados.

En el año 2002, la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnologías Médicas (ANMAT, 2002) incorporó el concepto de “alimento funcional” citando que los mismos, son definidos por los especialistas como aquellos “capaces de aportar sustancias con funciones fisiológicas definidas, brindando beneficios para la salud de quien los consume”. Para que un alimento pueda ser considerado funcional, debe demostrar que posee un efecto benéfico sobre una o varias funciones específicas del organismo (más allá de los efectos nutricionales habituales), que mejora el estado de salud y de bienestar, o bien que reduce el riesgo de una enfermedad. Esto significa que estos alimentos deben contener, necesariamente, alguno de los llamados componentes o

ingredientes funcionales, entre los cuales pueden mencionarse como ejemplos: vitaminas, antioxidantes, minerales, fibras dietarias.

I.5.1. Recomendaciones nutricionales para Fibra Dietaria

Las recomendaciones de ingesta de FD varían considerablemente en todo el mundo y a través del tiempo.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda una ingesta diaria de 27 a 40 gramos de fibra dietaria mientras que la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE.UU. (Food and Drugs Administration, FDA) recomienda 25 gramos de fibra por día cada 2000 kcal/día (Olganero y col., 2007). El Código Alimentario Argentino (CAA, 2013 b) en el capítulo V sobre “Normas para la rotulación y publicidad de los alimentos” establece valores de fibra alimentaria de 25 gramos para una dieta de 2000 kcal/día tomando como referencia la recomendación de FAO/OMS (2003). Sin embargo, los informes revelan un consumo promedio menor, de entre 13 y 14 g/día (King y col., 2012). Los nuevos estilos de vida han modificado los hábitos alimenticios saludables, produciendo una marcada reducción en el consumo de frutas y verduras (King y col., 2009).

I.5.2. Composición de la fibra dietaria y funcionalidad

La FD se divide en dos clases, de acuerdo a su comportamiento en agua: fracción soluble o insoluble (Periago y col., 1993). La fracción insoluble se encuentra relacionada a la estructura de las células vegetales, mientras que la fracción soluble consiste en secreciones de las células vegetales. Cada fracción proporciona diferentes efectos fisiológicos (Schneeman, 1987).

La fibra dietaria total (FDT) es el término utilizado para cuantificar la FD, la cual está compuesta por fibra dietaria insoluble (FDI) y fibra dietaria soluble (FDS). La mayoría de las fuentes tienen ambos tipos de fibras. La FDI es, en su mayoría, fragmentos de la pared celular compuesta por celulosa, lignina y hemicelulosa. La FDS contiene principalmente polisacáridos no celulósicos como pectinas, gomas y mucílagos. La FDI se relaciona tanto con la regulación como con la absorción del agua intestinal, en cambio, la FDS se asocia con la reducción del colesterol en sangre y la reducción de la absorción de glucosa (Periago y col., 1993).

En general, alrededor del 75% de la FD que se encuentra en los alimentos es en forma de FDI. La fibra de salvado de cereales es uno de los componentes principales en alimentos formulados con un alto contenido de FD, siendo bajo su contenido en FDS. Sin embargo, en las frutas, la relación de ambas fibras es más equilibrada (Saura-Calixto, 1993; Dreher, 1999).

Los principales componentes de la FD, su descripción y fuente de obtención se muestran en la Tabla I.3.

Con esta información podemos concluir que se encuentran presentes en la FD, una gran heterogeneidad de componentes los cuales le otorgan a cada una, características físicas, químicas y fisiológicas únicas.

La incorporación de FD a los alimentos puede así realizarse considerando sus propiedades funcionales de acuerdo al objetivo buscado. Las fibras pueden incorporarse al alimento como ingrediente (>5%) o como aditivo (<5%) (Guillón y Champ, 2000). Ellas pueden proveer modificaciones en la solubilidad, viscosidad, capacidad de retención de agua y aceite (Tungland y Meyer, 2002). Además, pueden cambiar la textura, evitar la sinéresis, estabilizar alimentos con alto contenido de grasas y mejorar

la vida útil (Elleuch y col., 2011). La FDS puede utilizarse como emulsificante y en productos de bajas calorías elevando el nivel de nutrientes (Fernández y García, 2001).

Tabla I.3. Tipos de FD, composición química y fuente.

Fibra	Componentes	Fuente
Celulosa	β -(1,4) glucosa	Pared celular de la mayoría de las plantas.
β -glucanos	β -(1,4) glucosa y β -(1,3) glucosa	Pared celular en la avena y la cebada.
Hemicelulosa	Heteropolisacáridos (glucosa, manosa, galactosa, xilosa y arabinosa) enlaces acetálicos o glicosílicos α y β	Verduras, frutas, legumbres y frutos secos.
Xilanos/ Arabinoxilanos	β -D-(1,4) xilosa	Cubierta exterior de granos.
Pectina Homogalacturonano "smooth regions"	Ácido α -(1,4)-D-galacturónico (algunos grupos pueden encontrarse metilados)	Paredes celulares y tejido intracelular de frutas y verduras.
Ramnogalacturonano-I "hairy regions"	Ácido(1,4) galacturónico, (1,2) ramnosa y 1-, 2-, 4- ramnosa ácido	
Ramnogalacturonano-II	Ácido α -(1-4) galacturónico (apiosa, ácido cérico, fucosa, α -arabinosa)	
Gomas	Estructura variable, dependiendo de la fuente	Polisacáridos de la pared celular de legumbres, algas y microorganismos.
Carragenanos	Sulfato-galactosa	Paredes celulares de las algas rojas y musgos irlandeses.
Alginatos	Ácido β -(1,4)-D-manurónico o ácido α -(1,4)-L-gulurónico	Paredes de algas marrones
Mucílagos	β -(1,4)-D-manosa, Ácido β (2 \rightarrow 1)-D-fructosil-fructosa, galactoglucomanos	Semillas de chía, lino y membrillo y algas.
Ligninas	Alcohol sirínico, alcohol guayacil y alcohol cumárico	Pared celular de vegetales.
Quitosano	β -(1 \rightarrow 4)-unido D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina	Exoesqueleto de crustáceos y de insectos.
Oligosacáridos resistentes Fructooligosacárido (FOS) e inulina; Galactooligosacáridos (GOS); Xilooligosacáridos (XOS); Isomaltooligosacáridos (IMOS)	β -(2 \rightarrow 1)-D-fructosil-fructosa	Achicoria, cebolla, ajo, alcaucil; Legumbres; Frutas y leche; Salsa de soja, sake y miel.
Almidones resistentes AR1 (atrapado); AR2 (cristalizado); AR3 (retrogrado); AR4 (modificado químicamente por la industria)	α (1 \rightarrow 4)-D-Glucosa con ramificaciones α (1 \rightarrow 6)-D-Glucosa	Granos de cereales y legumbres; Papas crudas, banana verde y harina de maíz; Pan, copos de cereales, papas cocidas y enfriadas y alimentos precocinados; Alimentos procesados.

La FD puede ser incorporada en alimentos de bajo contenido calórico para el reemplazo parcial de harina, grasa o azúcar, mejorando la capacidad de retención de agua o de aceite y, de esta forma, mejorando la estabilidad física de una emulsión o la estabilidad química a la oxidación (Elleuch y col., 2011). Pero, además, la fibra dietaria presenta una funcionalidad muy variada en relación con los aspectos organolépticos, microestructurales, mecánicos/físicos y en las propiedades químicas de los alimentos que la contienen.

I.5.3. Efectos de la fibra dietaria

La FD alcanza el colon sin haber sido digerida. Los efectos producidos y su intensidad dependen del tipo y cantidad de fibra, además de las características de la persona que la ingiere.

La FDS es fácilmente fermentada por la flora bacteriana (Escudero Álvarez y González Sánchez, 2006). En contacto con agua forma un retículo en el cual queda atrapada, aportando un aumento de la viscosidad. Esto conlleva a efectos sobre el metabolismo lipídico, hidrocarbonado y en su potencial anticarcinogénico (Mataix y Gassull, 2002). Se cree que éste es el mecanismo por el cual la FDS enlentece el vaciado gástrico, acelera el tránsito del intestino delgado y enlentece la absorción de nutrientes. En cambio, la FDI o poco soluble retiene el agua en su matriz estructural, produciendo un aumento de la masa fecal que acelera el tránsito intestinal. Esto contribuye a disminuir la concentración y el contacto con potenciales carcinógenos por parte de la mucosa del colon; además, es utilizada en tratamientos y prevención de constipación crónica (Kim, 2000).

I.6. Tratamiento de los tejidos vegetales para la obtención de fibra dietaria

Es de suma importancia tener en cuenta las interacciones que existen entre los polímeros que componen la pared celular para comprender la estructura y las propiedades de la misma. Éste conocimiento permite el desarrollo de metodologías adecuadas para la extracción de fracciones enriquecidas en determinados tipos de polímeros para su posterior análisis y/o utilización.

Una práctica habitual es la extracción de distintas fracciones basándose en su diferencia de solubilidad (Brummell, 2006). Primero se somete al tejido a ebullición con etanol absoluto y, posteriormente, se realiza una filtración. Debido a que los polímeros permanecen insolubles en este alcohol, el sólido resultante está compuesto fundamentalmente por las paredes celulares que se encontraban en el tejido tratado. El sólido resultante se denomina “residuo insoluble en alcohol” (AIR). Y, habitualmente, se somete a extracciones secuenciales con ácidos fuertes para obtener distintas fracciones enriquecidas en aquellos polisacáridos de interés.

Un punto importante a considerar es la contaminación que generan los productos usados para la extracción del compuesto de interés. Por ejemplo, la extracción ácida produce corrosión en el equipamiento y los efluentes generados deben tratarse antes de deshacerse de ellos para evitar producir contaminación ambiental.

Una variable de extracción de polisacáridos amigable con el medio ambiente es mediante tratamientos enzimáticos. Es de destacar que las enzimas pueden usarse no sólo para ayudar a la extracción si no también para realizar modificaciones de los polisacáridos involucrados que pueden mejorar la composición química y las propiedades físicas de la fibra dietaria (Caprez y col., 1987).

Las enzimas hidrolasas producen la degradación de los polisacáridos que componen la pared celular de los tejidos vegetales. Entre ellas se encuentran las celulasas, pectinasas

y hemicelulasas. Sus principales aplicaciones son: extracción y clarificación de jugos de frutas y verduras, producción de purés de frutas, modificación de propiedades sensoriales de frutas y verduras, extracción de aceite de oliva, mejoramiento en productos de panadería, elaboración de cerveza, etc.

La producción de enzimas, a su vez, puede llevarse a cabo con la intervención de plantas, microorganismos y otros. La obtención medida por microorganismos es habitualmente la preferida debido a su rápido crecimiento y a que las enzimas producidas son fácilmente extraíbles (Ogawa y Shimizu, 2004).

Debido a que comercialmente la obtención de fibra soluble, en particular pectina, se realiza tratando al material vegetal crudo con ácido mineral diluido caliente a $\text{pH} \approx 2$, los efluentes se han vuelto una importante consideración en la industria de las pectinas; de hecho, los problemas por efluentes han causado el cierre de algunas plantas (May, 1990). Con la finalidad de encontrar una alternativa y un modo ambientalmente amigable de extraer pectinas “*green labelled*”, se ha estudiado el uso de enzimas (Panouillé y col., 2006). Fissore y col. (2007, 2009, 2011) estudiaron la extracción de pectina a partir de distintos vegetales mediante hidrólisis enzimática con celulasas y hemicelulasas. Las pectinas obtenidas demostraron ser altamente influenciadas por la técnica de extracción utilizada y se obtuvieron algunas pectinas con alto potencial de uso como aditivos alimentarios espesantes y gelificantes. A pesar que varios procesos alternativos han sido patentados en los últimos años, la extracción de la pectina a nivel industrial se lleva a cabo por medio de hidrólisis ácida y posterior precipitación con alcohol. Después se seca, se muele y se tamiza a un tamaño de partícula definido (Levigne y col., 2002). La red de polisacáridos de pared debe romperse para permitir la extracción de pectina a partir de los tejidos vegetales. Debido a que la pared celular vegetal se compone principalmente de celulosa, hemicelulosa, pectina y proteína

(Figura I.6), el uso de enzimas tales como celulasas, hemicelulasas y proteasas, permite degradar la pared celular de la planta, facilitando el aislamiento de las pectinas (MacDougall y col., 2004). Por otro lado, el tratamiento enzimático es amigable con el medio ambiente, ya que no se generan residuos de ácidos minerales como ocurre en el tratamiento tradicional. Además, las enzimas están diseñadas para actuar sobre un sustrato específico (Shkodina y col., 1998). Por ejemplo, la hemicelulasa degrada las hemicelulosas dejando libre la pectina. De esta forma, la incorporación de enzimas tales como hemicelulasa y proteasa, permitiría extraer pectina por un tratamiento menos agresivo y menos contaminante del medioambiente.

Se han reportado varios métodos de extracción de inulina a partir de achicoria. Uno de ellos, es la utilización de las raíces de achicoria, las cuales fueron limpiadas, cortadas y la extracción se realizó con agua caliente. El jugo espeso resultante se calentó hasta 95°C y se lo mantuvo durante 30 h, luego se lo enfrió a 4°C. La inulina precipitó, y luego se filtró (Berghofer, 1993). Los métodos existentes tienen altos tiempos de tratamiento con una baja eficiencia en la extracción. Por lo tanto, es necesario encontrar un método adecuado para la extracción de inulina que sea económico y que produzca un alto rendimiento. La extracción asistida por microondas (MAE) es un proceso que utiliza la energía de microondas para calentar los solventes en contacto con una muestra con el fin de dividir los analitos de la matriz de la muestra en el solvente. La temperatura y la presión altamente localizadas pueden causar una migración selectiva de compuestos del material a un ritmo más rápido, por lo tanto, proporciona extractos enriquecidos en comparación con extractos convencionales. Es una técnica alternativa prometedora de preparación de muestras para una amplia variedad de aplicaciones (Gao, 2006; Rostagno y col., 2007; Zhang, 2007 y Zhou, 2008). La ventaja más importante del MAE es la capacidad de alcanzar rápidamente temperaturas elevadas y mantenerlos por

tiempos constantes (Brian, 1994). El aumento en la eficiencia de extracción por microondas es generalmente atribuido a su efecto por calentamiento volumétrico, que ocurre debido a la rotación de dipolos del disolvente en el campo de microondas, produciendo que la temperatura del solvente aumente, permitiendo que luego aumente la solubilidad del compuesto de interés. Se ha estudiado el mecanismo de la extracción por la asistencia con microondas, observando la destrucción celular del material vegetal después del tratamiento, utilizando microscopía de barrido de electrón. Jian (2010) trabajó en la optimización de extracción asistida por microondas en polisacáridos de *Cyclocaryapaliurus* usando metodología de superficie de respuesta.

I.7. Funciones de la microbiota y degradación de la FD

La microbiota intestinal desarrolla una intensa actividad metabólica que le permite mantener una relación de simbiosis o comensalismo con el huésped. La actividad bioquímica microbiana actúa colectivamente como un órgano, interviniendo en: la mejoría de la biodisponibilidad de nutrientes y la degradación de compuestos de la dieta no digeribles, el aporte de nuevos nutrientes, y la eliminación de compuestos perjudiciales y antinutrientes. Estas funciones metabólicas tienen una gran repercusión en el estado nutritivo y de salud del hombre; no obstante, dependen de la composición de la flora y de sus complejas interacciones con la dieta y el individuo (Sanz y col., 2004).

En el colon se dan principalmente dos tipos de fermentaciones: sacarolítica y proteolítica, debido a la presencia de la flora bacteriana. La principal función de la flora colónica es la fermentación en condiciones de anaerobiosis y producción de enzimas

capaces de digerir carbohidratos y proteínas de los sustratos no digeridos (Guarner, 2000).

I.7.1. Probióticos

De acuerdo a la FAO/OMS (2001) se denomina como probiótico a los: “microorganismos vivos que, administrados a una dosis suficiente, confieren un efecto beneficioso a la salud general del hombre o animal”.

Los requisitos que debe cumplir un microorganismo para ser considerado probiótico:

- Formar parte de la microbiota del intestino humano
- No ser patógeno ni toxigénico
- Mantenerse viable en medio ácido del estómago y en contacto con la bilis del duodeno
- Adherirse a las células epiteliales intestinales
- Capacidad de adaptación a la microbiota intestinal sin desplazar a la ya existente
- Producir sustancias antimicrobianas
- Tener la capacidad para aumentar de forma positiva las funciones inmunes y metabólicas (West y col., 2009).

Entre las bacterias con mayor incidencia probiótica se encuentran las bacterias ácido lácticas, BAL, pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Gourbeyre y col., 2011). El género más amplio es *Lactobacillus*, que presenta más de cien especies diferentes (Vasiljevik y Shah, 2008). Son bacilos, Gram positivos, catalasa negativos, no esporulados y en general inmóviles (Claesson y col., 2007). El pH óptimo de crecimiento es entre 5,5 y 6,2; la temperatura de crecimiento varía entre mesófilos y termófilos. Además, son anaerobios aerotolerantes y su crecimiento se ve favorecido en atmósfera microaerófila con un 5-10% de CO₂. Suelen encontrarse en diferentes nichos ecológicos, siempre y cuando haya fuente de carbohidratos hidrosolubles (Walter, 2008).

El género de *Bifidobacterium* posee más de treinta especies. Son bacilos pleomórficos, pudiendo cambiar su morfología a formas ramificadas “Y” o “V”, ensanchadas normalmente en uno de sus extremos. Son microorganismos Gram positivos, anaerobios estrictos, inmóviles, no esporulados y catalasa negativos. El pH óptimo es entre 6,0 y 7,0 y son mesófilos (Turróni y col., 2010). Las bifidobacterias difieren de los lactobacilos en que además de liberar ácido láctico, también liberan ácido acético.

De ésta forma lactobacilos y bifidobacterias producen una disminución del pH del colon controlando el crecimiento de bacterias patogénicas y, además, la eliminación de amonio tóxico (Klein y col., 1998). También producen vitaminas, principalmente del grupo B y K e interaccionan con el sistema inmunológico de la mucosa (Lanning y col., 2005; Tsuji y col., 2008).

Las bacterias denominadas potencialmente patogénicas presentes en el colon son *Escherichia Coli*, *Klebsiella*, *Fusobacterium*, *Bacterioides* y *Clostridium* debido a su fermentación proteolítica y producción de toxinas (Nelson y col., 1994).

De esta forma, la fermentación es un factor limitante ya que la producción de metabolitos ácidos puede alterar el pH del ciego y colon. Las bacterias comensales producen una exclusión competitiva limitando la superficie a colonizar, reducen la disponibilidad de nutrientes y secretan sustancias antimicrobianas, como las bacteriocinas (Lenoir-Winjkooop y col., 2007).

Numerosos estudios muestran la utilidad de BAL como alternativa al uso de antibióticos para prevenir o tratar desórdenes gastrointestinales tanto en humanos como en animales (Ouwehand y col., 2004). Algunas cepas se han utilizado como adyuvantes para prevenir infecciones gastrointestinales y enteritis (Coconnier y col., 2000). Además, se las ha asociado a actividad antiviral, principalmente en rotavirus causante de diarreas (Zhang y col., 2008).

I.7.2. Prebióticos

Gibson y Robertfroid (1995) y Robertfroid (2007) establecieron que para que un ingrediente alimenticio se considere un prebiótico debe ser demostrado científicamente que ese ingrediente resiste la acidez gástrica, la hidrólisis por enzimas de mamíferos y la absorción gastrointestinal, es fermentado por la microflora intestinal y estimula selectivamente el crecimiento y/o la actividad de las bacterias intestinales asociadas con la salud y el bienestar.

La resistencia de los prebióticos a la hidrólisis y su absorción más allá de la parte superior del tracto gastrointestinal asegura la protección de los probióticos hasta su llegada al intestino (Romano y col., 2016).

El prebiótico sirve de fuente de carbono selectivo para el crecimiento de un número limitado de microorganismos, provocando una modificación selectiva de la microbiota intestinal del huésped (Teitelbaum y Walker, 2002).

La inulina es obtenida principalmente de alcauciles, achicoria, Dalias y diente de león (Van Loo y Hermans, 2000) y es ampliamente reconocida en la literatura como efectivo prebiótico por la estimulación del desarrollo de bifidobacteria (Joossens y col., 2011; Pinheiro de Souza Oliveira y col., 2011). De acuerdo a la FDA, la inulina y los FOS, fueron considerados como GRAS, generalmente reconocidos como seguros, y pueden ser utilizados como ingredientes alimentarios naturales. Además, se ha demostrado que incrementan la absorción de calcio y magnesio, influye en la formación de glucosa en sangre, y reduce los niveles de colesterol y lípidos del suero (Coudray y col., 1997; Nines, 1999). Debido a sus propiedades prebióticas reconocidas, la inulina es utilizada en el desarrollo de nuevos productos alimenticios como bebidas, yogures, galletitas (Kolida y col., 2002; Olano-Martín y col., 2002; Joossens y col., 2011; Pinheiro de

Souza Oliveira y col., 2011). Por otro lado, Parkar y col. (2010) informaron el efecto prebiótico de pectina aislada de frutos de kiwi.

I.7.3. Efecto Prebióticos de la FD

La degradación bacteriana de la FD se produce en dos etapas:

- Una hidrólisis extracelular de los polisacáridos, obteniéndose mono- y disacáridos
- Luego una glicólisis anaeróbica intracelular

Este proceso genera 1-2,5 kcal/g, necesarias para mantener y desarrollar la flora bacteriana y las células epiteliales de la mucosa colónica (Prins, 1977; Wolin y Miller, 1983).

Además, la fermentación produce y libera ácidos grasos de cadena corta (AGCC), tales como: acético, propiónico y butírico, en proporción molar casi constante (60:25:15, respectivamente) y en menor proporción: valerato, hexanoato e isovalerato y gases (hidrógeno, anhídrido carbónico y metano). Éstos AGCC poseen un papel importante en el mantenimiento de la integridad de la mucosa colónica, siendo el principal sustrato nutritivo de las células de la mucosa intestinal a nivel ciego y colon (Miller y Wolin, 1979; Titgemeyer y col., 1991; Fernández-Bañares, 1992; Nordgaard y col., 1995). La fermentación proteolítica produce derivados nitrogenados tales como aminas, amonio y compuestos fenólicos, algunos de los cuales son carcinogénicos.

Más del 50 % de la fibra consumida es degradada en el colon, el resto se elimina en las heces. Todos los tipos de fibra, excepto la lignina, son fermentados por las bacterias intestinales, siendo las fibras solubles fermentadas en mayor grado que las insolubles. Los fructo-oligosacáridos (FOS) presentan una capacidad de fermentación del 100% y son denominados fibras funcionales, debido a su capacidad de multiplicar por diez el número de bifidobacterias (Escudero Álvarez y González Sánchez, 2006).

La composición química y la estructura física de la fibra es un factor determinante para que sea utilizada como sustrato por las enzimas bacterianas. Los polisacáridos provenientes de frutas y verduras son fermentados de mejor forma que los procedentes de cereales, debido al mayor contenido de las primeras en FDS.

Las especies bacterianas colónicas encontradas representan el 41-57 % del peso en seco de las heces y la mayoría (96-99%) son anaeróbicas. Además, se ha verificado que distintas cepas de la misma especie poseen distintos efectos en el hospedador (Aureli y col., 2011).

I.8. Compuestos Antioxidantes

El gran aumento de enfermedades crónicas y degenerativas en países desarrollados ha producido un gran interés en la prevención de estas enfermedades. De acuerdo a estudios epidemiológicos, se ha comprobado que las dietas ricas en frutas y verduras y, principalmente, la dieta que siguen los países mediterráneos europeos (Dieta Mediterránea), pueden prevenir el desarrollo de estas enfermedades, debido a la presencia de diversos compuestos bioactivos como la FD y los compuestos antioxidantes (Vicent-Baudry y Deffort, 2005).

Los compuestos polifenólicos son un amplio grupo de metabolitos secundarios que se encuentran en las plantas. Estos compuestos son capaces de prevenir procesos degenerativos asociados a un exceso de radicales libres del organismo (Namiki, 1990) por su actividad antioxidante. Se puede decir que los compuestos antioxidantes son “aquellas sustancias que, en bajas cantidades, actúan previniendo o retardando grandemente la oxidación de materiales fácilmente oxidables tales como las grasas” (Chipault, 1962).

Se conoce como radical libre a una especie química con uno o más electrones desapareados en un nivel energético superior, con capacidad de existencia independiente y con propiedades paramagnéticas, lo que le confiere una alta actividad (Halliwell y col., 1995; González San José y col., 2001). Los compuestos antioxidantes se pueden clasificar en primarios, que son los que reaccionan directamente con los radicales libres- en cuyo caso suelen dar lugar a un nuevo radical, menos reactivo que el original-, o como antioxidantes secundarios, potenciando otros sistemas antioxidantes (Gordon, 1990).

El número de compuestos polifenólicos naturales se ha estimado en casi más de un millón, debido a la diversidad química con que se presentan dado que suelen encontrarse glicosilados, unidos a diferentes azúcares y con diferentes formas de enlace. Sin embargo, la bioactividad se atribuye al fragmento aglicona, no al azúcar (Sakakibara y col., 2003).

Los compuestos polifenólicos alimentarios se pueden clasificar en dos grupos: extraíbles y no extraíbles. Los extraíbles son compuestos de bajo o medio peso molecular que pueden ser extraídos a través de solventes acuosos o acuosos-orgánicos. Los no extraíbles, en general, poseen un elevado peso molecular, o se encuentran unidos a la fibra dietaria o proteínas (Bravo y col., 1993).

Los compuestos polifenólicos extraíbles se pueden clasificar de acuerdo a su estructura química:

- Estructuras simples como ácidos fenólicos, que pueden dividirse en dos subgrupos, los ácidos hidroxibenzoicos (ácido gálico, p-hidroxibenzoico, protocatecuico, vainílico y sirínico) y los ácidos hidroxicinámicos (cafeico, ferúlico, p-cumárico y sinático). La Figura I.11 muestra estructuras de los dos subgrupos y de algunos antioxidantes.

•Estructuras esterificadas como: ácidos clorogénico, isoclorogénico, neoclorogénico y criptoclorogénico.

•Estructuras más complejas como: flavonoides que se subdividen en flavonas (apigeninas, luteína y rutina), en flavonoles (quercetina, miricetina), en flavanoles o catequinas (epicatequinas, galato de epicatequina, epigalocatequina, galato de epigalocatequina), en flavanonas (hesperidina, naringenina), en antocianinas (delfinidina, malvidina, cianidina) y los taninos condensados con un número bajo de monómeros. Los flavonoides se forman a partir de fenilalanina, tirosina y grupos acetatos. En la Figura I.12 se observa la estructura general de los flavonoides.

El alcaucil es una atractiva fuente de antioxidantes naturales, rico en polifenoles, principalmente ácidos fenólicos y flavonoides (Schütz y col., 2004). En la Figura I.13, se puede observar la vía general de obtención de los diferentes antioxidantes presentes en *Cynara cardunculus*.

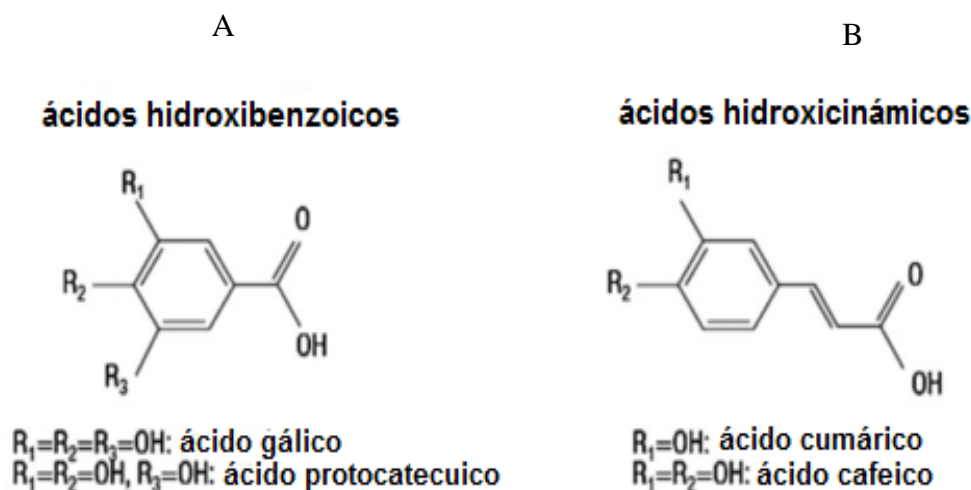


Figura I.11. A- Estructura de ácidos hidroxibenzoicos (ácido gálico y ácido protocatecuico). B- Estructura de ácidos hidroxicinámico (ácido cumárico y cafeico).

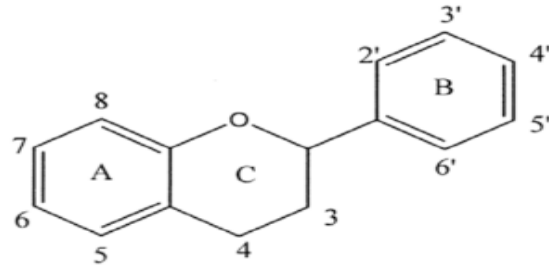


Figura I.12. Estructura básica de los flavonoides.

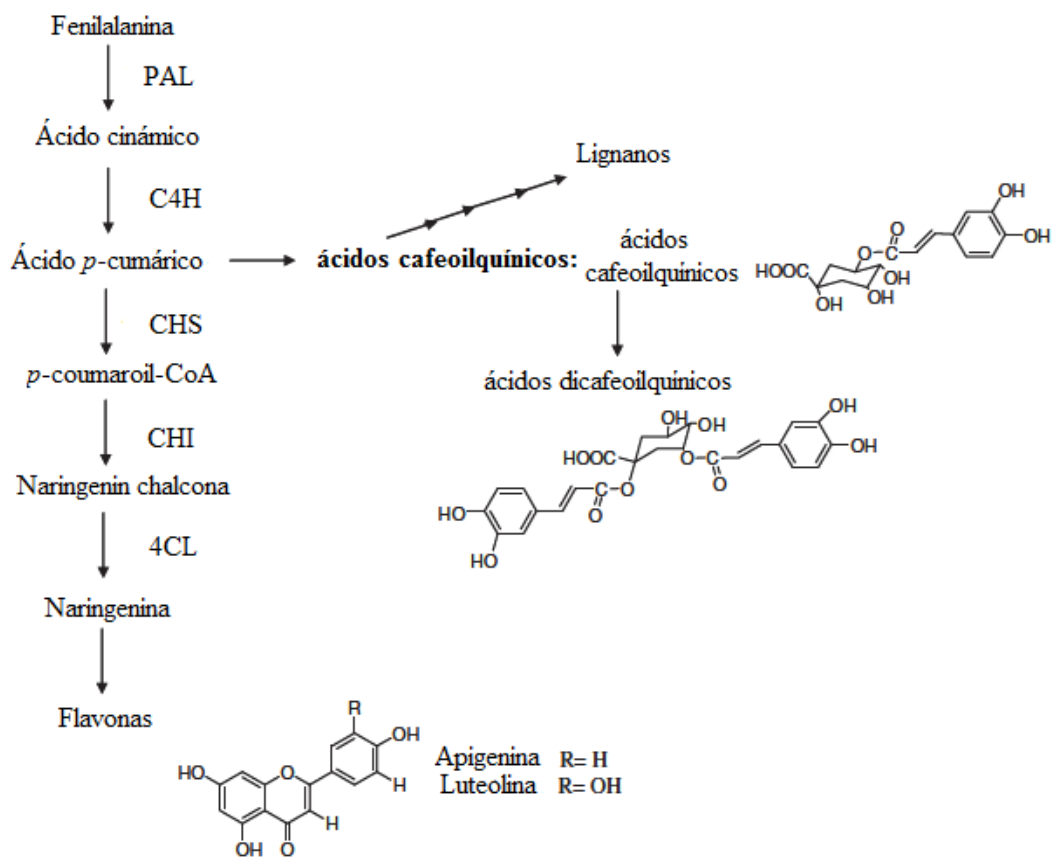


Figura I.13. Vía general de los fenilpropanoides y las estructuras de los compuestos fenólicos que se encuentran en mayor proporción en *Cynara cardunculus*. Abreviaturas PAL: fenilalanina amonio liasa, C4H: cinamato-4-hidroxilasa, 4CL: coumaroil-CoA ligasa, CHS: chalcona sintasa, CHI: chalcona isomerasa.

Los polifenoles no extraíbles incluyen taninos hidrolizables y taninos condensados con un número elevado de unidades en la cadena polimérica. Los taninos hidrolizables son

estructuras poliméricas que pueden derivar del ácido gálico o de su producto dimérico de condensación, el ácido hexahidroxidifénico. Los taninos condensados o proantocianidinas, son estructuras poliméricas formadas por unidades de antocianidina (flavonoides). Además, pueden tener sustituyentes acilos o glucosilos y uno de los más frecuentes es el ácido gálico (Santos-Buelga y Scalbert, 2000). Aunque las vías de síntesis de obtención de flavonoides son bien conocidas, los pasos que permiten la condensación y polimerización no han sido dilucidados. Los principales flavanoles monómeros de los polímeros (taninos condensados) más estudiados son (-) epicatequina y (+) catequina (Hagerman, 2002).

Las técnicas analíticas para cuantificación y/o identificación de compuestos fenólicos incluyen la cromatografía de capa fina (TCL), la cromatografía de gases (CG) y la de líquidos de alta resolución (HPLC) asociadas a métodos como la espectrometría de masa para ayudar a la identificación (Escarpa y Gonzalez, 2001).

La forma de acción de los compuestos polifenólicos es la donación de un hidrógeno y un electrón proveniente de un grupo OH del anillo B a un radical hidroxilo, peroxilo y peroxonitrilo, logrando estabilizarlos y el flavonoide se transforma en una molécula radicalica relativamente estable (Figura I.12). También son capaces de quelar metales, formando complejos y manteniendo su actividad antioxidante (Heim y col., 2002).

Finalmente, algunos compuestos polifenólicos, pueden potenciar las actividades de enzimas antioxidantes (Metin Donma y Donma, 2005).

Las estructuras polifenólicas que presentan una mayor capacidad antioxidante *in vitro*, no necesariamente la tendrán *in vivo*. En ciertos estudios se demostró que los polifenoles metilados que, *in vitro*, presentan una capacidad antioxidante muy inferior a la de su forma no metilada, mostraban una mayor capacidad para proteger a cultivos celulares de la toxicidad inducida por peróxido de hidrógeno (Deng y col., 2006). De

igual forma, los compuestos fenólicos más abundantes en los alimentos no son los más absorbidos; por ejemplo, el ácido gálico, generalmente se encuentra en menor proporción que otros polifenólicos, pero presenta mayores tasas de absorción.

La capacidad antioxidante puede considerarse actualmente un factor a tener en cuenta en análisis nutricional de frutas y verduras y en la determinación de variaciones en procesos post-cosecha. La capacidad antioxidante total de una muestra viene determinada por interacciones sinérgicas y de antagonismo entre diferentes compuestos antioxidantes, determinando que sea necesario realizar la extracción de los compuestos con eficiencia (Santos-Buelga y Scalbert, 2000).

Los métodos más usados para medir capacidad antioxidante son el método FRAP (ferric reducing/antioxidant power), basado en la capacidad del antioxidante para reducir el hierro y los métodos de ABTS (Acido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico), DPPH (1,1-difenilo-2-picril-hidrazilo) y ORAC (capacidad de absorción del radical de oxígeno), basados en la captación de distintos radicales libres. Se han estudiado distintos aspectos que influyen en su aplicación, como puede ser el disolvente empleado en la extracción o la presencia de compuestos no antioxidantes que pueden actuar como interferencias (Escarpa y Gonzalez, 2001).

En la actualidad, la industrialización de alimentos y la producción agrícola son generadores de grandes cantidades de residuos ricos en componentes fenólicos (Moure y col, 2001; Volf y col., 2006). Una de las fuentes más ricas es la piel de las bayas, que es desechada luego de la obtención de jugos y vinos (Larrosa y col., 2002; Lapornik y col., 2005). La industria citrícola produce grandes cantidades de residuos de piel y semillas, en la cual se ha encontrado mayor contenido de fenoles totales comparándola con sus partes comestibles (Bocco y col., 1998). También se han detectado compuestos

fenólicos en los residuos provenientes del alcaucil, coliflor, zanahorias, cebolla y apio (Larrosa y col., 2002).

Hoy en día, los principales usos de los compuestos antioxidantes son como colorantes naturales y conservantes de alimentos (Zhang y col., 2009).

I.9. Actividad Antiviral del alcaucil

I.9.1. Cultivo celular

El cultivo de células tiene su origen en el siglo XIX. El objetivo de este procedimiento es mantener vivas las células, fuera de su organismo de origen, para estudiar su comportamiento sin el control normal que ejerce el organismo vivo y bajo un ambiente experimental (Freshney, 2000).

El cultivo de células es la mejor manera de establecer nuevas líneas celulares en cultivos para estudiar la morfología celular y poder comparar el efecto de diferentes agentes o diferentes concentraciones de éstos agentes sobre el crecimiento y metabolismo.

I.9.2. Líneas celulares

Las líneas celulares son células de origen animal que se han adaptado para vivir en cultivo, lo que implica la alteración de las características de crecimiento (Freshney, 2000).

Las líneas celulares se pueden dividir en dos tipos principales (Morgan y Darling, 1995):

- Adherentes (células en monocapa) son aquellas que se fijan sobre un soporte sólido (plástico o vidrio).

- No adherentes (células en suspensión) son aquellas que normalmente no se fijan a la superficie del recipiente de cultivo.

Para la propagación de líneas celulares se deben utilizar ciertas condiciones tales como la baja densidad celular, baja concentración de Ca^{2+} y la presencia de factores de crecimiento. Además, es necesario controlar el pH, la temperatura y otras condiciones ambientales. El medio nutritivo debe ser un medio líquido, con fuente de carbono, aminoácidos esenciales, oligoelementos, un sistema regulador de pH, iones y factores de crecimiento (Freshney, 2000). También debe considerarse el agregado de antibióticos para reducir el riesgo de contaminación con microorganismos (Alvarado y Mendoza, 2002).

I.9.3. Ensayos de citotoxicidad

Los ensayos de citotoxicidad se clasifican en ensayos de viabilidad y ensayos de supervivencia. Los primeros determinan la proporción de células que inmediatamente después de un tratamiento potencialmente traumático, se mantienen viables (Freshney, 1995 y 2000).

La concentración letal 50 es la concentración de la sustancia en análisis que causa la muerte del 50% de las células presentes, evaluadas inmediatamente después del tratamiento (Cordero, 2002).

I.9.4. Método MTT

Este método permite obtener un resultado rápido en estudios de citotoxicidad. Es una técnica versátil y cuantitativa. Involucra el uso de una sal de tetrazolio MTT (metil tiazol tetrazolio) de color amarillo. Se evalúa la actividad y viabilidad celular *in vitro*, a través de la evaluación de la actividad de las enzimas mitocondriales (reductasa mitocondrial) de las células viables, que con su accionar dan lugar a unos cristales

azules de formazan (Figura I.14) insolubles en agua, pero solubles en dimetil sulfóxido (DMSO). La medición de la absorbancia a longitudes de onda entre 540 y 570 nm (Mosmann, 1983) permite evaluar la viabilidad celular (Angel, 1999).

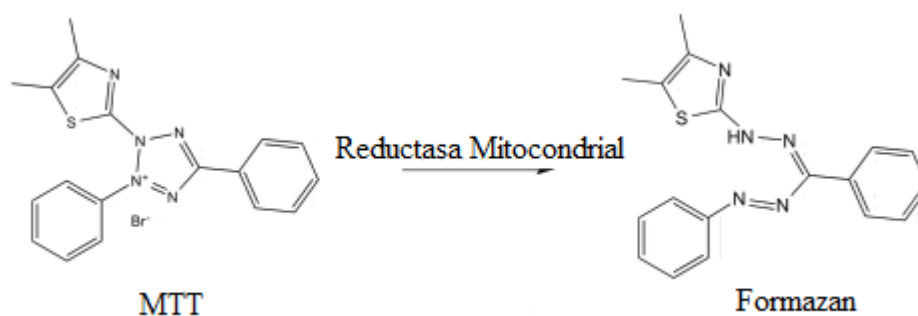


Figura I.14. Metabolización de MTT a sales de formazan por las células viables.

I.10. Familia *Herpesviridae*

Los herpesvirus se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y logran infectar distintas especies (Villareal, 2005). De los más de cien tipos de herpesvirus que fueron parcialmente caracterizados, ocho fueron encontrados en humanos: Virus herpes simplex tipo I (HSV-1), Virus herpes simplex tipo 2 (HSV-2), citomegalovirus (HCMV), virus varicela zoster (VZV), virus Epstein-Barr (EBV) y los herpes virus 6,7 y 8 (HHV-6, HHV-7 y HHV-8, respectivamente). Todos estos virus son ubicuos y producen una infección de por vida.

La familia *Herpesviridae* presenta un ADN lineal doble cadena y son envueltos. Estos virus presentan un genoma de gran tamaño, lo que refleja su larga historia evolutiva (Pellett y Roizman, 2007). Presentan latencia en el sistema nervioso central por el resto de la vida del hospedero.

La diferencia que existe entre los virus es su tropismo (afinidad que ese virus tiene a un tejido específico del hospedero) y, como consecuencia, se producen manifestaciones

clínicas distintas. Esta diversidad ha permitido clasificar a la familia *Herpesviridae* en 3 subfamilias *Alfaherpesviridae*, *Betaherpesviridae* y *Gammaherpesviridae* (Fauquet y Fargette, 2005).

La subfamilia *Alfaherpesviridae* posee un rango de huéspedes variable, con un ciclo de reproducción corto y, en cultivos celulares, su diseminación es rápida, produciendo una destrucción eficiente de las células infectadas; además, tiene la capacidad de producir latencia en el sistema nervioso periférico, ganglios trigéminos o sacro, según la vía de entrada. Pertenecen a éste grupo los herpes virus HSV-1, HSV-2 y VZV.

La subfamilia *Betaherpesviridae* posee un rango de huésped acotado, con un ciclo de reproducción largo y la infección en cultivos celulares es lenta. En general, las células infectadas sufren citomegalia (aumento de tamaño) y pueden hacer latencia en glándulas secretorias, células linfocitocitoculares, riñones y otros tejidos. Pertenecen a este grupo los herpes virus HCMV, HHV-6 y HHV-7.

La subfamilia *Gammaherpesviridae* replica *in vitro* en células linfoblastoides. Ciertos virus causan infecciones líticas en algunos tipos de células epiteloides y fibroblásticas. Pertenecen a este grupo el virus EBV.

I.10.1. Virus herpes simplex

El virus HSV ha sido clasificado en dos grupos serológicos diferentes. En general, HSV-1 causa lesiones oro-faciales mientras que HSV-2 lo hace en la zona genital. Sin embargo, se ha identificado a ambos virus en ambas zonas del cuerpo (Schneweis, 1962).

I.11. Reología

Los alimentos pueden contener componentes con efectos positivos en la salud tales como efectos antioxidantes o prebióticos. Las propiedades de flujo y deformación de la materia tienen una importante incidencia en la aceptación de los alimentos por el consumidor y así influyen en su consumo y, además, pueden afectar la digestión de los alimentos, incidiendo en ambos casos en que puedan ejercer los efectos previamente citados. Los alimentos son materiales complejos cuyas características y propiedades deseadas, especialmente las mecánicas, dependen frecuentemente de su estructura así como de la composición química (Stanley y Tung, 1975).

La reología es la ciencia que estudia la deformación y flujo de la materia. Las propiedades reológicas de los alimentos son importantes en relación a los procesos de control de calidad, la evaluación sensorial, el desarrollo de producto, el diseño, la optimización y la estandarización de procesos y los cambios de escala (Baby y Latha, 2002). La reología ha sido extensamente aplicada en frutas y vegetales en un esfuerzo por entender la relación entre la estructura, la textura, y los cambios inducidos por los distintos procesos (Edwards, 1999).

I.11.1. Comportamiento reológico de los alimentos

Los alimentos no pueden ser categorizados de manera simple en líquidos o sólidos ya que su comportamiento, en general, es viscoelástico.

Se denomina sólidos elásticos a aquellos materiales que cuando se le aplica una fuerza externa se deforman. El sólido ideal almacena la energía que se le entrega toda vez que se realiza un trabajo sobre él. Si los sólidos tuvieran un comportamiento ideal, cuando estas fuerzas externas se remueven, recuperarían la forma original ya que la energía

recibida está disponible para restablecer el cuerpo a la forma original cuando se remueven las fuerzas aplicadas.

Se denominan líquidos viscosos a los materiales que no tienen forma definida (se adoptan a la forma del recipiente que los contienen) y fluyen irreversiblemente bajo la acción de fuerzas externas. Los líquidos utilizan la energía recibida cuando se aplica una fuerza externa sobre ellos para fluir.

Los materiales alimenticios, en general, tienen propiedades que son intermedias entre un sólido elástico y un líquido viscoso, presentando entonces características viscoelásticas (Ward, 1990).

El esfuerzo al que se somete externamente un material puede ser aplicado: como una compresión (en dirección perpendicular a la superficie), o como un esfuerzo cortante o de cizalla (en dirección paralela a una cara). El esfuerzo es la fuerza aplicada por unidad de área y tiene unidades de presión. Tanto la deformación (γ), como la velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$) son la expresión matemática de la respuesta de un material al esfuerzo aplicado sobre él. Se produce una deformación siempre que ocurra un cambio en la distancia entre dos puntos de un material. La velocidad de deformación se obtiene directamente derivando la deformación con respecto al tiempo (Mohsenin, 1978).

Se denomina ecuación constitutiva a aquella que relaciona todos los componentes del esfuerzo con la deformación o con la velocidad de deformación. Es una característica única del material que describe su comportamiento para cualquier tipo de deformación o flujo.

En la mecánica clásica se distinguen dos tipos de respuestas extremas; la de los sólidos que responden a la Ley de Hooke y la de los líquidos que responden a la Ley de Newton. Aunque se sabe que existen muchos materiales que no se pueden describir con estos modelos. No obstante, la teoría de la elasticidad (Ley de Hooke) se puede

modificar para describir deformaciones finitas y la Ley de Newton también se puede generalizar para describir el comportamiento de líquidos que se suponen viscosos e inelásticos, en los cuales uno de los fenómenos típicos es que la viscosidad varía con la velocidad de corte. Estos fluidos se denominan no-Newtonianos generalizados. En este sentido, estas teorías se pueden considerar como extremos del espectro de comportamiento de los materiales reológicamente complejos (Bird y col., 1977, Barnes y col, 1991, Montes y White, 1993). Forman parte de este grupo de materiales casi la totalidad de los alimentos.

En la Figura I.15 se puede observar la clasificación de los distintos materiales.

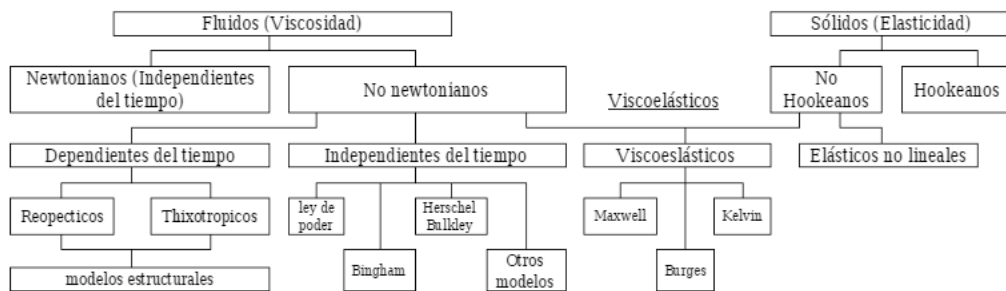


Figura I.15. Clasificación del comportamiento reológico de los distintos materiales (Ramírez Navas, 2006).

Los fluidos Newtonianos se caracterizan por tener una relación lineal entre el esfuerzo y la velocidad de deformación. La pendiente de la recta es la viscosidad dinámica (η), el cual es un valor constante e independiente del tiempo a todas las velocidades de deformación siempre que la temperatura y la presión se mantengan constantes y representa la resistencia que presenta el fluido a fluir. Algunos ejemplos de sustancias con este comportamiento son el agua, los jugos frutales despectinizados y la leche descremada.

Es importante destacar el significado de los algunos parámetros. Así, la velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$) se calcula como:

$$\dot{\gamma} = \frac{\partial \gamma}{\partial t}$$

dónde γ es la deformación de cizalla y t es el tiempo.

Los fluidos no Newtonianos independientes del tiempo, en general, muestran una relación no lineal entre el esfuerzo y la velocidad de deformación. La viscosidad resulta así función de la velocidad de deformación. Se los puede clasificar en:

- Pseudoplásticos: La viscosidad disminuye con el aumento de la velocidad de deformación. Ejemplos de ellos son la crema de leche, puré de frutas, entre otros.

- Dilatantes: Aumenta la viscosidad con el aumento de la velocidad de deformación. Ejemplos de ellos son algunos tipos de mieles y suspensiones de almidones modificados.

La ecuación de la Ley de la Potencia o Ley de Ostwald, suele utilizarse para describir los flujos pseudoplásticos y dilatantes:

$$\tau = k \cdot \dot{\gamma}^n$$

dónde k es el índice de consistencia y n es el índice de flujo y toma valores menores a 1 para los fluidos pseudoplásticos. Para un fluido Newtoniano, n es 1 y k será igual a su viscosidad.

El modelo de Herschel-Bulkley describe el comportamiento de un fluido que se comporta como un sólido hasta que sobrepasa un esfuerzo cortante mínimo (esfuerzo umbral, τ_0) y, a partir de dicho valor, se comporta como un líquido.

$$\tau = \tau_0 + k \cdot \dot{\gamma}^n$$

dónde τ es el esfuerzo aplicado, τ_0 es el esfuerzo mínimo de corte, k es el índice de consistencia, $\dot{\gamma}$ es la velocidad de deformación y n es el índice de flujo. Esta ecuación modela adecuadamente el comportamiento de los pseudoplásticos que presentan τ_0 .

Los fluidos no Newtonianos dependientes del tiempo se pueden clasificar en:

- Tixotrópicos: se caracterizan por un cambio de su estructura interna al aplicar un esfuerzo. La viscosidad disminuye al aumentar el tiempo de aplicación del esfuerzo cortante, recuperando su estado inicial total o parcialmente después de un reposo prolongado. Ejemplos de este comportamiento son el yogur y la salsa de tomate.

- Reopécticos: se caracterizan por un aumento de su viscosidad con el tiempo de aplicación del esfuerzo y recuperan su estado inicial total o parcialmente después de un tiempo de reposo. No es un comportamiento habitual en alimentos.

En relación al comportamiento sólido de los materiales, se destacan como importantes los siguientes parámetros:

Módulo de elasticidad (E): También llamado Modulo de Young. Se define como la relación entre el esfuerzo normal aplicado (σ) y la deformación normal (ϵ) que se obtiene.

$$E = \frac{\sigma}{\epsilon}$$

$$\varepsilon = \frac{\Delta L}{L}$$

dónde σ es el esfuerzo, ε es la deformación normal, ΔL es el cambio en la longitud L que es la longitud original del espécimen.

Módulo de cizalla (G): También llamado Modulo de Rigidez. Se obtiene como la relación entre el esfuerzo de cizalla aplicado (σ) y la deformación de cizalla (γ) que se obtiene.

$$G = \frac{\sigma}{\gamma}$$

$$\gamma = \frac{\Delta L}{h}$$

dónde τ es el esfuerzo de cizalla, γ es la deformación de cizalla, ΔL es el cambio en la longitud h es el espesor del espécimen.

Los fluidos viscoelásticos presentan propiedades viscosas y elásticas al mismo tiempo. Ello puede deberse a la complejidad de la materia en estudio. Por ejemplo, en el caso de los alimentos, a la presencia de una matriz con componentes líquidos y sólidos dispersos. Ejemplos de fluidos viscoelásticos son los sistemas hidrocoloidales como la gelatina o matrices complejas alimenticias como los helados donde coexisten estructuras de emulsiones y espumas.

En la Figura I.16 se observa el espectro del comportamiento reológico de los alimentos

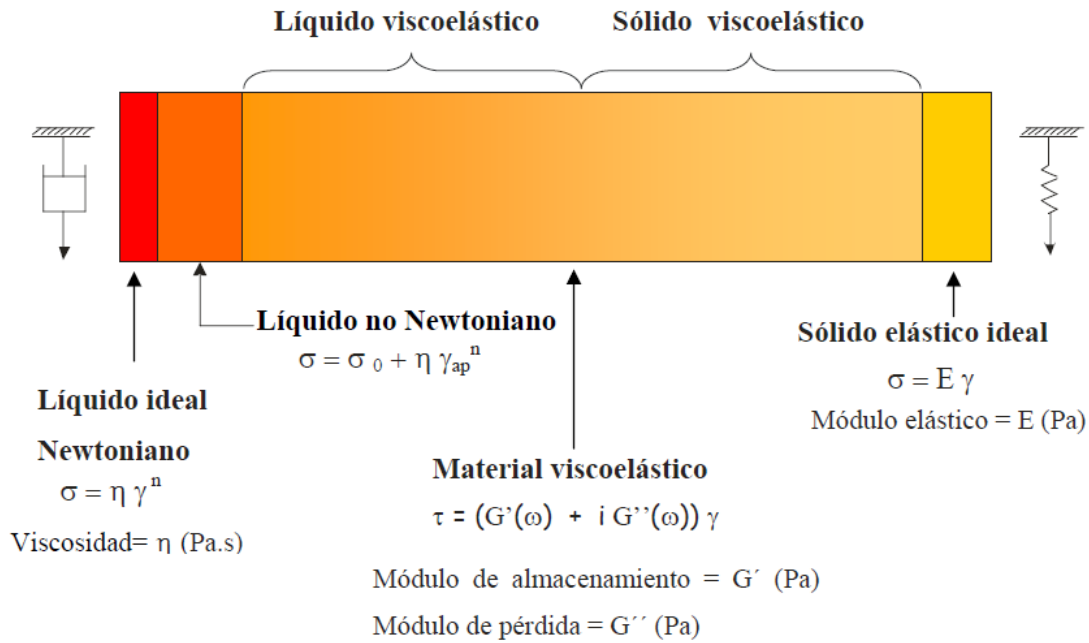


Figura I.16. Espectro del comportamiento mecánico en alimentos. (Aguilera y Stanley, 1990).

I.11.2. Evaluación instrumental de las propiedades reológicas

Los ensayos reológicos se pueden realizar en condiciones que involucran grandes deformaciones o en condiciones experimentales de bajas deformaciones (Sherman, 1970; Costell y col., 1997).

Pueden involucrar la aplicación de fuerzas normales o fuerzas tangenciales.

I.11.2.1. Ensayos de flujo

Se realizan, en general utilizando un viscosímetro rotatorio. Consisten en el estudio de la variación del esfuerzo con la velocidad de deformación con la finalidad de establecer el comportamiento de flujo del material. Los perfiles de flujo obtenidos se ajustan por medio de los modelos previamente mencionados (Bourne, 2002).

I.11.2.2. Ensayos dinámicos

En este tipo de ensayos la muestra se somete a un esfuerzo sinusoidal (Jackman y Stanley, 1992; Schramm, 1994;). Los ensayos dinámicos permiten determinar propiedades de la muestra en la región viscoelástica lineal, permitiendo su caracterización sin destrucción de la misma (Khan y col., 1997). Pueden ser ensayos de esfuerzo-deformación, esfuerzo-tiempo, deformación-tiempo.

Previo a realizar un ensayo dinámico, se debe determinar el intervalo de comportamiento viscoelástico lineal para el material en estudio. Si el ensayo se realizara fuera de ese rango, la muestra se alteraría y el comportamiento del material analizado sería bajo grandes deformaciones, en vez de pequeñas deformaciones.

Con esta clase de ensayos se pueden evaluar materiales alimenticios en ensayos que no afectan la estructura de la matriz en estudio (ensayos *at rest*) obteniéndose la evaluación en condiciones de viscoelasticidad lineal. El comportamiento reológico se modela mediante modelos matemáticos basados en la combinación de elementos elásticos y viscosos. Se puede así interpretar el comportamiento reológico y relacionarlo con la estructura del material (Ferry, 1980).

I.11.3. Modelado del comportamiento viscoelástico

Para la descripción de la respuesta de los materiales viscoelásticos, evaluada a través de ensayos dinámicos, se puede utilizar modelos mecánicos que combinan elementos elásticos y viscosos. En este modelado, dos de los elementos participantes son el elemento elástico ideal y el elemento viscoso ideal. El elemento elástico ideal es representado mediante un resorte cuyo comportamiento queda definido por el módulo E. El elemento viscoso ideal es representado mediante un pistón que se desliza dentro de

un líquido newtoniano y cuyo comportamiento queda definido por la viscosidad η . Los dos elementos se combinan para dar lugar al modelo de Maxwell y al modelo de Kelvin Voigt.

•Modelo de Maxwell: En la Figura I.17 se observa que el modelo está compuesto por un resorte y un pistón en serie. La deformación (γ) del sistema, para un dado tiempo, se divide en una parte puramente viscosa y otra puramente elástica, y la tensión (τ) que ambas partes soportan es de igual magnitud (Costell y col., 1997).

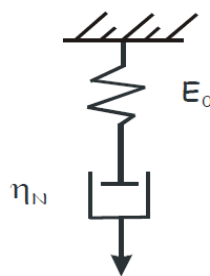


Figura I.17. Representación del Modelo de Maxwell.

•Modelo de Kelvin Voigt: En la Figura I.18 se puede observar que este modelo está constituido por un resorte y un pistón dispuestos en paralelo. El esfuerzo (τ) es la suma de los esfuerzos de los componentes, siendo uno proporcional a la velocidad de deformación y el otro, a la deformación. La deformación es de igual magnitud para cada elemento (Costell y col., 1997).

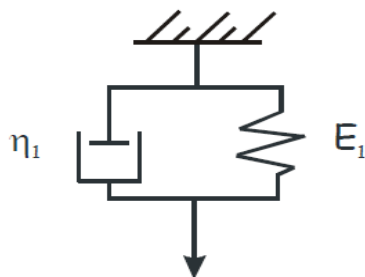


Figura I.18. Representación del Modelo de Kelvin.

La combinación de estos modelos permite acceder a modelar sistemas de comportamiento viscoelástico lineal más complejo.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

II.1. Objetivo General

Estudiar métodos novedosos para el aprovechamiento de tejidos de *Cynara cardunculus* (alcaucil) a través de la obtención de fracciones útiles como aditivos y/o ingredientes para la industria alimentaria.

II.2. Objetivos específicos

a) Estudiar el efecto de las enzimas proteasa y hemicelulasa en buffer citrato de sodio (pH 5,2), en el rendimiento, características químicas, físico-químicas y funcionales de fracciones ricas en fibra dietaria soluble y aisladas a partir del residuo insoluble en alcohol de tallo y brácteas de alcaucil.

b) Estudiar el efecto de una etapa de calentamiento previo al tratamiento con las enzimas proteasa y hemicelulasa en buffer citrato de sodio (pH 5,2), en el rendimiento, características químicas, físico-químicas y funcionales de fracciones ricas en fibra dietaria soluble y aisladas a partir del residuo insoluble en alcohol de tallo y brácteas de alcaucil.

c) Estudiar el efecto del método de calentamiento utilizado (calentamiento por convección o calentamiento asistido por microondas) en la obtención del residuo insoluble en alcohol (AIR) de tallo y brácteas de alcaucil, en las características de las fracciones obtenidas.

CAPÍTULO III

MATERIALES y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Obtención de polvo enriquecido en material de pared celular (CWM)

A partir de alcauciles (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*) frescos comprados en el Mercado Central, Gran Buenos Aires, Argentina, se obtuvo el polvo enriquecido en material de pared celular. Para ello, se separaron las brácteas y los tallos y cada parte se lavó y secó en estufa con convección a 85°C durante 2,5 horas (velocidad del aire: 0,5 metros por segundo). El residuo seco se molió en un molinillo doméstico (Wemir E 909, Argentina) para obtener el polvo enriquecido en material de pared celular (CWM) de cada tejido (Figura III.1).

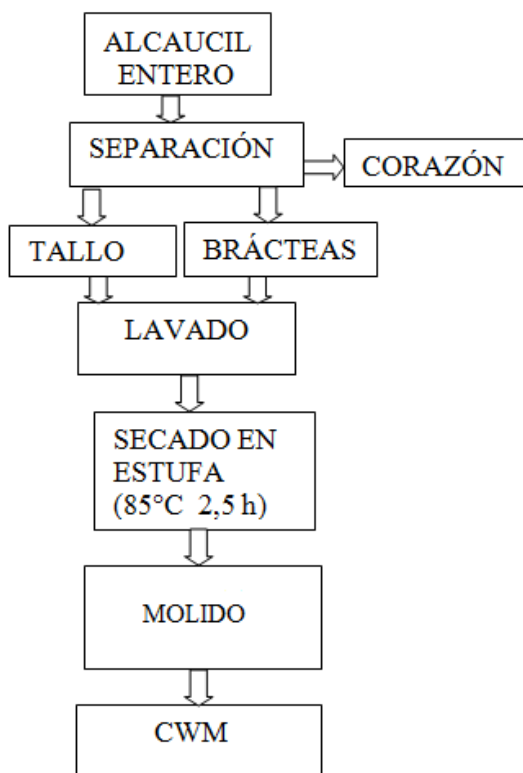


Figura III.1. Proceso de obtención del CWM

III.2. Obtención del residuo insoluble en alcohol (AIR). Tratamiento convectivo

Con el fin de concentrar los polisacáridos presentes en el polvo enriquecido en material de pared celular (CWM), se obtuvo el residuo insoluble en alcohol (AIR)

de acuerdo a Martín-Cabrejas y col. (1994), con ciertas modificaciones. Para ello, a 10 g de CWM se le agregan 700 ml de etanol 80 % (v/v), se llevó a ebullición durante 30 minutos con agitación constante y se filtró, separando el solvente. Al residuo sólido se le agregaron otros 350 ml de etanol 80 % (v/v) y se dejó en ebullición durante 15 minutos. Se filtró, separando el solvente y se realizaron dos tratamientos de 15 minutos a ebullición con 250 ml de etanol 80% (v/v). Se realizaron dos lavados del residuo, el primero, con 100 ml de etanol 80% (v/v) y el segundo, con 100 ml de etanol 96 % (v/v). Luego de filtrar, se dejó el residuo bajo campana durante una noche para evaporar el alcohol remanente, se congeló, liofilizó (sublimación a presión de cámara de 1000 μ m Hg y temperatura de bandeja de 25°C) y se molió. El polvo obtenido es el "AIR-C" o sea el residuo insoluble en alcohol obtenido a través del tratamiento por calentamiento convectivo de cada tejido.

III.3. Obtención del residuo insoluble en alcohol (AIR). Tratamiento Microondas

Para la obtención de los residuos insolubles en alcohol (AIR) con calentamiento por medio de microondas, para ambos tejidos, se utilizó un equipo microondas Ethos Plus (Milestone, Italia) con un magnetrón de 2.450 MHz. El microondas utiliza el sistema ATC-400 para la vigilancia y el control de la temperatura interna.

Se pesaron 10 gramos del CWM de cada tejido y se agregaron 50 ml de etanol al 80 % (v/v). Se trabajó a potencia máxima de 250 W, temperatura constante de 80°C y un tiempo de 12 minutos (Tabla III.1). Se filtró y al sólido se le agregaron 30 ml de etanol al 80 % (v/v) y se repitió el calentamiento. Luego de filtrar se repitió sobre el sólido la 2° etapa.

El sólido fue liofilizado como se describió en el ítem III.2. El polvo obtenido es el "AIR-M" o sea el residuo insoluble en alcohol obtenido a través del tratamiento por calentamiento por microondas de cada tejido.

Tabla III.1. Condiciones de tratamiento del microondas

Tiempo (minuto)	Potencia (Watt)	Temperatura (°C)
1	250	80 ¹
10	250	80
1	0	0

¹ Ascenso de temperatura desde ambiente a 80°C en un minuto.

III.4. Obtención de las fracciones enriquecidas en pectina e inulina

Debido a que la pectina es inestable a pH superior a 5 cuando se expone a temperaturas elevadas (Voragen y col., 2001), se decidió utilizar como condiciones de trabajo, un pH de 5,2 y una temperatura no superior a 50°C. Se tuvo en cuenta que la inulina es estable a pH 5 - 7 en el intervalo de temperaturas de 20 a 70°C (Luo y col., 2011) y también la sensibilidad a la temperatura y a la acidez de las enzimas (Motamed Zadegan y col., 2010, Wang y col, 2010, Hassan y col, 2013). De acuerdo a las razones previamente enumeradas, se realizó un diseño experimental, teniendo como punto central del diseño las siguientes condiciones:

- Temperatura de 40°C,
- Tiempo: 5 horas,
- pH: 5,2.

Se pesaron 5 g AIR-Cs de tallo o brácteas y se realizó una digestión bajo agitación (10 rad. s⁻¹) en 500 ml de solución de buffer citrato de sodio 0,05 M, pH 5,2 con azida de sodio 0,01% (p/p) y sometidas a diferentes condiciones de:

- Enzimas hemicelulasa (H) y/o proteasa (P).
- Concentraciones de enzimas: 0-200 µl de P y 0-200 mg de H por cada 5 gramos de AIR.
- Tiempo de hidrólisis con agitación constante: 5 horas.
- Temperatura: 40°C.

Posteriormente se filtró el sistema y al sobrenadante, se le adicionaron dos volúmenes de etanol 96 % (v/v) para aislar la fibra soluble. Para poder separarla, se filtró la solución con un filtro de fibra de vidrio y el residuo sólido se liofilizó en las condiciones descriptas previamente.

III.5. Las enzimas utilizadas: Hemicelulasa (H) y Proteasa (P)

La H utilizada fue provista por Sigma, St. Louis, EE.UU. (código comercial H2125). Obtenida de *Aspergillus niger* con actividad de celulasa secundaria. Una unidad producirá un cambio de fluidez relativa de 1 cada 5 minutos, usando goma de arábica como sustrato a pH 4,5 a 40°C.

La P utilizada fue provista por Sigma, St. Louis, EE.UU. (código comercial P1236): Esta enzima es Neutrase® 0,8 L, una proteasa de *Bacillus amyloliquefaciens* con la actividad endo-proteolítica. Tiene una actividad de 0,8 unidad Anson / g (Au / g). Una unidad Anson se define como la cantidad de enzima necesaria para digerir hemoglobina bajo condiciones específicas (25°C y pH 7,5) produciendo una cantidad de productos solubles en ácido tricloroacético (TCA) que da el mismo color con el reactivo de Folin-Ciocalteu que un miliequivalente de tirosina.

III.6. Diseño experimental y análisis estadísticos

Para encontrar el efecto de los factores estudiados (concentración de proteasa y/o hemicelulasa) sobre las variables respuestas (rendimiento y composición química de las fracciones), se utilizó un diseño (Tabla III.2). Las enzimas se utilizaron tal como fueron provistas por Sigma (St. Louis, EE.UU). Los niveles de enzima utilizados fueron dispuestos como un diseño simple de dos factores proyectado desde una estrella y un diseño de caja central compuesto (CCD). Se eligió un diseño simple de dos factores sobre un diseño factorial completo, debido a que se realizaron 11 tratamientos, incluyendo los puntos centrales por triplicado, con el fin de cubrir cinco valores diferentes para cada variable en el espacio experimental. El diseño factorial completo mínimo para probar curvatura también requirió 11 tratamientos, pero abarca sólo tres valores de datos diferentes para las combinaciones posibles de los tratamientos asegurando al mismo tiempo que es estadísticamente apropiado.

En un diseño simple de dos factores, los valores alfa de los puntos estrellas tienen un rango de $[-\sqrt{(2)/2}; +\sqrt{(2)/2}]$, en lugar de $[-\sqrt{(2)}; +\sqrt{(2)}]$ que es el usado en un diseño convencional CCD.

Tabla III.2. Diseño Experimental utilizado

Tratamiento	Valor Codificado		Valor sin codificar	
	Proteasa	Hemicelulasa	Proteasa (µL)	Hemicelulasa (mg)
1	-1	-1	0	0
2	1	-1	200	0
3	-1	1	0	200
4	1	1	200	200
5	α	0	170	100
6	$-\alpha$	0	30	100
7	0	α	100	170
8	0	$-\alpha$	100	30
9*	0	0	100	100
10*	0	0	100	100
11*	0	0	100	100

*Punto Central. α valor alfa = $[\sqrt{(2)/2}]$

Esta diferencia nos permitió fijar las concentraciones de enzimas en cero para los niveles más bajos de la parte de la caja del diseño. Un CCD convencional habría requerido concentraciones de enzimas "negativas" para los puntos estrellas.

Los factores llevaron a los valores de -1 (0 μL), $-\alpha$ (30 μL), 0 (100 μL), $+\alpha$ (170 μL) y 1 (200 μL) para P y -1 (0 mg), $-\alpha$ (30 mg), 0 (100 mg), $+\alpha$ (170 mg) y 1 (200 mg) para H. El diseño experimental se presenta en la Tabla III.2.

III.6.1. Pre-tratamiento con calor y diseño experimental reducido

De acuerdo a los resultados obtenidos, se redujo el diseño experimental a cuatro sistemas (Tabla III.3) para los AIRs obtenidos a partir de los tratamientos por convección y microondas. Además, se introdujo un pretratamiento de calentamiento a 70°C durante 5 minutos, con el objetivo de favorecer la solubilización de la inulina presente en alta proporción en los tejidos.

Tabla III.3. Diseño experimental reducido.

Sistema	Temperatura de extracción (°C)	Tiempo de extracción (h)	Cantidad de enzimas (P/H) ¹
1	40	5	0/0
2	40	5	200/0
3	40	5	0/200
4	40	5	200/200

¹(P, μL / H, mg)

III.7. Fracciones de fibra soluble obtenidas de tallo y brácteas

Las fracciones de fibra soluble obtenidas a partir de AIR-C de tallo y brácteas se describen a continuación:

CS1: Fracción obtenida a partir del tratamiento de 5 g de AIR-C de tallo con 500 ml de buffer citrato 0,05 M (pH 5,2).

CS2: Fracción obtenida a partir del tratamiento de 5 g de AIR-C de tallo con 200 µl de proteasa en 500 ml de buffer citrato 0,05 M (pH 5,2).

CS3: Fracción obtenida a partir del tratamiento de 5 g de AIR-C de tallo con 200 mg de hemicelulasa en 500 ml de buffer citrato 0,05 M (pH 5,2).

CS4: Fracción obtenida a partir del tratamiento de 5 g de AIR-C de tallo con 200 µl de proteasa y 200 mg de hemicelulasa en 500 ml de buffer citrato 0,05 M (pH 5,2).

CB1: Fracción obtenida a partir del tratamiento de 5 g de AIR-C de brácteas con 500 ml de buffer citrato 0,05 M (pH 5,2).

CB2: Fracción obtenida a partir del tratamiento de 5 g de AIR-C de brácteas con 200 µl de proteasa en 500 ml de buffer citrato 0,05 M (pH 5,2).

CB3: Fracción obtenida a partir del tratamiento de 5 g de AIR-C de brácteas con 200 mg de hemicelulasa en 500 ml de buffer citrato 0,05 M (pH 5,2).

CB4: Fracción obtenida a partir del tratamiento de 5 g de AIR-C de brácteas con 200 µl de proteasa y 200 mg de hemicelulasa en 500 ml de buffer citrato 0,05 M (pH 5,2).

Las fracciones de fibra soluble obtenidas a partir de AIR-M de tallo y brácteas se describen a continuación:

MS1: Fracción obtenida a partir del tratamiento de 5 g de AIR-M de tallo con 500 ml de buffer citrato 0,05 M (pH 5,2).

MS2: Fracción obtenida a partir del tratamiento de 5 g de AIR-M de tallo con 200 µl de proteasa en 500 ml de buffer citrato 0,05 M (pH 5,2).

MS3: Fracción obtenida a partir del tratamiento de 5 g de AIR-M de tallo con 200 mg de hemicelulasa en 500 ml de buffer citrato 0,05 M (pH 5,2).

MS4: Fracción obtenida a partir del tratamiento de 5 g de AIR-M de tallo con 200 µl de proteasa y 200 mg de hemicelulasa en 500 ml de buffer citrato 0,05 M (pH 5,2).

MB1: Fracción obtenida a partir del tratamiento de 5 g de AIR-M de brácteas con 500 ml de buffer citrato 0,05 M (pH 5,2).

MB2: Fracción obtenida a partir del tratamiento de 5 g de AIR-M de brácteas con 200 μ l de proteasa en 500 ml de buffer citrato 0,05 M (pH 5,2).

MB3: Fracción obtenida a partir del tratamiento de 5 g de AIR-M de brácteas con 200 mg de hemicelulasa en 500 ml de buffer citrato 0,05 M (pH 5,2).

MB4: Fracción obtenida a partir del tratamiento de 5 g de AIR-M de brácteas con 200 μ l de proteasa y 200 mg de hemicelulasa en 500 ml de buffer citrato 0,05 M (pH 5,2).

III.8. Evaluación del rendimiento de las distintas fracciones

El rendimiento (%) de las fracciones enriquecidas en fibra se determinó como la relación de la cantidad de fracción resultante liofilizada respecto de a la cantidad de AIR utilizado en cada caso para el tratamiento enzimático. Éste fue el parámetro utilizado para determinar el sistema óptimo.

III.9. Análisis Químicos

Para la preparación de todos los reactivos, se utilizó agua desionizada (Milli-QTM). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado en cada muestra.

III.9.1. Humedad

La humedad se determinó en la muestra seca utilizando una masa de $\approx 0,5$ g, mediante secado en una balanza infrarroja (analizador de humedad MB45 Ohaus Corporation, EE.UU.) hasta peso constante. La determinación se hizo, al menos, por duplicado. Adicionalmente se determinó la actividad de agua (a_w) de la muestra de fibra seca

utilizando un higrómetro AQUA LAB Series 3 Quick (Start Decagon Devices, Inc., EE.UU.). Este ensayo se realizó, al menos, por duplicado.

III.9.2. Caracterización química del AIR y del CWM

Sobre los AIRs y CWMs obtenidos se hicieron las determinaciones de: lignina, celulosa, hidratos de carbono totales no celulósicos, ácidos urónicos, inulina y proteínas.

Para la determinación del contenido de lignina, celulosa, hidratos de carbono totales no celulósicos (HC) y ácidos urónicos, se realizó una serie de hidrólisis ácidas secuenciales de acuerdo a Ng y col. (1998).

La determinación de la lignina se realizó dispersando $\approx 0,3$ g de AIR o CWM en 2,08 ml de solución de ácido sulfúrico 72% (p/p), durante 3 horas a 25°C. Se ajustó la concentración de esta dispersión a 1 M en ácido sulfúrico, agregando el volumen necesario de agua desionizada (≈ 25 ml), y cada muestra fue calentada a 100°C durante 2,5 horas en un baño de agua. Cada dispersión fue enfriada, centrifugada durante 10 min a 12000 g y, finalmente, se separó el sobrenadante. Se lavó el *pellet* tres veces con agua desionizada y finalmente se liofilizó. El residuo obtenido se pesó e informó como lignina. El sobrenadante se neutralizó cuidadosamente y sobre el mismo se determinó el contenido de hidratos de carbono totales por el método del fenol-sulfúrico (Dubois y col., 1956) usando glucosa, fructosa y ácido galacturónico como estándares, el contenido de proteínas (Lowry y col., 1951) y el contenido de inulina utilizando un kit de determinación de fructanos (Quemener y col., 1993).

Se llevó a cabo un segundo procedimiento con otra porción de $\approx 0,3$ g de AIR o CWM, a la cual se le agregó 2,08 ml de solución 72% (p/p) de ácido sulfúrico; se dispersó el material e inmediatamente se agregó agua para alcanzar una dilución 1M seguida de calentamiento por 2,5 horas a 100°C. El residuo final obtenido fue lavado tres veces con agua desionizada y posteriormente se liofilizó. El *pellet* pesado corresponde a celulosa +

lignina. El sobrenadante se neutralizó cuidadosamente y sobre el mismo se determinó el contenido de hidratos de carbono totales no celulósicos por el método del fenol-sulfúrico (Dubois y col., 1956) usando glucosa, fructosa y ácido galacturónico como estándares.

El tercer procedimiento de hidrólisis se llevó a cabo con una nueva porción de $\approx 0,3$ g de AIR o CWM, la cual fue tratada según la técnica aplicada durante el segundo procedimiento pero en este caso, se procedió con una hora de calentamiento a 100°C en un baño de agua.

Se separó el sobrenadante para la cuantificación del contenido de ácidos urónicos por el método espectrofotométrico reportado por Filisetti-Cozzi y Carpita (1991), usando ácido galacturónico como estándar.

El grado de metilación (GM) se evaluó a partir del método espectrofotométrico de metanol de acuerdo a Wood y Siddiqui (1971), previa saponificación de los ésteres como se describen en III.9.3.6.

III.9.3. Técnicas analíticas utilizadas para la caracterización química de las fracciones aisladas

III.9.3.1. Determinación de carbohidratos totales

El contenido de hidratos de carbono se evaluó por el método de Dubois y col. (1956). El método del ácido fenol-sulfúrico es un método colorimétrico de determinación de los carbohidratos totales en una muestra. El método detecta prácticamente todas las clases de carbohidratos, incluidos mono-, di-, oligo- y polisacáridos pero la capacidad de respuesta de los diferentes carbohidratos varía. Por lo tanto, a menos que se sepa que una muestra contiene solo un hidrato de carbono, los resultados deben expresarse arbitrariamente en términos de un hidrato de carbono.

En este método, el ácido sulfúrico concentrado descompone cualquier polisacárido, oligosacárido y disacárido en monosacáridos. Las pentosas (compuestos de 5 carbonos) se deshidratan a furfural y las hexosas (compuestos de 6 carbonos) a hidroximetil furfural. Estos compuestos luego reaccionan con fenol (condensación) para producir un color amarillo. Para los productos con alto contenido de hexosas, la glucosa se usa comúnmente para crear la curva estándar. La absorción se mide a 490 nm. El color de esta reacción es estable durante varias horas, y la precisión del método está dentro de $\pm 2\%$ en condiciones adecuadas.

Se dispensaron 2 ml de solución de muestra utilizando una pipeta graduada, dentro de un tubo de ensayos y se agregó 50 μl de fenol 80 % (p/p), se homogenizó y luego se agregó 5 ml de ácido sulfúrico concentrado rápidamente. Se dejó reposar 10 minutos a 25 °C. La solución se dejó enfriar y se homogenizó nuevamente. El color salmón que se desarrolló se evaluó midiendo la absorbancia a 490 nm. El color obtenido es proporcional al contenido de azúcares presentes. La cantidad de azúcar presente en la muestra fue determinado por referencia a una curva estándar construida previamente con una solución estándar de D-glucosa (0,00128 g de glucosa / 250ml), fructosa (0,0106 g de fructosa/50 ml) y ácido galacturónico (0,0107g de ác. galacturónico/10 ml).

A continuación se informan las ecuaciones de ajuste de las curvas de calibración obtenidas utilizando glucosa y ácido galacturónico y la curva de calibración completa observada utilizando fructosa.

Curva de calibración con glucosa para la determinación del contenido de carbohidratos totales:

$$y = 0,0053 x + 0,0077 \quad R^2 = 0,9927$$

Curva de calibración con ácido galacturónico para la determinación del contenido de carbohidratos totales:

$$y = 0,0047 x - 0,0103 \quad R^2 = 0,9895$$

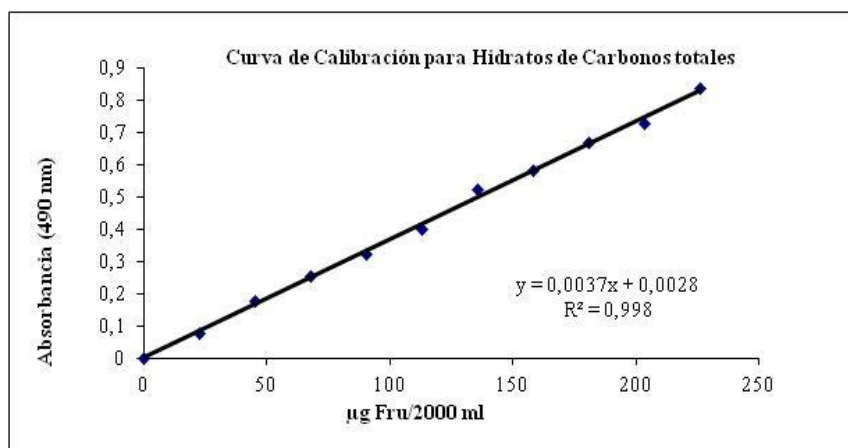


Figura III.2. Curva de calibración con fructosa para la determinación del contenido de carbohidratos totales

III.9.3.2. Determinación de ácidos urónicos

La evaluación del contenido de ácidos urónicos, puede ser realizada mediante la evaluación espectrofotométrica. Para ello, los métodos espectrofotométricos más conocidos en esta determinación son aquellos que emplean como cromóforos al m-hidroxidifenilo, el 3,5-dimetilfenol y el carbazol. De manera general, el procedimiento que emplea el m-hidroxidifenilo como cromóforo es el más citado de todos y se caracteriza por ser cuantitativo, sensible y específico. Este método se basa en la aparición de un cromógeno de color rosado cuando el ácido urónico es calentado a 100°C en una mezcla de ácido sulfúrico/tetraborato de sodio y posteriormente tratado con m-hidroxidifenilo.

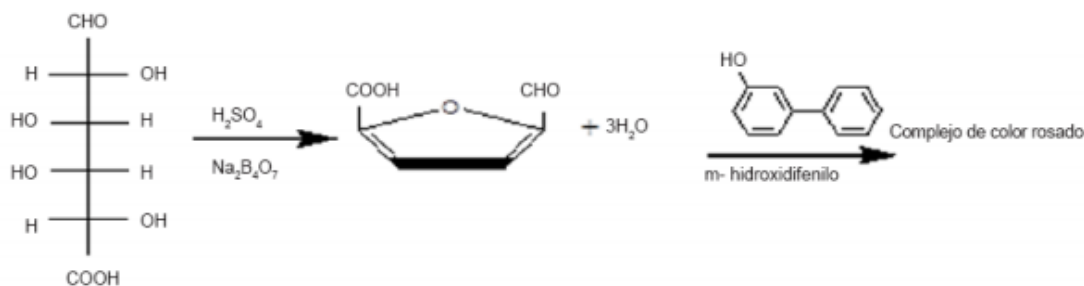


Figura III.3. Representación esquemática de la formación del complejo de color rosado entre el ácido galacturónico y el m-hidroxidifenilo.

En esta tesis se utilizó la técnica reportada por Filisetti-Cozzi y Carpita (1991), agregando ácido sulfámico a las muestras para suprimir el pardeamiento de los azúcares neutros que fueran liberados y calentando con una mezcla de ácido sulfúrico tetraborato, ya que este último aumenta la sensibilidad de la reacción con ácidos urónicos.

Se tomó una alícuota de 20 μl de muestra y se llevó a volumen final (400 μl) con agua desionizada (Milli-QTM); se agregaron 40 μl de ácido sulfámico (4 M; $\text{pH}=1,6$). Luego se añadieron 2400 μl de la solución de tetraborato de sodio (0,075 M en solución en ácido sulfúrico concentrado) y se colocaron las muestras tapadas en un baño de agua a 100 $^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos. La reacción se detuvo rápidamente colocando las muestras en un baño de agua con hielo. Se añadieron 80 μl de solución de m-hidroxidifenilo 0,15 % (p/v) en NaOH 0,5 % (p/v). A partir de los 10 minutos de contacto, el color se desarrolló completamente. La absorbancia fue leída a 525 nm.

La curva de calibración se llevó a cabo con una solución estándar de ácido D-galacturónico (AGU) conteniendo 0,0118 g AGU en 10 ml de solución.

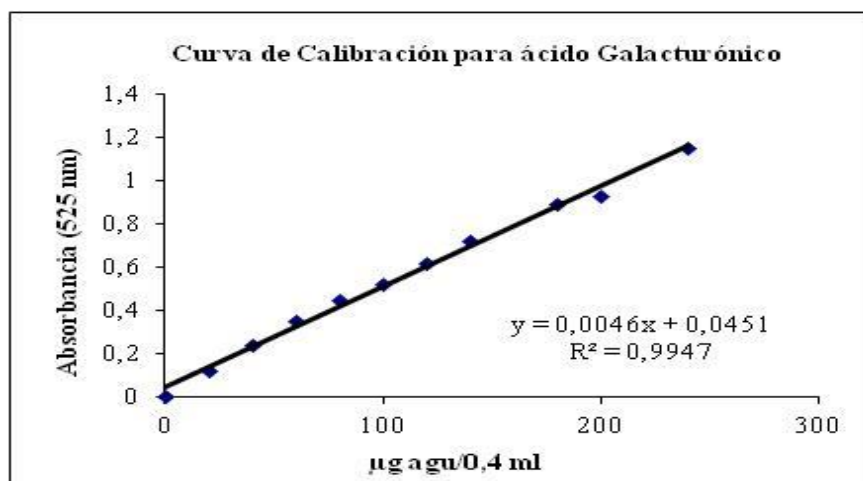


Figura III.4. Curva de calibración con ácido galacturónico para la determinación del contenido de ácidos urónicos.

III.9.3.3. Determinación de inulina

La inulina es un fructano con glucosa terminal y por lo tanto se utilizó el método propuesto por la AOAC 999.03 (Quemener y col., 1993; McCleary y Blakeney, 1999 y McCleary y Rossiter, 2004) utilizando el kit para determinar fructanos “fructan assay procedure” de Megazyme (Irlanda). El ensayo permite medir la cantidad (% m/m) de fructano que posee una muestra sin interferencia de azúcares reductores y de sacarosa. Para ello utiliza un grupo de enzimas específicas: por un lado Enzima A (sacarasa, β -amilasa, pululanasa y maltasa) y, por otro lado, fructanasa (exo y endo-inulinasa).

La sacarosa es hidrolizada a D-fructosa y D-glucosa usando la enzima específica sacarasa. El almidón y los maltosacáridos (si estuviesen presentes en la muestra) son hidrolizados a D-glucosa gracias a la acción combinada de las β -amilasa, pululanasa y maltasa altamente purificadas. Los azúcares reductores son luego reducidos a los alcoholes de azúcar por tratamiento con borohidruro alcalino. La solución es neutralizada y el exceso de borohidruro es removido mediante tratamiento con ácido acético diluído. La inulina es hidrolizada a D-fructosa y D-glucosa con una exo-

inulinasa+endoinulinasa (fructanasa purificada) y los azúcares reductores producidos son medidos con el método PAHBAH (hidrazida de ácido p-hidroxibenzoico). Este método es simple de utilizar, específico para azúcares reductores y la respuesta del color con D-fructosa y D-glucosa es la misma. La reacción depende de la formación de bisbenzoylhydrazones aniónicas de glioxal y metilglioxal a partir de azúcares reductores calentados en medio alcalino con PAHBAH. La absorbancia de las mismas se mide a longitudes de onda de de 410-415 nm.

Se dispersan 100 mg de muestra en 40 ml de agua destilada durante 15 minutos a 80 °C. Luego se lleva a volumen hasta 50 ml. Se filtra en un papel de 11 µm para separar los sólidos insolubles. Se toma una alícuota de 0,2 ml y se añade 0,2 ml de Enzima A y se deja agitando 30 minutos a 40°C. Luego se agrega 0,2 ml de borohidruro para reducir los azúcares reductores a alcohol de azúcar y se agita nuevamente 30 minutos a 40°C. Para eliminar el borohidruro, se añade 0,5 ml de ácido acético (0,1 M), el cual lleva el pH a un valor de 4,5. Se toma una alícuota de 0,2 ml de esta solución y se añade 0,1 ml de fructanasa y se deja agitando 20 minutos a 40 °C. Finalmente, se añaden 5 ml de reactivo PAHBA, el cual da una coloración en presencia de fructanos y se deja 6 minutos a 100 °C para luego enfriar por 5 minutos a 20 °C y así medir la absorbancia a 410 nm.

III.9.3.4. Determinación de proteínas

El contenido proteico se determinó en las muestras mediante el método colorimétrico de valoración cuantitativa de Lowry y col. (1951) utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar.

A la muestra se añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas.

El método consta de dos etapas:

1) los iones Cu^{2+} , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos Cu^{2+} -proteína tienen un color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos fenólicos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción. El Cu^{2+} se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato.

2) se produce la reducción, también en medio básico, del reactivo de Folin-Ciocalteu, por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina, presentes en la mayoría de las proteínas, actuando el cobre como catalizador. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso. El cobre se quelaría a la estructura peptídica y así facilita la transferencia electrónica a la mezcla de los ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico. Estos al reducirse (pierden de 1 a 3 átomos de oxígeno) viran a color azul.

Para la reacción colorimétrica y posterior medición espectrofotométrica se tomó una alícuota de 50 μl de muestra en una dilución 1:3 y se llevó a volumen final (100 μl) con agua desionizada (Milli-QTM) y se agregaron 1000 μl del reactivo A. Se colocaron las muestras tapadas en un baño de agua a 37 °C y se mantuvieron durante 20 minutos; luego se retiraron del baño y se les agregó 100 μl del reactivo B. Nuevamente se colocaron las muestras en baño de agua a 37 °C durante 20 minutos. Finalizado el tiempo de reacción se retiraron y se realizó la lectura a 660 nm a temperatura ambiente.

Los reactivos antes nombrados tienen la siguiente composición:

Reactivo A: Carbonato de sodio 2% (p/v) en solución de NaOH 0,1N; sulfato de cobre pentahidratado 1% (p/v) y tartrato de sodio y potasio 1% (p/v). Relación de mezcla de

100:1:1.

Reactivo B: Solución Folin Ciocalteu: agua desionizada Milli-QTM. Relación de mezcla (1:1).

La curva de calibración se realizó con una solución acuosa de albúmina de suero bovino BSA (SIGMA Protein Standard; SIGMA, EE.UU.) en concentración de 400 µg BSA/ml.

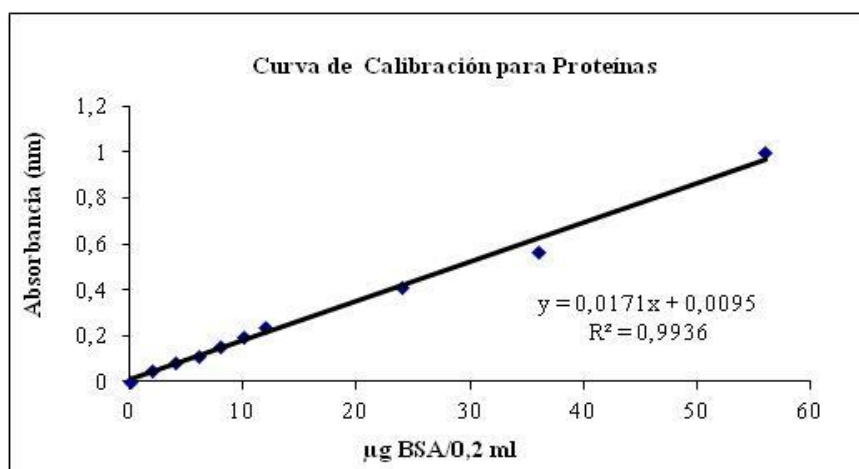


Figura III.5. Curva de calibración con BSA para la determinación del contenido de proteínas

III.9.3.5. Determinación de compuestos fenólicos

El ensayo de Folin-Ciocalteu (Bunzel y col., 2000; Singleton y Rossi, 1965; Singleton y col., 1999) se utiliza como medida del contenido en compuestos fenólicos totales en productos vegetales. Se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm. Este reactivo contiene una mezcla de wolframato (tungstato) sódico (Na_2WO_4) y molibdato sódico (Na_2MoO_4) en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido

fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido), de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es la que medimos para evaluar el contenido en polifenoles.

La oxidación de los polifenoles presentes en la muestra, causa la aparición de una coloración azulada que presenta un máximo de absorción a 765 nm, y que se cuantifica por espectrofotometría en base a una curva patrón de ácido gálico.

Una cantidad de $\approx 0,55$ g de muestra se mezcló con 30 ml de NaOH 2M y la solución se mantuvo durante 18-24 horas a temperatura ambiente (25°C), bajo vacío y al abrigo de la luz. Finalizada la hidrólisis alcalina, se agregó a cada muestra 5,7 ml de HCl ($\text{pH} < 2$). Se tomó 40 μl de las muestras sometidas a hidrólisis y se agregaron 1800 μl de una mezcla de reactivo Folin Ciocalteau y agua desionizada Milli-QTM (relación 1:10). Se agitó y se dejó reaccionar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregaron 1200 μl de una solución de NaHCO_3 7,5 % (p/v) y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. Finalizada la reacción y completado el desarrollo del color, se evaluó la absorbancia a 765 nm.

Para la curva de calibración se usó como estándar una solución de 2 mg/ml de ácido gálico (Anedra, Argentina).

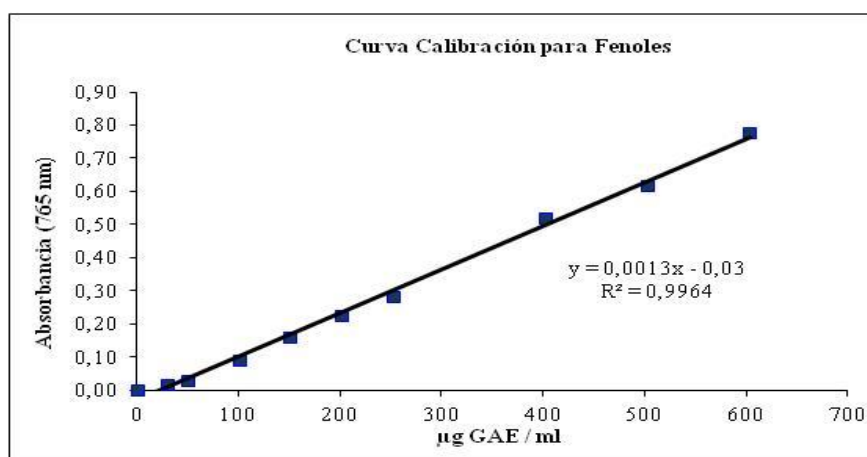


Figura III.6. Curva de calibración con ácido gálico equivalente (GAE) para la determinación del contenido de fenoles.

III.9.3.6. Determinación del grado de metilación

El ensayo de metanol permite la determinación espectrofotométrica sensible y selectiva directa del contenido de éster metílico de la pectina. La saponificación de la pectina con NaOH 0,5 N libera el metanol que se determina directamente después de la acidificación (Wood y Siddiqui, 1971).

Para los AIRs o CWMs se utilizó un volumen de 0,5 ml de los sobrenadantes neutralizados (Item III.8.2) y se le agregan 0,25 ml de NaOH (1,5 N), en tubo falcon tapado y se homogeneizó cada 10 minutos durante 1 hora a temperatura ambiente.

Para las fracciones de tallo o brácteas se utilizó una masa ($\approx 0,028$ g) y 10 ml de NaOH (0,5 N), en tubo falcon tapado y se homogeneizó cada 10 minutos durante el periodo de 1 hora a temperatura ambiente. Además, se realizó un blanco de muestra con igual masa y con 10 ml de agua desionizada MilliQTM. Luego se separó los sobrenadantes por centrifugación. Se tomó una alícuota de 500 μ l de cada muestra y se agregó 250 μ l de H₂SO₄ (5,5N) y 250 μ l de NaOH (1,5 N). Las muestras saponificadas y los blancos de muestras (muestras sin saponificar) fueron tratadas para posterior cuantificación.

Para la reacción colorimétrica se agregó a cada muestra 200 μ L de KMnO₄ 2% (p/v) y se dejó enfriar las muestras durante 15 minutos en un baño de agua con hielo. Luego, se agregaron 200 μ L de una solución de AsO₃H₂Na 0,5 M en H₂SO₄ 0,12 N y 600 μ L de agua desionizada (MilliQTM); se agitó y se dejó a temperatura ambiente durante una hora. Transcurrido éste tiempo se adicionaron 2000 μ L de una solución de 2,4-pentadiona 0,02 M disuelta en solución buffer acetato de amonio 2 M/ ácido acético 0,05 M. Luego se colocaron las muestras en un baño de agua a 60°C durante 15

minutos; finalizado el tiempo de reacción, se colocaron en baño de agua fría con hielo para cortar la reacción. Se leyó la absorbancia a 412 nm.

Para la determinación de la concentración de metanol, se utilizó una curva de calibración de una solución estándar de metanol (86,9 µg metanol/ml H₂SO₄ 1N).

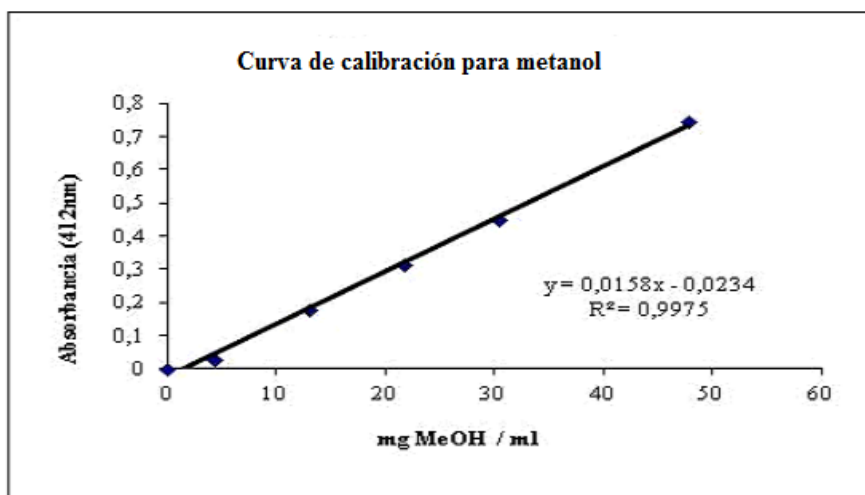


Figura III.7. Curva de calibración con metanol (MeOH) para la determinación del contenido de metanol.

El GM fue calculado como la relación entre los moles de metanol y los moles de ácido galacturónico en cada una de las muestras analizadas.

III.9.3.7. Determinación de actividad antioxidante

Se evaluó la actividad antioxidante por medio de las técnicas de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) y FRAP (poder antioxidante para reducir el hierro).

El ensayo de DPPH se realizó de acuerdo con Brand-Williams y col. (1995), evaluando la capacidad que tienen las muestras para captar radicales libres.

La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH. Otros nombres: 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) es conocida como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual la molécula no se dimeriza, como ocurre en la mayoría de los radicales libres. La deslocalización del electrón también intensifica el color violeta intenso típico del radical, el cual absorbe en metanol a 517 nm. Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno, el color violeta va desapareciendo por la formación de la forma reducida.

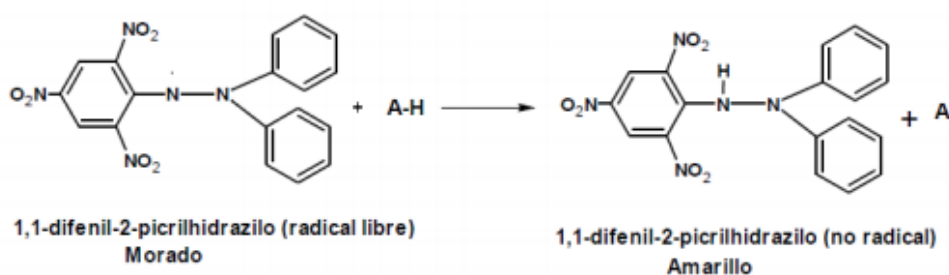


Figura III.8. Representación esquemática de la reacción del DPPH con un sustrato antioxidante.

Se pesó una masa (~0,1 g) de muestra y 2 ml de metanol (MeOH), en un tubo color caramelo con tapa y se homogeneizó en vortex. Se lo llevó a 37°C con agitación constante durante 30 minutos. Luego se separaron los sobrenadantes por centrifugación. Se tomó una alícuota de 100 μ L de cada muestra y también se realizó un blanco con 100 μ L de MeOH, a cada tubo se agregaron 3,9 ml de solución de DPPH (6×10^{-5} M) y se agitó. Las muestras se colocaron en cámara a 37°C durante 30 min en oscuridad. La curva estándar se preparó con ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, (Trólox) con una concentración de 6×10^{-5} M y con ácido ascórbico con una concentración de 2000 μ M. Se evaluó la absorbancia a 517 nm.

El análisis del poder reductor férrico/antioxidante (FRAP) se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito por Benzie y Strain (1996) y Pulido y col. (2000).

En este método se determina la capacidad antioxidante de forma indirecta. Se basa en el poder que tiene una sustancia antioxidante para reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} . El complejo férrico-2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina (TPTZ) incoloro es reducido al complejo ferroso coloreado. Cuanto más antioxidante es la sustancia objeto de estudio, mayor es la reducción y mayor la concentración de Fe^{2+} y más alta la señal de absorbancia.

El mecanismo del FRAP es de transferencia de electrones, a diferencia de otros métodos donde se produce captura de radicales libres y puede ser útil, en combinación con otros métodos, en la determinación de la capacidad antioxidante de productos que contengan distintos tipos de antioxidantes.

A pH bajo, la reducción del complejo férrico-2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina (FeIII-TPTZ) a la forma ferrosa (que tiene un color azul intenso), puede ser monitoreada midiendo el cambio en la absorbancia a 593 nm. El cambio en la absorbancia está directamente relacionado con el poder reductor combinado o "total" de los antioxidantes donantes de electrones presentes en la mezcla de reacción.

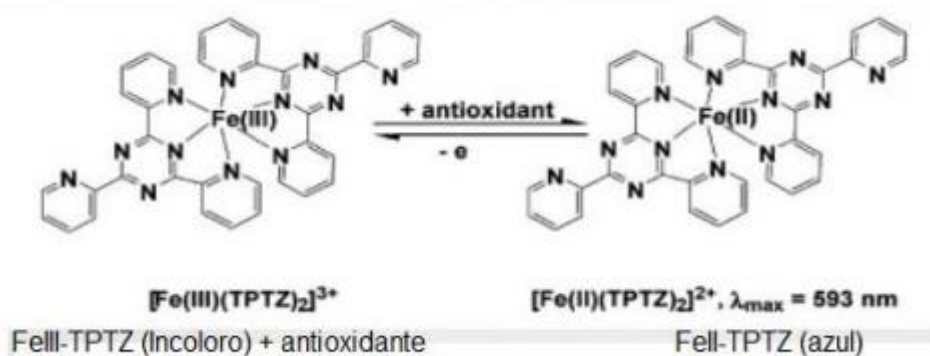


Figura III.9. Representación esquemática de la formación del complejo de color azul FeII-TPTZ por la acción de un antioxidante donante de electrones sobre el FeIII-TPTZ .

Se utilizó una masa (~0,1 g) de muestra y 2 ml de MeOH, en un tubo color caramelo con tapa y se homogeneizó en vortex. Se lo llevó a 37°C con agitación constante durante 30 minutos. Luego se separaron los sobrenadantes por centrifugación. Se tomó una alícuota de 60 µL de cada muestra y también se realizó un blanco con 60 µL de MeOH, a cada tubo se agregó 180 µL de agua desionizada (MilliQ™) y 1800 µL de reactivo de FRAP (2,5 ml de 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina (TPTZ) 0,01 M en HCl 0,04M, 2,5 ml ml de sc FeCl₃.6H₂O 0,02 M en agua y 25 ml de buffer acetato de sodio 0,3 M, pH 3,5). Las muestras se colocaron en cámara a 37°C durante 30 min en oscuridad. La curva estándar se preparó con Trólox (500 µM). Se evaluó la absorbancia a 595 nm.

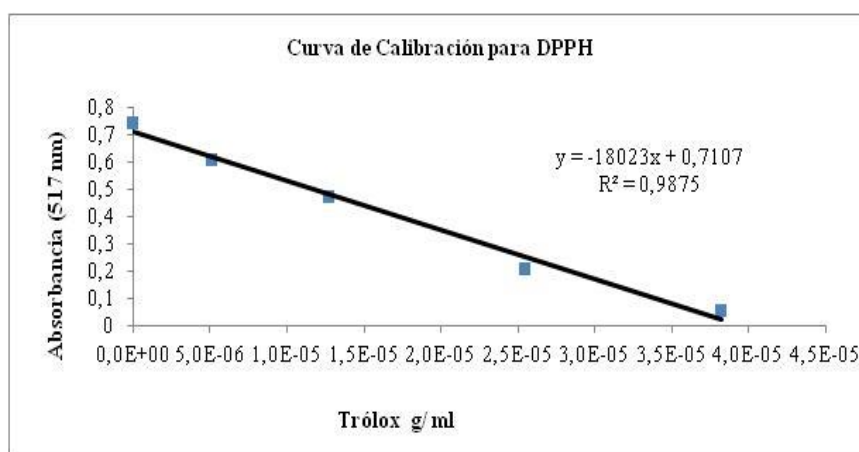


Figura III.10. Curva de calibración con Trólox para la determinación del actividad antioxidante (DPPH).

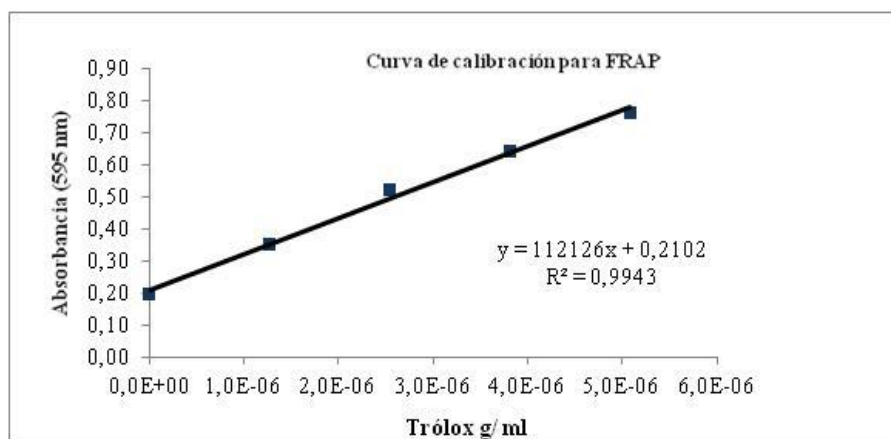


Figura III.11. Curva de calibración con Trólox para la determinación del actividad antioxidante (FRAP)

III.9.3.8. Determinación de masas moleculares de pectina e inulina.

La determinación se realizó por cromatografía de permeación en gel utilizando un Cromatógrafo GPC (Gel permeation chromatography, Waters System, Suecia) con un horno calefactor (TCM 5 CH, Singapur), un detector de índice de refracción (Waters 2414) y un detector de arreglo de diodos DAD (Waters 2998). Se colocó una precolumna Ultrahydrogel (6 x 40 mm), en serie con las columnas Ultrahydrogel 500 y 1000 (7.8 x 300 mm) (Waters, Japón). La fase móvil fue nitrato de sodio 0,1 M a una velocidad de flujo de 0,8 ml min⁻¹ y mantenida a 50°C (Brigand y col., 1990). Las fracciones de fibras aisladas a partir de AIR-C y AIR-M (0,01g) fueron disueltas en 5 ml de nitrato de sodio 0,1M. Los estándares utilizados para la calibración de la columna fueron dextransos con masas moleculares de 5200 Da hasta 66800 Da provenientes de un kit PSS (Waters, Alemania), sacarosa (Anedra, Argentina) y glucosa (Anedra, Argentina).

Se determinó la masa molecular promedio de la pectina e inulina presentes en las fracciones aisladas con un pretratamiento con calor a partir de AIR-C y AIR-M de cada

tejido. Para ello, se utilizó la curva de calibración (Figura III.12) obtenida con los estándares de dextrano y ajustada utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Log Mol Wt} = s -4,53*V + 2,54 e^{-1} * V^2 - 5,07 e^{-3} * V^3 \quad (\text{III.1})$$

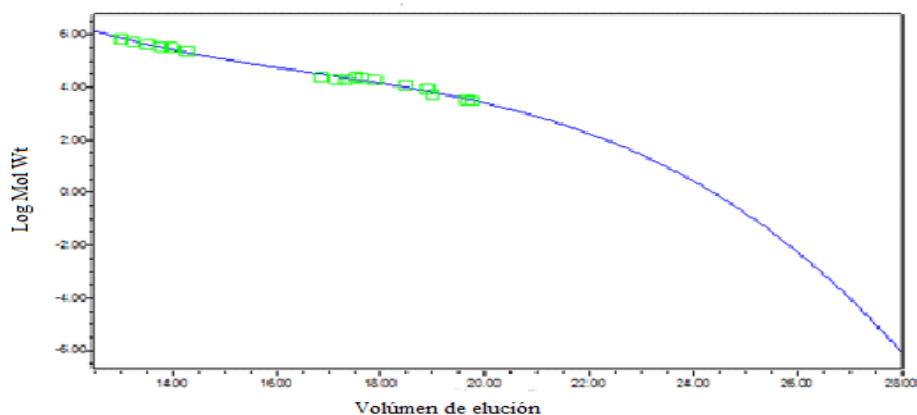


Figura III.12. Curva de calibración con dextranos para la determinación de masas moleculares.

III.9.3.9. Determinación cromatográfica de compuestos polifenólicos

La extracción se realizó pesando 0,4 gramos de material liofilizado con 4 ml de metanol grado HPLC, se vortexeó 5 minutos, luego se aplicó ultrasonido por 45 minutos a 25°C y se dejó en shaker 48 horas a 25 °C. Finalmente, la muestra se filtró a través de un filtro de nylon de 0,45 µm.

El análisis se realizó por cromatografía líquida de alta presión con un cromatógrafo HPLC (Waters) con detector de arreglo de diodo (DAD), bomba binaria, horno y desgasificador, utilizando una columna con relleno de C18 (4,6 x 150 mm, tamaño de partícula 5 µm) XBridge (Waters). Para la fase móvil se utilizó un gradiente constituido en base a dos fases móviles:

Fase móvil A: agua acidificada (0,5% v/v de ácido acético)

Fase móvil B: acetonitrilo

En la Tabla III.4 se muestra el gradiente utilizado en la determinación cromatográfica de los compuestos polifenólicos.

Tabla III.4. Gradiente utilizado en la determinación cromatográfica de los compuestos polifenólicos

Tiempo (minutos)	Fase móvil A (%)	Fase móvil B (%)
0	100	0
10	80	20
15	70	30
20	50	50
25	25	75
35	0	100
42	100	0
47	100	0

Con un flujo de 0,5 ml/min, la temperatura de la columna se mantuvo a 40°C y el volumen de inyección de las muestras fue de 20 µL (Abu-Reidah, 2013). La identificación se llevó a cabo a 320 nm.

También se utilizó un HPLC-MS (Agilent serie 1200), equipado con una columna Phenomenex Luna C18 (100 x 2,00 mm, 3µm). La fase móvil y el gradiente utilizado fue el mismo que se utilizó para el método del HPLC-DAD. El flujo de trabajo fue de 0,2 mL/min. El sistema HPLC estaba acoplado a un espectrómetro de masa QTOF (microOTROF-Q II, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania), un acelerador ortogonal, una fuente de ionización de electrospray (ESI), el cual fue utilizado en modo negativo con nitrógeno como gas de colisión. El espectro fue adquirido sobre un rango de masa desde 50 m/z a 1000. Los valores óptimos de los parámetros ESI-MS fueron: voltaje de capilaridad +3,5 kV, temperatura del gas de secado 200°C, flujo de gas de secado 7,0 L/min, set de nebulización 51 psi y RF de colisión 150 Vpp.

III.10. Determinación del color

El color de los tejidos de brácteas y tallo (tratamiento por convección y microondas) fue evaluado utilizando un fotocolorímetro (Minolta Co. Ltd., Osaka, Japón) con iluminante D65 y ángulo de observador α de 2°. Cada muestra fue colocada sobre un azulejo blanco, registrándose el color a través de las coordenadas cromáticas L (luminosidad), a (color rojo-verde) y b (color azul-amarillo) del espacio CIELab. Se realizaron las mediciones por duplicado y se informó el valor medio y el desvío estándar.

Los datos obtenidos de L^* , a^* y b^* fueron utilizados para evaluar los cambios en la luminosidad (ΔL^*); en el grado de color rojo-verde (Δa^*) y en el grado de color amarillo-azul (Δb^*).

Siendo:

$$\Delta L^* = L^* - L_0^*$$

$$\Delta a^* = a^* - a_0^*$$

$$\Delta b^* = b^* - b_0^*$$

L_0^* , a_0^* y b_0^* corresponden a los valores obtenidos cuando no se utilizó enzima, y L^* , a^* y b^* los valores obtenidos cuando se utilizó enzima en los tejidos.

Luego se calculó el espacio Euclidiano, es la distancia entre dos puntos cualesquiera de color que representa la diferencia de color (ΔE^*) y se calcula a partir de ΔL , Δa y Δb :

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

Se destaca que el cálculo de ΔE^* se realizó por diferencia de los parámetros de color a^* , b^* , L^* de las fracciones obtenidas con la presencia de enzimas respecto a las fracciones obtenidas en ausencia de enzimas.

III.11. Reología

La caracterización reológica se realizó utilizando un reómetro (MCR300 Para Physica, Anton Paar, Austria) equipado con platos paralelos dentados (PP25/S) de 25 mm de diámetro. Se eligió una luz entre platos de 800 μm . La temperatura se mantuvo constante a 25°C a través de un sistema de placa Peltier. Los datos se adquirieron en estado estacionario.

III.11.1. Sistemas acuosos con calcio

Se pesaron 0,04 gramos de cada fracción de fibra aislada a partir de AIR-C y AIR-M y se suspendieron en 1700 μl de agua destilada, se agitaron hasta hidratación completa a una temperatura de 65°C; luego se llevaron a volumen final de 2000 μl con agua desionizada y una solución de cloruro de calcio bajo agitación constante (Fissore y col., 2013). Se prepararon sistemas al 2% (p/v) conteniendo 40 mg de calcio por cada gramo de ácido galacturónico (GalA). Luego, los sistemas fueron almacenados a 8°C durante 18 horas para lograr que se hidraten y equilibren previa medición.

III.11.2. Ensayos Realizados

III.11.2.1. Ensayos de Flujo

Los sistemas acuosos de fibra con calcio fueron sometidos a ensayos de flujo, para luego ajustar los datos a distintos modelos de viscosidad. Para lo cual fue necesario determinar la curva de viscosidad en un amplio rango de valores de velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$) entre valores 0,001 – 100 rad s^{-1} a temperatura constante de 25°C.

A cada velocidad de deformación, se alcanzó el estado estacionario antes de registrar los datos.

Los perfiles de flujo obtenidos fueron ajustados por uno de los siguientes modelos:

Ley de la Potencia:

$$\tau = k \dot{\gamma}^n \text{ (III.3)}$$

Donde τ representa al esfuerzo de corte, k representa el índice de consistencia, $\dot{\gamma}$ es la velocidad de deformación y, n es el índice de flujo.

Modelo de Herschel-Bulkley:

$$\tau = \tau_0 + k \dot{\gamma}^n \text{ (III.4)}$$

Donde τ representa al esfuerzo de corte, τ_0 representa el esfuerzo de corte mínimo necesario para que el sistema comience a fluir, k representa el índice de consistencia, $\dot{\gamma}$ es la velocidad de deformación y, n es el índice de flujo.

III.11.2.2. Ensayos dinámicos

Las fracciones disueltas al 2% (p/v) en solución acuosa de cloruro de calcio, de modo tal de tener una concentración de 40 mg de calcio/g GalA, fueron sometidas a ensayos dinámicos.

En primer lugar se realizaron los barridos de amplitud a frecuencia constante (1 Hz) para determinar el rango viscoelástico lineal (RVL) para cada sistema, a partir del cual se seleccionó el valor de esfuerzo constante para trabajar en los barridos de frecuencia.

Se evaluaron los módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G''), así como la deformación (γ) como función del esfuerzo (τ), a una frecuencia constante de 1 Hz y a una temperatura constante de 25°C. Los valores de G' y G'' se registraron en función

del aumento de la frecuencia angular (ω , s^{-1}), luego de alcanzar la condición de estado estacionario para cada punto.

Los espectros mecánicos obtenidos fueron ajustados con distintos modelos según el caso:

a) **Modelo tipo Ley de la Potencia:**

$$G' = A \omega^m \quad (\text{III.5})$$

$$G'' = B \omega^q \quad (\text{III.6})$$

donde A, B, m y q son parámetros de ajuste, ω es la frecuencia angular (s^{-1}) y, G' y G'' (Pa) son los módulos de almacenamiento y pérdida, respectivamente.

b) **Modelo generalizado de Maxwell**

Este modelo resulta de la combinación en paralelo de n elementos de Maxwell (resorte y elemento viscoso ó pistón en serie), donde uno de ellos mostró su tiempo de relajación característico (λ_i) tendiendo a infinito, dando lugar a un módulo de equilibrio, G_e , correspondiente a un resorte aislado (Ferry, 1980). La función viscoelástica exhibida por los elementos de Maxwell puede derivarse para los componentes reales y complejos del módulo de relajación, dando las expresiones matemáticas para G' y G'' , en un espectro viscoelástico discreto de tiempos de relajación:

$$G'(\omega) = G_e + \sum_{i=1}^N G_i \frac{(\lambda_i \omega)^2}{1 + (\lambda_i \omega)^2} \quad (\text{III.7})$$

$$G''(\omega) = \sum_{i=1}^N G_i \frac{\lambda_i \omega}{1 + (\lambda_i \omega)^2} \quad (\text{III.8})$$

donde λ_i es la relación entre la viscosidad Newtoniana del elemento viscoso (η_i) y el módulo Hookeano del resorte (G_i). Los N modos de relajación están definidos por sus tiempos de relajación λ_i y resistencias G_i (Lapasin y Pricl, 1995).

El espectro viscoelástico discreto de los sistemas acuosos de las fracciones, se estimó a partir de los datos experimentales de G' y G'' y con las ecuaciones (III.7) y (III.8), a través de un proceso iterativo que minimiza la desviación estándar (s):

$$s^2 = \frac{1}{M} \sum_{j=1}^M \left[\left(1 - \frac{1}{G'(\omega_j)} \sum_{i=1}^N \frac{G_i (\omega_j \lambda_i)^2}{1 + (\omega_j \lambda_i)^2} \right)^2 + \left[1 - \frac{1}{G''(\omega_j)} \sum_{i=1}^N \frac{G_i (\omega_j \lambda_i)}{1 + (\omega_j \lambda_i)^2} \right]^2 \right] \quad \text{(III.9)}$$

El modelado matemático fue adecuado usando un bajo número de elementos (N) pero suficientes para minimizar s debido a que $N < M$ (Quintana, 2003). Además, se obtuvieron valores experimentales de M , $G'(\omega_j)$, $G''(\omega_j)$, N parámetros (G_i y λ_i).

Los valores de G_i y λ_i , fueron aplicados para predecir los valores de G' y G'' . El porcentaje de error ($\hat{\epsilon}\%$) entre los datos experimentales y los obtenidos por el modelado de Maxwell fueron calculados con las siguientes ecuaciones (Quintana, 2003):

$$\hat{\epsilon}\% (G') = (\sum(G'_{\text{experiment}} - G'_{\text{predict}})/G'_{\text{predict}}).100/N \quad \text{(III.10)}$$

$$\hat{\epsilon}\% (G'') = (\sum(G''_{\text{experiment}} - G''_{\text{predict}})/G''_{\text{predict}}).100/N \quad \text{(III.11)}$$

III.12. Actividad prebiótica

III.12.1. Activación de las cepas bacterianas

Para los estudios de actividad prebiótica, se utilizaron cultivos congelados de *Lactobacillus plantarum* 8114 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, EE.UU.), *Bifidobacterium bifidum* ATCC 11863 (MEDICA-TEC, Buenos Aires,

Argentina) y *Escherichia coli* 25922 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, EE.UU.). *L. plantarum* 8114 fue sembrado en agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS), *B. bifidum* 11.863 en agar MRS suplementado con 0,05% de L-cisteína y *E. coli* ATCC 25922 en agar de soja tríptico (TSA) o agar nutritivo. Luego, *E. coli* se incubó a 37 °C durante 24 - 48 horas bajo condiciones aeróbicas, *L. plantarum* y *B. bifidum* se incubaron a 37 °C durante 24 - 48 horas en una cámara anaeróbica (Oxoid, Cambridge, Reino Unido) en una atmósfera anaeróbica (Anaerocult A, Merck, Darmstadt, Alemania). Después de eso, una colonia de cada placa se transfirió a 10 ml de caldo MRS para *L. plantarum* o en 10 ml de caldo MRS suplementado con 0,05% L-cisteína para *B. bifidum* y se incubaron durante una noche en condiciones anaeróbicas. Para *E. coli*, una colonia de la placa de TSA se inoculó en 10 ml de caldo de soja tríptico (TSB) y se incubó en condiciones aerobias durante 48 h. (Figura III.13).

III.12.2. Protocolo de trabajo

El ensayo se realizó de acuerdo a la Figura III.14 mediante la adición de 1% (v/v) de las cepa lista para usar de *L. plantarum* a tubos con 5 ml de caldo MRS que contenían 1% (p/v) de glucosa o 1% (p/v) de las muestras de fibras. Para el ensayo de *B. bifidum* se adicionó 1% (v/v) de la cepa lista para usar de *B. bifidum* a tubos con 5 ml de caldo MRS suplementados con 0,05% de L-cisteína que contenían 1% (p/v) de glucosa o 1% (p/v) de muestras de fibras.

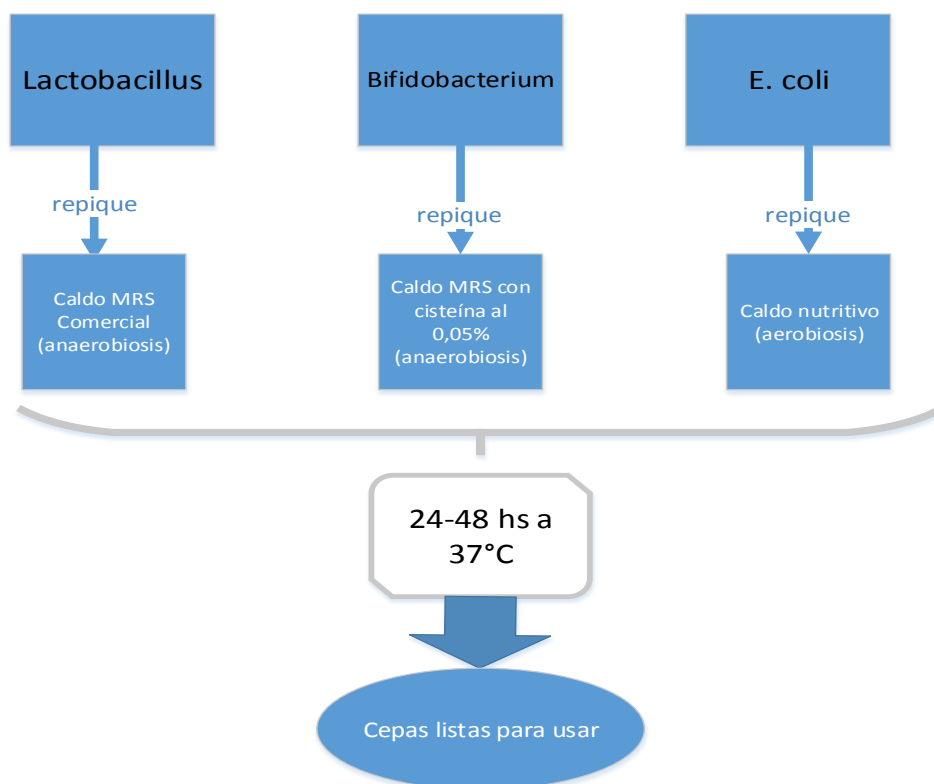


Figura III.13. Proceso de activación de cepas para la determinación de actividad prebiótica.

En ambos casos, los cultivos se incubaron a 37 °C durante 48 h bajo un sistema de generación atmosférica anaeróbica (Anaerocult A, Merck, Darmstadt, Alemania) en una cámara anaeróbica (Oxoid, Cambridge, Reino Unido).

Las incubaciones de 0 y 48 h se realizaron por triplicado utilizando el método de dilución en serie en agar MRS (*L. plantarum*) o agar MRS suplementado con L-cisteína (*B.bifidum*) a 37°C en anaerobiosis y los resultados fueron calculados como unidades formadoras de colonias/ml (UFC/ ml) de cultivo. Cada ensayo se repitió un mínimo de tres veces. Se utilizó 1% (v/v) de la cepa lista para usar de *E. coli* en caldo mínimo M9 con 1% (p/v) de glucosa o de 1% (p/v) de las muestras de fibra, se incubaron a 37°C durante 48 h en condiciones de aerobiosis como fue descrito por Huebner y col. (2007, 2008) y Marotti y col. (2012) a las 0 y 48 h de incubación, se realizó un recuento

de las muestras inoculadas por duplicado en placas de TSA incubadas a 37 ° C en condiciones de aerobiosis. Los resultados se expresaron como UFC / ml de cultivo.

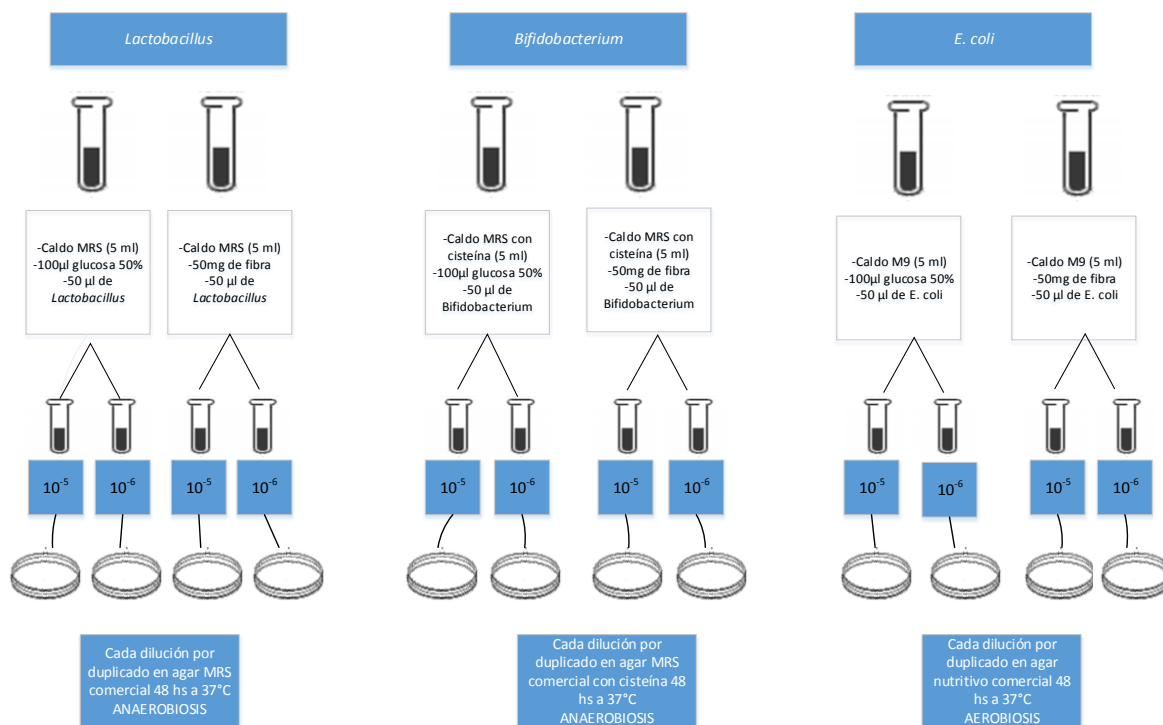


Figura III.14. Flujo de trabajo usado para el ensayo de puntuación de la actividad prebiótica.

Se obtuvieron los recuentos de cada dilución para *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (probióticos) y *E.coli* (entérico) y con estos datos se calculó el Score de Actividad Prebiótica teniendo en cuenta el desarrollo de los microorganismos en glucosa y en las fracciones aisladas (prebiótico).

$$\text{Score de Actividad Prebiótica} = \left(\frac{\log \text{UFC probiótico/ml del prebiótico a 48 h} - \log \text{UFC probiótico/ml del prebiótico a 0 h}}{\log \text{UFC probiótico/ml de glucosa a 48 h} - \log \text{UFC probiótico/ml de glucosa a 0 h}} \right) - \quad \text{(III.12)}$$

$$- \left(\frac{\log \text{UFC entérico/ml del prebiótico a 48 h} - \log \text{UFC entérico/ml del prebiótico a 0 h}}{\log \text{UFC entérico/ml de glucosa a 48 h} - \log \text{UFC entérico/ml de glucosa a 0 h}} \right)$$

III.13. Actividad antiviral

III.13.1. Líneas celulares

Se utilizó la línea celular Vero, proveniente de riñón de mono verde africano adulto *Cercopithecus aethiops* (ATCC CCL 81).

Las células Vero fueron crecidas y mantenidas en botellas cerradas a 37 °C, utilizando medio mínimo esencial Eagle (MEM) (Gibco BRL – Life Technologies, EE.UU.) suplementado con 5 % de suero de ternera (ST) (Gibco BRL – Life Technologies, EE.UU.) inactivado (56 °C durante 30 min) y 50 µg/ml de gentamicina (Sigma-Aldrich, EE.UU.). Para el medio de mantenimiento (MM) la concentración de suero fue reducida a 1,5 %.

III.13.2 Virus

Se utilizó el virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) cepa F. Las suspensiones virales fueron preparadas y tituladas en células Vero.

III.13.3. Ensayo de plaqueo directo

Se titularon las suspensiones virales por cuantificación de unidades formadoras de placas (UFP). Para ello se infectaron monocapas de células Vero crecidas en placas de 24 pocillos con diluciones seriadas al décimo de las distintas suspensiones virales. Se dejó adsorber el virus 1h a 37°C en atmósfera de CO₂. Luego se retiró el inóculo y se cubrió cada pocillo con medio de plaqueo (MP) (MM conteniendo 0,7% de metilcelulosa). Después de 48 h de incubación, se fijaron las células con formol al 10 %

durante 15 minutos y se tiñeron con cristal violeta (1 % en metanol 10 %). Se contaron las UFP en cada pocillo y se determinó el título viral mediante la siguiente fórmula:

Título viral: N° promedio de UFP/ (dilución x Vol. del inóculo). (III.13)

III.13.4. Ensayo de citotoxicidad

Se utilizó el ensayo colorimétrico o técnica del MTT (3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difenil bromuro de tetrazolio, Sigma-Aldrich, EE.UU.) (Mosmann, 1983). Este compuesto es procesado por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa formando cristales de formazán (producto coloreado), en cantidad proporcional al número de células viables presentes en el cultivo. Para estudiar el efecto de las fracciones de FD sobre células confluentes, las monocapas de células crecidas en microplacas de 96 cavidades fueron tratadas con diferentes concentraciones de cada fracción de fibra aislada a partir de AIR-C y AIR-M (0- 5 mg/ml), por triplicado durante 48 h a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se agregaron 10 µl de una solución de MTT (5 mg/ml) en cada cavidad y se incubó a 37°C durante 2 h. Seguidamente, se descartaron los sobrenadantes y los cristales de formazán fueron disueltos en 200 µl de etanol 96°. Se determinó la densidad óptica, utilizando un lector de microplacas a una longitud de onda de prueba de 595 nm. Se calculó la CC₅₀, concentración citotóxica del compuesto que reduce el 50% de la viabilidad celular, con el promedio de absorbancia, tomando como control monocapas tratadas sólo con el disolvente del compuesto. El control se realizó cubriendo las células con medio de cultivo en ausencia de las fracciones.

III.13.5. Determinación de la actividad antiviral

La actividad antiviral de las fracciones de FD se determinó mediante un ensayo de reducción del número de placas de virus en células Vero. Para ello, monocapas de

células Vero crecidas en microplacas de 24 pocillos, fueron infectadas con 50 unidades formadoras de placa por pocillo (UFP/pocillo) en ausencia o presencia de diluciones seriadas al medio de las fracciones en estudio. Luego de una hora de adsorción a 37 °C, se retiró el inóculo y las células fueron cubiertas con medio de plaqueo (MP), conteniendo las mismas concentraciones de las fracciones en estudio o sin fracciones (control). Luego de 48 horas a 37 °C, las células fueron fijadas con formol y teñidas con cristal violeta para el recuento de placas de lisis. La concentración inhibitoria 50% (IC₅₀) fue calculada como la concentración de las fracciones que reduce las placas virales en un 50 %.

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{100 - \text{UFP de la muestra} \times 100}{\text{UFP del control}} \quad \text{(III.14)}$$

Todas las determinaciones fueron realizadas por duplicado

III.13.6. Expresión de la actividad antiviral.

La actividad antiviral se expresó por medio del índice de selectividad (IS) que se calcula como la relación entre CC₅₀ e IC₅₀.

III.14. Modelado de los Datos y Análisis Estadístico

Los ajustes no lineales se realizaron utilizando el utilitario Prism 5 (Statistical Software para Windows; GraphPad, EE.UU.), así como la función Solver del programa Excel para Windows XP (Microsoft, EE.UU.). Los análisis estadísticos de comparación de resultados se realizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA; nivel de significancia α : 0,05); como test “*a posteriori*” se utilizó el test de Tukey (Sokal y

Rohlf, 2000). Los análisis de correlación de Pearson se realizaron con el programa InfoStat (Versión 2011, Grupo InfoStat, FCA, Universidad de Córdoba, Argentina).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS y DISCUSIÓN

RESULTADOS y DISCUSIÓN

IV.1. Obtención del material de la pared celular (CWM) y del residuo insoluble en alcohol (AIR)

Los tejido de brácteas y tallo de alcaucil fueron cortados y lavados para eliminar compuestos hidrosolubles como azúcares simples y otros compuestos residuales. Se realizó la deshidratación del material por tratamiento a 85°C durante 2,5 horas obteniéndose un polvo enriquecido en material de la pared celular (CWM). Esto también permitió la inactivación enzimática para su estabilización. El rendimiento del CWM para tallo (S) fue de 20,7 g de polvo/100 g de alcaucil fresco y para brácteas (B) fue de 14,4 g de polvo/100 g de alcaucil fresco. El rendimiento de AIR cuando se aplicó calentamiento convectivo (AIR-C) fue de 63g/100 g CWM base seca (b.s.) para tallo y de 78 g/ 100 g CWM b.s. para brácteas. El rendimiento de AIR cuando se aplicó calentamiento por microondas (AIR-M) fue de 70 g/100 g CWM b.s. para tallo y de 84 g/ 100 g CWM b.s. para brácteas. Por lo tanto los CWMs tienen un alto porcentaje de polímeros insolubles de la pared celular.

La obtención del residuo insoluble en alcohol con la asistencia del calentamiento con microondas redujo el tiempo necesario para el proceso llevándolo de los valores de aproximadamente una hora (calentamiento convectivo) a un tiempo de 36 min.

IV.2. Caracterización química del CWM de brácteas y tallos y de los AIR-C y AIR-M de ambos tejidos

Ambos CWM y AIR estuvieron constituidos principalmente por carbohidratos (Tabla IV.1 y IV.2).

Como puede observarse en la Tabla IV.1, los contenidos totales de carbohidratos en CWM fueron de 66 g/100g para brácteas y 60 g/100 g para tallo. La curva de calibración usada para la determinación de carbohidratos fue realizada con fructosa, debido al alto contenido de inulina en las muestras.

Como puede observarse, los carbohidratos de ambos CWMs están principalmente constituidos por carbohidratos no celulósicos, observando valores de 47 y 51 g/100 g para el CWM de tallo y brácteas, respectivamente.

El contenido de inulina fue el doble en tallo que en brácteas, presentando valores de 6,5 y 3,2 g/100 g para el CWM de tallo y brácteas, respectivamente. Wouters (2011) estudió el contenido de inulina en hojas y corazón de alcaucil y reportó concentraciones de 3 a 10 g de inulina pero por cada 100 gramos de alcaucil fresco.

La cuantificación del residuo insoluble en alcohol puede observarse en la Tabla IV.2. Se encontraron diferencias significativas en el contenido de carbohidratos totales, celulosa, ácidos urónicos, inulina, lignina, proteínas y polifenoles de acuerdo al método de calentamiento aplicado en la obtención del AIR. En particular se puede destacar un mayor contenido de carbohidratos y polifenoles presentes en los AIRs, tanto de tallo como de brácteas, cuando el calentamiento fue realizado con microondas. Fissore y col. (2015) informaron un contenido de carbohidratos de 76 g/100 g en AIR de tallo de alcaucil obtenido por calentamiento convectivo.

Tabla IV.1. Composición química del material de la pared celular.

Composición	Bractéas CWM	Tallo CWM
Carbohidratos totales ¹ (g/100g)	65,8 ± 5,4	59,1 ± 1,5
Celulosa (g/100g)	18,9 ± 0,9	8,0 ± 0,6
Ácidos urónicos (g/100g)	8,7 ± 0,9	9,9 ± 0,6
Inulina (g/100g)	3,2 ± 0,4	6,5 ± 0,6
Lignina (g/100g)	14,8 ± 1,5	11,0 ± 0,8
Carbohidratos no celulósicos (g/100g)	46,9	51,1
Proteínas (g/100g)	8,8 ± 0,0	9,0 ± 0,3
Polifenoles (g/100g GAE) ²	0,53 ± 0,03	0,64 ± 0,01
GM (%) ³	38,7	44,5

Resultados expresados como media y desvío estándar (n=3).

¹ Calculado en relación a la curva de calibración de fructosa.

² GAE: equivalentes de ácido gálico.

³ GM fueron calculados como un porcentaje entre los moles de metanol y los moles de GalA por 100 g de muestra.

Femenia y col. (1999) encontraron una alta proporción de ácidos urónicos en el tallo parenquimal del coliflor con valores de 22,1g de ácidos urónicos cada 100 g de AIR.

Por otro lado, Fissore y col. (2009) encontraron una cantidad un poco superior de ácidos urónicos en mesocarpio de calabaza y remolacha (12-14 g/100g AIR).

Se determinó la actividad antioxidante en todas los CWM y AIR obtenidos. En la Tabla IV.3 se puede observar que la mayor actividad antioxidante corresponde a los CWM, principalmente de tallo. Además, el método DPPH, en general, dió valores superiores a los obtenidos con FRAP. Gouveia y Castilho (2012) reportaron resultados superiores a los aquí obtenidos con DPPH (665 mg de Trólox/ 100 g) para alcaucil.

Tabla IV.2. Composición química del residuo insoluble en alcohol (AIR) del tallo y brácteas para ambos tratamientos.

Composición	Bractéas AIR-C	Brácteas AIR-M	Tallo AIR-C	Tallo AIR-M
Carbohidratos totales ¹ (g/100g)	86,4 ± 3,2 A	93,1 ± 1,6 B	81,3 ± 7,9 A	96,9 ± 5,4 B
Celulosa (g/100g)	22,2 ± 3,1 A	10,7 ± 0,8 B	8,7 ± 1,3 A	8,0 ± 0,6 A
Ácidos urónicos (g/100g)	10,2 ± 1,2 A	8,7 ± 0,2 B	11,1 ± 1,7 A	7,6 ± 0,3 B
Inulina (g/100g)	7,9 ± 1,2 A	5,4 ± 0,1 B	11,9 ± 0,8 A	6,0 ± 0,2 B
Lignina (g/100g)	15,1 ± 0,1 A	17,0 ± 0,2 B	15,1 ± 1,3 A	14,5 ± 0,2 A
Carbohidratos no celulósicos (g/100g)	64,2	82,4	72,6	88,9
Proteínas (g/100g)	8,5 ± 0,8 A	5,5 ± 0,1 B	9,0 ± 0,3 A	4,6 ± 0,1 B
Polifenoles (g/100g GAE) ²	0,40 ± 0,02 A	0,53 ± 0,02 B	0,46 ± 0,05 A	0,85 ± 0,03 B
GM (%) ³	37,7	32,9	36,5	38,4

Resultados expresados como media y desvío estándar (n=3)

¹ Calculado en relación a la curva de calibración de fructosa

² GAE: equivalentes de ácido gálico

³ GM fueron calculados como un porcentaje entre los moles de metanol y los moles de GalA por 100 g de muestra

AIR-C residuo insoluble en alcohol obtenido por calentamiento convectivo

AIR-M residuo insoluble en alcohol obtenido por calentamiento asistido por microondas.

Para cada tejido, letras mayúsculas diferentes indican diferencias en el contenido de cada compuesto por el diferente método de calentamiento usado en la obtención del AIR, a un nivel de probabilidad de 0,05.

Las propiedades reductoras de las muestras evaluadas por el ensayo de FRAP mostraron que la fracción CWM de ambos tejidos presentó considerablemente mayor actividad antioxidante que sus respectivos AIRs. El CWM de tallo presentó una actividad antioxidante ligeramente mayor que el CWM de brácteas. La misma tendencia se observó para los AIRs. Silva Leal y Martínez Corredor (2017) informaron valores de

actividad antioxidante, evaluada por el método de FRAP, de 525,1 mg TEAC/100 g de peso seco de brácteas y 3028 mg TEAC/100 g de peso seco de tallo.

Las diferencias en la actividad antioxidante observadas para los CWM y AIR podrían deberse a una solubilización y/o destrucción de los antioxidantes a consecuencia de las extracciones realizadas con etanol para la obtención del AIR y los efectos serían distintos para cada método de calentamiento involucrado en dicha obtención.

La humedad final de AIR tallo y brácteas para ambos tratamientos fue entre 3-4 % (m/m). El valor final de la actividad acuosa (a_w) fue entre 0,35-0,70 \pm 0,04, permitiendo un almacenamiento estable del material durante el estudio.

Tabla IV.3. Determinación de actividad antioxidante de los CWM y AIR de tallo y brácteas por los métodos DPPH y FRAP.

Tejido	DPPH		FRAP
	Ácido Ascórbico (mg/100g)	Trólox (mg/100g)	Trólox (mg/100g)
CWM tallo	390,5 \pm 30,2	545,0 \pm 42,2	314,1 \pm 23,1
CWM brácteas	243,7 \pm 29,5	340,1 \pm 41,1	289,9 \pm 19,6
AIR-C tallo	119,1 \pm 3,4	166,3 \pm 4,7	38,0 \pm 11,7
AIR-C brácteas	121,6 \pm 5,7	169,8 \pm 8,0	26,1 \pm 0,8
AIR-M tallo	74, \pm 1,1	105,5 \pm 1,6	116,0 \pm 2,5
AIR-M brácteas	71,4 \pm 2,3	101,9 \pm 2,7	110,3 \pm 0,0

Resultados expresados como media y desvío estándar (n=3)

IV.3. Caracterización de fracciones enriquecidas en fibra dietaria y aisladas a partir de AIR-C de acuerdo al diseño experimental

Uno de los propósitos de este trabajo fue la transformación de los subproductos obtenidos del alcaucil en productos de mayor valor agregado, tales como fibra dietaria,

usando digestión enzimática como un método de extracción amigable con el medio ambiente, mejorando así la sustentabilidad del proceso de industrialización.

La temperatura y pH de desarrollo del diseño experimental tuvo en cuenta (Voragen y col., 2001; Howard y col., 2003; Motamed Zadegan y col., 2010; Wang y col., 2010; Denglin y col., 2011; Luo y col., 2011 y Hassan y col., 2013):

-las restricciones de pH y temperatura relacionadas con la estabilidad de la pectina y de la inulina presentes en los AIRs utilizados como material base en la obtención de las fracciones a obtener y

-la sensibilidad de las actividades enzimáticas a la temperatura y a la acidez.

El diseño experimental involucró, entonces, el tratamiento de los AIRs de brácteas y tallo con enzimas a una temperatura de 40°C durante 5 h y a un pH de 5,2.

Una cantidad de 5,00 g de AIR-C obtenido de tallo o brácteas de alcaucil fue hidrolizado en 500 ml de buffer citrato de sodio (0,05M, pH 5,2) con 0,01% de azida sódica (p/v) y la variable estudiada fue la cantidad de enzima. El diseño experimental fue informado en la Tabla III.2 del capítulo III de esta tesis. Ello condujo a la obtención de diversas fracciones, que fueron caracterizadas evaluando las variables dependientes: carbohidratos totales, proteínas, ácido galacturónico, inulina, polifenoles totales y rendimiento.

Los resultados de la caracterización de las fracciones aisladas se pueden observar en las Tablas IV.4 y IV.5. En general, el contenido de proteínas, inulina, polifenoles y el rendimiento fueron mayores en las fracciones obtenidas a partir de tallo.

El contenido de ácido galacturónico y, en algunos casos, el contenido de carbohidratos fueron mayores para las fracciones obtenidas a partir de brácteas.

Con respecto a las fracciones aisladas de brácteas, puede observarse que:

a- El contenido de carbohidratos totales tiende a aumentar para algunos tratamientos, cuando la hemicelulasa está presente en concentraciones entre 100-200 mg.

b- Proteínas y polifenoles tienden a disminuir cuando la hemicelulasa o ambas enzimas están presentes.

Con respecto a las fracciones aisladas de tallo, puede observarse que:

a- El contenido de carbohidratos totales tiende a aumentar para algunos tratamientos, cuando la hemicelulasa está presente en concentraciones entre 100-200 mg.

b- Para las mayores concentraciones de enzimas (2,3 y 4) el contenido de polifenoles tiende a disminuir.

c- El rendimiento aumenta con la presencia de enzima.

Tabla IV.4. Composición de las fracciones aisladas de brácteas de AIR-C.

Sistema	Tratamiento (proteasa/hemicelulasa) ¹	Carbohidratos totales (g/100g) ²	Proteínas (g/100g)	Ácido galacturónico (g/100g)	Inulina (g/100g)	Polifenoles (g/100g GAE) ³	Rendimiento (g/100gAIR)
CB1	(0/0)	75,0±1,2 A a	3,6±0,1 C fg	38,2±1,2 A ab	12,3±0,1 A b	0,9±0,1 A de	3,76
CB2	(200/0)	75,1±1,5 A a	3,8±0,2 C g	38,5±3,0 A ab	12,8±0,4 A bc	0,9±0,1 A de	4,60
CB3	(0/200)	102,4±8,2 B d	2,7±0,1 B cd	29,8±3,1 B a	13,0±1,0 A bcd	0,7±0,1 B ab	4,17
CB4	(200/200)	93,0±2,8 B cd	2,1±0,1 A abc	42,2±3,9 A b	14,7±0,2 B d	0,7±0,1 B ab	2,69
CB5	(170/100)	76,1±2,4 a	1,6±0,1 a	34,7±2,4 ab	12,3±0,3 b	0,6±0,1 a	2,82
CB6	(30/100)	99,5±3,5 cd	2,6±0,4 cd	33,8±4,7 ab	14,3±0,1 cd	0,9±0,1 de	4,38
CB7	(100/170)	82,0±1,0 ab	1,9±0,6 ab	34,3±6,9 ab	9,6±0,2 a	0,8±0,1 bcd	3,54
CB8	(100/30)	75,8±0,6 a	2,4±0,1 bcd	37,6±1,7 ab	12,7±0,1 bc	0,7±0,1 ab	7,75
CB9	(100/100)	96,4±4,9 cd	2,8±0,0 de	44,0±4,0 b	14,2±2,1 cd	0,8±0,1 bcd	4,40
CB10	(100/100)	90,2±1,1 bc	3,2±0,0 ef	33,6±3,7 ab	14,1±0,6 cd	0,9±0,1 de	3,66
CB11	(100/100)	76,0±1,5 a	2,5±0,2 cd	30,0±4,0 a	11,6±0,2 b	0,9±0,2 de	2,89

¹ La concentración de proteasa se expresó en µL/5 g AIR. La concentración de hemicelulasa se expresó en mg/ 5g AIR.

² Calculado en relación a la curva de calibración de fructosa.

³ GAE: equivalentes de ácido gálico.

Para los sistemas 1-4, dentro de cada columna, distintas letras mayúsculas indican diferencias significativas (p<0,05).

Para los sistemas 1-11, dentro de cada columna, distintas letras minúsculas, indican diferencias significativas.

Tabla IV.5. Composición de las fracciones aisladas de tallo de AIR-C.

Sistema	Tratamiento (proteasa/hemicelulasa) ¹	Carbohidratos totales (g/100g) ²	Proteínas (g/100g)	Ácido galacturónico (g/100g)	Inulina (g/100g)	Polifenoles (g/100g GAE) ³	Rendimiento (g/100gAIR)
CS1	(0/0)	72,6±3,6 A ab	4,3±0,4 B d	21,3±0,8 A a	14,6±2,3 A ab	1,1±0,1 C d	5,09
CS2	(200/0)	73,8±4,3 A abc	4,2±0,2 B cd	18,7±1,5 A a	25,6±3,3 B e	0,9±0,1 B bc	8,55
CS3	(0/200)	87,0±0,4 B e	3,1±0,1 A a	17,6±2,4 A a	11,4±0,1 A a	0,8±0,1 AB ab	6,94
CS4	(200/200)	82,0±5,0 B bcde	3,9±0,2 AB abcd	18,1±1,7 A a	14,9±1,3 A abc	0,7±0,1 A a	6,99
CS5	(170/100)	77,3±0,8 abcde	4,1±0,1 bcd	17,7±0,5 a	15,1±0,2 abc	1,0±0,1 cd	7,43
CS6	(30/100)	83,9±6,3 cde	3,7±0,5 abcd	19,7±1,3 a	21,3±1,4 d	0,9±0,2 bc	7,64
CS7	(100/170)	84,5±5,8 de	3,9±0,1 abcd	14,2±3,3 a	14,1±1,9 ab	1,1±0,1 d	10,79
CS8	(100/30)	70,1±1,7 a	3,6±0,2 abc	17,6±1,6 a	19,2±0,2 cd	1,1±0,1 d	6,49
CS9	(100/100)	75,6±0,5 abcd	3,9±0,1 abcd	21,2±0,7 a	14,9±4,9 abc	1,1±0,1 d	7,56
CS10	(100/100)	75,2±1,8 abcd	3,5±0,1 ab	20,5±1,6 a	15,6±0,5 abc	1,2±0,1 d	5,98
CS11	(100/100)	78,5±2,1 abcde	4,1±0,1 bcd	37,1±12,5 b	17,1±0,6 bcd	1,5±0,2 e	6,61

¹ La concentración de proteasa se expresó en $\mu\text{L}/5\text{ g AIR}$. La concentración de hemicelulasa se expresó en $\text{mg}/5\text{ g AIR}$.

² Calculado en relación a la curva de calibración de fructosa.

³ GAE: equivalentes de ácido gálico.

Para los sistemas 1-4, dentro de cada columna, distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Para los sistemas 1-11, dentro de cada columna, distintas letras minúsculas, indican diferencias significativas.

La hemicelulasa (H) es un grupo de enzimas que degrada la pared celular que incluye xilanasas, manasas y arabinasas, las cuales pueden remover sustituyentes de hemicelulosa y además, uniones débiles de hemicelulosa-celulosa; la utilizada en esta investigación tiene actividad celulasa lateral de acuerdo a los proveedores. La proteasa (P) puede degradar extensina, rica en hidroxiprolina y presente en la pared celular, lo que contribuye al debilitamiento de la pared celular. En consecuencia, las enzimas utilizadas pueden alterar de manera diversa la pared celular, determinando características diferentes en las fracciones obtenidas.

Fissore y col. (2014) utilizaron 10 g de CWM de tallo y brácteas de alcaucil y a través del tratamiento con 250 mg de hemicelulasa a pH 5,2 (30°C, 20 h), concluyeron que el uso de la hemicelulasa produjo el aumento del rendimiento y del contenido de polifenoles pero disminuyó el contenido de inulina, para ambos tejidos, respecto al tratamiento sólo con buffer citrato a pH 5,2. Las fracciones obtenidas a partir del AIR-C de alcaucil en la presente investigación fueron comparadas con las obtenidas por Fissore y col. (2014) a partir del CWM de alcaucil y se observó que para AIR-C, las fracciones tenían menos contenido de proteínas, menos inulina y más ácido galacturónico. Además la preparación del AIR-C permitió la concentración de los carbohidratos, eliminando los azúcares pequeños y otros componentes solubles en alcohol. Sin embargo, es posible que cierto contenido de proteínas e inulina se haya perdido durante el tratamiento con etanol en el proceso de obtención del AIR-C, determinando las diferencias observadas en estos compuestos.

IV.3.1. Análisis de regresión del diseño experimental para las fracciones aisladas de AIR-C

El análisis de regresión de los resultados obtenidos mostró que, para las fracciones aisladas a partir de brácteas, no se encontraron efectos significativos de la concentración

de proteasa y/o hemicelulasa en relación al contenido de ácido galacturónico, inulina, polifenoles totales y rendimiento. Con respecto al contenido de carbohidratos el efecto fue positivo pero poco significativo (p: 0,0314) con la concentración de hemicelulasa (H), siendo el modelo polinomial: $Y = 85,591 + 9,968 H$; además, el R^2 del modelo fue bajo (0,419). En relación al contenido de proteínas, el efecto de la concentración de hemicelulasa fue negativo y ligeramente significativo (p: 0,0412), con un bajo R^2 (0,386) y con el siguiente modelo polinomial:

$$Y = 2,65 - 0,5863 H.$$

Para las fracciones aisladas de tallo, no se detectaron efectos significativos de las enzimas en el contenido de proteínas y ácido galacturónico o en el rendimiento. Para el contenido de carbohidratos se encontró un efecto positivo y significativo de la hemicelulasa ($p < 0,001$; R^2 : 0,722) y el modelo polinomial observado fue: $Y = 78,2273 + 6,5622 H$. El contenido de inulina mostró un efecto negativo y levemente significativo de la concentración de hemicelulasa con un modelo polinomial: $Y = 16,6891 - 3,5215 H$ (p: 0,0382), con un bajo R^2 (0,396). El contenido de polifenoles, mostró un efecto negativo con el uso de proteasa (P); la asociación se produjo a través del término cuadrático (p: 0,0476 y R^2 : 0,533) y el modelo polinomial fue: $Y = 11,9468 - 0,6693 P - 3,2018 P^2$.

IV.3.2. Correlación de Pearson para las fracciones aisladas a partir de AIR-C

La correlación entre los datos fue analizada a través de los coeficientes de Pearson (Rodgers y Nicewander, 1988) para brácteas y tallo (Tabla IV.6 y IV.7). Los coeficientes de correlación de los momentos de los productos de Pearson (PPMCC) toman valores entre -1 (dependencia negativa) y +1 (dependencia positiva) y miden la fuerza de la relación lineal entre las variables evaluadas.

Tabla IV.6. Coeficientes de la correlación de Pearson para el rendimiento, la composición de las fracciones y las enzimas ensayadas para las fracciones aisladas a partir de AIR-C brácteas.

	Ácido galacturónico	Carbohidratos	Hemicelulosa	Inulina	Polifenoles	Proteínas	Proteasa	Rendimiento
Ácido galacturónico		-0,1521 (10) [0,6750]	-0,2454 (10) [0,4945]	0,3338 (10) [0,3459]	0,0872 (10) [0,8106]	0,1181 (10) [0,7453]	0,4569 (10) [0,1844]	0,0423 (10) [0,9075]
Carbohidratos	-0,1521 (10) [0,6750]		0,6766 (10) [0,0317]	0,5513 (10) [0,0985]	-0,1213 (10) [0,7385]	-0,1014 (10) [0,7804]	-0,3500 (10) [0,3214]	-0,2020 (10) [0,5758]
Hemicelulosa	-0,2454 (10) [0,4945]	0,6766 (10) [0,0317]		0,0514 (10) [0,8878]	-0,5875 (10) [0,0741]	-0,6233 (10) [0,0542]	0,0000 (10) [1,0000]	-0,4705 (10) [0,1699]
Inulina	0,3338 (10) [0,3459]	0,5513 (10) [0,0985]	0,0514 (10) [0,8878]		0,0471 (10) [0,8972]	0,2241 (10) [0,5337]	0,0806 (10) [0,8247]	-0,0139 (10) [0,9695]
Polifenoles	0,0872 (10) [0,8106]	-0,1213 (10) [0,7385]	-0,5875 (10) [0,0741]	0,0471 (10) [0,8972]		0,8584 (10) [0,0015]	-0,2276 (10) [0,5271]	0,1327 (10) [0,7147]
Proteínas	0,1181 (10) [0,7453]	-0,1014 (10) [0,7804]	-0,6233 (10) [0,0542]	0,2241 (10) [0,5337]	0,8584 (10) [0,0015]		-0,2224 (10) [0,5368]	0,1854 (10) [0,6081]
Proteasa	0,4569 (10) [0,1844]	-0,3500 (10) [0,3214]	0,0000 (10) [1,0000]	0,0806 (10) [0,8247]	-0,2276 (10) [0,5271]	-0,2224 (10) [0,5368]		-0,1833 (10) [0,6123]
Rendimiento	0,0423 (10) [0,9075]	-0,2020 (10) [0,5758]	-0,4705 (10) [0,1699]	-0,0139 (10) [0,9695]	0,1327 (10) [0,7147]	0,1854 (10) [0,6081]	-0,1833 (10) [0,6123]	

Entre corchetes, el p-valor correspondiente a la significación estadística de la correlaciones.

Entre paréntesis, los pares de datos usados para calcular cada coeficiente.

En las Tablas IV.6 y IV.7 se informan los PPMCC y los p valores para las fracciones aisladas de AIR-C de brácteas y tallos, respectivamente. Cuando se evaluó cada par de variables, se observó que para brácteas (pares de datos usados: 10), carbohidratos-hemicelulosa (PPMCC: 0,6766; p: 0,0317) y polifenoles-proteínas (PPMCC: 0,8584; p: 0,0015), las correlaciones fueron fueron significativas ($p < 0,05$) y positivas. Para tallos (pares de datos usados: 9), carbohidratos-hemicelulosa (PPMCC: 0,8308; p: 0,0055), proteínas-proteasa (PPMCC: 0,8110; p: 0,0080) e inulina-hemicelulosa (PPMCC: 0,8167; p: 0,0072) tuvieron correlación significativa ($p < 0,05$) y el coeficiente fue negativo para el último par. Estos resultados muestran que la hemicelulosa se relaciona

linealmente con el contenido de carbohidratos en las fracciones y que la proteasa se relaciona con el contenido de proteínas.

Tabla IV.7. Coeficiente de la correlación de Pearson para el rendimiento, la composición de las fracciones y las enzimas ensayadas para las fracciones aisladas a partir de AIR-C tallo.

	Proteasa	Hemicelulosa	Carbohidratos	Proteínas	Ácido galacturónico	Inulina	Polifenoles	Rendimiento
Proteasa		-0,2872 (9) [0,4537]	-0,4598 (9) [0,2130]	0,8110 (9) [0,0080]	-0,0498 (9) [0,8988]	0,3221 (9) [0,3979]	-0,1690 (9) [0,6639]	0,1096 (9) [0,7789]
Hemicelulosa	-0,2872 (9) [0,4537]		0,8308 (9) [0,0055]	-0,4055 (9) [0,2789]	-0,3352 (9) [0,3779]	-0,8167 (9) [0,0072]	-0,3483 (9) [0,3583]	0,1016 (9) [0,7949]
Carbohidratos	-0,4598 (9) [0,2130]	0,8308 (9) [0,0055]		-0,3453 (9) [0,3628]	-0,3762 (9) [0,3183]	-0,4738 (9) [0,1976]	-0,4753 (9) [0,1960]	0,3444 (9) [0,3641]
Proteínas	0,8110 (9) [0,0080]	-0,4055 (9) [0,2789]	-0,3453 (9) [0,3628]		-0,0551 (9) [0,8880]	0,4767 (9) [0,1945]	0,0275 (9) [0,9440]	0,4639 (9) [0,2084]
Ácido galacturónico	-0,0498 (9) [0,8988]	-0,3352 (9) [0,3779]	-0,3762 (9) [0,3183]	-0,0551 (9) [0,8880]		0,2317 (9) [0,5485]	0,0803 (9) [0,8374]	-0,6497 (9) [0,0582]
Inulina	0,3221 (9) [0,3979]	-0,8167 (9) [0,0072]	-0,4738 (9) [0,1976]	0,4767 (9) [0,1945]	0,2317 (9) [0,5485]		-0,1032 (9) [0,7916]	0,0873 (9) [0,8233]
Polifenoles	-0,1690 (9) [0,6639]	-0,3483 (9) [0,3583]	-0,4753 (9) [0,1960]	0,0275 (9) [0,9440]	0,0803 (9) [0,8374]	-0,1032 (9) [0,7916]		0,0764 (9) [0,8451]
Rendimiento	0,1096 (9) [0,7789]	0,1016 (9) [0,7949]	0,3444 (9) [0,3641]	0,4639 (9) [0,2084]	-0,6497 (9) [0,0582]	0,0873 (9) [0,8233]	0,0764 (9) [0,8451]	

Entre corchetes, el p-valor correspondiente a la significación estadística de la correlaciones.

Entre paréntesis, los pares de datos usados para calcular cada coeficiente.

Se observó una relación lineal entre el contenido de polifenoles y de proteínas, un hecho que puede atribuirse a las interacciones proteína-polifenol que fueron previamente reportadas (Haslam, 1974; Siebert y col., 1996; Papadopoulou y Frazier, 2004) y que pueden ser las responsables por sus extracciones conjuntas.

IV.3.3. Análisis de las fracciones aisladas a través de los tratamientos 1-4 y estudio de los efectos de un paso de pre-calentamiento sobre el rendimiento y composición

De acuerdo a los resultados informados previamente, obtenidos a partir del diseño experimental, se eligieron las cuatro condiciones que se consideraron más favorables para continuar con la optimización del aislamiento de fracciones ricas en fibra dietaria a partir de tallo y brácteas de alcaucil. Por ello, se seleccionaron los tratamientos 1-4 en los cuales se observaron los efectos más marcados, para estudiar la influencia de una etapa de calentamiento, previo al tratamiento con enzimas. El objetivo de este pretratamiento fue el incrementar el rendimiento (Ruiz-Cano y col., 2014; Fissore y col., 2014) y la cantidad de inulina presente en las fracciones ya que la misma incrementa su solubilidad al aumentar la temperatura (Bot y col., 2004).

En las Tablas IV.8 y IV.9 se informa la composición de las fracciones enriquecidas en fibra dietaria aisladas a partir de AIR-C de brácteas y de tallo de alcaucil con un precalentamiento y posterior tratamiento enzimático. Los datos informados fueron analizados a través de un ANOVA para evaluar los efectos de los diferentes tratamientos enzimáticos y se realizó un test *a posteriori* de Tukey todo ello para evaluar los sistemas que presentaron diferencias en las características químicas.

Se pudo observar que el uso de enzimas produjo cambios significativos en la composición química (carbohidratos, proteínas, ácido galacturónico, inulina, polifenoles) de las fracciones aisladas de ambos tejidos luego de un tratamiento térmico. El mismo análisis se realizó a las fracciones obtenidas sin un pretratamiento con calor cuyos datos fueron reportados en las Tablas IV.4 y IV.5 (tratamientos del 1-4) y los resultados son informados en la Tabla IV.10. Se pudo observar que el uso de enzimas produce cambios significativos en la composición química (carbohidratos totales, proteínas, ácido galacturónico, inulina, polifenoles) para todas las fracciones evaluadas excepto para tallo, para el cual el contenido de ácido galacturónico no fue significativamente ($p > 0,05$) afectado por el tratamiento enzimático.

Tabla IV.8. Composición de las fracciones aisladas enzimáticamente a partir de AIR-C de brácteas previo paso de pre-calentamiento.

Sistema (P/H)	Carbohidratos totales (g/100g) ¹	Proteínas (g/100g)	GalA (g/100g)	Inulina (g/100g)	ANP (%) ²	ANP/ GalA	GM (%) ³	Polifenoles (g/100g GAE) ⁴	Rendimiento (g/100g AIR)
1 (0/0)	88,0±0,6 A	1,6±0,0 BC	26,1±1,3 A	47,0±0,2 A	14,9	0,7	49	0,21±0,01 B	10,92
2 (200/0)	88,3±4,1 A	1,1±0,0 A	19,8±0,7 B	23,3±0,0 B	45,2	2,6	47	0,19±0,02 AB	13,25
3 (0/200)	107,0±2,7 B	1,4±0,0 B	19,9±0,2 B	22,4±0,9 B	64,7	3,8	47	0,17±0,01 A	12,07
4 (200/200)	90,3±1,5 A	1,7±0,2 C	18,9±0,9 B	30,7±0,2 C	40,7	2,5	53	0,25±0,01 C	13,38
Tabla de ANOVA									
F	37,49	24,89	44,31	1863				19,01	
P	<0,0001 ***	0,0002***	<0,0001 ***	<0,0001 ***				0,0005***	
R ²	0,9336	0,9032	0,9432	0,9986				0,8770	

En cada columna, letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05).

¹Calculado en relación a la curva de calibración de fructosa

²Azúcar Neutro de la Pectina (ANP) calculado por diferencia entre carbohidratos totales, celulosa, galA e inulina.

³GM calculado como un porcentaje entre la relación de moles de metanol y moles de GalA cada 100 g de muestra.

⁴GAE: equivalentes de ácido gálico.

Tabla IV.9. Composición de las fracciones aisladas enzimáticamente a partir de AIR-C de tallo previo paso de pre-calentamiento.

Sistema (P/H)	Carbohidratos totales (g/100g) ¹	Proteínas (g/100g)	GalA (g/100g)	Inulina (g/100g)	ANP (%) ²	ANP/GalA	GM (%) ³	Polifenoles (g/100g GAE) ⁴	Rendimiento (g/100g AIR)
1(0/0)	84,3±0,9 A	1,7±0,1 A	19,9±0,2 A	39,5±0,5 C	24,9	1,4	35	0,20±0,07 A	22,70
2 (200/0)	88,9±0,2 B	2,1±0,1 B	22,8±0,2 B	40,7±0,5 D	25,4	1,3	46	0,31±0,01 AB	19,30
3(0/200)	94,0±0,7 C	1,5±0,1 A	18,3±0,1 C	30,3±0,1 B	45,4	2,9	47	0,30±0,01 AB	22,66
4 (200/200)	96,3±1,9 C	2,2±0,1 B	13,7±0,4 D	28,5±0,7 A	54,1	4,6	41	0,32±0,04 B	21,47
Tabla de ANOVA									
F	69,76	32,75	691,3	482,4				4,700	
P	<0,0001 ***	<0,0001 ***	<0,0001 ***	<0,0001 ***				0,0356*	
R ²	0,9632	0,9247	0,9962	0,9945				0,6380	

En cada columna, letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05).

¹Calculado en relación a la curva de calibración de fructosa

²Azúcar Neutro de la Pectina (ANP) calculado por diferencia entre carbohidratos totales, celulosa, galA e inulina.

³GM calculado como un porcentaje entre la relación de moles de metanol y moles de GalA cada 100 g de muestra.

⁴GAE: equivalentes de ácido gálico.

Tabla IV.10. ANOVA de una vía para la evaluación del efecto del tratamiento enzimático del AIR-C de brácteas y tallo de alcaucil en la composición de las fracciones aisladas (tratamientos 1-4 de las Tablas IV.4 y IV.5).

	Tratamiento (P/H)	Carbohidratos Totales	Proteínas	Ácido galacturónico	Inulina	Polifenoles totales
BRÁCTEAS ANOVA						
F		28,30	106,6	9,546	11,11	23,55
P		0,0001***	<0,0001***	0,0051**	0,0032*	0,0003***
R ²		0,9139	0,9756	0,7816	0,8064	0,8983
TALLO ANOVA						
F		9,957	14,20	2,856	26,19	74,97
P		0,0045**	0,0014**	0,1046	0,0002*	<0,0001***
R ²		0,7887	0,8419	0,5172	0,9076	0,9657

p< 0, 01; *p< 0,001.

La comparación estadística de los resultados de las Tablas IV.4 y IV.8 y de las Tabla IV.5 y IV.9 permitió concluir que la inclusión de una etapa de pre-tratamiento térmico incrementa el rendimiento y el contenido de inulina en las fracciones aisladas de brácteas y tallo y disminuye los contenidos de proteínas, polifenoles y ácido galacturónico en brácteas. Se sabe que a temperaturas por debajo de 50°C, parte de la inulina no se disuelve completamente (Bot y col., 2004). La aplicación de un pretratamiento a 70°C entonces, ayuda a incrementar la solubilidad de la inulina y su concentración en el extracto, a partir del cual las fracciones son insolubilizadas por medio de etanol.

De acuerdo a Lutz y col. (2011), el contenido total de polifenoles de diferentes verduras cocidas varía en función del tratamiento aplicado. Ellos se podrían reducir hasta un 50% debido a la ruptura de los antioxidantes y su liberación al agua puede aumentar debido a una mayor accesibilidad o puede permanecer sin cambios. Ruiz-Cano y col. (2014) estudiaron el efecto del tratamiento térmico sobre la composición de seis subproductos de alcaucil y observaron que el tratamiento térmico tuvo un efecto negativo sobre el

contenido de proteínas, probablemente debido a la pérdida de proteínas solubles; además, el contenido fenólico total varió ampliamente en función del tratamiento térmico. Williams y col. (2013) mostraron que los niveles de fenoles y otros compuestos bioactivos disminuyeron cuando algunos vegetales se trataron térmicamente.

En relación a la evaluación de los efectos del calor y del tratamiento enzimático, un ANOVA de dos vías (Tabla IV.11) mostró que la aplicación de calor no tiene el mismo efecto para todos los tratamientos enzimáticos, revelando la existencia de interacciones entre ambos tratamientos excepto para el contenido de carbohidratos totales en tallo ($p > 0,05$).

Tabla IV.11. ANOVA de dos vías para el análisis del efecto de la aplicación del tratamiento enzimático y del tratamiento por calor en la composición de las fracciones aisladas a partir de AIR-C de brácteas y tallos de alcaucil.

	Fuente de variación	Hidratos de carbono totales	Proteínas	GalA	Inulina	Polifenoles Totales
TALLO	Pre-tratamiento calor	<0,0001	<0,0001	0,6166	<0,0001	<0,0001
	Tratamiento Enzima	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	Interacción	0,0885	0,0020	0,0002	<0,0001	<0,0001
BRACTEAS	Pre-tratamiento calor	0,0002	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	Tratamiento Enzima	<0,0001	<0,0001	0,0002	<0,0001	<0,0001
	Interacción	0,0041	<0,0001	0,0002	<0,0001	<0,0001

Se informan los nivel de significatividad. Test *a posteriori* de Tuckey, α : 0,05.

Es de destacar que a las fracciones informadas en la Tablas IV.8 y IV.9 se les determinó el grado de metilación observándose los siguientes valores:

-Fracciones obtenidas con pre-tratamiento térmico y enzimático y a partir de AIR-C de brácteas: 49%, 49%, 47% y 53% para CB1, CB2, CB3 y CB4, respectivamente.

-Fracciones obtenidas con pre-tratamiento térmico y enzimático y a partir de AIR-C de tallos: 36%, 46%, 47% y 41% para CS1, CS2, CS3 y CS4, respectivamente.

Se observa que todas estas fracciones presentan, en general, bajo grado de metilación salvo la fracción CB4 la cual presenta un valor de 53% ligeramente por encima del valor límite entre el bajo y el alto grado de metilación (50%).

Se puede concluir entonces que el tratamiento térmico acoplado al enzimático genera fracciones ricas en inulina y pectina de bajo grado de metilación.

IV.4. Caracterización del color para el AIR-C de tallo y brácteas de alcaucil y para las fracciones obtenidas a partir de ellos previo paso de precalentamiento

Los parámetros L^* , a^* y b^* fueron evaluados para el AIR-C de tallos y brácteas y para las fracciones obtenidas a partir de ellos. Además, el parámetro ΔE^* fue calculado en cada caso.

Se puede observar que los AIRs, tanto de brácteas como de tallo, son los polvos más oscuros (menos luminosos). Esta tendencia puede estar asociada a que los pigmentos presentes en el alcaucil se pierden (destrucción, difusión) en el proceso posterior de obtención de fracciones enriquecidas en fibras solubles de pectina e inulina.

Las fracciones más luminosas para ambos tejidos fueron las obtenidas por tratamientos sin enzimas y cuando se usó solo hemicelulasa. De acuerdo a los parámetros a^* y b^* , las fracciones tienen baja coloración rojiza y amarillenta. Cuando se analizó el coeficiente ΔE^* el tratamiento 2 fue el que produjo mayor variaciones en tallo y el tratamiento 4 dió resultados similares en ambos tejidos.

La importancia en la determinación del color se encuentra asociada al efecto que va a ejercer la fracción en los alimentos al que se integre y, por lo tanto, a su incidencia en la aceptación por parte del consumidor.

Tabla IV.12. Parámetros de color evaluados para el AIR-C de tallos y brácteas y para las fracciones obtenidas a partir de ellos previo paso de precalentamiento.

Tratamiento	L*	a*	b*	ΔE^*
AIR-C tallo	49,28 ± 0,18	4,25 ± 0,01	20,60 ± 0,08	
CS1	69,64 ± 0,01 A	3,09 ± 0,04 A	15,98 ± 0,06 A	N/A
CS2	61,43 ± 0,05 B	4,01 ± 0,04 B	17,40 ± 0,08 A	8,38
CS3	68,97 ± 0,00 C	3,26 ± 0,04 C	17,03 ± 0,02 B	1,26
CS4	64,21 ± 0,45 D	3,57 ± 0,04 D	16,51 ± 0,01 B	5,48
AIR-C brácteas	52,25 ± 0,11	3,33 ± 0,03	19,67 ± 0,01	
CB1	65,65 ± 0,16 A	3,04 ± 0,12 AB	16,11 ± 0,34 A	N/A
CB2	63,82 ± 1,01 B	2,87 ± 0,06 A	14,99 ± 0,14 B	2,15
CB3	67,77 ± 0,05 C	3,07 ± 0,01 B	15,20 ± 0,01 B	2,31
CB4	59,97 ± 0,45 D	3,35 ± 0,07 C	14,72 ± 0,11 B	5,86

Se informa el valor medio y el desvío estándar.

"L": luminosidad, siendo 0: negro y 100: blanco,

"a" (+): rojo (-): verde

"b" (+): amarillo (-): azules

Diferentes letras indican diferencias significativas (p<0,05).

IV.5. Identificación de polifenoles en las fracciones aisladas a partir de AIR-C, previo paso de precalentamiento

De acuerdo a Bravo y col. (2007), el contenido de fenólicos está directamente relacionado con la capacidad antioxidante, la cual aporta una característica importante a las fracciones obtenidas a partir del residuo de alcaucil, desde el punto de vista nutricional.

El estudio de los compuestos fenólicos presentes en las diferentes fracciones aisladas enzimáticamente a partir de brácteas y tallo de alcaucil con un paso de pre-tratamiento térmico, fue realizado a través de HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS operado en modo de ionización negativa. Para la identificación, se utilizó el espectro UV y los datos de

espectrometría de masa (MS), junto con la interpretación del espectro MS observado, en comparación con los espectros de literatura.

La Figura IV.1 muestra los cromatogramas del HPLC-DAD de las fracciones obtenidas. Como puede observarse en las Tablas IV.13 y IV.14, algunos picos no pudieron ser identificados. En todas las fracciones se identificó un compuesto con una relación masa/carga (m/z) de 353,09, en concordancia con una fórmula molecular $C_{16}H_{17}O_9$ correspondiente al compuesto ácido monocateoilquínico.

Otro compuesto con un ion m/z de 515,12 (fórmula molecular: $C_{25}H_{23}O_{12}$), el cual corresponde al ácido dicafeoilquínico, se observó en la fracción CB3 (Abu-Reidah y col., 2013). Éstos derivados hidroxicinámicos han sido reportados previamente por Schütz y col. (2004) quienes encontraron que el ácido monocateoilquínico fue el compuesto más abundante en un total de 13 preparaciones comerciales de *Cynara scolymus* (seis medicinales, un jugo fresco y siete suplementos dietarios). Pandino y col. (2010, 2011a, 2011b) también observaron que cultivos de alcaucil *Tondo di Paestum* y *Violetto di Sicilia* tuvieron un alto contenido de ácidos cafeoilquínicos y que, independientemente del cultivo, los polifenoles se encontraban acumulados en partes específicas de la planta y ello estaría relacionado a su rol en el tejido vegetal. En particular, el tallo floral fue la mejor fuente de ácidos cafeoilquínicos, principalmente ácido clorogénico (ácido 5-O- cafeoilquínico) y ácido 1,5-di-O-cafeoilquínico.

Al considerar a los lignanos, a 17,6 min, se detectó un pico en todas las fracciones con excepción de la CS2, que dió lugar a tres fragmentos derivados de pinoresinol y no completamente separados. Se detectó un fragmento m/z de 357,13 correspondiente a la fórmula molecular $C_{26}H_{31}O_{11}$ y $C_{28}H_{33}O_{12}$ y los fragmentos de m/z 151,04 y 136,02, correspondientes a la fórmula molecular $C_{20}H_{21}O_6$. De acuerdo a During y col. (2012), los lignanos en las plantas pueden ser absorbidos y metabolizados en el intestino

delgado y el pinoresinol tiene una fuerte acción anti-inflamatoria sobre las células Caco-2 del intestino humano, posiblemente en relación a su estructura de furfurano y/o su metabolismo intestinal.

Con respecto a los derivados de las flavonas, un glucurónido de apigenina fue detectado en todas las fracciones a través de los patrones de fragmentación observados en el espectro MS, el cual muestra un fragmento a un m/z 269,0462 que corresponde a la fórmula molecular $C_{21}H_{17}O_{11}$ (Asen y col., 1974). Lombardo y col. (2010) estudiaron las diferentes variedades de alcaucil y reportaron que los receptáculos son una interesante fuente de derivados de apigenina, principalmente apigenina-7-O-glucurónido y que las brácteas internas son las partes más ricas en apigenina total entre todas las partes de la planta analizadas. Navarro Núñez y col. (2008) notaron que el flavonoide apigenina mejora la eficacia de la aspirina en la inhibición de la agregación plaquetaria.

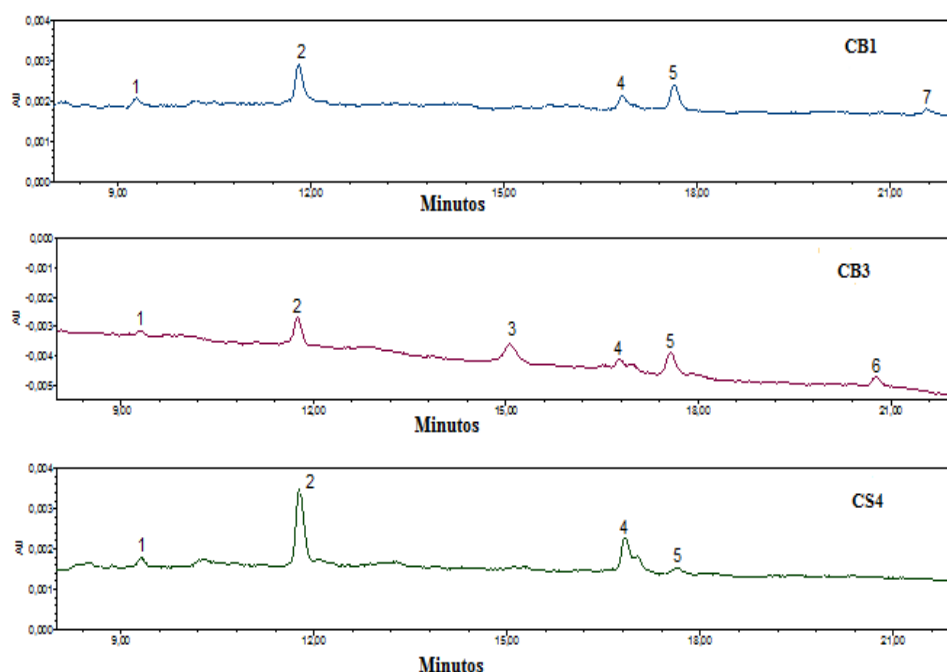


Figura IV.1. Cromatogramas HPLC-DAD de las fracciones aisladas a partir de *Cynara cardunculus* previo paso de pre-calentamiento. Pico 1: Desconocido; 2: Ácido monocateoilquínico; 3: Ácido dicafeoilquínico; 4: Apigenina-7-O-glucuronido; 5: Pinoresinol; 6: Desconocido; 7: Desconocido.

Tabla IV.13. Identificación de polifenólicos en fracciones aisladas enzimáticamente a partir de AIR-C de brácteas obtenidas a partir de *Cynara cardunculus* previo paso de pre-calentamiento.

Brácteas	Número de compuesto	Identidad asignada	Tiempo de retención (min)	Fórmula	Masa Molecular (g.mol ⁻¹)
CB1	1	Desconocido	9,3	-	-
	2	Ácido monocateoilquínico	11,8	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353,09
	4	Apigenina 7-glucurónido I	16,8	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₁	445,08
	5	Pinoresinol 4-O-β-D-glucósido	17,6	C ₂₆ H ₃₁ O ₁₁	519,19
		Pinoresinol-acetilhexosido		C ₂₈ H ₃₃ O ₁₂	561,20
		(+)-Pinoresinol		C ₂₀ H ₂₁ O ₆	357,13
	7	Desconocido	21,6	-	-
CB2	1	Desconocido	9,3	-	-
	2	Ácido monocateoilquínico	11,8	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353,09
	4	Apigenina 7-glucurónido I	16,8	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₁	445,08
	5	Pinoresinol 4-O-β-D-glucósido	17,6	C ₂₆ H ₃₁ O ₁₁	519,19
		Pinoresinol-acetilhexosido		C ₂₈ H ₃₃ O ₁₂	561,20
		(+)-Pinoresinol		C ₂₀ H ₂₁ O ₆	357,13
CB3	1	Desconocido	9,3	-	-
	2	Ácido monocateoilquínico	11,8	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353,09
	3	Ácido Dicateoilquínico	15,0	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂	515,12
	4	Apigenina 7-glucuronido I	16,8	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₁	445,08
	5	Pinoresinol 4-O-β-D-glucósido	17,6	C ₂₆ H ₃₁ O ₁₁	519,19
		Pinoresinol-acetilhexosido		C ₂₈ H ₃₃ O ₁₂	561,20
		(+)-Pinoresinol		C ₂₀ H ₂₁ O ₆	357,13
6	Desconocido	20,8	-	-	
CB4	1	Desconocido	9,3	-	-
	2	Ácido monocateoilquínico	11,8	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353,09
	4	Apigenina 7-glucurónido I	16,8	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₁	445,08
	5	Pinoresinol 4-O-β-D-glucósido	17,6	C ₂₆ H ₃₁ O ₁₁	519,19
		Pinoresinol-acetilhexosido		C ₂₈ H ₃₃ O ₁₂	561,20
	(+)-Pinoresinol		C ₂₀ H ₂₁ O ₆	357,13	

Tabla IV.14. Identificación de polifenólicos en fracciones aisladas enzimáticamente a partir de AIR-C de tallo obtenidas a partir de *Cynara cardunculus* previo paso de precalentamiento.

Tallo	Número de compuesto	Identidad asignada	Tiempo de retención (min)	Fórmula	Masa Molecular (g.mol ⁻¹)
CS1	2	Ácido monocateoilquínico	12,2	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353,09
	4	Apigenina 7-glucurónido I	16,8	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₁	445,08
	5	Pinoresinol 4-O-β-D-glucósido	17,5	C ₂₆ H ₃₁ O ₁₁	519,19
		Pinoresinol-acetilhexosido (+)-Pinoresinol		C ₂₈ H ₃₃ O ₁₂	561,20
				C ₂₀ H ₂₁ O ₆	357,13
CS2	2	Ácido monocateoilquínico	11,8	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353,09
	4	Apigenina 7-glucurónido I	16,8	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₁	445,08
CS3	2	Ácido monocateoilquínico	11,8	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353,09
	4	Apigenina 7-glucurónido I	16,8	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₁	445,08
	5	Pinoresinol 4-O-β-D-glucósido	17,6	C ₂₆ H ₃₁ O ₁₁	519,19
		Pinoresinol-acetilhexosido (+)-Pinoresinol		C ₂₈ H ₃₃ O ₁₂	561,20
				C ₂₀ H ₂₁ O ₆	357,13
CS4	1	Desconocido	9,3	-	-
	2	Ácido monocateoilquínico	11,8	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353,09
	4	Apigenina 7-glucurónido I	16,8	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₁	445,08
	5	Pinoresinol 4-O-β-D-glucósido	17,6	C ₂₆ H ₃₁ O ₁₁	519,19
		Pinoresinol-acetilhexosido (+)-Pinoresinol		C ₂₈ H ₃₃ O ₁₂	561,20
				C ₂₀ H ₂₁ O ₆	357,13

IV.6. Distribución de la masa molecular de las fracciones aisladas enzimáticamente a partir de AIR-C de tallo y brácteas, previo paso de pre-calentamiento

Una de las formas de evaluación de la modificación de los componentes en las fracciones estudiadas, involucra el análisis de la distribución de sus masas moleculares lo cual se desarrolló por medio de cromatografía de permeación en gel (GPC). Se sabe que los polímeros naturales son susceptibles a las altas temperaturas y a diferentes tipos de tratamiento utilizados para su extracción, dando como resultado que se puedan producir degradaciones de los mismos lo cual se refleja en el cambio de las propiedades

funcionales. Se puede decir que los compuestos de mayor masa molecular aparecen en estos análisis a tiempos de retención más bajos mientras que los compuestos de menor peso molecular, como los oligosacáridos producto de su degradación, presentan mayores tiempos de retención.

Los perfiles de elución para las fracciones aisladas de AIR de tallo y de brácteas, fueron similares. El promedio en peso de la masa molecular (M_w), el promedio en número de la masa molecular (M_n) y el índice de polidispersidad (M_w/M_n) fueron calculados y se los informa en la Tabla IV.15. En estas determinaciones, los compuestos mono- y disacáridos fueron excluidos. El índice de polidispersidad indica si un pico es homogéneo con respecto a la masa molar. Un polímero homogéneo (monodisperso) presentará un índice de polidispersidad igual a 1 y cuando la distribución de un polímero se ensancha, el índice de polidispersidad aumenta (Wang y Cui, 2005).

Los M_w s encontrados para las cuatro fracciones de brácteas se presentaron en el rango de 1.441-617.777 Daltons. Las fracciones CB1, CB2 y CB4 mostraron picos al tiempo 25,5 minutos equivalentes a 1.441- 1.579 Da. Las fracciones CB3 y CB4 mostraron un pico a los 24 min, equivalentes a 7.233- 7.642 Da, los cuales corresponden a polisacáridos de inulina de diferentes grados de polimerización (Azis y col., 1999; Panchev y col., 2011 y Mensink y col., 2015). Las fracciones CB1 y CB2 también mostraron picos a 14,0-14,8 min los cuales corresponden a masas moleculares de 315.544- 505.278 Da; la fracción CB3 mostró picos a los tiempos 17,6 y 19,9 min con masas moleculares de 617.777 y 71.876 Da, respectivamente. La fracción CB4 mostró un pico a los 18 min (~336000 Da) el cual se encuentra en el orden de los M_w s informados para las pectinas (MacDougall y Ring, 2004).

Con respecto a tallo, las fracciones CS1, CS2, CS3 y CS4 mostraron picos a los tiempos de retención de ~25,5 min los cuales reflejan la presencia de inulina con M_w s de ~

1.240-1.535 Da y las fracciones CS2 y CS4 mostraron un pico a los ~24,0 min (masa molecular: 5439-7119 Da). Como previamente se observó para las fracciones obtenidas a partir de brácteas, la inulina se presenta con diferentes grados de polimerización. La presencia de pectina con diferentes características estructurales fue detectada para las fracciones CS1 (tiempo de retención 15,1 min, M_w 747.178 Da), CS2 (tiempo de retención 15,2 min, M_w 456.759 Da), CS3 (tiempo de retención 13,0 min, M_w 1.258.382 Da) y CS4 (tiempo de retención 14,4, 17,2 y 20,1 min, M_w 1.108.130, 356.067 y 48.366 Da, respectivamente).

Las fracciones obtenidas para tallo presentaron las mayores masas moleculares encontradas lo cual indicaría la presencia de grandes moléculas agregadas que son incapaces de disociarse durante la permeación a través de la columna de gel (Cárdenas y col., 1997).

El índice de polidispersidad osciló, en general, entre 1,0 y 2,9, lo que significa que está en el intervalo de los polisacáridos naturales (Fissore y col., 2013) pero, en el caso de la fracción CB2, se obtuvo un rango de entre 1,1 y 4,3.

La fracción CS4 muestra mayor cantidad de picos en la región correspondiente a los polisacáridos de ácido galacturónico (tres picos) y polisacáridos de fructosa (dos picos). Lo mismo puede decirse con respecto a las fracciones de brácteas, en relación a CB3 (dos picos en la región de polisacáridos de GalA y uno en la región de polisacáridos de fructosa); CB4 y CS2 mostraron dos picos en la región de polisacáridos de fructosa.

Tabla IV.15. Masa molecular de las fracciones aisladas a partir de AIR-C de brácteas y tallo de alcauil.

Tratamiento	Mn (Da)	Mw (Da)	Mz (Da)	Polidispersidad	Tiempo de retención (min)
CS1	572.775	747.178	909.323	1,3	15,1
	1.448	1.489	1.526	1,0	25,5
CS2	157.683	456.759	817.122	2,9	15,2
	4.238	5.439	7.125	1,3	24,3
	1.116	1.240	1.323	1,1	25,7
CS3	1.245.052	1.258.382	1.271.014	1,0	13,0
	1.502	1.535	1.567	1,0	25,5
CS4	1.075.443	1.108.130	1.140.400	1,0	14,4
	292.046	356.067	426.037	1,2	17,2
	44.773	48.366	51.950	1,1	20,1
	5.821	7.119	8.611	1,2	23,8
	1.306	1.459	1.575	1,1	25,5
CB1	168.900	505.278	848.755	3,0	14,0
	1.319	1.441	1.541	1,1	25,6
CB2	74.007	315.544	714.061	4,3	14,8
	1.483	1.579	1.680	1,1	25,6
CB3	471.617	617.777	798.926	1,3	17,6
	43.496	71.876	110.712	1,6	19,9
	6.419	7.642	8.971	1,2	23,9
CB4	132.744	335.765	671.177	2,6	18,0
	5.892	7.233	8.747	1,2	24,0
	1.398	1.447	1.491	1,0	25,5

Se informa el promedio en peso de la masa molecular (Mw), el promedio en número de masa molecular (Mn), promedio en relación al eje Z de la masa molecular (Mz) y el índice de polidispersidad (Mw/Mn).

IV.7. Comportamiento reológico de las fracciones aisladas enzimáticamente a partir de AIR-C de tallo y brácteas, previo paso de pre-calentamiento

El estudio del comportamiento reológico permite evaluar la potencial aplicación de las fracciones aisladas conteniendo pectina e inulina.

Para este análisis, se prepararon sistemas acuosos al 2,00% (p/v) de las distintas fracciones aisladas de tallo y brácteas de alcaucil. Las muestras se solubilizaron agitando vigorosamente y luego se dejaron en reposo durante 18 h para llegar al equilibrio. Previa medición se agregó la cantidad adecuada de calcio. No se observó precipitado alguno por lo que las fracciones se encontraban completamente solubilizadas.

IV.7.1. Comportamiento de flujo de las fracciones aisladas de AIR-C

El comportamiento de flujo fue modelado a través de las Leyes de la Potencia y de Herschel-Bulkley. En la Figura IV.2 se pueden observar las curvas de flujo para las fracciones aisladas a partir de AIR-C de tallo de alcaucil. Todos los sistemas acuosos al 2,00% (p/v) de fracciones de tallo mostraron un comportamiento de flujo pseudoplástico como se puede observar cuando la viscosidad es graficada en función de velocidad de deformación. Exhibieron un primer plateau Newtoniano a bajas velocidades de deformación, mostrando una viscosidad Newtoniana inicial (η_0) (Ross-Murphy, 1994). La muestra CS1 mostró mayor viscosidad a todas las velocidades de deformación evaluadas, seguida por CS2 y CS3 (panel A). Es importante remarcar que CS1 mostró el menor GM de todas las fracciones de tallo aisladas y, en conjunto con CS2, el mayor contenido de inulina. La fracción CS4 mostró la viscosidad más baja lo cual puede atribuirse a su menor contenido de ácido galacturónico (13,7 g/100g) y a la más alta relación molar de azúcares neutros de la pectina/ácido galacturónico (Tabla IV.9) a pesar del bajo GM de las pectinas presentes y la presencia de iones de calcio. Este factor debió haber afectado la formación de la red polimérica en el medio acuoso en comparación con las fracciones CS1, CS2 y CS3. En general, los polímeros hidrofílicos pueden formar estructuras de redes tridimensionales en medios acuosos aún a muy bajas

concentraciones poliméricas, siempre que se encuentren por encima de la concentración específica de solapamiento C^* (Lapasin y Pricl, 1995). Las concentraciones polisacáridicas superiores a C^* dan lugar a sistemas con el comportamiento reológico de soluciones semidiluidas donde las macromoléculas individuales interpenetran el dominio de las otras macromoléculas, determinando un brusco cambio en las propiedades de flujo.

La Figura IV.3 muestra las curvas de flujo pseudoplástico obtenidas para las fracciones de fibra aisladas a partir de AIR-C de brácteas de alcaucil. La fracción CB1 fue la que mostró mayor viscosidad a cada velocidad de deformación evaluada seguida por CB2 (panel A). CB1 fue la fracción con mayor contenido de inulina y ácido galacturónico, acompañada por la menor relación molar de azúcares neutros de la pectina/ácido galacturónico (Tabla IV.8). Aunque las fracciones CB2, CB3 y CB4 no presentaron diferencias significativas en su contenido de pectinas, CB3 y CB4 mostraron las viscosidades más bajas a cada velocidad de cizalla evaluada. Estas fracciones mostraron un valor alto de la relación contenido de azúcares neutros de la pectina/ácido galacturónico (CB3) y un mayor grado de metilación en el caso de CB4, como puede observarse en la Tabla IV.8. Es importante mencionar que el número de regiones libres de azúcares neutros de la pectina y el grado de sustitución global determinan propiedades tales como la viscosidad y la solubilidad (Vincken y col., 2003; Cameron y col., 2011).

En las Figuras IV.2B y IV.3B se pueden observar los gráficos de esfuerzo de corte (τ) en función de la velocidad de deformación para los sistemas acuosos con calcio, de las fracciones extraídas de tallo y brácteas, respectivamente. Con excepción de CB1, el comportamiento de flujo fue ajustado con la Ley de la Potencia o de Ostwald (las fracciones CB4, CS1, CS2 y CS4) o con el modelo de Herschel-Bulkley (las fracciones

CB2, CB3 y CS3), obteniendo un R^2 cercano o mayor al 0,9 (Tabla IV.16). La fracción CB2 mostró el mayor esfuerzo mínimo de corte (τ_0) y fue la que mostró el comportamiento pseudoplástico más débil (mayores valores de n) (Tabla IV.16).

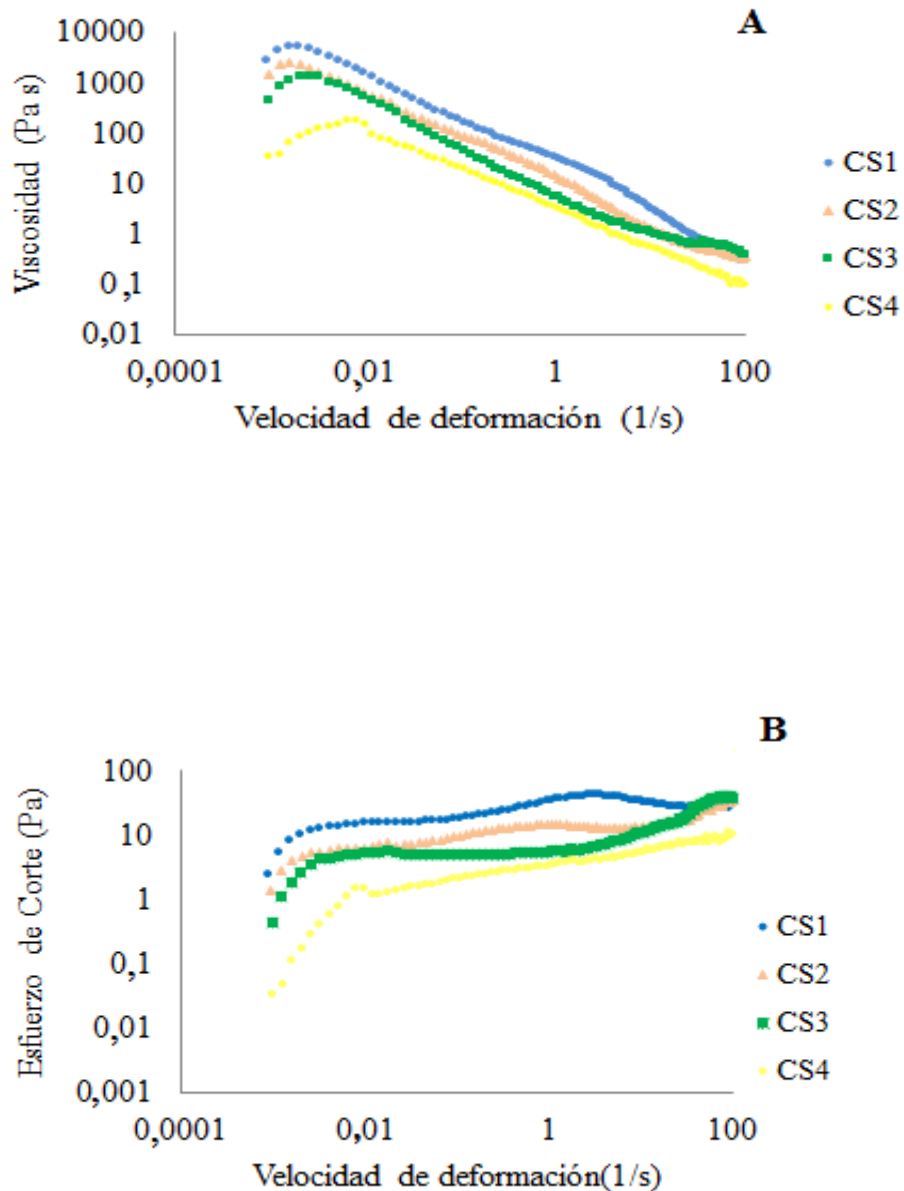


Figura IV.2. Comportamiento de flujo (25°C) de los sistemas acuosos con calcio y conteniendo un 2,00 % (p/v) de las diferentes fracciones aisladas de AIR-C de tallo y con calcio (A) Viscosidad (Pa.s). (B) Esfuerzo de corte (Pa).

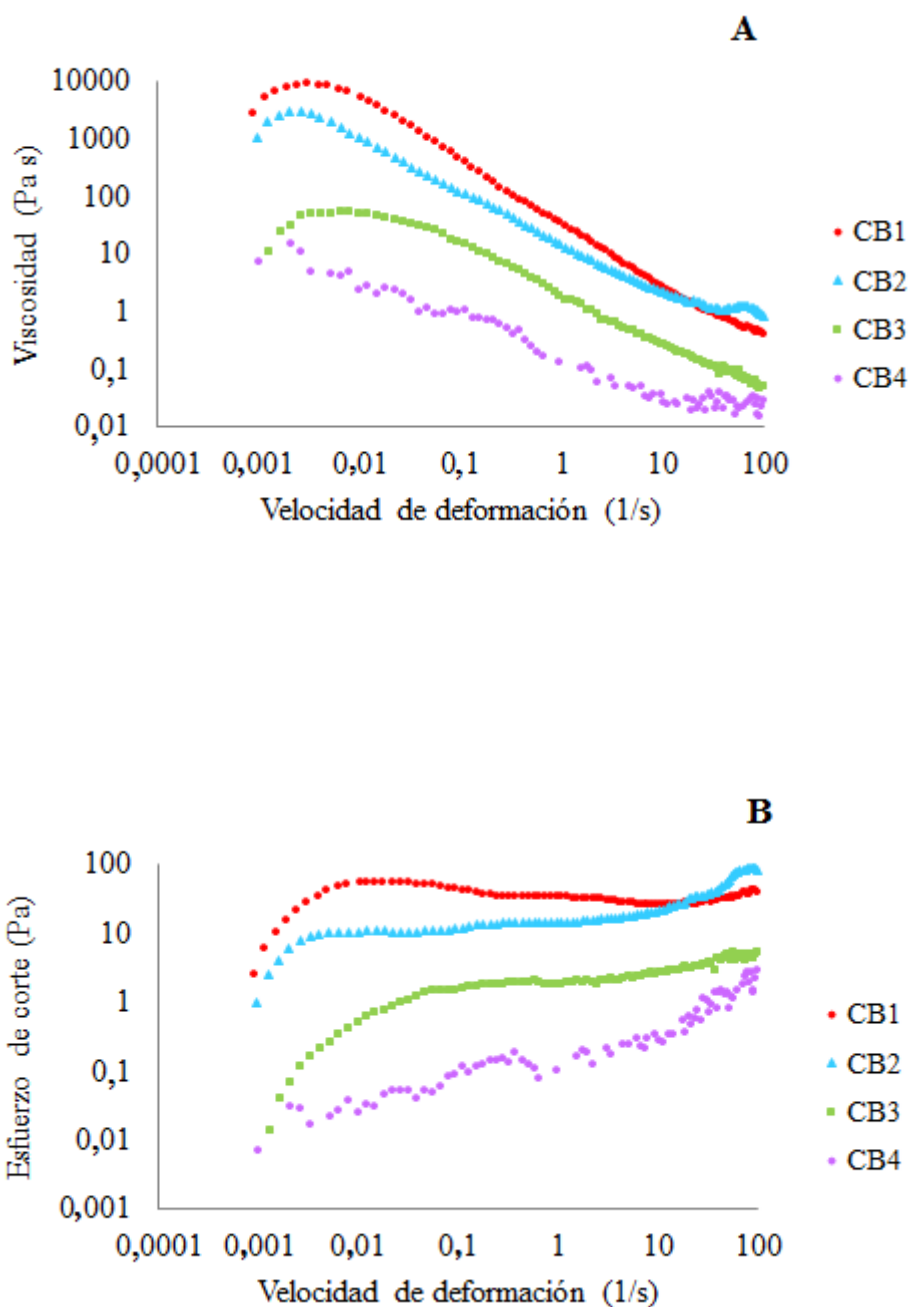


Figura IV.3. Comportamiento de flujo (25°C) de los sistemas acuosos con calcio y conteniendo un 2,00 % (p/v) de las diferentes fracciones aisladas de las fracciones de AIR-C de brácteas. (A) Viscosidad (Pa.s). (B) Esfuerzo de corte (Pa).

El esfuerzo mínimo de corte (τ_0) está asociado a la existencia de una red polimérica desarrollada cuando un sistema acuoso se encuentra en reposo durante un tiempo. Sin embargo, cuando se aplica un esfuerzo que excede el valor crítico (τ_0), la red se afecta y

el tiempo experimental no es suficiente para que se desarrollen nuevas interacciones en la red polimérica desorganizada y el sistema fluye. La fracción CS1 mostró el mayor índice de consistencia (k), la mayor viscosidad aparente obtenida a una velocidad de deformación de 20 s^{-1} y, conjuntamente con CS2 y CS4, los mayores comportamientos pseudoplásticos (menores valores de n). Las fracciones tratadas con proteasa y hemicelulasa (CB4 y CS4) mostraron la viscosidad aparente más baja tanto para brácteas como para tallos.

Tabla IV.16. Modelado con la Ley de Ostwald y con la Ley de Herschel Bulkley del comportamiento reológico de las fracciones aisladas a partir de AIR-C de brácteas o tallos de alcaucil.

Tratamiento	η_a (Pa.s) (20 s^{-1})	τ_0 (Pa)	k (Pa. s^n)	n	R^2
CB2	1,84	$12,3 \pm 0,3$ A	$1,1 \pm 0,1$ A	$0,94 \pm 0,03$ A	0,98
CB3	0,57	$1,5 \pm 0,1$ B	$0,42 \pm 0,08$ B	$0,47 \pm 0,4$ B	0,94
CB4	0,27		$0,20 \pm 0,01$ B	$0,37 \pm 0,04$ C	0,84
CS1	32,76		$32,7 \pm 0,4$ C	$0,20 \pm 0,01$ D	0,96
CS2	14,46		$14,4 \pm 0,2$ D	$0,17 \pm 0,01$ D	0,96
CS3	1,53	$4,4 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,1$ A	$0,77 \pm 0,03$ E	0,98
CS4	3,36		$3,3 \pm 0,1$ E	$0,23 \pm 0,00$ D	0,98

¹Se muestra la media y error estándar.

τ_0 : esfuerzo de corte mínimo; η_a : viscosidad aparente a un esfuerzo de corte de 20 s^{-1} .

k , Índice de consistencia; n : Índice de pseudoplasticidad; R^2 : bondad de ajuste ($\alpha:0.05$).

Se puede concluir que las fracciones de tallo y brácteas, obtenidas sin adición de enzimas (CS1 y CB1) mostraron las viscosidades más altas, mientras que aquellas tratadas con hemicelulasa mostraron las viscosidades más bajas (CB3, CB4, CS3 y CS4) (Figura IV.2 y IV.3). Fissore (2009) informó que la pectina aislada a partir de zapallo con buffer citrato exhibía una viscosidad de un orden de magnitud mayor que las fracciones aisladas con hemicelulasa. Las hemicelulosas son polisacáridos caracterizados por un esqueleto con uniones β -(1 \rightarrow 4) y con una configuración ecuatorial en los carbonos C1 y C4 y cuyos residuos monosacáridicos pueden ser xilosa, galactosa, manosa, arabinosa, glucosa, fucosa y con presencia de ácido glucurónico

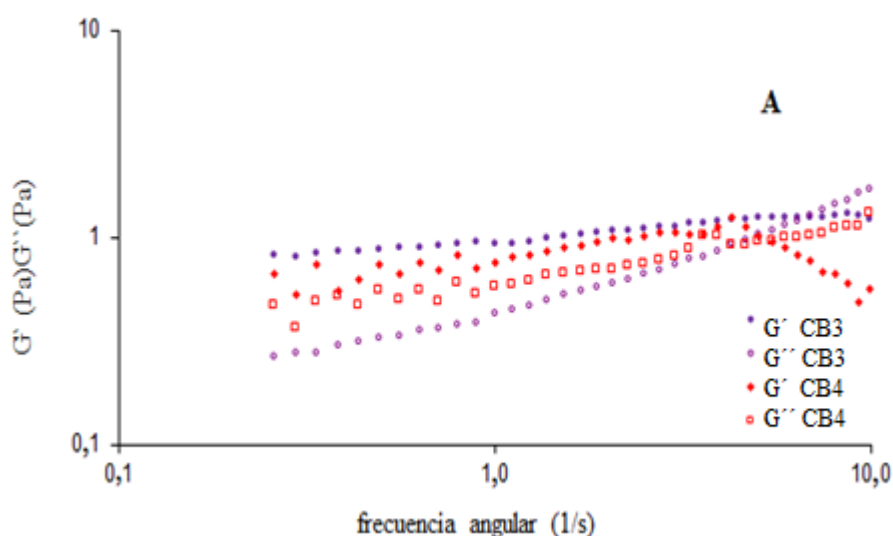
(Scheller y Ulvskov, 2010). Las hemicelulasas son un grupo de enzimas definidas como hidrolasas de glicanos que atacan la cadena principal de las hemicelulosas (Ghose y Bisaria, 1987). Es importante recordar que, de acuerdo a los proveedores, la hemicelulasa en esta investigación tiene actividad secundaria de celulasa, lo que resulta en cierto grado de alteración de la estructura de la celulosa. Es probable que la acción de la hemicelulasa, al romper las cadenas de hemicelulosa de la pared, diera lugar a polisacáridos de menor capacidad viscosante. Fissore y col. (2007) aislaron pectina a partir de calabaza utilizando hemicelulasa y observaron que la viscosidad aparente, a 25°C, se redujo con el incremento de la relación enzima-sustrato utilizada en el procedimiento de hidrólisis.

IV.7.2. Propiedades reológicas oscilatorias para las fracciones aisladas de AIR-C

Una vez determinada la zona de viscoelasticidad lineal, se evaluaron los espectros mecánicos de los sistemas acuosos conteniendo las fracciones aisladas (2% p/v) e iones calcio a lo largo de tres décadas de frecuencia angular (ω) entre 0,05 y 100 rad/s. Se observaron espectros de tipo gel a 25°C con el módulo G' siempre superior a G'' (Figuras IV.4) y una dependencia con la frecuencia para los módulos, siendo más pronunciada para G'' , lo cual produce un entrecruzamiento a 18, 7 y 4 s⁻¹ para algunos sistemas estudiados (CS4, CB3 y CB4, respectivamente) como se puede observar en los paneles A y B de la Figura IV.4 (Picout y Ross-Murphy, 2003). Como se estableció previamente (Tablas IV.8 y IV.9), las fracciones CS4 y CB3 contenían moléculas de pectina altamente ramificadas (4,6 y 3,8 relación molar de azúcares neutros de la pectina/ácido galacturónico) mientras que CB4 mostró el mayor grado de metilación (53%), afectando ambos factores a la formación de zonas de unión con el calcio.

Además, la fracción CS4 fue la menos enriquecida en pectina, ya que ella exhibió el menor contenido de ácido galacturónico (Tabla IV.9). Considerando los perfiles de masas moleculares reportados (Tabla IV.15), CB3 y CS4 fueron las únicas fracciones que presentaron macromoléculas de pectina con dos y tres diferentes masas moleculares promedio en peso, respectivamente. Por otra parte, la fracción CB4 exhibió un peso molecular relativamente bajo (335.765 Da).

Los geles puede clasificarse en dos categorías principales: geles débiles y geles fuertes. Bajo pequeñas deformaciones, los geles fuertes presentan el comportamiento típico de los sólidos viscoelásticos y, por encima de una deformación crítica, se rompen. Por otro lado, bajo pequeñas deformaciones, los geles débiles presentan un comportamiento similar a los geles fuertes pero cuando aumenta la deformación, la red tridimensional sufre una progresiva ruptura y ellos fluyen debido a la ausencia de entrecruzamientos permanentes. Para un gel débil, el módulo muestra cierta dependencia de la frecuencia (Clark y Ross-Murphy, 1987; Lapasin y Prichl, 1995; Ikeda y Nishinari, 2001; Rosalina y Bhattachyara, 2002).



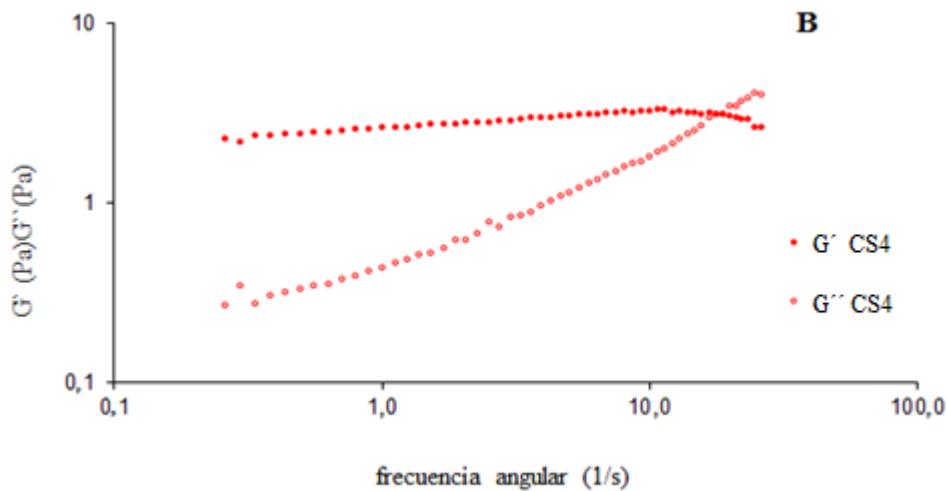


Figura IV.4. Espectro mecánico registrado en los ensayos dinámicos a 25°C para los sistemas acuosos con calcio y constituidos por 2,00% (p/v) de las diferentes fracciones aisladas: **(A)** Fracciones CB3 y CB4; **(B)** Fracción CS4. Símbolos rellenos: Módulo de almacenamiento (G'); Símbolos vacíos: Módulo de pérdida (G'').

Los espectros mecánicos mostrados en la Figura IV.5 Paneles A y B, que corresponden a los sistemas acuosos al 2% de las fracciones CS1, CS2, CS3, CB1 y CB2 conteniendo iones de calcio, exhibieron una dependencia con la frecuencia con un mínimo a bajas frecuencias ($\approx 1 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$) para el módulo G'' , pero el módulo elástico (G') fue relativamente independiente de la frecuencia. Además, los valores de G' fueron un orden de magnitud superior a los de G'' a bajas frecuencias angulares y hasta 10 $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$.

La fracción CS2 formó el gel más fuerte, con valores de módulo elástico (G') de 100 Pa (Figura IV.5A). Comportamientos similares mostraron los sistemas acuosos de las fracciones CB1 y CB2 (Figura IV.5B), con valores de G' de 80-90 Pa. Por otro lado, los espectros de CS1 y CS3 mostraron valores de G' casi de un orden de magnitud menor que CS2 (Figura IV.5A).

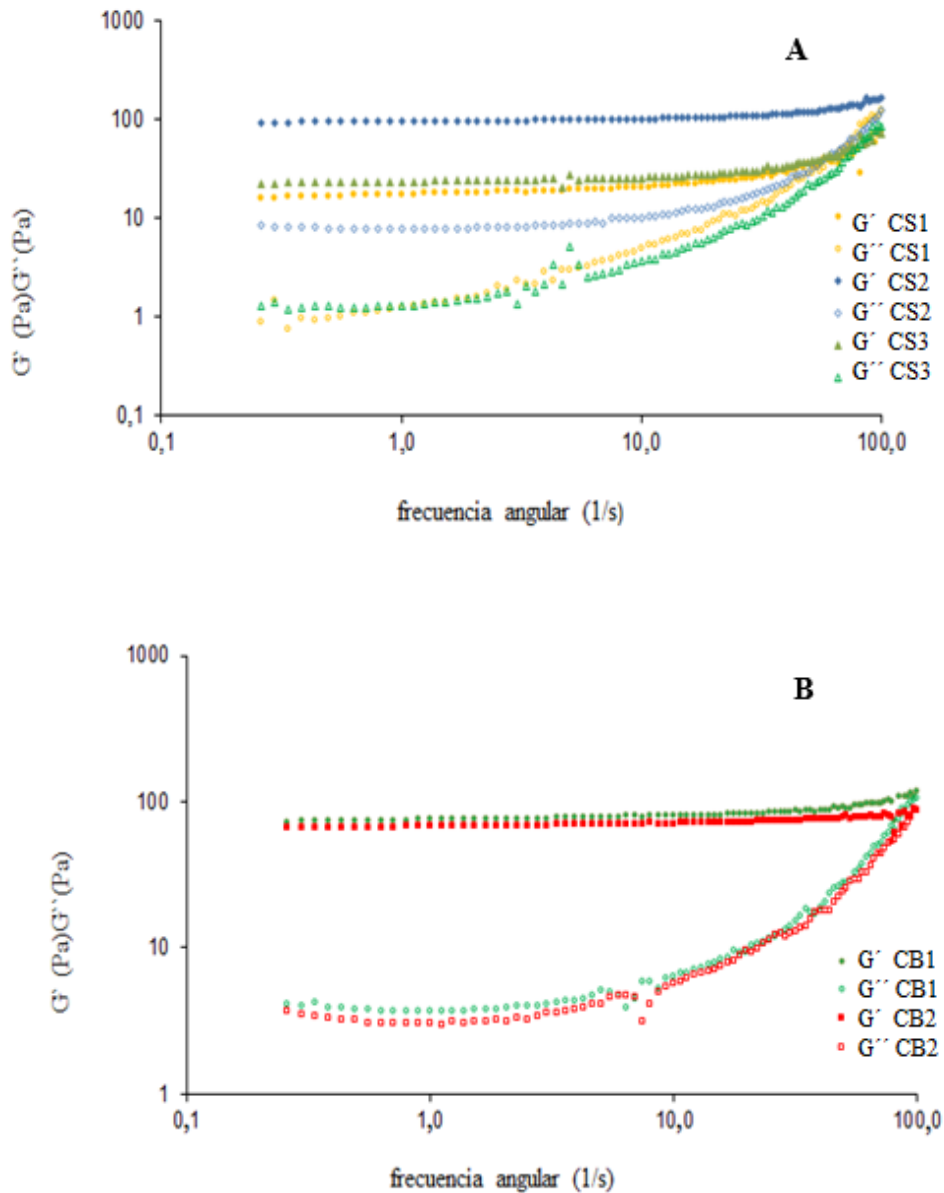


Figura IV.5. Espectro mecánico registrado en los ensayos dinámicos a 25°C para los sistemas acuosos con calcio y constituidos por 2,00% (p/v) de las diferentes fracciones aisladas: **(A)** Fracciones CS1, CS2 y CS3; **(B)** Fracciones CB1 y CB2. Símbolos rellenos: Módulo de almacenamiento (G'); Símbolos vacíos: Módulo de pérdida (G'').

La fracción CS2 presentó el mayor contenido de ácido galacturónico e inulina en las fracciones aisladas de AIR-C de tallo, junto con una menor relación de azúcares neutros de las pectinas/GalA que las fracciones CS3 y CS4 (Tabla IV.9).

CS1 y CS3 presentaron pectinas con masas moleculares mayores que la fracción CS2 y con menor polidispersidad (Tabla IV.15).

La fracción CB1 presentó el mayor contenido de GalA e inulina de todas las fracciones extraídas del AIR-C de alcaucil y el más bajo contenido de azúcares neutros de la pectina, lo cual conduce a la menor relación de azúcares neutros de la pectina/ácido galacturónico (Tabla IV.8). Esto indica que esta pectina está constituida principalmente por homogalacturonanos, y presentó, además, un bajo GM (49%). Por otra parte, de acuerdo a Roberfroid (2004), la inulina trabaja en sinergismo con la mayoría de los agentes gelificantes como gelatina, alginatos, κ - y ι - carragenanos, gomas gelano y maltodextrinas pudiendo así contribuir al comportamiento reológico observado, a través de su interacción sinérgica con la pectina. Contrariamente, CB2 mostró el menor contenido de ácido galacturónico (pectinas) y mayor contenido de azúcares neutros de la pectina, lo cual indica la presencia de pectinas con regiones de ramnogalacturonanos. El contenido de inulina de la fracción CB2 fue de casi la mitad del contenido presentado por la fracción CB1 (Tabla IV.8). De todas formas, esta fracción presentó uno de los mejores comportamientos reológicos junto con CS2 y CB1 en presencia de iones calcio, y las tres presentaron una población de pectinas con similares pesos moleculares y alta polidispersidad (2,9, 3,0, 4,3) (Tabla IV.15). Se debe recordar que la asociación entre homogalacturonanos en pectinas de bajo metoxilo, por medio de iones calcio, requiere de bloques de, por lo menos, 10 a 14 unidades de ácido galacturónico para que se formen zonas de unión entrecruzadas (Vincken y col., 2003) y una distribución más favorable para la fracción CB2 podría haber determinado su mejor comportamiento reológico.

IV.7.3. Ajuste a un modelo tipo Ley de la Potencia de los datos experimentales correspondientes a los espectros mecánicos

Con el objetivo de comparar los espectros mecánicos de los sistemas de geles obtenidos luego de la adición de calcio fue usado un modelo tipo Ley de la Potencia para ajustar los datos experimentales (Kim y Yoo, 2006). Los parámetros obtenidos se muestran en la Tabla IV.17.

Los valores de los coeficientes corresponden a un comportamiento tipo gel. El coeficiente pre-exponencial A para G' fue, para todas las fracciones, mayor que el coeficiente pre-exponencial B para G'' , y, con la excepción de las fracciones CB3 y CB4, G' y G'' presentaron una diferencia de uno o más ciclos log entre ellos, lo cual demuestra que el comportamiento elástico fue superior al comportamiento viscoso. Las fracciones CB3 y CB4 mostraron los menores valores del parámetro A. Los valores más bajos obtenidos para m indicaron una baja dependencia con la frecuencia para G' , como pudo observarse también en el espectro mecánico (Figura IV.5) mientras que los valores más altos de q indicaron la más importante dependencia de G'' con la frecuencia. La última tendencia es típica de los sistemas biopoliméricos que constituyen geles débiles (Alonso-Mougan y col., 2002). De acuerdo a Jampala y col. (2005) para un gel físico, $m > 0$, y para un gel químico, $m = 0$, entonces, el valor de m podría ser usado como una medida de la semejanza de un gel físico a un gel químico.

Tabla IV.17. Parámetros calculados¹ luego del ajuste de los datos experimentales del ensayo dinámico (25°C) de sistemas acuosos al 2,00% (p/v) conteniendo calcio, a un modelo de tipo Ley de la Potencia.

Fracción aislada	G'(Pa)		
	A	<i>m</i>	R ²
CB1	74,3 ± 0,6 A	0,046 ± 0,003 A	0,79
CB2	67,6 ± 0,3 B	0,029 ± 0,001 B	0,84
CB3	0,962 ± 0,004 C	0,146 ± 0,003 C	0,99
CB4	0,81 ± 0,02 C	0,21 ± 0,02 E	0,84
CS1	16,5 ± 0,3 D	0,13 ± 0,01 D	0,85
CS2	94,4 ± 0,6 E	0,042 ± 0,003 A	0,79
CS3	22,8 ± 0,3 F	0,12 ± 0,01 B	0,72
CS4	2,55 ± 0,03 G	0,089 ± 0,006 B	0,84

Fracción aislada	G''(Pa)		
	B	<i>q</i>	R ²
CB1	0,023 ± 0,005 A	1,83 ± 0,05 A	0,98
CB2	0,11 ± 0,02 B	1,40 ± 0,05 B	0,97
CB3	0,43 ± 0,01 C	0,54 ± 0,01 C	0,99
CB4	0,59 ± 0,01 D	0,32 ± 0,02 D	0,90
CS1	0,43 ± 0,05 C	1,03 ± 0,03 E	0,98
CS2	0,12 ± 0,04 B	1,45 ± 0,07 B	0,93
CS3	0,11 ± 0,02 B	1,34 ± 0,04 B	0,98
CS4	0,36 ± 0,02 C	0,73 ± 0,02 F	0,98

¹ Se muestra promedio y error estándar.

R²: bondad de ajuste (α : 0,05).

Dentro de cada columna, diferentes letras indican deferencias significativas (p<0,05).

IV.7.4. Ajuste al Modelo de Maxwell de los datos experimentales correspondientes a los espectros mecánicos

Los valores del módulo elástico G_i y del tiempo característico de relajación λ_i fueron obtenidos a través del ajuste de los valores experimentales de G' y G'' al modelo generalizado de Maxwell (Ecuaciones III.7 y III.8). La regresión no lineal de dichos datos experimentales dió el mejor conjunto de valores para G_i junto con λ_i y el factor de escala λ_{i+1}/λ_i . Todos los sistemas fueron ajustados con 3 módulos de Maxwell, excepto

los sistemas acuosos de las fracciones CS2 y CB3 que necesitaron de cuatro cuerpos de Maxwell. Los resultados obtenidos y el porcentaje de error medio fueron reportados en la Tabla IV.18 para G' y G'' , mostrando una alta concordancia entre los valores experimentales y predichos. Los parámetros del modelo generalizado de Maxwell fueron graficados como un espectro de relajación (G_i versus λ_i) (Figura IV.6).

Tabla IV.18. Parámetros calculados a través del ajuste de los datos experimentales al Modelo generalizado de Maxwell y error medio porcentual ($\hat{\epsilon}\%$) entre los módulos experimentales y los predichos para los diferentes sistemas acuosos de las fracciones.

Tratamiento	G_i (Pa)	λ_i (s)	CV	$\hat{\epsilon}\%$ (G')	$\hat{\epsilon}\%$ (G'')
CS1	65,45	0,007939	0,018	1,38	0,23
	1,22	0,8364			
	18,73	146,2			
CS2	161,7	0,003691	0,005	0,063	-0,113
	10,48	0,2949			
	7,822	2,129			
	87,45	80,29			
CS3	56,37	0,006299	0,02	1,03	2,25
	1,492	0,7106			
	24,64	91,0			
CS4	233,1	0,0007146	0,049	-0,09	0,329
	0,6219	0,4228			
	2,478	50,75			
CB1	167,6	0,003013	0,0086	0,15	0,13
	5,196	0,5136			
	75,79	73,83			
CB2	187,5	0,002413	0,0082	0,1097	0,0868
	4,166	0,4581			
	67,63	74,15			
CB3	101,7	0,00167	0,0477	-0,076	0,583
	0,3714	0,4609			
	0,1712	1,814			
	0,7541	23,49			
CB4	48,93	0,003688	0,184	-1,01	1,89
	0,5333	0,6853			
	0,6519	5,041			

λ_i = tiempo de relajación

G_i = módulo plateau

CV = Coeficiente de variación

$\hat{\epsilon}\%$ = porcentaje de error para los módulos

Es importante remarcar que para los tiempos de relajación obtenidos, los mayores valores de G_i fueron encontrados para los sistemas acuosos de las fracciones CS2, CB1 y CB2, seguidos por los sistemas acuosos de las fracciones CS1 y CS3 (Figura IV.6). Los valores más bajos de G_i se obtuvieron para los sistemas CS4, CB3 y CB4. Un mayor valor de G_i para λ_i (sistemas CS2, CB1 y CB2) implica un mayor tiempo de vida para las zonas de unión de la red (Moraes y col., 2011).

Como puede observarse en la Tabla IV.18, las fracciones CS2, CB1 y CB2 mostraron λ_i del mismo orden y sus valores fueron desde 0,0037 a 80,29 s, 0,0030 a 73,83 s y 0,0024 a 74,15 s, respectivamente, pero CS2 necesitó de 4 elementos y CB1 y CB2, de tres elementos para ajustar el modelo. Las fracciones CS4, CB3 y CB4 presentaron los menores valores de G_i para los mayores λ_i (Figura IV.6). En particular, CS4 mostró mayor G_i (233,1 Pa) para el menor λ_i (0,007 s) observado, lo cual significa un menor tiempo de vida de las zonas de unión.

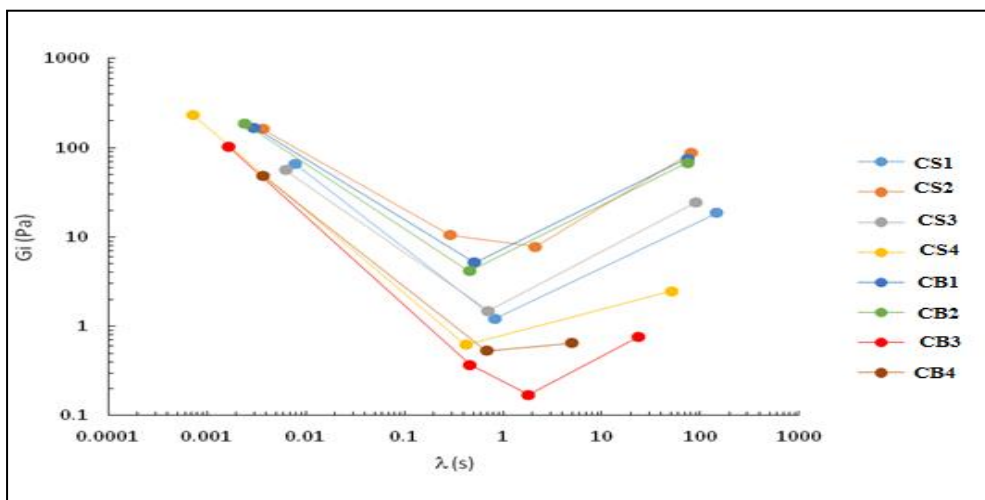


Figura IV.6. Distribución de los tiempos de relajación obtenidos a 25°C para los sistemas acuosos constituidos por 2,00% (p/v) de las diferentes fracciones aisladas (CS1, CS2, CS3, CS4, CB1, CB2, CB3 y CB4).

IV.8. Conclusiones sobre las características químicas, físico-químicas y reológicas de las fracciones aisladas a partir de AIR-C

Se obtuvo el residuo insoluble en alcohol de brácteas y tallo de alcaucil mediante un calentamiento convectivo (AIR-C). El posterior tratamiento del AIR-C a 40°C durante 5 horas con buffer citrato/ proteasa/ hemicelulasa, permitió obtener fracciones enriquecidas en fibra dietaria soluble (pectina e inulina). La técnica es un método de extracción amigable con el medio ambiente que contribuye a mejorar la sustentabilidad del proceso de industrialización.

El rendimiento y la composición química de las fracciones fueron influenciados por el tipo de tejido y los niveles de hemicelulasa y proteasa; los mayores niveles ensayados fueron los más efectivos para modificar el contenido de carbohidratos o rendimiento. En general, la hemicelulasa mostró un efecto más marcado que la proteasa ejerciendo un efecto positivo en el contenido de carbohidratos de las fracciones.

La aplicación de un tratamiento con calor previo al tratamiento del AIR-C con buffer citrato/ proteasa/ hemicelulasa, contribuyó al incremento del rendimiento y contenido de inulina y la disminución del contenido de proteínas y polifenoles en las fracciones. Las fracciones obtenidas presentaron, en general, un grado de metilación inferior al 50%. Se observaron, en general, interacciones entre los tratamientos con buffer citrato/ proteasa/ hemicelulasa y los tratamientos con calor para las mayores concentraciones de enzima.

Las fracciones obtenidas, contenían compuestos polifenólicos tales como ácido monocateolquínico, apigenina y pinoresinol.

Se estudiaron los comportamientos reológicos de flujo de las fracciones, en presencia de calcio por el grado de metilación de las pectina presente. Se observó un comportamiento pseudoplástico.

Todas las fracciones presentaron comportamiento de gel, en presencia de calcio, en los estudios oscilatorios. Las fracciones CB3, CB4 y CS4, aisladas en presencia de hemicelulasa (CB3) o de hemicelulasa y proteasa (CB4 y CS4) mostraron el cruce de la curva de G' y de G'' a las más bajas frecuencias angulares lo cual se encuentra relacionado a las características químicas y estructurales de sus pectinas. Estas fracciones también mostraron una población más heterogénea de sacáridos de ácido galacturónico y/o fructosa. La técnica propuesta para la producción de fracciones a partir de tallo o brácteas de alcaucil dio origen a muestras con un importante contenido de pectina e inulina y, consecuentemente, con interesantes propiedades nutricionales. La capacidad de algunas de estas sustancias para gelificar reveló la potencialidad de estas fibras como aditivo modificador de textura.

IV.9. Composición química y rendimiento de las fracciones aisladas a partir del residuo insoluble en alcohol obtenido con asistencia de calentamiento por microondas (AIR-M) de brácteas o tallos de alcaucil

El rendimiento y la composición química de las fracciones aisladas a partir de AIR-M se observan en la Tabla IV.19.

En todos los casos, el rendimiento de las fracciones obtenidas a partir de AIR-M de tallo fue ligeramente superior al de las fracciones aisladas de AIR-M de brácteas.

Realizando una comparación con las fracciones obtenidas a partir del AIR-C, los rendimientos de las fracciones obtenidas a partir de AIR-M fueron menores, siendo la diferencia de alrededor del 40% en tallo. En cambio, en brácteas, los rendimientos fueron similares y, en el caso de MB1 y MB3, se obtuvieron mayores rendimientos que para CB1 y CB3.

Como puede observarse en la Tabla IV.19, el principal constituyente fueron los carbohidratos (66-89 g/100g). Para las fracciones de tallo y brácteas, el principal carbohidrato fue inulina (32-45 g/100 g) mientras que el contenido de GalA fue del orden de 22-29 g/100g. De acuerdo al contenido de GalA, en cambio puede evaluarse que la extracción no fue completamente eficiente ya que el GalA obtenido fue menor que el contenido en el residuo insolubles en alcohol. Todas las fracciones presentaron bajo grado de metilación (19 – 27 para las fracciones de tallo y 30- 35 para las fracciones de brácteas). La proporción de proteínas en las fracciones de tallo fueron mayores que en las fracciones obtenidas a partir de brácteas. El contenido de polifenoles totales encontrado en tallo fue el doble que en las fracciones obtenidas a partir de brácteas.

Al comparar los resultados con los correspondientes a las fracciones aisladas a partir de AIR-C, se puede observar un mayor contenido de carbohidratos en general (84,3-96,3 g/100 g para las fracciones de tallo y 88,0-107,0 g/100g para las fracciones de brácteas) con respecto a las fracciones obtenidas a partir de AIR -M.

Todas las fracciones obtenidas a partir de AIR-M presentaron un mayor contenido de GalA, al compararlas con los mismos tratamientos obtenidos a partir de AIR-C (13,7-22,8 g/100g para tallo y 18,9-26,1 g/100g para brácteas) pero su GM fue menor comparado con las fracciones obtenidas a partir de AIR-C (36-47% para tallo y 47-53% para brácteas).

El contenido de inulina de las fracciones obtenidas a partir de AIR-M de tallo fue similar al de las fracciones obtenidas a partir de AIR-C de tallo (28,5- 40,7 g/100g AIR-C) en general, pero las fracciones obtenidas a partir de AIR-M de brácteas presentaron mayores contenidos de inulina que aquéllas obtenidas a partir de AIR-C de brácteas (22,4-47,0 g/100g AIR-C), excepto para la fracción MB1 que mostró un contenido

menor que la fracción CB1(47,0 g/100g). Respecto a los azúcares neutros de pectina, todas las fracciones obtenidas a partir de AIR-C mostraron mayores contenidos (14,9-64,7 g/100g) que las fracciones obtenidas a partir de AIR-M.

El tratamiento con microondas dió lugar a fracciones con mayor contenido de proteínas que el calentamiento convectivo para las fracciones de tallo y para la fracción MB2 mientras que para las otras fracciones de brácteas, el contenido de proteínas fue similar.

El contenido de polifenoles totales de las fracciones obtenidas a partir de AIR-M de tallo fue de 0,3-0,4 g/100g y para brácteas fue de 0,1 -0,14 g/100g.

Los resultados muestran que todas las fracciones aisladas contenían fibra dietaria soluble (57-72%). Por esta razón, ellas pueden ser consideradas valiosos ingredientes para la fabricación industrial de alimentos ricos en fibras para prevenir riesgos severos, como obesidad, enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer de colon-rectal, entre otros (Mann y Cummings, 2009; Sánchez-Muniz, 2012). Estas fracciones mostraron un contenido de fibra dietaria soluble más alto que las fracciones aisladas de otros subproductos vegetales como residuos de manzana (Sudha y col., 2007), repollo (Tanongkankit y col., 2012), y piel de mango (Ajila y Rao, 2013). El uso de calentamiento por microondas para la extracción de AIR permitió obtener, en general, una mayor cantidad de pectina, inulina y proteínas en las fracciones. Kratchanova y col. (2004) observaron que el uso de microondas produjo la destrucción de las células parenquimales de la piel de naranja fresca, lo cual incrementó el rendimiento de pectina. Es de destacar que la literatura destaca como las mayores ventajas del calentamiento con microondas, la reducción de la cantidad de solventes y del tiempo respecto al calentamiento convectivo (Tewari y col., 2015).

Tabla IV.19. Composición química y rendimiento de las fracciones obtenidas a partir de AIR-M

Fracción	Carbohidratos totales(g/100g) ¹	Proteínas (g/100g)	GalA ² (g/100g)	Inulina (g/100g)	ANP (%) ³	ANP / GalA	Polifenoles totales (g/100g GAE) ⁴	GM (%) ⁵	Rendimiento (%)
MS1	89 ± 2 A	3,2 ± 0,1 A	29,3 ± 0,1 A	42,2 ± 0,8 A	17,7	0,7	0,32 ± 0,1 AB	22 AB	14,29
MS2	77,7 ± 0,4 AB	3,2 ± 0,1 A	24,1 ± 2,7 A	40,0 ± 0,5 B	13,7	0,7	0,39 ± 0,01 C	27 AB	13,82
MS3	78,0 ± 6,3 AB	2,8 ± 0,2 A	24,5 ± 4,4 A	31,8 ± 0,5 C	21,2	1,0	0,35 ± 0,01 B	19 A	14,20
MS4	66,2 ± 6,4 B	2,8 ± 0,3 A	29,4 ± 1,5 A	34,5 ± 0,8 D	2,0	0,1	0,29 ± 0,02 A	26 B	13,80
MB1	70,9 ± 1,0 A	1,3 ± 0,2 A	22,1 ± 1,2 A	45,0 ± 0,2 A	4,0	0,2	0,11 ± 0,01 A	30 A	12,96
MB2	72,5 ± 1,5 A	2,1 ± 0,5 AB	25,6 ± 1,7 B	40,3 ± 1,1 B	6,0	0,3	0,14 ± 0,01 B	32 A	12,76
MB3	81,8 ± 2,4 B	1,5 ± 0,1 AB	25,3 ± 0,5 B	41,1 ± 1,9 B	16,0	0,7	0,14 ± 0,01 B	32 A	15,24
MB4	82,1 ± 4,6 B	2,3 ± 0,5 B	26,9 ± 0,2 B	41,0 ± 1,7 B	14,1	0,6	0,14 ± 0,01 B	35 A	12,78

¹ Calculado en relación a la curva de calibración de fructosa.

² GalA: ácido galacturónico

³ Azúcar neutro de la pectina (ANP). Calculado por diferencia entre carbohidratos totales, celulosa, galA e inulina.

⁴ GAE: Equivalentes de ácido gálico.

⁵ GM fue calculado como un porcentaje entre los moles de metanol y los moles de GalA cada 100 g de muestra.

Para los tratamientos 1-4, dentro de cada columna, distintas letras indican diferencias significativas (p<0,05).

IV.10. Determinación de color de las fracciones obtenidas a partir de AIR-M

Se evaluaron los parámetros de color L^* , a^* y b^* y se calculó el parámetro ΔE^* .

En la Tabla IV.20 se puede observar que el AIR-M de tallo es menos luminoso ($L^*=40,78$) que las fracciones obtenidas a partir de él ($L^*=50,78$ a $62,77$). En el caso de brácteas, el AIR-M fue más oscuro que las fracciones MB2 y MB3 y más luminoso que las fracciones MB1 y MB4.

El parámetro b^* tuvo valores positivos, mostrando que las fracciones tenían un color amarillo. El parámetro a^* tuvo valores positivos bajos en todas las fracciones, revelando un color rojizo. Se puede observar que las fracciones de tallo fueron más amarillas y rojas que las fracciones de brácteas.

Con respecto al parámetro ΔE^* , las fracciones MS4 y MB3 fueron las que mostraron las mayores variaciones respecto a las fracciones obtenidas sin el uso de enzimas (MS1 y MB1).

Se puede concluir que las fracciones aisladas son luminosas y coloreadas lo que debe ser considerado para su inclusión en sistemas alimenticios, dado el efecto que pueden tener en la apariencia final del producto.

Al comparar con las fracciones obtenidas a partir de AIR-C, se observa que los parámetros de color ($L^*: 61,43-69,64$, $a^*: 3,09-4,01$, $b^*: 15,98-17,40$ para las fracciones de tallo y $L^*: 59,97-67,77$, $a^*: 2,87-3,35$, $b^*: 14,72-16,11$ para las fracciones de brácteas) toman valores semejantes a los aquí comentados pero, en general, se observa una tendencia a una mayor luminosidad para las fracciones aisladas a partir de AIR-C de brácteas y tallos, menor a^* y b^* para las fracciones aisladas de AIR-C de tallo o mayor a^* y b^* para las fracciones aisladas de AIR-C de brácteas.

Tabla IV.20. Parámetros de color para las fracciones aisladas a partir de AIR-M de brácteas y tallos de alcaucil.

Tratamiento	L*	a*	b*	ΔE^*
AIR-MS	40,78 ± 0,00	3,89 ± 0,04	21,92 ± 0,04	
MS1	50,78 ± 0,10 A	3,29 ± 0,01 A	16,15 ± 0,06 A	N/A
MS2	53,73 ± 0,01 B	3,56 ± 0,03 B	18,06 ± 0,02 B	3,52
MS3	57,00 ± 0,99 C	4,88 ± 0,13 C	19,73 ± 0,46 C	7,35
MS4	62,77 ± 0,07 D	3,78 ± 0,05 D	18,95 ± 0,07 D	12,32
AIR-MB	56,95 ± 0,05	2,58 ± 0,01	23,10 ± 0,07	
MB1	55,44 ± 0,02 A	2,00 ± 0,01 A	13,02 ± 0,15 A	N/A
MB2	61,39 ± 0,36 B	1,97 ± 0,03 A	12,57 ± 0,08 B	5,97
MB3	76,78 ± 0,08 C	2,18 ± 0,04 B	14,65 ± 0,09 C	21,40
MB4	50,33 ± 0,03 D	2,88 ± 0,01 C	14,54 ± 0,08 C	5,40

Se informa el valor medio y el desvío estándar.

“L”: luminosidad, siendo 0 = negro y 100 = blanco;

“a” (+): rojo y (-): verde

“b” (+): amarillo y (-): azul

N/A: no aplica.

Dentro de cada columna y para cada tejido, letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

IV.11. Identificación de compuestos polifenólicos en las fracciones aisladas a partir de AIR-M

La identificación de los polifenólicos presentes en las diferentes fracciones aisladas de brácteas y tallo a partir del residuo insoluble en alcohol obtenido por calentamiento con microondas, se realizó mediante HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS operando en modo de ionización negativo. Para la identificación, fueron usados los espectros de UV y datos de MS, junto con la interpretación de los espectros observados en MS en comparación con los espectros encontrados en la literatura.

En la Figura IV.7 pueden observarse los cromatogramas de HPLC-DAD para las fracciones MB1 y MS2, a modo de ejemplo.

Se identificaron los siguientes compuestos (Tabla IV.21 y IV.22):

-derivados del ácido hidroxibenzoico como el ácido sirínico,

-derivados del ácido hidroxicinámico como el ácido monocateoilquínico y el ácido clorogénico,

-flavonas como la apigenina y

-lignanos como los derivados del pinosinol.

En ambas fracciones mostradas en la Figura IV.7 se encontraron cuatro compuestos a los tiempos de retención de 8,7, 9,4, 13,9 y 16,3 min que no pudieron ser identificados. Adicionalmente, las fracciones de brácteas mostraron dos picos a 15,9 y a 19,2 min desconocidos. Como puede observarse en los cromatogramas, se encontraron más picos en las fracciones de brácteas.

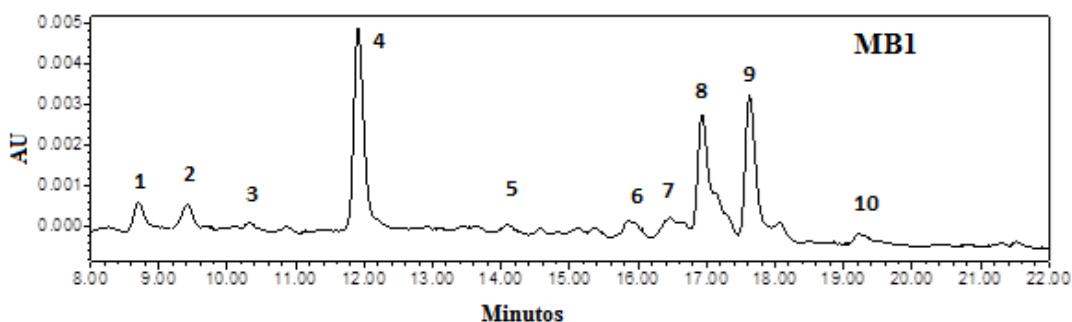
En todas las fracciones de brácteas fueron identificados los mismos picos que en las fracciones de tallos. Se identificó un pico al tiempo 10,2 min el cual presentó fragmentos de ionización correspondientes a dos compuestos diferentes, el ácido sirínico O-hexósido ($C_{15}H_{19}O_{10}$) con un m/z 359,10 y el ácido clorogénico glucósido II ($C_{22}H_{27}O_{14}$) con un m/z 515,14. Un compuesto a los 11,8 min mostró un m/z de 353,09, de acuerdo con la fórmula molecular $C_{16}H_{17}O_9$ correspondiente al ácido monocateoilquínico (Moglia y col., 2008). Además, un compuesto de tipo flavona con un m/z de 445,08 ($C_{21}H_{17}O_{11}$) correspondiente al compuesto apigenina 7-glucurónido (Abu-Reidah y col., 2013) se observó a los 16,8 min. Un derivado de lignanos se identificó al tiempo de retención 17,6 min con una fórmula molecular incompleta debido a la detección de tres fragmentos diferentes de pinosinóles no completamente separados. Los fragmentos detectados fueron uno de m/z 357,13 correspondiente a la

fórmula molecular $C_{26}H_{31}O_{11}$ y $C_{28}H_{33}O_{12}$ y otros dos de m/z 151,04 y 136,02 correspondientes a la fórmula molecular $C_{20}H_{21}O_6$.

Al comparar con los resultados observados para las fracciones obtenidas a partir de AIR-C, se concluye que sólo la fracción CB3 mostró un pico adicional correspondiente al ácido dicafeoilquínico ($C_{25}H_{23}O_{12}$) con un m/z de 515,12 a los 15,0 min. Las otras fracciones obtenidas a partir de AIR-C presentaron menos compuestos polifenólicos que las fracciones con igual tratamiento obtenidas a partir de AIR-M.

Los compuestos de flavonas pueden proteger a las células del daño foto-oxidativo producido por el exceso de radiaciones ultravioletas (UV), entre otras funciones (Smith y Markham, 1996 y Jaakola y col., 2004). Los ácidos hidroxicinámicos se han visto implicados en la provisión estructural de soporte para la pared celular de plantas a través de ciertos compuestos poliméricos, tales como polisacáridos (Faulds y Willimason, 1999). Además, son precursores de la lignina, que permite mejorar la defensa mecánica de la pared celular de las plantas.

Con respecto al ácido clorogénico, se ha demostrado que posee propiedades antioxidantes y anticancerígenas en estudios *in vivo* (Kim y col., 1998; Rechner y col., 2002; Gonthier y col., 2003). Los flavonoides como la luteolina y apigenina tienen un amplio espectro de actividades farmacológicas y se sugirieron como los componentes bioactivos de diferentes plantas (Pérez-García y col., 2000).



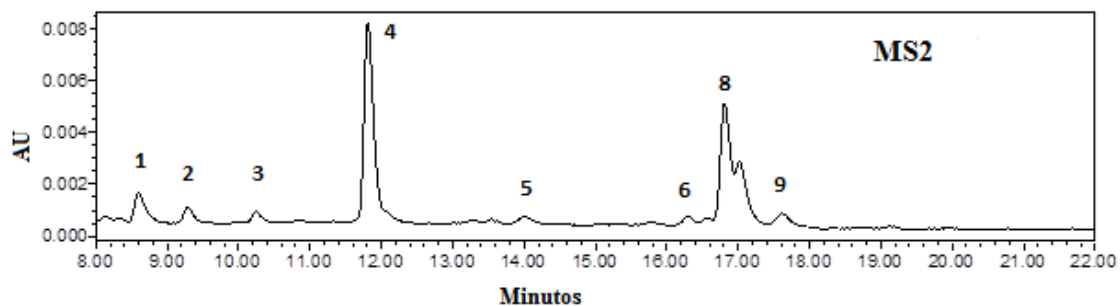


Figura IV.7. Cromatogramas HPLC-DAD de las fracciones aisladas a partir de AIR-M de *Cynara cardunculus*. Picos: 1: Desconocido; 2: Desconocido; 3: Sirínigico/ Ácido clorogénico; 4: Ácido monocateoilquínico; 5, 6 y 7: Desconocidos; 8: Apigenina-7-O-glucurónido; 9: Pinoresinol; 10: Desconocido.

Tabla IV.21. Identificación de polifenólicos en las fracciones aisladas a partir de AIR-M de brácteas.

Número de compuesto	Identidad asignada	Tiempo de retención (min)	Fórmula	MW
1	Desconocido	8,7		
2	Desconocido	9,4		
3	Ácido Sirínigico O-hexosido	10,2	$C_{15}H_{19}O_{10}$	359,10
	Ácido Clorogénico glicósido II	10,2	$C_{22}H_{27}O_{14}$	515,14
4	Ácido monocateoilquínico	11,8	$C_{16}H_{17}O_9$	353,09
5	Desconocido	13,9		
6	Desconocido	15,9		
7	Desconocido	16,3		
8	Apigenina 7-glucurónido I	16,8	$C_{21}H_{17}O_{11}$	445,08
9	Pinoresinol 4-O- β -D-glucósido		$C_{26}H_{31}O_{11}$	519,19
	Pinoresinol-acetilhexósido	17,6	$C_{28}H_{33}O_{12}$	561,20
	(+)-Pinoresinol		$C_{20}H_{21}O_6$	357,13
10	Desconocido	19,2		

Tabla IV.22. Identificación de polifenólicos en las fracciones aisladas a partir de a partir de AIR-M de tallo.

Número de compuesto	Identidad asignada	Tiempo de retención (min)	Fórmula	MW
1	Desconocido	8,7		
2	Desconocido	9,4		
3	Ácido sirínico O-hexosido	10,2	C ₁₅ H ₁₉ O ₁₀	359,10
	Ácido clorogénico glicósido II	10,2	C ₂₂ H ₂₇ O ₁₄	515,14
4	Ácido Monocafeoilquínico	11,8	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353,09
5	Desconocido	13,9		
7	Desconocido	16,3		
8	Apigenina 7-glucurónido I	16,8	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₁	445,08
	Pinoresinol 4-O-β-D-glucosido		C ₂₆ H ₃₁ O ₁₁	519,19
9	Pinoresinol-acetilhexosido	17,6	C ₂₈ H ₃₃ O ₁₂	561,20
	(+)-Pinoresinol		C ₂₀ H ₂₁ O ₆	357,13

IV.12. Distribución de la masa molecular de las fracciones aisladas a partir de AIR-M

La distribución de las masas moleculares de los polisacáridos en las fracciones aisladas fue evaluada por la técnica cromatográfica de permeación de gel (GPC).

La Tabla IV.23 muestra la masa molecular promedio en número (M_n), masa molecular promedio en peso (M_w), el índice de polidispersidad (M_w/M_n) y los tiempos de retención.

Las fracciones de tallo mostraron picos de pectinas de 397-806 kDa y picos de inulina de 1,5-8,0 kDa. Todas las fracciones de tallo presentaron un pico a los 25,5 min, el cual es atribuido a la inulina. Las fracciones MS1 y MS2 contenían pectinas de mayor masa molecular que las fracciones MS3 y MS4. Las fracciones MS1, MS2 y MS4 presentaron dos picos de inulina mientras que la fracción MS3 presentó sólo uno.

Para las fracciones de brácteas, se observaron picos de pectinas de 100-629 kDa y picos de inulina de 1,3-11,5 kDa. Los M_w s de las ocho muestras fueron diferentes (Tabla

IV.23), siendo las fracciones MS1, MS2 y MB4 las que tuvieron mayor masa molecular de pectina (721, 806 y 629 kDa, respectivamente). Las muestras MS3, MS4 y MB2 presentaron masas moleculares promedio en peso medias (397, 446 y 522 kDa, respectivamente) y MB1 y MB3 mostraron las menores masas moleculares (101 kDa, en ambos casos). Morris y col. (2000, 2008) reportaron que las masas moleculares de pectinas comerciales con diferentes grados de esterificación fueron constantes en el rango de 190-195 kDa.

Tabla IV.23. Masa molecular de las fracciones aisladas a partir de AIR-M de tallo y brácteas de alcaucil.

Tratamiento	M_n (Da)	M_w (Da)	M_z (Da)	Polidispersidad	Tiempo de retención (min)
MS1	529199	721273	896823	1,4	13,6
	4495	4670	4847	1,0	24,3
	1946	2932	4799	1,5	25,5
MS2	623163	806103	962909	1,7	13,6
	5204	5582	6006	1,1	24
	2015	3424	6404	1,7	25,5
MS3	139700	397291	769971	2,8	15,5
	1349	1471	1563	1,1	5,5
MS4	173144	445768	789951	2,6	15,6
	6872	8021	9326	1,2	23,5
	1331	1457	1544	1,1	25,5
MB1	66058	100621	145989	1,5	19,2
	8337	11555	14669	1,4	21,7
	1309	1553	1758	1,2	25,5
MB2	229963	521659	818687	2,3	15,3
	1818	2020	2737	1,1	25,3
MB3	87401	100969	114909	1,2	19,2
	6117	7225	8560	1,2	24
	1184	1345	1486	1,1	25,7
MB4	473382	629159	807972	1,3	15,8
	80391	102954	126587	1,3	19,2
	5958	7108	8524	1,2	23,8
	1315	1463	1588	1,1	25,6

Se informa el promedio en peso de la masa molecular (M_w), el promedio en número de masa molecular (M_n), promedio en relación al eje Z de la masa molecular (M_z) y el índice de polidispersidad (M_w/M_n).

De acuerdo con Azis y col. (1999) la inulina presenta una masa molecular promedio que va desde los 3000 hasta los 6000 Da pero Ronkart y col. (2007) informaron para inulina obtenida a partir de alcaucil, un grado de polimerización de 80 lo que significa un masa molecular de aproximadamente 13000 Da. El índice de polidispersidad tomó valores en un rango desde 1,0 hasta 2,8 siendo mayor para los picos de pectinas. El índice de polidispersidad de los polisacáridos naturales está generalmente en el rango de 1,5-2,0 (Fissore y col., 2013). Al comparar estos resultados con los M_w s encontrados para las fracciones aisladas a partir del AIR obtenido con calentamiento convectivo, se puede observar que el método de calentamiento utilizado para la obtención del AIR influyó en la distribución de las masas moleculares de los polisacáridos pero no se pudo detectar una tendencia clara. En particular, las fracciones obtenidas a partir de AIR-C mostraron pectinas con mayores M_w s que aquellas fracciones aisladas a partir de AIR-M: 397.291 y 445.768 Da para las fracciones MS3 y MS4, respectivamente versus 1.258.382 y 1.108.130 Da para las fracciones CS3 y CS4, respectivamente).

IV.13. Comportamiento reológico de las fracciones aisladas a partir de AIR-M

IV.13.1. Comportamiento de flujo de las fracciones aisladas a partir de

AIR-M

Las curvas de flujo fueron determinadas a 25°C bajo un incremento en la velocidad de deformación desde 0,001-100 rad.s⁻¹. La Figura IV.8 muestra las curvas obtenidas para los sistemas preparados con las fracciones aisladas a partir de tallo y en la Figura IV.9 las correspondientes a brácteas. Una cantidad de 40 mg Ca²⁺ por g de pectina fue agregado a todos los sistemas, los cuales contenían pectinas con un bajo grado de metilación (Tabla IV.19).

Todas las fracciones mostraron un comportamiento pseudoplástico y los datos obtenidos fueron ajustados con el modelo de Herschel Bulkley, con un esfuerzo de corte mínimo que varió desde 1,3 Pa para la fracción MB3 hasta 19,6 Pa para la fracción MB2. Como puede observarse en la Tabla IV.24 las fracciones de tallo dieron un mayor valor de k que las fracciones de brácteas. La fracción MS1 mostró la mayor capacidad de espesamiento con el mayor valor de k (27 Pa s^n) y el mayor esfuerzo mínimo de corte (14,5 Pa) mientras que la fracción MB4 fue la de menor consistencia (menor valor de k). Las viscosidades aparentes (20 s^{-1}) fueron en general mayores para las fracciones de tallo con excepción de la fracción MB2. Las fracciones MB2 y MB4 fueron las menos pseudoplásticas (mayor n) y la fracción MS3 tuvo el menor valor de n .

Cuando se compara con las fracciones obtenidas a partir del AIR obtenido con calentamiento convectivo, la mayor diferencia significativa se observó para la fracción MB4 que dió una curva de flujo por encima de la obtenida para la fracción CB4. Esto podría ser atribuido al mayor contenido de GalA e inulina y al menor GM en la fracción MB4. Por el contrario, la fracción MB1 dió una curva de flujo por debajo de la presentada por la fracción CB1 lo cual puede ser explicado por un menor contenido de GalA e inulina. Las curvas de flujo de la fracción MS1 se superponen con la curva correspondiente a la fracción CS1. También la curva presentada por MS2 se superpone con la correspondiente a CS2, teniendo ambas similares contenidos de GalA e inulina. Las otras fracciones dieron curvas similares presentando valores superiores a aquellas fracciones aisladas a partir de AIR-M que las fracciones análogas obtenidas a partir de AIR-C, pudiéndose explicar ello por un mayor contenido de GalA e inulina y menor GM en las fracciones obtenidas con AIR-M.

Es importante remarcar que las fracciones aisladas a partir de AIR-C contenían cantidades mayores de azúcares neutros de pectinas. Se sabe que la pectina es un

gelificante y un agente de espesamiento (Willats y col., 2006; Fissore y col., 2013) y al incrementar su contenido, sin duda, ella contribuye al comportamiento reológico. Con respecto a la inulina, Toneli y col. (2008) informaron que soluciones de inulina obtenida a partir de la raíz de achicoria aumentaban la viscosidad aparente cuando se incrementaban las concentraciones de inulina, sólidos totales y sólidos solubles. Estos resultados están en concordancia con los presentados por Bishay (1998), Nogueira (2001), Zimeri y Kokini (2003) y Bot y col. (2004), quienes informaron que para valores de sólidos del 15% o inferiores, la inulina presenta un comportamiento newtoniano. Sin embargo, a partir de un 25% de sólidos, la inulina comienza a mostrar un fuerte comportamiento de fluido pseudoplástico.

Tabla IV.24. Parámetros¹ del ajuste de los datos experimentales al modelo de Herschel Bulkley y viscosidad aparente de las fracciones aisladas a partir de AIR-M.

Tratamiento	η_a (Pa.s) 20 s ⁻¹	τ_0 (Pa)	k (Pa.s ⁿ)	n	R ²
MS1	5,3	14,5 ± 0,8 A	27 ± 1 A	0,41 ± 0,02 A	0,99
MS2	2,7	1,7 ± 0,4 B	17,1 ± 0,4 B	0,37 ± 0,02 A	0,99
MS3	1,9	12 ± 1 C	11 ± 1 C	0,28 ± 0,05 B	0,94
MS4	3,0	7,0 ± 0,5 D	16 ± 1 B	0,40 ± 0,03 A	0,98
MB1	0,6	5,2 ± 0,1 D	1,8 ± 0,1 D	0,45 ± 0,02 A	0,98
MB2	4,2	19,6 ± 0,5 A	9,0 ± 0,6 C	0,66 ± 0,08 C	0,93
MB3	0,5	1,3 ± 0,1 B	2,9 ± 0,1 E	0,39 ± 0,01 A	0,99
MB4	0,8	5,7 ± 0,7 D	1,2 ± 0,3 D	0,71 ± 0,06 C	0,95

¹Se muestra la media y el error estándar.

τ_0 : esfuerzo mínimo de corte; η_a : viscosidad aparente a un esfuerzo de corte de 20 s⁻¹;
k, Índice de consistencia; n: Índice de pseudoplasticidad; R²: bondad de ajuste (α :0,05).

Aunque esta concentración es superior a la presente en los sistemas acuosos usados para los ensayos de flujo de esta tesis, su contribución al comportamiento reológico puede explicarse por la acción sinérgica que ejerce sobre muchos agentes gelantes (Roberfroid, 2004) tales como la pectina.

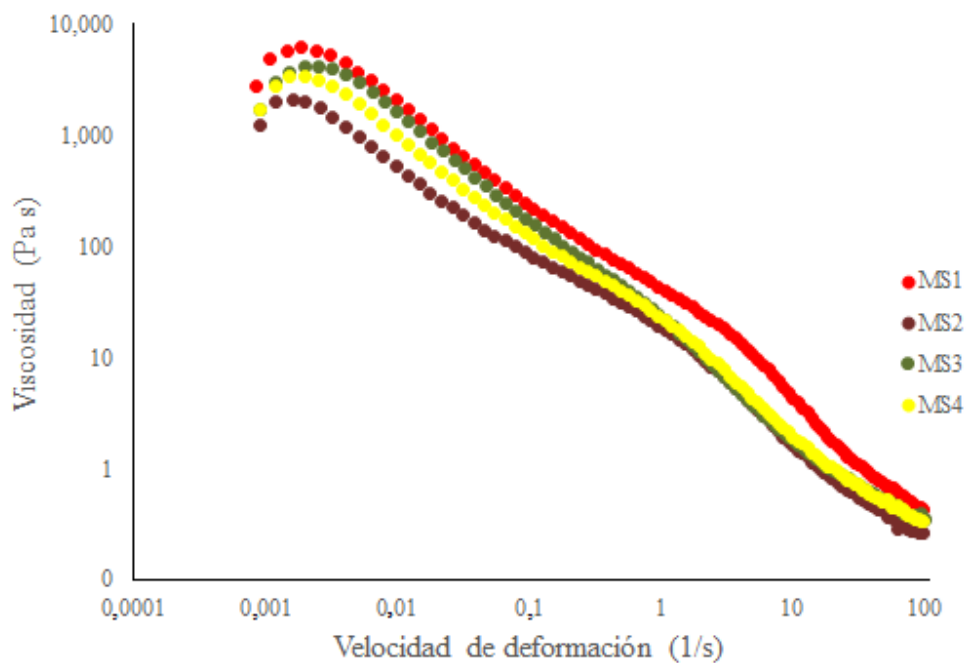


Figura IV.8. Comportamiento de flujo (25°C) de los sistemas acuáticos con calcio y conteniendo 2% (p/v) de las diferentes fracciones aisladas a partir de AIR-M de tallo.

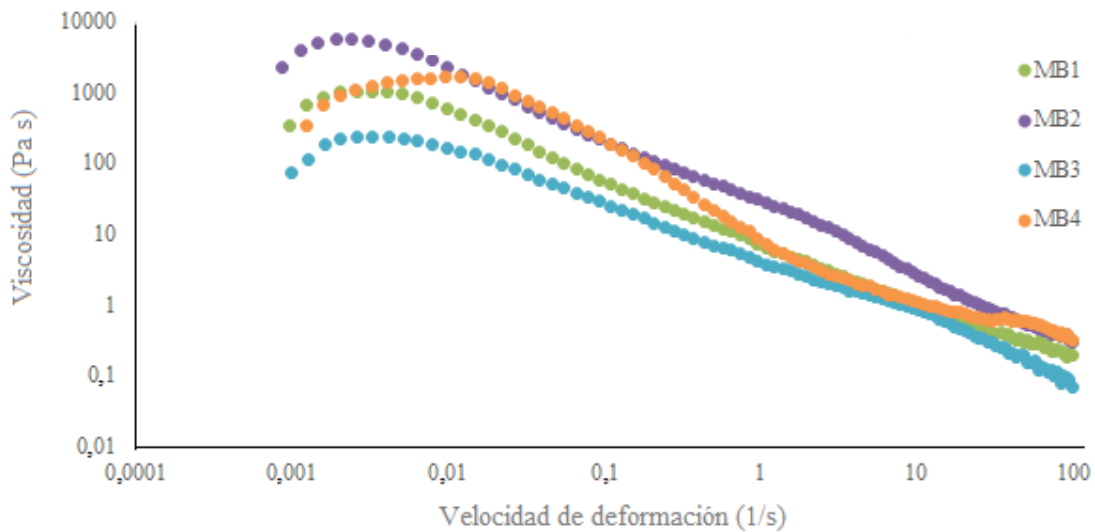


Figura IV.9. Comportamiento de flujo (25°C) de los sistemas acuosos con calcio y conteniendo 2% (p/v) de las diferentes fracciones aisladas a partir de AIR-M de brácteas.

IV.13.2. Propiedades reológicas oscilatorias para las fracciones aisladas de AIR-M

Los mismos sistemas utilizados en el ensayo previo fueron evaluados a través de un ensayo dinámico para la obtención del espectro mecánico y caracterización del material. Se realizó un barrido de amplitud a 25°C y a frecuencia constante de 1Hz para determinar la región viscoelástica lineal. Para trabajar en condiciones lineales, se utilizó un esfuerzo constante entre 1-7% en la realización de los barridos de frecuencia. En general, todos los sistemas mostraron $G' > G''$ con una muy pequeña dependencia de la frecuencia para G' y una dependencia mayor para G'' (Figuras IV.10 y IV.11).

La fracción MS1 mostró los mayores valores de G' y G'' . Para las fracciones de brácteas, G' mostró una pequeña dependencia de la frecuencia excepto para la fracción MB4, mientras que para G'' todas las fracciones mostraron dependencia de la frecuencia. El comportamiento observado corresponde al de los geles, con $G' > G''$ en

un orden de magnitud o más y una tendencia al cruce de los módulos a frecuencias altas. Las fracciones de tallo dieron geles más fuertes que las fracciones de brácteas, siendo la fracción MB3 la que dió lugar al gel más débil. Las fracciones MS1 y MS4, con mayor contenido de GalA, dieron los mayores valores de G' (geles más fuertes).

Con el fin de comparar estas fracciones con las que se obtuvieron a partir de AIR-C, se observa que, en general, las fracciones de tallo obtenidas a partir de AIR-M dieron geles más fuertes, lo cual se explica por su mayor contenido GalA. Lo mismo puede decirse para las fracciones de brácteas, excepto para la fracción MB1 cuyo G' (y el contenido de GalA) fue más bajo que para la correspondient fracción aislada a partir de AIR-C.

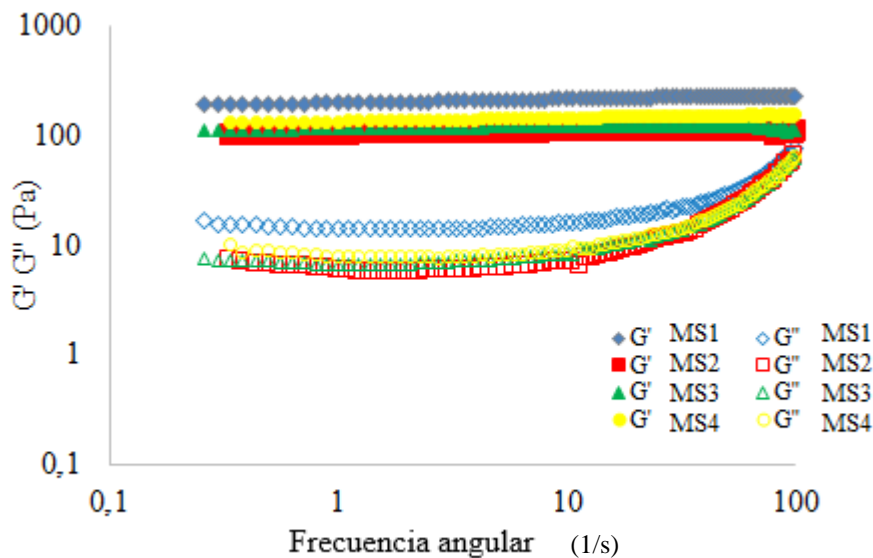


Figura IV.10. Espectro mecánico registrado en los ensayos dinámicos a 25°C para los sistemas acuosos con calcio y constituidos por 2,00% (p/v) de las diferentes fracciones aisladas de tallo. Símbolos llenos: modulo de almacenamiento (G'); símbolos vacíos: modulo de pérdida (G'').

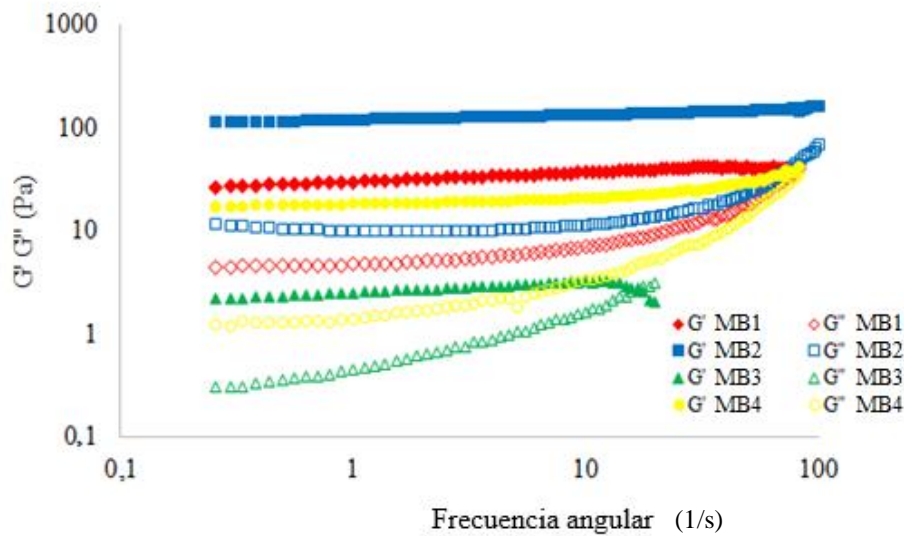


Figura IV.11. Espectro mecánico registrado en los ensayos dinámicos a 25°C para los sistemas acuosos con calcio y constituidos por 2,00% (p/v) de las diferentes fracciones aisladas de brácteas. Símbolos llenos: modulo de almacenamiento (G'); símbolos vacíos: modulo de pérdida (G'').

La diferencia más notable fue observada en las fracciones MB4 y CB4. Ésta última presentó un G' justo por encima de G'' y un cruce de los módulos a frecuencias cercanas a 4 s^{-1} , mientras que MB4 mostró un perfil de gel con $G' > G''$ en un orden de magnitud y un cruce de los módulos a altas frecuencias (Figura IV.11). Esta tendencia puede ser atribuida a los mayores contenidos de GalA e inulina y al menor GM de la fracción MB4.

IV.13.3. Ajuste a un modelo tipo Ley de la Potencia de los datos experimentales correspondientes a los espectros mecánicos

Los datos experimentales correspondientes al espectro mecánico fueron ajustados a un modelo tipo Ley de la Potencia (ecuaciones III.5 y III.6) y se evaluó el grado de

dependencia con la frecuencia (exponentes m y q) de los mismos. Los resultados de informan en las Tablas IV.25 y IV.26.

Tabla IV.25. Parámetros calculados¹ luego del ajuste de los datos experimentales de G' a un modelo de tipo Ley de la Potencia.

Fracción aislada	G' (Pa)		
	A	m	R^2
MS1	200,3 ± 0,3 A	0,033 ± 0,001 A	0,98
MS2	105,4 ± 0,1 B	0,018 ± 0,001 B	0,95
MS3	116,0 ± 0,3 C	0,018 ± 0,001 B	0,84
MS4	135,5 ± 0,2 D	0,030 ± 0,0004 A	0,99
MB1	30,4 ± 0,2 A	0,078 ± 0,002 A	0,94
MB2	118,4 ± 0,4 B	0,055 ± 0,001 B	0,97
MB3	2,54 ± 0,03 C	0,08 ± 0,007 A	0,76
MB4	17,4 ± 0,3 D	0,11 ± 0,01 C	0,84

¹Se muestra la media y error estándar.

R^2 : bondad de ajuste (α : 0,05).

Dentro de cada columna, y para cada tejido, diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Como puede observarse, los valores de A para G' fueron mayores que los de B para G'' confirmando un comportamiento de los sistemas de tipo gel (Kim y Yoo, 2006) especialmente para las fracciones MS1, MS2, MS3, MS4 y MB2. Los exponentes mostraron que G'' ($q \sim 0,4-1,3$) tuvo mayor dependencia que G' ($m \sim 0,01-0,1$) con la frecuencia. De acuerdo a Rao (1999), para geles verdaderos, la representación de $\log \omega$ versus $\log G'$ o $\log G''$ muestra muy baja pendiente, mientras que para geles débiles esos gráficos tienen pendientes positivas y G' es mayor que G'' en amplios rangos de ω .

Tabla IV.26. Parámetros calculados¹ a partir del ajuste de los datos experimentales de G'' a un modelo de tipo Ley de la Potencia.

Fracción aislada	G'' (Pa)		
	B	q	R^2
MS1	4,9 ± 0,8 A	0,52 ± 0,04 AC	0,73
MS2	0,16 ± 0,04 B	1,3 ± 0,1 B	0,91
MS3	4,2 ± 0,4 A	0,39 ± 0,03 A	0,78
MS4	1,5 ± 0,3 C	0,73 ± 0,04 C	0,81
MB1	0,14 ± 0,04 A	1,3 ± 0,1 A	0,92
MB2	1,3 ± 0,3 B	0,81 ± 0,04 B	0,80
MB3	0,36 ± 0,02 C	0,69 ± 0,02 C	0,98
MB4	0,37 ± 0,04 D	0,93 ± 0,04 B	0,95

¹Se muestra la media y error estándar.

R^2 : bondad de ajuste (α : 0,05).

Dentro de cada columna, y para cada tejido, diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

IV.13.4. Ajuste al Modelo de Maxwell de los datos experimentales correspondientes a los espectros mecánicos

La regresión no lineal de los datos experimentales al modelo de Maxwell produjo el mejor conjunto de valores para G_i junto con λ_i y el factor de escala λ_{i+1}/λ_i . Los resultados de este procedimiento numérico pueden ser convenientemente expresados a través de la distribución de los correspondientes tiempos de relajación $G_i(\lambda_i)$, que se reporta en la Figura IV.12.

Las muestras MS1, MB1 y MB2 necesitaron de 5 elementos, las muestras MS2 y MS3 necesitaron 4 elementos y las muestras MS4, MB3 y MB4 necesitaron de 3 elementos para ajustar el modelo de Maxwell.

Los valores de G_i y λ_i y el error medio porcentual ($\hat{\epsilon}\%$) entre los valores experimentales y los valores predichos de G' y G'' (Quintana, 2003) se informan en la Tabla IV.27. Los errores medios porcentuales ($\hat{\epsilon}\%$) dieron valores entre -0,6% y 0,5% para G' y desde -1,0 % y 0,5% para G'' , mostrando una alta concordancia entre los datos experimentales y los predichos lo cual muestra la adecuación del ajuste.

Se puede observar en la Figura IV.12 que los módulos de todas las muestras presentaron una marcada disminución entre 0,1 y 1 s, la cual fue más pronunciada para la fracción MB3, con alto contenido de azúcares neutros de la pectina. La comparación con el comportamiento presentado por las fracciones obtenidas a partir de AIR-C (Figura IV.6), permite concluir que estas fracciones mostraron un decaimiento mayor a tiempos de relajación de, aproximadamente, 2 s.

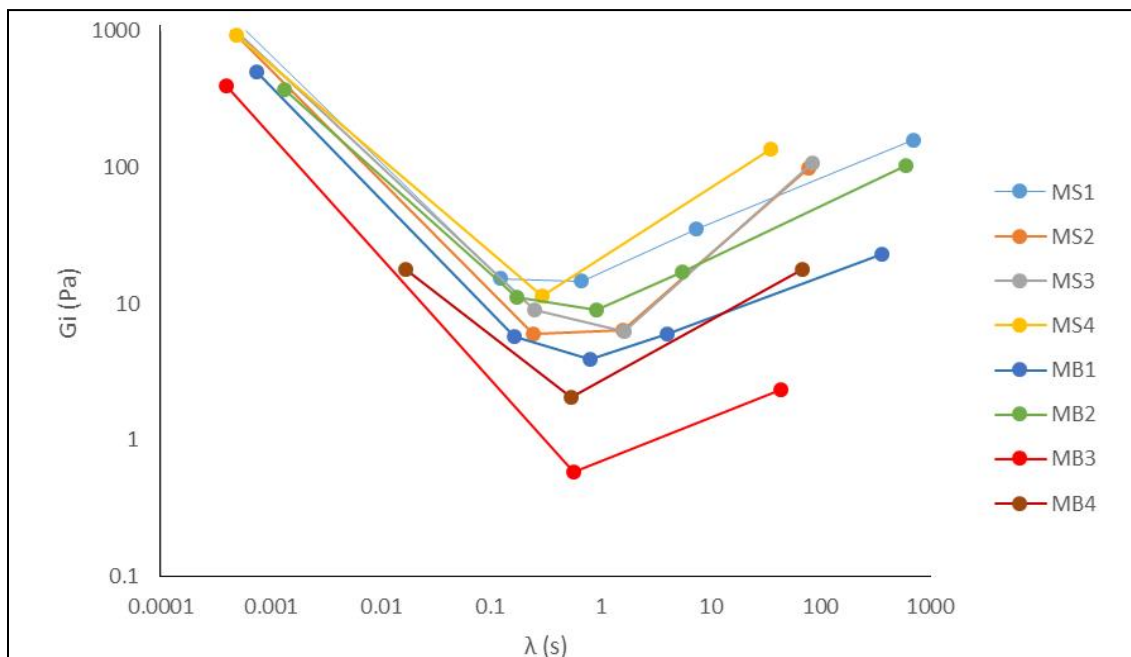


Figura IV.12. Distribución de los tiempos de relajación obtenidos a 25°C de sistemas acuosos con calcio y constituidos por 2,00 % (p/v) de las diferentes fracciones aisladas (MS1, MS2, MS3, MS4, MB1, MB2, MB3 y MB4).

Tabla IV.27. Parámetros calculados a través del ajuste de los datos experimentales al Modelo de Maxwell y error medio porcentual ($\hat{\epsilon}\%$) entre los módulos experimentales y los predichos para los diferentes sistemas acuosos de las fracciones.

Tratamiento	G_i (Pa)	λ_i (s)	CV	$\hat{\epsilon}\%$ (G')	$\hat{\epsilon}\%$ (G'')
MS1	1003	0,0006	0,0026	-0,052	-0,701
	15,33	0,1230			
	14,67	0,6698			
	35,18	7,34			
	160,1	704,6			
MS2	1257	0,0003356	0,0068	-0,036	0,049
	6,046	0,2456			
	6,464	1,617			
	99,38	77,66			
MS3	1296	0,0003493	0,00063	-0,648	0,1815
	9,011	0,2501			
	6,28	1,664			
	107,6	85,06			
MS4	941,5	0,0004895	0,062	0,188	-0,065
	11,51	0,2928			
	137,3	35,66			
MB1	505,4	0,0007418	0,0056	0,202	0,0044
	5,808	0,1665			
	3,948	0,7988			
	6,056	4,022			
	23,14	362,5			
MB2	375,3	0,001335	0,0044	0,1217	0,2214
	11,2	0,1729			
	8,969	0,9165			
	17,05	5,475			
	102,4	596			
MB3	401,4	0,0003971	0,1583	0,4616	0,254
	0,5804	0,5685			
	2,33	43,6			
MB4	17,72	0,01692	0,0226	-0,306	-1,05
	2,082	0,5419			
	18,01	67,65			

λ_i = tiempo de relajación

G_i = modulo plateau

CV = Coeficiente de variación

$\hat{\epsilon}\%$ = porcentaje de error para los módulos

IV.14. Conclusiones sobre las características químicas, físico-químicas y reológicas de las fracciones aisladas a partir de AIR-M

Las fracciones obtenidas a partir de AIR-M mostraron un alto contenido de inulina y de pectina de bajo grado de metilación. En presencia de calcio, estas fracciones presentaron un esfuerzo mínimo de corte y comportamiento pseudoplástico y formaron geles. Las fracciones obtenidas a partir de AIR-M de brácteas y usando hemicelulasa presentaron un comportamiento de gel débil.

Al realizar una comparación entre el uso de AIR-C y AIR-M para la obtención de las fracciones, se observa que aquéllas aisladas a partir de AIR-M presentan un mayor contenido de inulina, pectina y proteína en la mayoría de los casos y, en general, dan lugar a la formación de geles más fuertes. Por el contrario, un mayor grado de metilación se observó en las fracciones aisladas a partir de AIR-C. En consecuencia, la elección del método de calentamiento aplicado a la obtención del AIR dependerá de la aplicación a dar a estas fracciones.

Los resultados muestran que la obtención del AIR asistida por microondas es una interesante alternativa para ayudar a concentrar carbohidratos y antioxidantes a partir de los residuos de alcaucil. Se identificaron diversos compuestos polifenólicos a través de la utilización del análisis cromatográfico y de la espectrometría de masa en las fracciones aisladas a partir de AIR-M. En particular, se observaron derivados de ácido cafeoilquínico, apigenina y pinosinol.

IV.15. Actividad antioxidante de las fracciones obtenidas a partir de AIR-M y AIR-C

Debido a la presencia de compuestos polifenólicos en las fracciones obtenidas a partir de AIR-C y AIR-M y a los abundantes antecedentes bibliográficos acerca de la

influencia de dicha presencia en la actividad antioxidante de distintos subproductos vegetales (Heim y col., 2002; Metin Donma y Donma, 2005; Deng y col., 2006; Huyut y col., 2017; Nam y col, 2017), se estudió dicha actividad a través del ensayo de FRAP utilizando como estándar, el ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico o Trólox. Los resultados se pueden observar en la Figura IV.13.

Como se puede observar, todas las fracciones aisladas presentaron actividad antioxidante. Los valores más altos se obtuvieron para las fracciones aisladas de AIR de tallo (67,90 mg Trólox/100 g para la fracción MS2 y 67,50 mg Trólox/100 g para la fracción CS1) y los valores más bajos se obtuvieron para las fracciones obtenidas a partir de AIR-C de brácteas (24,20-38,30 mg Trólox/100g).

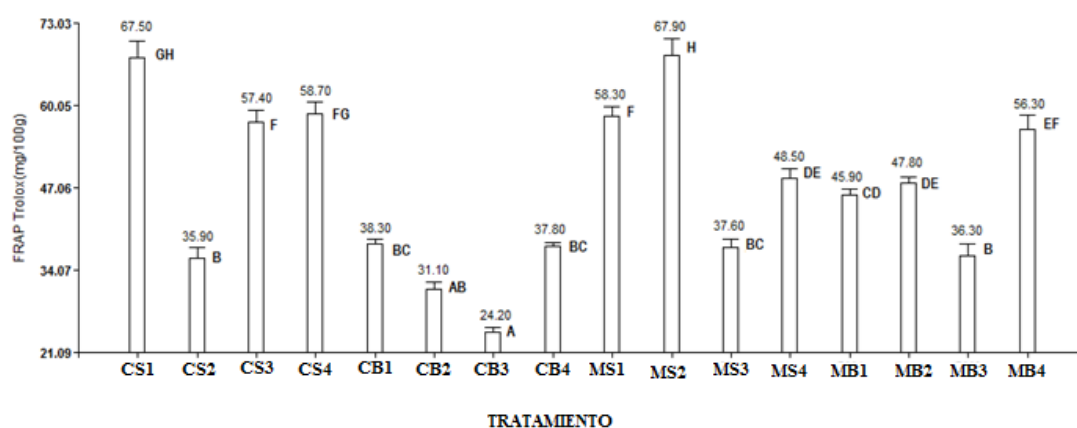


Figura IV.13. Poder antioxidante evaluado por la técnica de FRAP. Los datos son expresados como valores medios de tres mediciones (\pm SEM, error estándar de la media). Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Rubio-Senent y col. (2015) estudiaron la producción de pectinas solubles en agua a partir de residuos acuosos provenientes de la producción de aceite de oliva. Estos investigadores informaron un alto nivel de actividad antioxidante y de contenido de polifenoles en el producto lo que muestra su potencialidad para ser usado como fibra dietaria antioxidante. Chen y col. (2016) estudiaron por diseños de superficie de

respuesta la obtención de polisacáridos pécticos de cáscaras de mandarina usando extracción asistida por microondas y encontraron actividad antioxidante evaluada por la técnica de FRAP y DPPH.

La correlación entre el contenido de polifenoles totales (Tablas IV.8, IV.9, IV.19) y la actividad antioxidante evaluada por el método de FRAP, fue analizada a través de los coeficientes de Pearson para las fracciones aisladas a partir de AIR-C y AIR-M de brácteas y tallos. Como ya se comentó previamente, los coeficientes de correlación de los momentos de los productos de Pearson (PPMCC) toman valores desde -1 (dependencia negativa) a +1 (dependencia positiva). Esta correlación mide la fuerza de la relación lineal entre las variables evaluadas. Se evalúa también el p-valor correspondiente a la significación estadística de la correlaciones.

Se pudo observar que los polifenoles totales y la actividad antioxidante se correlacionaron positivamente (PPMCC=0,36, p=0,01). Gil y Rueda (2002) encontraron una correlación positiva (PPMCC > 0,9, p ≤ 0,05) entre las actividades antioxidantes que se determinaron con el ensayo de FRAP y el ensayo de fenoles totales en nectarinas, melocotones y ciruelas. Gardner y col. (2000) observaron una alta correlación entre fenoles totales y actividad antioxidante que fue determinada por FRAP en jugos de frutas. La capacidad antioxidante de los derivados de ácidos fenólicos depende normalmente del número de grupos hidróxilos y metóxidos unidos al anillo aromático. Por ejemplo, los polifenoles son más eficaces que los monofenoles, y los derivados de ácidos cinámicos exhiben una mayor capacidad antioxidante que su homólogo benzoico (Kim y Lee, 2004).

El ensayo de Folin-Ciocalteu utilizado para la evaluación del contenido total de polifenoles es afectado por sustancias interferentes, tales como ácidos orgánicos y azúcares (Singleton y col., 1999) lo cual introduciría cierta incertidumbre en la

evaluación de polifenoles totales y podría afectar la fuerza de esta correlación. Por otra parte, otros compuestos distintos a los polifenoles presentes en las fracciones podrían ser responsables de la capacidad antioxidante. También puede suceder que estas sustancias sean buenos secuestradores de radicales pero agentes reductores pobres, lo que también podría afectar los resultados.

Es importante destacar que se realizó el ensayo de DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) sobre las fracciones aisladas a partir de AIR-C y AIR-M para ambos tejidos. Este compuesto posee un radical libre debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, presentando un color violeta intenso típico el cual absorbe a 517 nm. La presencia de un compuesto con actividad antioxidante determina que el color violeta desaparezca (Blois, 1958). Sin embargo, las fracciones evaluadas no produjeron decoloración del color violeta, lo cual podría deberse a que la acción antiradicalaria de las mismas estaría por debajo del umbral de la reacción.

IV.16. Actividad prebiótica de las fracciones aisladas de AIR-C y AIR-M

Huebner y col. (2007) establecieron que la actividad prebiótica es la capacidad que tiene un ingrediente alimenticio de promover el crecimiento de un microorganismo en relación con otros microorganismos y con relación al crecimiento en sustratos no prebióticos, como glucosa. En consecuencia, los carbohidratos tienen una puntuación de actividad prebiótica positiva si ellos son fermentados al igual que la glucosa por cepas probióticas y además, si son fermentados selectivamente por probióticos pero no por otras bacterias intestinales.

Se estudió el incremento del número de células para las cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* luego de 48 h de crecimiento en las fracciones enriquecidas en fibras solubles al 1% (p/v) o en glucosa al 1% (p/v). El mismo procedimiento se utilizó para

estudiar el crecimiento de *E. coli*, el cual fue elegido para representar la porción entérica de la flora comensal. De este modo se calcularon los puntajes de la actividad prebiótica (PAS) derivados de las densidades celulares (ecuación III.12) para las diferentes muestras.

En la Tabla IV.28 se pueden observar los puntajes de la actividad prebiótica (PAS) para las diferentes muestras.

Todos los scores fueron positivos. Un PAS negativo significa que la cepa ensayada crece menos con el prebiótico que con glucosa y/o tiene un menor crecimiento en el prebiótico que el microorganismo entérico utilizando el mismo carbohidrato prebiótico.

Para *B. bifidum* se observaron PAS con valores de 0,01- 1,04 y para *L. plantarum* los valores fueron 1,34- 2,87. El mayor PAS fue para la fracción MS3 (2,87) seguido por CS4 (2,84) y MB3 (2,62) al utilizar la cepa *L. plantarum*. Cuando se utilizó la cepa *B. bifidum* los mayores scores fueron para las fracciones CB1 (1,04), CS1 (1,00) y CB2 (0,88).

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en las puntuaciones de las actividades prebióticas entre el crecimiento de las dos cepas, siendo los valores de *L. plantarum* mayores que los obtenidos para *B. bifidum*. Por ejemplo, *L. plantarum* tuvo un PAS mayor (2,08) para CB3 comparado con *B. bifidum* (0,03) y lo mismo se puede decir para otras fracciones ensayadas. Esto indica que existirían diferencias en sus capacidades metabólicas.

Tabla IV.28. PAS of *Bifidobacterium bifidum* 11863 and *Lactobacillus plantarum* 8114 sobre diferentes fracciones a partir de AIR-C y AIR-M.

Fracción	<i>Bifidobacterium bifidum</i> 11863	<i>Lactobacillus plantarum</i> 8114
CS1	1,00 ± 0,19 ef	1,40 ± 0,15 ab
CS2	0,69 ± 0,15 cde	1,67 ± 0,26 abc
CS3	0,71 ± 0,13 cdef	1,91 ± 0,28 abcde
CS4	0,25 ± 0,04 ab	2,84 ± 0,30 f
CB1	1,04 ± 0,18 f	2,10 ± 0,25 abcdef
CB2	0,88 ± 0,15 def	1,95 ± 0,24 abcde
CB3	0,03 ± 0,01 a	2,08 ± 0,23 abcdef
CB4	0,66 ± 0,11 cd	2,19 ± 0,24 bcdef
MS1	0,74 ± 0,13 cdef	1,34 ± 0,16 a
MS2	0,05 ± 0,01 a	1,49 ± 0,48 abc
MS3	0,01 ± 0,01 a	2,87 ± 0,27 f
MS4	0,31 ± 0,05 ab	2,54 ± 0,26 def
MB1	0,09 ± 0,02 a	1,80 ± 0,22 abcd
MB2	0,07 ± 0,01 a	1,65 ± 0,19 abc
MB3	0,54 ± 0,09 bc	2,62 ± 0,23 ef
MB4	0,69 ± 0,14 cde	2,28 ± 0,30 cdef

Dentro de cada columna, diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Las fracciones MS3, MS4, MB3 y MB4 obtenidas en presencia de hemicelulasa o con ambas enzimas a partir de AIR-M, mostraron los mayores PAS para *L. plantarum* al igual que las fracción CS4.

En general, los mayores PAS para *B. bifidum* fueron observados en las fracciones obtenidas a partir de AIR-C excepto para las fracciones MS4, MB3 y MB4.

De acuerdo a Huebner y col. (2007), no está claro cuáles son los carbohidratos prebióticos más adecuados para el crecimiento selectivo de cepas específicas. El Kaoutari y col. (2013) observaron que la hidrólisis de la pectina da lugar a la liberación de compuestos bioactivos que se encontraban unidos a ella lo cual contribuiría al mayor

desarrollo de cepas bacterianas probióticas. Por otra parte es sabido que la inulina, presente en las fracciones evaluadas, tiene actividad prebiótica (Roberfroid y Delzenne, 1998). El efecto bifidogénico de la inulina y de la oligofruktosa ha sido también comprobado (Wang y Gibson, 1993; Gibson y Roberfroid, 1995; Gibson y col., 1995; Djouzi y Anmdrieux, 1997; Roberfroid y Delzenne, 1998; Roberfroid, 2007; Pinheiro de Souza Oliveira y col., 2011). Olano-Martín y col. (2002) informaron que diferentes bifidobacterias crecieron mejor sobre moléculas más pequeñas como los oligosacáridos derivados de pectinas que sobre pectinas, mostrando los primeros un efecto prebiótico que promovió el crecimiento de bifidobacterias con un nulo incremento en el número de bacterias potencialmente patogénicas. Estos autores también concluyeron que el grado de metilación juega un rol importante en los procesos fermentativos, siendo las pectinas altamente metiladas las que producen menores velocidades de crecimiento microbiano.

Hongpattarakere y col. (2012) informaron que en presencia de prebióticos, son producidos por fermentaciones anaeróbicas, varios ácidos grasos de cadena corta (SCFA) y lactato, los cuales suprimirían el crecimiento de bacterias intestinales patogénicas. Estos SCFA también suplen de energía al epitelio colónico y modulan el metabolismo lipídico (Topping y Clifton, 2001 y Hongpattarakere y col., 2012). Varios estudios (Gibson y Robertfroid, 1995 y Niness, 1999) han sido reportados acerca de los beneficios saludables de las bifidobacterias, tales como: inhibir el crecimiento de las bacterias peligrosas, estimular el componente del sistema inmune, la absorción de ciertos iones y la síntesis de las vitaminas del grupo B.

IV.17. Actividad antiviral de las fracciones aisladas de AIR-C y AIR-M

En varios estudios se informó que las plantas medicinales tradicionales tienen fuerte actividad antiviral. Aunque un gran número de nuevos componentes han sido aislados sólo algunos de ellos son comercializados como productos farmacéuticos (Patra, 2012). Las fracciones extraídas a partir de AIR-C y AIR-M fueron inicialmente testeadas en cuanto a su citotoxicidad a través de la evaluación de su efecto en la viabilidad de células Vero. Como se observa en la Tabla IV.29, el CC_{50} para las fracciones obtenidas a partir de AIR-C tomó valores desde 2,5 a > 5 mg/ml mientras que las fracciones obtenidas a partir de AIR-M mostraron valores de $CC_{50} > 5$ mg/ml.

Luego, las fracciones fueron estudiadas en cuanto a su actividad antiviral hacia la cepa F del virus HSV-1 a través de un ensayo en placa de reducción de virus sobre células Vero. Entre las fracciones aisladas a partir de AIR-C, CS1-CS4 fueron las más activas con valores de IC_{50} de 0,71 a 0,79 mg/ml, mientras que CB1 y CB2 no mostraron un efecto inhibitorio hacia HSV-1 hasta una concentración de 1,25 mg/ml. En general, las fracciones obtenidas a partir del AIR-C de brácteas mostraron un mayor IC_{50} que las fracciones aisladas a partir de AIR-C de tallo.

Con respecto a las fracciones obtenidas a partir de AIR-M, todas ellas mostraron efecto antiherpético con valores de IC_{50} en el rango de 0,61 a 1,16 mg/ml, con la excepción de MB1 que se mostró inactiva hasta la mayor concentración testada (1,25 mg/ml). En el caso de AIR-M, la diferencia de comportamiento entre fracciones provenientes de brácteas y tallos no mostró una tendencia clara.

Tabla IV.29. Citotoxicidad y actividad antiviral de las fracciones solubles extraídas a partir de AIR-M y AIR-C.

Fracciones	CC ₅₀ (mg/ml)	IC ₅₀ (mg/ml)	IS (CC ₅₀ / IC ₅₀)
CS1	2,5	0,71 ± 0,01	3,5
CS2	2,5	0,71 ± 0,12	3,5
CS3	2,8	0,73 ± 0,15	3,8
CS4	2,6	0,79 ± 0,06	3,3
CB1	3,2	> 1,25	-
CB2	3,6	> 1,25	-
CB3	3,4	1,25 ± 0,10	2,7
CB4	>5	1,25 ± 0,20	> 4
MS1	>5	0,61 ± 0,02	> 8,2
MS 2	5	0,64 ± 0,02	7,8
MS3	>5	0,73 ± 0,04	> 6,8
MS4	>5	1,00 ± 0,27	> 5
MB1	> 5	>1,25	-
MB2	> 5	1,16 ± 0,13	> 4,3
MB3	>5	0,71 ± 0,12	7,1
MB4	>5	0,83 ± 0,06	6,0

CC₅₀: concentración citotóxica 50 %.
 IC₅₀: concentración inhibitoria 50 %.
 IS: índice de selectividad (CC₅₀/ IC₅₀).
 Promedio y desvío estándar (n=3).

Dada la baja citotoxicidad exhibida por todas las fracciones, el índice de selectividad (IS= CC₅₀/ IC₅₀) tomó valores entre 2,7 y >8,2, indicando la especificidad del efecto inhibitorio de este tipo de compuestos hacia el virus del herpes.

Suarez y col. (2010) evaluaron la actividad antiviral hacia el HSV-1 de extractos metanólicos (ME) y acetónicos (AE) de bagazo de manzana. Los valores de CC_{50} obtenidos para estos extractos sobre células Vero fueron 5,49 mg/ml y 7,28 mg/ml para los extractos AE y ME, respectivamente. Además, el IC_{50} mostró valores de $576,7 \pm 17,2$ μ g/ml y $710,9 \pm 1,6$ μ g/ml para los extractos de AE y ME, respectivamente. Consecuentemente, el valor IS fue de alrededor de 10.

Fissore y col. (2014) estudiaron la actividad antiviral contra HSV-1 de fracciones aisladas a partir de CWM de brácteas, tallo y corazón en presencia o no de hemicelulosa, observando valores de IS entre $> 6,8$ a $>55,4$. En cambio, las fracciones obtenidas a partir de AIR-C de brácteas y tallos en la presente investigación mostraron baja selectividad y sólo las fracciones MS1, MS2, MS3, MB3 y MB4 obtenidas a partir de AIR-M presentaron valores de IS superiores a 6, indicativos de un efecto inhibitorio específico hacia HSV-1.

Chiang y col. (2002) evaluaron compuestos puros en relación a la actividad antiviral. El ácido clorogénico y el ácido cafeico presentaron una fuerte actividad antiviral; el ácido clorogénico fue activo a través del herpesvirus HSV-1, HSV-2 y adenovirus VAD-3, VAD-8 y VAD-11. Otros compuestos como baicaleína, baicalina, ácido ferúlico, ácido p-cumárico y ácido vanílico fueron activos sobre, al menos, alguno de los virus testeados. Los autores encontraron que los compuestos conteniendo más de un grupo hidroxilo (ácido cafeico, ácido clorogénico) tuvieron una actividad antiviral más potente que los compuestos con un solo grupo hidróxilo (ácido ferúlico, ácido p-cumárico).

En varias investigaciones, la caracterización de ingredientes antivirales activos reveló un amplio rango de diferentes clases estructurales, por ejemplo, flavonoides, taninos, lignanos, terpenos, nafto- y antraquinonas, polisacáridos, proteínas y péptidos, los cuales actuaban como potentes inhibidores de HSV (Jassim y Naji, 2003).

Con respecto a los polisacáridos la literatura, en general, informa la actividad antiviral de polisacáridos sulfatados como el galactofucano (Thompson y Dragar, 2004). Sin embargo, un polisacárido pectico obtenido a partir de *Portulaca oleracea* mostró actividad antiviral contra HSV-2 y un arabinogalactano obtenido a partir de hojas de *Stevia rebaudiana* mostraron tener efecto *in vitro* contra HSV-1 (Dong y col., 2010; Olivera y col., 2013). Por otra parte, fructanos con actividad antiviral han sido aislados de Chikuyo-Sekko-To, la hierba usada en la medicina china medicinal tradicional (Liu y col, 2004; Lee y col., 2011) que consiste en siete drogas crudas de las partes aéreas de *Lophatherum gracile*, raíces de *Panax ginseng*, raíces de *Glycyrrhiza glabra*, raíces de *Ophiopogon japonicus*, raíces tuberosas de *Pinellia ternata*, semillas de *Oryza sativa* de gypsum y de *Polygonatum cyrtonema* Hua.

De acuerdo a lo antedicho, es necesario un mayor desarrollo de la investigación para poder identificar el principio activo en las fracciones estudiadas así como el mecanismo de acción antiviral.

IV.18. Conclusiones sobre la actividad antioxidante, antiviral y prebiótica de las fracciones aisladas a partir de AIR-C y AIR-M

La utilización de calentamiento convectivo o asistido por microondas para la obtención del residuo insoluble en alcohol (AIR-C o AIR-M) permitió obtener 16 fracciones, presentando trece de las mismas, actividad anti HSV-1. La mayor efectividad se observó para las fracciones obtenidas a partir de AIR-M y, particularmente, las fracciones obtenidas de AIR-M de tallo mostraron las actividades antivirales más selectivas.

Las fracciones presentaron actividad antioxidante, evaluada por el método de FRAP, que podría atribuirse a la presencia de compuestos polifenólicos.

Estas fracciones también sirvieron como una alternativa de fuente de carbono para bacterias probióticas, probablemente debido a su alto contenido de inulina u otros componentes de pared celular como pectina u oligosacáridos de ácidos galacturónicos. El *score* o puntaje de actividad prebiótica (PAS) que describe el grado en el cual las fracciones aisladas pueden proporcionar un crecimiento selectivo de lactobacilos y bifidobacterias, mostró los mayores valores para *L. plantarum* que creció en un medio enriquecido con las fracciones aisladas a partir de AIR-M de tallo y con el uso de la enzima hemicelulasa (PAS: 2,87) y para *B. bifidum* que creció en un medio enriquecido con la fracción aislada a partir de AIR-C de brácteas sin uso de enzima (PAS: 1,04).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES GENERALES

V. Conclusiones generales

A continuación se reseñan las investigaciones realizadas y las conclusiones obtenidas.

a) Acción de buffer/hemicelulasa/proteasa para la obtención de fracciones enriquecidas en fibra soluble a partir de brácteas y tallos de *Cynara cardunculus*. Uso de calentamiento convectivo en la preparación del material base.

Se evaluó la acción de buffer/hemicelulasa/proteasa para la obtención de fracciones enriquecidas en fibra soluble a partir del tejido de brácteas y tallos de alcaucil (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*). El material base para la obtención de las fracciones fue el residuo insoluble en alcohol (AIR) de los tejidos, obtenido mediante calentamiento convectivo (AIR-C). El diseño experimental consistió en un diseño simplex de dos factores utilizando proteasa en cantidades variables entre 0 y 200 μL y hemicelulasa en cantidades entre 0 y 200 mg para 5 g de material. Se exploró el efecto de 5 h de tratamiento con buffer/hemicelulasa/proteasa a 40 °C en el rendimiento y la composición química de las fracciones aisladas. Las fracciones obtenidas contenían inulina y pectina. En general, los contenidos de proteína, inulina y polifenoles eran más altos en las fracciones provenientes de tejidos del tallo. El rendimiento y la composición de las fracciones fue afectado por el tejido usado y el nivel de hemicelulasa y proteasa; en general, los niveles más altos ensayados fueron los más efectivos para obtener un mayor rendimiento y mayor contenido de carbohidratos. En general, la hemicelulasa mostró un efecto más marcado que la proteasa y ejerció un efecto positivo en el contenido de carbohidratos de las fracciones. La inclusión de una etapa de precalentamiento (5 min a 70°C) produjo un aumento del rendimiento y del contenido de inulina para las fracciones obtenidas de brácteas y tallos y disminuyó los contenidos de proteína y polifenoles y, para brácteas, de ácido galacturónico. Estas fracciones, en

general, contenían los compuesto polifenólicos ácido monocafeoilquínico, apigenina y pinoresinol. Los resultados obtenidos mostraron la conveniencia de incluir la etapa de pre-calentamiento en las obtenciones posteriores debido a su efecto en el aumento del rendimiento.

b) Comportamiento reológico de fracciones de fibra dietaria aisladas de residuos de *Cynara cardunculus*. Uso de calentamiento convectivo en la preparación del material base. Aplicación de etapa de precalentamiento antes del tratamiento de obtención con buffer citrato/proteasa/hemicelulasa.

Se estudió el comportamiento reológico de las fracciones aisladas de brácteas y tallo del alcaucil utilizando un pretratamiento térmico seguido de procesamiento con buffer citrato (pH 5.2) (CS1, CB1) o buffer/proteasa (CS2, CB2) o hemicelulasa (CS3, CB3) o ambas enzimas (CS4, CB4). Sus sistemas acuosos (2,00% p/v) en presencia de Ca^{2+} (40 mg/g pectina), presentaron comportamiento pseudoplástico de flujo con esfuerzo de corte inicial en el caso de CB2, CB3 o CS3. Las fracciones extraídas en presencia de buffer citrato mostraron las mayores viscosidades (CB1, CS1). Los ensayos reológicos realizados bajo condiciones dinámicas, mostraron la formación de redes de tipo gel con diferente tiempo de vida media de las uniones calcio. Éstas se vieron favorecidas en su estabilidad, en general, por un mayor contenido de pectina, de inulina, de la proporción de homogalacturonano respecto a los azúcares neutros de la pectina y por el menor grado de metilación (GM).

c) Extracción de fracciones enriquecidas en pectina e inulina a partir de tejidos de *Cynara cardunculus*. Uso de calentamiento asistido por microondas en la preparación

del material base. Aplicación de etapa de precalentamiento antes del tratamiento de obtención con buffer/hemicelulasa/proteasa.

Se aislaron diferentes fracciones dietarias a partir de los residuos de la industrialización (bracteas y tallos) de alcaucil (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*). El calentamiento asistido por microondas se utilizó para obtener el residuo insoluble en alcohol (AIR-M), material base para la obtención de las fracciones a estudiar. Se aplicó una etapa de precalentamiento (5 min a 70°C) antes del tratamiento con buffer/hemicelulasa/proteasa para obtener las fracciones. Se caracterizaron las mismas y se compararon los resultados con los obtenidos cuando se utilizó como material base para el aislamiento, el residuo insoluble en alcohol obtenido con calentamiento convectivo (AIR-C).

Las fracciones mostraron estar enriquecidas en pectina e inulina. Se observaron efectos específicos de las enzimas utilizadas para el aislamiento de las fracciones en cuanto a contenido de polisacáridos, masa molecular promedio y comportamiento viscoelástico de sus sistemas acuosos. Las fracciones formaron geles en la presencia de calcio a temperatura ambiente y presentaron un color amarillento.

Las características de las fracciones se encontraban condicionadas por el método de calentamiento usado en la obtención del AIR. El tratamiento con microondas permitió la extracción de mayores cantidades de inulina, pectina y proteína en la mayoría de las fracciones. Por el contrario, los más altos grados de metilación se observaron en las fracciones obtenidas a partir del AIR-C. En consecuencia, la elección del método de calentamiento usado en la obtención del AIR dependerá del uso específico deseado para las fracciones o sea de las propiedades deseadas.

d) Propiedades funcionales de las fracciones enriquecidas en inulina y pectina aisladas de brácteas y tallos de *Cynara cardunculus*. Uso de calentamiento asistido por convección o por microondas en la preparación del material base. Aplicación de etapa de precalentamiento antes del tratamiento con buffer/hemicelulasa/proteasa.

Las fracciones aisladas de brácteas y tallos de alcaucil se evaluaron en cuanto a su actividad antioxidante, antiviral y prebiótica.

Las fracciones mostraron actividad antioxidante. Una mayor diversidad de picos de compuestos polifenólicos se observaron en las fracciones aisladas a partir de AIR-M que en aquellas obtenidas a partir de AIR-C. En particular, se observaron ácido cafeoilquínico, apigenina y derivados de pinosinol. La capacidad antioxidante evaluada por el ensayo de FRAP (poder antioxidante para reducir el hierro) correlacionaba positivamente con el contenido total de compuestos polifenólicos.

El virus herpes simplex tipo-1 (HSV-1) se utilizó para evaluar el efecto de las fracciones aisladas en el desarrollo del virus en líneas celulares Vero. Trece de las 16 fracciones estudiadas, presentaron actividad anti HSV-1. La mayor efectividad se observó para las fracciones obtenidas a partir de AIR-M. Particularmente, las fracciones obtenidas de AIR-M de tallos mostraron la actividad antiviral más selectiva.

La actividad prebiótica se evaluó utilizando *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium bifidum* y *Escherichia coli* y usando el ensayo de *score* o puntaje de actividad (PAS). El mayor PAS (2,87) se observó para *L. plantarum* y fue desarrollado por la fracción aislada de tallos mediante el uso de AIR-M y usando hemicelulasa (MS3) seguido por la fracción aislada de brácteas a partir del AIR-C y usando el buffer citrato únicamente (CB1), la cual mostró un PAS de 1,04 con respecto a *B. bifidum*.

Se puede concluir que los residuos del alcaucil (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*) son un interesante material para ser utilizado en la producción de aditivos e ingredientes para la industria de alimentos, farmacéutica o cosmética dado que las fracciones aisladas, ricas en fibras solubles presentan actividad antioxidante, prebiótica y antiviral, poseen potencial como ingredientes nutritivos y aditivos espesantes y gelificantes naturales.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdul-Hamid A. y Luan Y.S. (2000). Functional properties of dietary fibre from defatted rice bran. *Food Chemistry*, 68, 15-19.

- Abu-Reidah I.M., Arráez-Román D., Segura-Carretero A. y Fernández-Gutiérrez A. (2013). Extensive characterization of bioactive phenolic constituents from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS. *Food Chemistry*, 141, 2269–2277.

- ANMAT. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (2002). ANMAT. LOS ALIMENTOS FUNCIONALES: ¿COMIDA QUE CURA?. Salud para Todos. Año 10, N° 110.

- Aguilera J.M. y Stanley D.W. (1990). *Microstructural Principles of Food Processing & Engineering*. Elsevier Applied Science, Essex, England.

- Ajila C.M. y Rao U. J. S. P. (2013). Mango peel dietary fibre: Composition and associated bound phenolics. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 444–450.

- Alonso-Mougan M., Mejjide F., Jover A., Rodríguez-Nuñez E. y Vázquez-Tato J. (2002). Rheological behaviour of an amide pectin. *Journal of Food Engineering*, 55, 123-129.

- Alvarado A.C. y Mendoza L.M. (2002). Posibles efectos citotóxicos de sustancias aisladas de diferentes especies vegetales colombianas. *Microbiología industrial*. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias. Departamento de Microbiología Industrial Bogotá. 89p.

- Angel A.C. (1999). Estudio fitoquímico preliminar, toxicidad y determinación de la actividad antitumor de extractos etanólicos de *Cucumis dipsauceus*. *Química farmacéutica*. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Química Farmacéutica. Bogotá. 81 p.

- Asen S. y Horowitz R.M. (1974). Apigenin 4'-O-β-D-glucoside 7-O-β-D)-glucuronide: The copigment in the blue pigment of *Centaurea cyanus*. *Phytochemistry*, 13, 1219–1223.

- Aureli P., Capurso L., Castellazzi A.M., Clerici M., Giovannini M., Morelli L., Poli A., Pregliasco F., Salvini F. y Zuccotti G.V. (2011). Probiotics and health: an evidence-based review. *Farmacological research*, 63(5),366-76.

- Ávila E. (1987). El alcaucil, planta hortícola y medicinal. Editorial El Ateneo.

- Azis B.H., Chin B., Deacon M.P., Harding S.E. y Pavlov G.M. (1999). Size and shape of inulin in dimethyl sulphoxide solution. *Carbohydrate Polymers*, 38, 231–234.

- Baby Latha R., Bhat K.K. y Bhattacharya S. (2002). Rheological behaviour of steamed rice flour dispersions. *Journal of Food Engineering*, 51, 125-129.

- Barnes H.A., Hutton J.F. y Walters K. (1991). An Introduction to Rheology. (3ra Edición) Amsterdam: Elsevier, pp. 210.

- Benzie I.F.F. y Strain J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Journal Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.

- Berghofer E. (1993). Pilot-scale production of inulin from chicory roots and its use in food stuffs. *Studies in Plant Science*, 77-84.

- Biedrzycka E. y Bielecka M. (2004). Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. *Trends Food Science Technology*, 15, 170-175.

- Bird R.B., Armstrong R. y Hassager O. (1977). Dynamic of Polymeric Liquid. Vol I. New York: John Wiley & Sons.

- Bishay I. E. (1998). Rheological characterization of inulin. En: Gums and Stabilizers for the Food Industry (Eds. Williams P. A.; Phillips G. O.). Vol. 9, Royal Society of Chemistry, London.

- Blois M.S. (1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, 181, 1199 – 1200.

- Bocco A., Cuvelier M., Richard H. y Berset, C. (1998). Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2123–2129.

- Bot A., Erle U., Vreeker R. y Agterof W. G. M. (2004). Influence of crystallisation conditions on the large deformation rheology of inulin gels. *Food Hydrocolloid*, 18(4), 547-556.

- Bourne, M. (2002). Food Texture and Viscosity. Concept and Measurement. Elsevier, Holanda.
- Braccini I., y Pérez S. (2001). "Molecular basis of Ca²⁺ - induced gelation in alginates and pectins: the Egg-Box Model revisited." *Biomacromolecules*, 2, 1089-1096.
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E. y Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science Technology*, 28, 25-30.
- Bravo L., Mañas E. y Saura-Calixto F. (1993). Dietary non-extractable condensed tannins as indigestible compounds; effects on faecal weight, protein and fat excretion. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 63, 63-68.
- Bravo L., Goya L. y Lecumberry E. (2007). LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. *Food Research International*, 40, 393-405.
- Brett C.T. y Waldron K.W. (1996). The Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls (second edition). London, UK: Chapman and Hall pp. 26-32.
- Brian W. (1994). Microwave assisted extraction. *American Laboratories* 34-40.
- Brigand G., Denis A., Grall M. y Lecacheux D. (1990). Insight into the structure of pectin by high performance chromatographic methods. *Carbohydrate Polymers*, 12, 61-77.
- Brownleader M.D., Jackson P., Mobasher A., Pantelides A.T., Sumar S., Trevan M. y Dey P.M. (1999). Molecular aspects of cell wall modifications during fruit ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 39 (2), 149-164.
- Brummell D.A. (2006). Cell wall disassembly in ripening fruit. *Functional Plant Biology*, 33, 103-119.
- Bunzel, M., Ralph, J., Marita, J., Steinhart, H (2000). Identification of 4-O-5'-coupled diferulic acid from insoluble cereal fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48, 3166-3169.
- Caffall K.H. y Mohen D. (2009). The structure, function and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 344, 1879-1900.

- Cameron R., Luzio G., Vasu P., Savary B. y Williams M. (2011). Enzymatic modification of a model homogalacturonan with the thermally tolerant pectin methylesterase from citrus: 1. Nanostructural characterization, enzyme mode of action, and effect of pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 2717-2724.

- Caprez A., Arrigoni E., Neukom H. y Amado R. (1987). Improvement of the sensory properties of two different dietary fiber sources through enzymatic modification. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technology*, 20, 245-250.

- Cárdenas A., Higuera-Ciapara I. y Goycoolea F.M. (1997). Rheology and Aggregation of Cactus (*Opuntia ficus-indica*) Mucilage in Solution. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 1, 152-199.
- Carpita N.C. y McCann M.C. (2000) The cell wall. En: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Eds Buchanan B.B., Gruissem W., Jones R.L.). Wiley, Nueva York. pp. 52-108.

- Castagnino A. M. (2009). *Manual de Cultivos Hortícolas innovadores*. Editorial Hemisferio Sur.

- Catignani G.L. y Carter M.E. (1982). Antioxidant properties of lignin. *Journal of Food Science*, 47,1745-1748.

- Chen R., Jin C., Tong Z., Lu J., Tan L., Tian L. y Chang Q. (2016) Optimization extraction, characterization and antioxidant activities of pectic polysaccharide from tangerine peels. *Carbohydrate Polymers*, 136, 187-197.

- Chiang L.C., Chiang W., Chang M.Y., Ng L.T. y Lin C.C. (2002). Antiviral activity of *Plantago major* extracts and related compounds in vitro. *Antiviral Research*, 55, 53–62.

- Chipault J.R. (1962). Antioxidants for food use. En: *Autoxidation and Antioxidants* (Ed. Lunderberg W.O.). Wiley, Nueva York. pp. 477-542.

- Claesson M.J., Van Sinderen D. y O'Toole P.W. (2007). The genus *Lactobacillus*-a genomic basis for understanding its diversity. *FEMS Microbiology Letters* , 269, 22-28.

- Clark A.H. y Ross-Murphy S.B. (1987). Structural and mechanical properties of biopolymer gels. *Advances in Polymer Science*, 83, 57-192.

- Coconnier M.H., Lievin V., Lorrot M. y Servin A.L. (2000). Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus*. LB against intracellular Salmonella enteric serovar typhimurium infecting human entero cyte like Caco-2/TC-7 cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1152-7.

- Comisión del Codex-Alimentarius. (2009). Codex Dietary Fiber Definition. ALINORM 09/32/REP ALINORM 10/33/26, 0/33/REP Resolución Conjunta SPReI N°95/2008 y SAGPyA N° 358/2008.

- Comisión del Codex-Alimentarius. (2009). Lista de métodos para la determinación de la fibra dietética en el trámite 7. Acceso 8 de agosto de 2016. ftp://ftp.fao.org/codex/Meetings/CCNFSDU/ccnfsdu31/nf31_03s.pdf.

- Comisión del Codex-Alimentarius (2010). La definición de fibra dietética – discusiones sostenidas durante el Noveno Simposio de Fibra Vahouny: Llegando a un acuerdo científico. Publicado: 1º. De Noviembre, 2010, from <http://ilsa.org/mexico/wp-content/uploads/sites/29/2016/09/La-Definici%C3%B3n-De-Fibra-Diet%C3%A9tica.pdf>.

- Código Alimentario Argentino, C. A. A. (2013a). Capítulo V: Normas para la rotulación y publicidad de los alimentos.

- Código Alimentario Argentino, C. A. A. (2013b). Capítulo XVII: Alimentos dietéticos.

- Coenen G.J., Bakx E.J., Verhoef R.P., Schols H.A. y Vorangen A.G.J. (2007). Identification of the connecting linkage between homo or xylogalacturonan and rhamnogalacturonan and rhamnogalacturonan type I. *Carbohydrate Polymers*, 70, 224-235.

- Cordero C.C. (2002). Implementación de un método *in vitro* de evaluación preliminar de actividad anticáncer de extractos vegetales empleando líneas celulares derivadas de tumores humanos. Tesis pregrado. Universidad Nacional de Colombia. Química Farmacéutica.

- Costell E., Fiszman S. M. y Durán L. (1997). Propiedades físicas I. Reología de sólidos y textura. En: Temas en Tecnología de Alimentos. (Ed. Aguilera, J.M.). CYTED. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo. Instituto Politécnico Nacional, México.

- Coudray C., Bellanger J., Castiglia-Delavaud C., Remy C., Vermorel M. y Rayssiguier Y. (1997). Effect of soluble or partly soluble dietary fibres

supplementation on absorption and balance of calcium, magnesium, iron and zinc in healthy young men. *European Journal Clinical Nutrition*, 51, 375-80.

- Cravero V. (2000). Evaluación de familias S1 de alcaucil (*Cynara scolymus* L.) y empleo de técnicas de análisis multivariado para caracterización y selección. Universidad Nacional de Rosario, Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela de Graduados.

- DeLeenheer L. y Hoebregs H. (1994). Progress in the elucidation of the composition of chicory inulin. *Starch*, 46, 193-196.

- Deng D., Zhang J., Cooney J.M., Skinner M.A., Adaim A., Jensen D.J. y Stevenson D.E. (2006). Methylated polyphenols are poor “chemical” antioxidants but can still effectively protect cells from hydrogen peroxide-induced cytotoxicity. *FEBS Letters*, 580, 5247-50.

- Denglin L., Wei L., Jianxue L. y Shengnan L. (2011). Acid-induced degradation behavior of inulin. En: *Proceedings of the International Conference on Agricultural and Biosystems Engineering*, Los Angeles. pp. 59-61.

- Departamento de Agricultura de los EE.UU. USDA (2016). https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2820?fgcd=&manu=&lfacet=&format=&count=&max=50&offset=6550&sort=fd_s&order=asc&qlookup=&ds=&qt=&qp=&qa=&qn=&q=&ing=.

- Djouzi Z. y Andrieux C. (1997). Compared effects of three oligosaccharides on metabolism of intestinal microflora in rats inoculated with a human faecal flora. *British Journal of Nutrition*, 78, 313–324.

-Dong C.X., Hayashi K., Lee J.B. y Hayashi T. (2010). Characterization of structures and antiviral effects of polysaccharides from *Portulaca oleracea* L. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* (Tokyo), 58, 507-510.

- Dreher M. (1987). Dietary fiber content of food sources. En: *Handbook of Dietary Fiber: An Applied Approach*. Marcel Dekker, Inc., New York.

- Dreher M. (1999). Food sources and uses of dietary fiber. En: *Complex Carbohydrates in Foods*. (Eds. Cho S.S., Prosky L. y Dreher M.). Marcel Dekker, Inc. Basel. pp. 327-366.

- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Robers P.A. y Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350–356.

- During A., Debouche C., Raas T. y Larondelle Y.(2012). Among plant lignans, pinoresinol has the strongest antiinflammatory properties in human intestinal Caco-2 cells, 142(10), 1798-805.

- Edwards M. (1999). Vegetables and fruit. En Food Texture. Measurement and Perception (Ed. Rosenthal A.J.), Aspen Publishers, Gaithersburg.

- El Kaoutari A., Armougom F., Gordon J.I., Raoult D. y Henrissat B. (2013). The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 11, 497–504.

- Elleuch M., Bedigian D., Roiseux O., Besbes S., Blecker C. y Attia H. (2011). Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterization, technological functionality and commercial applications: A review. *Food Chemistry*, 124(2), 411–421.

- Escarpa A. y González M.C. (2001). An Overview of Analytical Chemistry of Phenolic compounds. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 31, 57–139.

- Escudero Álvarez E. y González Sánchez P. (2006). La fibra dietética. Nutrición hospitalaria, Unidad de Dietética y Nutrición. Hospital La Fuenfría. Madrid.

- FAOSTAT. Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database (2012). Food and Agricultural Commodities Production. Final 2011 Data. Acceso el 15 de diciembre de 2014. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>.

- FAO, Food Agriculture Organization (2012). The State of Food Insecurity in the World 2012. Economic Growth is necessary but not Sufficient to Accelerate Reduction of Hunger and Malnutrition. W.F.P., World Food Programme, I.F.A.D., International Fund for Agricultural Development. FAO, Rome.

- FAO, Food Agriculture Organization. (2013). Food wastage footprint. Impacts on natural resources. A summary Report. ISBN 978-92-5-107752-8. www.fao.org/nr/sustainability.

- FAO., Food Agriculture Organization. (2016). Pérdidas y desperdicios de alimentos en America Latina y el Caribe. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Boletín 3. Febrero de 2016. <http://www.fao.org/3/a-i5504s.pdf>.

- FAO/OMS, Food Agriculture Organization/Organización Mundial de la Salud (2001). Evaluación de las Propiedades Saludables y Nutricionales de los Probióticos en los Alimentos, incluida la Leche en Polvo con Bacterias Vivas del Ácido Láctico. Informe. Córdoba, Argentina, 1- 4 de octubre de 2001.

- FAO/OMS, Food Agriculture Organization/Organización Mundial de la Salud (2003). Diet, Nutrition and Prevention of Chronic Diseases. Series 916.

- Fauget C.M. y Fargette D. (2005). International Committee on Taxonomy of Viruses and the 3,142 unassigned species. *Virology Journal*, 2: 64, 1-10.

- Faulds C.B. y Williamson G. (1999). The role of hydroxycinnamates in the plant cell wall. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 393–395.

- Femenia A., Rigby N.M., Selvendran R.R. y Waldron K.W. (1999). Investigation of the occurrence of pectic-xylan–xyloglucan complexes in the cell walls of cauliflower stem tissues. *Carbohydrate Polymers*, 39 (2), 151-164.

- Fernández Garcia A., Butz P. y Tauscher B. (2001). Effects of high pressure processing on carotenoid extractability, antioxidant activity, glucose diffusion and water binding of tomato puree (*Lycopersicon Esculentum* Mill). *Journal of Food Science*, 66, 1033-1038.

- Fernández-Bañares F. (1992). Sugar malabsorption: intestinal functional symptoms after ingestion of lactose, fructose, sorbitol, and mixtures of fructose-sorbitol in adults. *Gastroenterología y hepatología*, 15, 462-462.

- Ferry J. D. (1980). *Viscoelastic Properties of Polymers* (3ª edición). Wiley, New York.

- Filisetti-Cozzi T.M.C.C. y Carpita N.C (1991). Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry*, 197, 157–162.

- Firpo I.T. (2007). Procesos, daños y pérdidas poscosecha del alcaucil en el Cinturón Hortícola de Rosario. *Revista de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias - UNR Año VII - N° 12*, 015- 023.

- Fissore E.N., Ponce N.M.A., Stortz C.A., Rojas A.M. y Gerschenson L.N (2007). Characterization of fiber obtained from pumpkin (*Cucumis moschata*, Duch.) mesocarp through enzymatic treatment. *Food Science Technology International*, 16 (1), 1–7.

- Fissore E. N. (2009). Obtención de productos enriquecidos en pectina a partir de residuos de la industrialización de calabaza (*Curcubita moschata* Duch ex Poiret) y remolacha (*Beta vulgaris* L. var. *Conditiva*) y su caracterización. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

- Fissore E.N., Ponce N., Matkovic L., Stortz C., Rojas A.M. y Gerschenson L.N. (2011). Isolation of pectin-enriched products from red beet (*Beta vulgaris* L. var. *conditiva*) waste: composition and functional properties. *Food Science and Technology International*. 17,(6), 517–527.

- Fissore E.N., Rojas A.M., Gerschenson L.N. y Williams P.A. (2013). Butternut and beetroot pectins: characterization and functional properties. *Food Hydrocolloids*, 31(2), 172–182.

- Fissore E., Santo Domingo C., Pujol C., Damonte E., Rojas A.M. y Gerschenson L.N. (2014). Upgrading of residues of bracts, stems and hearts of *Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* to functional fractions enriched in soluble fiber. *Food & Function*, 5(3), 463-470.

- Fissore E.N., Santo Domingo C., Gerschenson L.N. y Giannuzzi L. (2015). A study of the effect of dietary fiber fractions obtained from artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) on the growth of intestinal bacteria associated with health. *Food & Function*, 6, 1667-1674.

- Franck A. y DeLeenheer L. (2005). Inulin. En: *Biopolymers Online*. 6. DOI: 10.1002/3527600035.bpol6014. Wiley online library.

- Freshney R.I. (1995). *Animal cell culture. A practical approach*. Oxford University Press.

- Freshney R.I. (2000). *Culture of animal cell. A manual of basic technique*. Cuarta edición. John Wiley and Sons Inc. New York.

- Gao M (2006). Dynamic microwave assisted extraction of flavonoids from *Saussurea medusa* Maxim cultured cells. *Biochemical Engineering Journal* 32: 79-83.

- Gardner P.T., White T.A.C., McPhail D.B. y Duthie G.G (2000). The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chemistry*, 68, 471–474.

- Ghose T.K., y Bisaria V.S. (1987). Measurement of hemicellulase activities. Part 1: Xylanases. *Pure and Applied Chemistry*, 59, 12, 1739-1752.

- Giannouli P., Richardson R. K. y Morris E. R. (2004). Effect of polymeric co-solutes on calcium pectinate gelation: dextrans and inulin. *Carbohydrate polymers*, 55, 357 – 365.

- Gibson G.R. y Roberfroid M.B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125:1401-1412.1.

- Gibson, G.R., Beatty, E.R., Wang, X. y Cummings, J.H. (1995). Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology*, 108, 975–982.

- Gil A. y Rueda R.(2002). Interaction of early diet and the development of the immune system. *Nutrition Research Reviews*, 15: 263-92.

- González San José M.J., Muñiz Rodríguez P. y Valls Bellés V. (2001). Actividad antioxidante de la cerveza: estudios *in vitro* e *in vivo*. Centro de Información Cerveza y Salud, Madrid.
http://www.cervezaysalud.es/wp-content/uploads/2015/08/Dossier_2015.pdf

- Gonthier M.P., Verny M.A., Besson C., Rémésy C. y Scalbert A. (2003). Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. *Journal of Nutrition*, 133:1853-1859.

- Gordon M.H. 1990. The mechanism of antioxidant action *in vitro*. En: Food Antioxidants (ed. Hudson J.F.). Elsevier, London. pp. 1-18.

- Goulao L.F. y Oliveira C.M. (2008). Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. *Trends in Food Science & Technology*. 19, 4-25.

- Gourbeyre P., Denery S. y Bodinier M. (2011). Probiotics, prebiotics, and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions. *Journal of Leukocyte Biology*, 89(5), 685-95.

- Gouveia S. C. y Castilho P. C. (2012). Phenolic composition and antioxidant capacity of cultivated artichoke, Madeira cardoon and artichoke-based dietary supplements. *Food Research International*, 48, 712–724.

- Guarner F. (2000). El colon como órgano: hábitat de la flora intestinal. *Alimentación nutrición y salud*, 7(4):99-106.

- Guillón F. y Champ M. (2000). Structural and physical properties of dietary fibres, and consequences of processing on human physiology. *Food Research International*, 33, 233-245.

- Hagerman A.E. (2002). Tannin Handbook, Department of Chemistry and Biochemistry, Miami University, USA.

- Halliwell B., Murcia M.A., Chirico S. y Aruoma O.I. (1995). Free radicals and antioxidants in vivo: what they do and how they work. *Critical reviews in Food Science and Nutrition*, 35, 7-20.

- Hammouda F. y Seif-El-Nasr M. (1993). Flavonoids of *Cynara scolymus* L. cultivated in Egypt. *Plant Foods for Human Nutrition*. 44, 163-169.

- Haslam E. (1974). Polyphenol-Protein Interactions. *Biochemical Journal*. 139, 285-288.

- Hassan M. A., Haroun B. M., Amara A. A. y Serour E. A. (2013). Production and characterization of keratinolytic protease from new wool-degrading *Bacillus* species isolated from egyptian ecosystem. *BioMed Research International*. Volume 2013, Article ID 17501. Hindawi Publishing Corporation. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/175012>.

- Heim K.E., Tagliaferro A.R. y Bobilya D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572-84.

- Hermida J.R. (1993). Tratamiento y aprovechamiento del orujo de aceituna. *Tecnologías Complementarias en la Industria Alimentaria*, 137-148.

- Hipsley E.H. (1953) Dietary "fiber" and pregnancy toxemia. *British Medical Journal*, 2, 420-422.

- Hongpattarakere T., Cherntong N., Wichienchot S., Kolida S. y Rastall R.A. (2012). In vitro prebiotic evaluation of exopolysaccharides produced by marine isolated lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers*, 87, 846–852.

- Hosney R.C. (1986) *Principles of Cereal Science and Technology*. AACC. St. Paul, Minnesota.

- Howard R. L., Abotsi E., Jansen van Rensburg E. L. y Howard S. (2003). Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology*, 2 (12), 602-619.

- Huebner J., Wehling R.L. y Hutkins R.W. (2007). Functional activity of commercial prebiotics. *International Dairy Journal*, 17, 770-775.

- Huebner J., Wehling R. L., Parkhurst A. y Hutkins R. W. (2008). Effect of processing conditions on the prebiotic activity of commercial prebiotics. *International Dairy Journal*, 18, 287-293.

- Huyut Z., Beydemir S. y Gulcin I. (2017). Antioxidant and Antiradical Properties of Selected Flavonoids and Phenolic Compounds. *Biochemistry Research International*, ID 7616791, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2017/7616791>.

- Ikeda S. y Nishinari K. (2001). Weak gel-type rheological properties of aqueous dispersions of nonaggregated k-carrageenan helices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4436–4441.

- Izydorczyk M., Cui S.W. y Wang Q. (2005). Polysaccharide Gums: Structures, Functional Properties, and Applications. En: *Food Carbohydrates: chemistry, physical properties and applications* (Ed. Cui S.W.),. Taylor & Francis, London, Reino Unido.

- Jaakola L., Määttä-Riihinen K., Kärenlampi S. y Hohtola A. (2004). Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves. *Planta*, 218, 721–728.

- Jackman R. L. y Stanley D. W. (1992). Failure mechanisms of tomato pericarp tissue suggested by large and small deformation test. *Journal of Texture Studies*, 23, 475-489.

- Jampala, S.N., Manolache, S., Gunasekaran, S., y Denes, F.S. (2005). Plasma-enhanced modification of xanthan gum and its effect on rheological properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3618-3625.

- Jarvis M. C. (2011). Plant cell walls: Supramolecular assemblies. *Food Hydrocolloids*, 25, 257–262.

- Jassim S. A. A. y Naji M. A. (2003). Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 412–427.
- Jian (2010). Optimization of microwave-assisted extraction of polysaccharides from *Cyclocarya paliurus* (Batal). Iljinskaja using response surface methodology. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90: 1353-1360.
- Joossens M., Huys G., Van Steen K., Cnockaert M., Vermeire S., Rutgeerts P., Verbeke K., Vandamme P. y De Preter V. (2011). High-throughput method for comparative analysis of denaturing gradient gel electrophoresis profiles from human fecal samples reveals significant increases in two bifidobacterial species after inulin-type prebiotic intake. *FEMS Microbiology Ecology*, 75(2), 343-349.
- Khan S., Royer J. y Srinivasa R. (1997). Rheology: Tools and methods. *Aviation Fuels with Improved Fire Safety: A Proceedings*, 6, 31-46.
- Kim G.H. y Willis R.B.H. (1998) Interaction of enhanced carbon dioxide and reduced ethylene on the storage life of strawberry. *Journal of Horticultural Science*. 73:181-184.
- Kim Y.I. (2000). AGA Technical Review: impact of dietary fiber on colon cancer occurrence. *Gastroenterology*, 118,1235-57.
- Kim D. O. y Lee C. Y. (2004). Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44: 253–273.
- Kim C. y Yoo B. (2006). Rheological properties of rice starch-xhantan gum mixtures. *Journal of Food Engineering*. 75, 120-128.
- King D.E., Mainous A.G.I., Carnemolla M. y Everett C.J (2009). Adherence to healthy lifestyle habits in US adults. 1988-2006. *The American Journal of Medicine*, 122(6) ,528-534.
- King D., Mainous A.G.III. y Lambourne C.A (2012). Trends in Dietary Fiber Intake in the United States, 1999-2008. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 112, 642-648.
- Klein G., Pack A., Bonaparte C. y Reuter G. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 41, 103-125.

- Kolida S., Tuohy K. y Gibson G.R. (2002). Prebiotic effects of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, 87(2), 193-197.

- Kratchanova M., Slavov A. y Kratchanov C. (2004). Interaction of pectin with amino acids and other aminocompounds in aqueous solution. *Food Hydrocolloids*, 18, 677-683.

- Kroyer G.T. (1995). Impact of Food Processing on the Environment – an Overview. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 28, 547-552.

- Lanning D.K., Rhee K.J. y Knight K.L. (2005). Intestinal bacteria and development of the B-lymphocyte repertoire. *Trends Immunology*, 26,419-425.

- Lapasin R. y Pricl S. (1995). Rheology of industrial polysaccharides. Theory and applications. Blackie Academic and Professional. Chapman & Hall., Glasgow, Reino Unido. pp. 85-103.

- Lapornik B., Prosek M., y Golc Wondra. A. (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, 71, 214–222.

- Larrauri J.A. (1999). New approaches in the preparation of high dietary fibre powders from fruit by-products. *Trends in Food Science and Technology*, 10, 3-8.

- Larrosa M., Llorach R., Espin J. C. y Tomas-Barberan, F.A. (2002). Increase of antioxidant activity of tomato juice upon functionalisation with vegetable byproduct extracts. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 35,532–542.

- Las Heras M.S. (2004). Análisis de sistemas pectinolíticos bacterianos. Aislamiento y caracterización de las pectinasas PelA de *Paenibacillus* sp. BP-23 e YvpA de *Bacillus subtilis*. Tesis Doctoral, Barcelona, España.

- Lattanzio V., Kroon P., Linsalata V. y Cardinali A. (2009). Globe artichoke: a functional food and source of nutraceutical ingredients. *Journal of functional foods*. 1, 131 – 144.

- Laufenberg G., Kunz B. y Nystroem M. (2003). Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. *Bioresearch Technology*. 87, 167–198.

- Lee J-B, Fukai T., Hayashi K.y Hayashi T. (2011). Characterization of fructan from Chikuyo-Sekko-To, a Kampo prescription, and its antiherpetic activity in vitro and in vivo. *Carbohydrate Polymers*, 85, 408–412.
- Lenoir-Winjkoop I., Sanders M. E., Cabana M. D., Caglar E., Corthier G., Rayes N., Sherman P. M., Timmeman H. M., Vaneechoutte M., Van Loo J. y Wolvers D. A. (2007). Probiotic and prebiotic influence beyond the intestinal tract. *Nutrition Review*, 65, 469-89.
- Levigne S., Ralet M.C. y Thibault J.F. (2002). Characterization of pectins extracted from fresh sugar beet under different conditions using an experimental design. *Carbohydrate Polymers*, 49, 2, 145-153.
- Liu F., Liu Y., Meng Y., Yang M. y He K.. (2004). Structure of polysaccharide from *Polygonatum cyrtonema* Hua and the antiherpetic activity of its hydrolyzed fragments. *Antiviral Research*, 63, 183–189.
- Lombardo S., Pandino G., Mauromicale G., Knödler M., Carle R. y Schieber A. (2010). Influence of genotype, harvest time and plant part on polyphenolic composition of globe artichoke [*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori]. *Food Chemistry*, 119, 1175–1181.
- Lopez-Molina D., Navarro-Martínez M. D., Rojas Melgarejo F., Hiner A., Chazarra S. y Rodríguez-Lopez J. N., (2005). Molecular properties and prebiotic effect of inulin obtained from Artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Phytochemistry*, 66(12):1476-84.
- Lowry O.H., Rosebrough N. J., Farr A. L. y Randall R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275.
- Luo D., Xu W., Liu J. y Liu S. (2011). Acid-induced degradation behavior of inulin. International Conference on Agricultural and Biosystems Engineering. *Advances in Biomedical Engineering*, 1-2, 59-61.
- Lutz M., Henríquez C. y Escobar M. (2011). Chemical composition and antioxidant properties of mature and baby artichokes (*Cynara scolymus* L.), raw and cooked. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 49–54.
- Lynd L. R., Weimer P. J., van Zyl W. H. y Pretorius I. S. (2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66, 3, 506-577.

- MacDougall A. J. y Ring S. G. (2004). Pectic polysaccharides. En: *Chemical and functional properties of food saccharides* (Tomasik P., Ed). CRC Press LLC, Boca Raton.

- Mann J. I. y Cummings J. H. (2009). Possible implications for health of the different definitions of dietary fibre. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 19(3), 226–229.

- Marotti I., Bregola V., Aloisio I., Di Gioia D., Bosi S., Di Silvestro R., Quinnand R. y Dinelli G.(2012). *Journal science Food Agriculture*, 92(10), 2133-2140.

- Martin-Cabrejas M. A. M., Waldron K. W. y Selvendran R. R. (1994). Cell wall changes in spanish pear during ripening. *Journal of Plant Physiology*, 144, 541 – 548.

- Mataix J. y Gassull M. A. (2002). Fibra alimentaria. En: *Nutrición y alimentación humana* (Mataix J. , Ed.). Ergon, Madrid, España. pp. 119-137.

- May C.D. (1990). “Industrial Pectins: Sources, Production, and Applications”. *Carbohydrate Polymers*, 12, 79-99.

- McCleary, B.V.; Blakeney, A.B. (1999). Measurement of inulin and oligofructan. *Cereal Food World* 44, 398-406.

- McCleary, B.V.; Rossiter, P. (2004). Measurement of novel dietary fibers. *J. AOAC Int.*, 87, 707-711.

- Mc.Neil M., Darvill A. y Albersheim, P. (1980) Structure of plant cell wall, rhamnogalacturonan I a structurally complex pectic polysaccharide in the walls of suspension cultured sycamore cells acer - pseudopltanus cells. *Plant Physiology*, 66 (6), 1128-1134.

- Mensink M. A., Frijlink H. W., Van der Voort Maarschalk K. y Hinrichs W. L. J. (2015). Inulin, a flexible oligosaccharide. I: Review of its physicochemical characteristics. *Carbohydrate Polymers*, 130, 405–419.

- Metin Donma M. y Donma O. (2005). Phytonutrient and children: the other side of the medallion. *Food Research International*, 38, 681-92.

- Miller T.L. y Wolin M.J. (1979) Fermentation by saccharolytic intestinal bacteria. *American Journal of Clinical Nutrition*, 32, 164–72.

- Moglia A., Lanteri S., Comino C., Acquadro A., De Vos R. y Beekwilder J. (2008). Stress-induced biosynthesis of dicaffeoylquinic acids in globe artichoke. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 56, 8641-8649.

- Mohsenin N. N. (1978). Physical Properties of Plant and Animal Materials. En: Structure, Physical Characteristics and Mechanical Properties. Gordon and Breach Science Publishers. New York.

- Montes S. y White J.L. (1993) Rheological models of rubber-carbon black compounds: low interaction viscoelastic models and high interaction thixotropic - plastic – viscoelastic models. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, 49, 277–298.

- Moraes I. C. F., Fasolin L. H., Cunha R. L. y Menegalli F. C. (2011). Dynamic and steady-shear rheological properties of Santan and guar gums dispersed in Bellow passion fruit pulp (*Passiflora edulis f. flavicarpa*). *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 28(03), 483-494.

- Morgan S. J. y Darling D. C. (1995). Cultivo de células animales. Editorial Acribia, Zaragoza, España.

- Morris G.A., Foster T.J. y Harding S.E. (2000). The effect of the degree of esterification on the hydrodynamic properties of citrus pectin. *Food hydrocolloids*, 14: 227–235. 41.

- Morris G.A., de la Torre J.G., Ortega A., Castile J., Smith A. y Harding S.E. (2008). Molecular flexibility of citrus pectins by combined sedimentation and viscosity analysis. *Food Hydrocolloids*, 22: 1435–1442.

- Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assays for celular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.

- Motamed Zadegan A., Davarniam B., Asadi G., Abedian A. y Ovissipour M. (2010) Optimization of enzymatic hydrolysis of yellowfin tuna *Thunnus albacares* viscera using Neutrase. *International Aquatic Research*, 2, 173-181.

- Moure A., Cruz J. M., Franco D., Dominguez J.M., Sineiro J. y Dominguez H. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72, 145–171.
- Nam J.S., Jang H.L.y Rhee Y.H. (2017). Antioxidant Activities and Phenolic Compounds of Several Tissues of Pawpaw (*Asimina triloba* L. Dunal) Grown in Korea *Journal of Food Science*, 82(8):1827-1833.
- Namiki M. (1990). Antioxidants/antimutagens. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 29, 273-300.
- Navarro-Núñez L., Lozano M. L., Palomo M., Martínez C., Vicente V., Castillo J., Benavente-García O., Diaz-Ricart M., Escolar G. y Rivera J. (2008). Apigenin inhibits platelet adhesion and thrombus formation and synergizes with aspirin in the suppression of the arachidonic acid pathway. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* , 56 (9):2970-6.
- Nelson J. L., Alexander J. N., Gianotti L., Chalk C. L. y Pilas T. (1994). Influence of dietary fiber on microbial growth in vitro and bacterial translocation after burn injury in mice. *Nutrition*. 10:32-36.
- Ng A., Parr A. J., Ingham L. M., Rigby N. M. y Waldron K. M (1998). Cell wall chemistry of carrots (*Daucus carota* CV. Amstrong) during maturation and storage. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46, 2933-2939.
- Niness K. R. (1999). Inulin and oligofructose: what are they?. *American Society for Nutritional Sciences*, 129, 1402S-1406S.
- Nogueira R. I. (2001). Processo de obtenção de inulina de chicória (*Cichorium intybus*) em pó. Ph.D. dissertação, Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil.
- Nordgaard I., Hansen B. S. y Mortensen P. B. (1995). Colonic fermentation of complex dietary carbohydrates in short-bowel patients. No association with hydrogen excretion and fecal and plasma short-chain fatty acids. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 30(9):897-904.
- Nwanekezi E., Alawuba O. y Mkpolulu C. (1994). Characterization of pectic substances from select tropical fruits. *Journal of Science and Technology*, 31(2), 159 – 161.

- Ogawa J. y Shimizu S. (2004). Enzymes. En: *Bioprocesses and Biotechnology for Functional Foods and Nutraceuticals* (Neuser J.R. y German J.B., Eds.). Marcel Dekker Inc, Nueva York.

- Olagnero G., Abad A., Bendersky S., Genevois C., Granzella L. y Montonati M. (2007). Alimentos Funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. *Diaeta* (Buenos Aires), 25 (121), 20-33.

- Olano-Martin, E., Gibson, J. R. y Rastall, R.A. (2002). Comparison of the *in vitro* bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 505–511.

- Oliveira A; Cordeiro L., Goncalves R., Ceole L., Ueda-Nakamura, T. y Iacomini M. (2013). Structure and antiviral activity of arabinogalactan with (1→6)-β-D-galactan core from *Stevia rebaudiana* leave. *Carbohydrate Polymers*, 94, 179-184.

- O'Neill M. A., Ishii T., Albersheim P. y Darvill A. G. (2004) Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 109- 139.

- Ouwehand A. C., Parhiala R. y Salminen S. (2004). Influence of the endogenous mucosal microbiota on the adhesion of probiotic bacteria *in vitro*. *Microbial Ecology*, 16, 202-204.

- Panchev I., Delchev N., Kovacheva D. y Slavov A. (2011). Physicochemical characteristics of inulins obtained from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *European Food Research and Technology*, 233, 889-896.

- Pandino G., Courts F. L., Lombardo S., Mauromicale G. y Williamson G. (2010). Caffeoylquinic acids and flavonoids in the immature inflorescence of globe artichoke, wild cardoon, and cultivated cardoon. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58 , 1026–1031.

- Pandino G., Lombardo S., Mauromicale G. y Williamson G. (2011 a). Phenolic Acids and Flavonoids in leaf and floral stem of cultivated and wild *Cynara cardunculus* L. genotypes. *Food Chemistry*, 126, 417-422.

- Pandino G., Lombardo S., Mauromicale G. y Williamson G. (2011 b). Profile of polyphenols and phenolic acids in bracts and receptacles of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*) germplasm. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 148-153.

- Panouillé M., Thibault J.F. y Bonnin E. (2006). Cellulase and protease preparations can extract Pectins from various plant byproducts. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54, 8926-8935.

- Papadopoulou, A. y Frazier, R. A. (2004). Characterization of protein-polyphenol interactions. *Trends in Food Science and Technology*, 15 (3-4), 186-190.

- Parkar S. G., Redagate E., Wibisono R., Luo X., Koh E. y Schröder R. (2010). Gut health benefits of kiwifruit pectins: Comparison with commercial functional polysaccharides. *Journal of Functional Foods*, 2(3), 210–218.

- Patra A.K. (2012). *Dietary Phytochemicals and Microbes*. Springer Science Business Media, Dordrecht, Holanda.

- Pauly M., Albersheim P., Darvill A. y York W. S. (1999) Molecular domains of the cellulose/xyloglucan network in the cell walls of higher plants. *The Plant Journal*, 20: 629-639.

- Pellett P. E. y Roizman B. (2007). The family Herpesviridae: A brief introduction. En: *Fields virology* (Knipe D.M. y Howley P. M., Eds). Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia. pp. 2479–2499.

- Pérez-García F., Adzet T. y Canigueral S. (2000). Activity of artichoke leaf extract on reactive oxygen species in human leukocytes. *Free Radical Research*, 33, 661-5.

- Periago M. J., Ros G., López G., Martínez M.C. y Rincón F. (1993). Componentes de la fibra dietética y sus efectos fisiológicos. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 33 (3), 229-246.

- Picout D.R. y Ross-Murphy S.B. (2003). Rheology of biopolymer solutions and gels. *The Scientific World Journal*, 3, 105-121.

- Pinheiro de Souza Oliveira R., Perego P., Nogueira de Oliveira M. y Converti A. (2011). Effect of inulin as prebiotic and synbiotic interactions between probiotics to improve fermented milk firmness. *Journal of Food Engineers*, 107, 36-40.

- Prins R. A. (1977). Biochemical activities of gut microorganisms. En: *Microbial Ecology of the Gut* (Clarke R.T.J. y Bauchop T., Eds.). Academic Press, Nueva York. pp. 73–183.

- Pulido R., Bravo L., y Saura-Calixto F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3396-3402.

- Quemener B., Thibault J. F. y Coussement P. (1993). Determination of inulin and oligofructose in food products, and integration in the AOAC method for measurement of total dietary fibre. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 27, 125-132.

- Quintana J. M. (2003). Microestructura, estabilidad y propiedades reológicas de emulsiones alimentarias estabilizadas con hidrocoloides. PhD-Thesis, Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Química.

- Ramírez N. J. S. (2006). Introducción a la reología de los alimentos. Universidad del Valle, Cali, Colombia. *Revista ReCiTeIA*, 6 (1). <http://revistareciteia.es.tl/>.

- Rao, M.A. (1999). Rheological behavior of processed fluid and semisolid foods. En: *Rheology of Fluid and Semisolid Foods* (Rao A.M. Ed.). Aspen Pub., Maryland. pp. 153–218.

- Rechner A. R., Kuhnle G., Bremner P., Hubbard G. P., Moore K. P. y Rice-Evans C. A. (2002). The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 33, 220-235.

- Ridley B. L., O'Neill M. A. y Mohnen D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57, 929-967.

- Roberfroid M. B. y Delzenne N. M. (1998). Dietary fructans. *Annual Review of Nutrition*, 18, 117-143.

- Roberfroid M. (2004). Inulin: A Fructan. En: *Inulin-Type Fructans Functional Food Ingredients* (Ed. Wolinsky I.). CRC Press, Boca Raton. pp. 259-275.

- Roberfroid M. (2007). Prebiotics: the concept revisited *Journal of Nutrition*, 137, 830S–837S.

- Rodgers J. y Nicewander W. (1988). Thirteen ways to look at the correlation coefficient. *The American Statistician*, 42, 59-66.

- Rodríguez López J. N. (2009). Aprovechamiento de residuos de alcachofa. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Murcia, Murcia, España.

- Romano N., Santos M., Mobili P., Vega R. y Gómez-Zavaglia A. (2016). Effect of sucrose concentration on the composition of enzymatically synthesized short-chain fructo-oligosaccharides as determined by FTIR and multivariate analysis. *Food Chemistry*, 202, 467–475.

- Ronkart S. N., Blecker C.S., Fourmanoir H., Fougnes C., Deroanne C., Van Herck J.-C. y Michel P. (2007). Isolation and identification of inulooligosaccharides resulting from inulin hydrolysis. *Analytica Chimica Acta*, 604, 81-87.

- Rosalina I. y Bhattacharya M. (2002). Dynamic rheological measurements and analysis of starch gels. *Carbohydrate Polymer*, 48, 191–202.

- Ross Murphy, S. B. (1994). Rheological characterization of polymer gels and networks. *Polymer Gels and Networks*, 2 (3-4), 229-237.

- Rostagno M.A., Palma M. y Barroso C.G. (2007). Microwave assisted extraction of soy isoflavones. *Anal. Chim. Acta* 588: 274-282.

- Rubio-Senent F., Rodríguez-Gutierrez G., Lama-Muñoz A., Aranzazu García A. y Fernandez-Bolaños, J. (2015). Novel pectin present in new olive mill wastewater with similar emulsifying and better biological properties than citrus pectin. *Food Hydrocolloids*, 50, 237-246.

- Ruiz-Cano D., Pérez-Llamas F., Frutos M. J., Arnao M. B., Espinosa C., López Jiménez, J. Á. y Zamora S. (2014). Chemical and functional properties of the different by-products of artichoke (*Cynara scolymus* L.) from industrial canning processing. *Food Chemistry*, 160, 134–140.

- Sakakibara H., Honda Y., Nakagawa S., Ashida H. y Kanazawa K. (2003). Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 51, 571-581.

- Sánchez-Muniz F. J. (2012). Dietary fibre and cardiovascular health. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 31–45.

- Santos-Buelga C. y Scalbert A. (2000). Proanthocyanidins and tannin-like compounds. Nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80, 1094-1117.

- Sanz Y., Collado M. C., Haros M. y Dalmau J. Funciones metabólico-nutritivas de la microbiota intestinal y su modulación a través de la dieta: probióticos y prebióticos. *Acta Pediátrica Española*, 62(11), 520-526.

- Saura-Calixto F. (1993). Fibra dietética de manzana: hacia nuevos tipos de fibras de alta calidad. *Alimentaria*, 242, 57-61.

- Scheller H. V. y Ulvskov P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 263-289.

- Schieber A., Stintzing F.C. y Carle R. (2001). By-products of plant food processing as a source of functional compounds—recent developments. *Trends in Food Science and Technology*, 12, 401–413.

- Schneeman B. O. (1987). Soluble vs. insoluble fiber-different physiological responses. *Food Technology*, 41 (2), 81- 82.

- Schneweis K. E. (1962). Serological studies on the type differentiation of Herpesvirus hominis. *Zeitschrift für Immunitätsforschung und Experimentelle Therapie*, 124, 24-48.

- Schols H. A. y Voragen A. G. J. (1996). Complex pectins. En: Pectin and Pectinase (Eds. Visser, J. A. y Voragen, A. G. J.). Elsevier Science, Holanda. pp 3-19.

- Schols H. A. y Voragen A. G. J. (2003). Pectic polysaccharides. En: Handbook of Food Enzymology (Eds: Whitaker J.R., Voragen G.J. y Wong D.W.S.). Marcel Dekker Inc., Nueva York.

- Schramm G. (1994). A Practical Approach to Rheology and Rheometry. Haake, Karlsruhe, Alemania.

- Schütz K., Kammerer D., Carle R. y Schieber A. (2004). Identification and quantification of caffeoylquinic acids and flavonoids from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads, juice, and pomace by HPLC–DAD–ESI/MSⁿ. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 , 4090–4096.

- Sherman, P. (1970). *Industrial Rheology*. Academic Press, Londres, Reino Unido.

- Shkodina O. G., Zeltser O. A., Selivanov N. Y. e Ignatov V. V. (1998). Enzymic extraction of pectin preparations from pumpkin. *Food Hydrocolloids*, 12, 313-316.

- Siebert K. J., Troukhanova N. V. y Lynn P. Y. (1996). Nature of polyphenol-protein interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44 (1), 80-85.

- Silva Leal M.A. y Martínez Corredor L.M. (2017). Evaluación del efecto del pre-tratamiento con ultrasonido sobre la extracción de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante en brácteas y tallos de la alcachofa (*Cynara scolymus*) cultivada en Cundinamarca. Trabajo de Grado para optar al Título de Ingeniería en Alimentos. Universidad de La Salle. Facultad de Ingeniería. Bogotá, Colombia. Disponible en: <http://repository.lasalle.edu.co/handle/10185/21217>. Accedido el 10 de noviembre de 2017.

- IX Simposio Internacional de la Alcachofa, Cardo y sus variantes silvestres (2015). Ciudad de La Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina. Disponible en: <http://www.alcachofa2015.com/seccion.php?catId=1&subcatId=26>. Accedido el 18 de enero de 2016.

- Singleton, V.L., Rossi, J (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdc–phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16, 144–153.

- Singleton V. L., Orthofer R. y Lamuela-Raventós R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin- Ciocalteau reagent. *Methods of Enzymology*, 299, 152-78.

- Smith G. J. y Markham K. R. (1996). The dissipation of excitation energy in methoxyflavones by internal conversion. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 99 , 97-101.

- Sokal R. R. y Rohlf J. B. (2000). *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research*. WH Freeman and Company, San Francisco.

- Somerville C., Bauer S., Brininstool G., Facette M., Hamann T., Milne J., Osborne E., Paredes A., Persson S., Raab T., Vorwerk S. y Youngs H. (2004). Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science*, 306: 2206-2211.

- Stanley D. W. y Tung M. A. (1975). Microstructure of food and its relation to texture. En: *Rheology and Texture in Food Quality*. (Eds. De Man, J.M., Voisey, P.W.,

Rasper, V.F. y Stanley, D.W.). The Avi Publishing Company Inc., Westport, Connecticut. pp.289-78.

- Suárez B., Álvarez A. L., García Y. D., Barrio G. D., Lobo A. P. y Parra F. (2010). Phenolic profiles, antioxidant activity and in vitro antiviral properties of apple pomace. *Food Chemistry*, 120 (1), 339–342.

- Sudha M. L., Baskaran V. y Leelavathi K. (2007). Apple pomace as a source of dietary fiber and polyphenols and its effect on the rheological characteristics and cake making. *Food Chemistry*, 104(2), 686–692.

- Taiz L. y Zeiger E. (2002). *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Oxford Press, Nueva York.

- Tanongkankit Y., Chiewchan N. y Devahastin S. (2012). Physicochemical property changes of cabbage outer leaves upon preparation into functional dietary fiber powder. *Food and Bioprocess Processing*, 90(3), 541-548.

- Teitelbaum J. E. y Walker W.vA. (2002). Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. *Annual Review of Nutrition*, 22, 107-138.

-Tewari S., Ramalakshmi K., Methre L.y Mohan Rao L.J. (2015) Microwave-Assisted Extraction of Inulin from Chicory Roots Using Response Surface Methodology. *Journal of Nutrition and Food Science*, 5(1). <https://www.omicsonline.org/open-access/microwaveassisted-extraction-of-inulin-from-chicory-roots-using-response-surface-methodology-2155-9600-5-342.pdf>.

- Thompson K. D. y Dragar C. (2004). Antiviral activity of *Undaria pinnatifida* against herpes simplex virus. *Phytotherapy Research*, 18 (7), 551- 555.

- Titgemeyer E. C., Bourquin L. D., Fahey G. C. y Garleb K. A. (1991). Fermentability of various fiber sources by human fecal bacteria in vitro. *American Journal of Clinical Nutrition*, 53, 1418-1424.

- Toneli J. T. C. L., Park K. J., Ramalho J. R. P., Murr F. E. X. y Fabbro I. M. D. (2008). Rheological characterization of chicory root (*Cichorium Intybus L.*) inulin solution, 25 (3), 461 - 471.

- Topping D. L. y Clifton P. M. (2001). Short-chain fatty acids and human colonic function: Roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological Reviews*, 81(3), 1031-1064.

- Tsuji M., Suzuki K., Kinoshita K. y Fagarasam S. (2008). Dynamic interactions between bacteria and immune cells leading to intestinal IgA synthesis. *Seminars in Immunology*, 20, 59-66.

- Tunglund B.C. y Meyer D. (2002). Nondigestible oligo- and polysaccharides (dietary fiber): their physiology and role in human health and food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3, 73-92.

- Turquois T., Rinaudo M., Taravel F.R. y Heyraud A. (1999). Extraction of highly gelling pectic substances from sugar beet pulp and potato pulp: influence of extrinsic parameters on their gelling properties. *Food Hydrocolloids*, 13, 255-262.

- Turróni F., Van Sinderen D. y Ventura M. (2010). Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium*. *International Journal of Food Microbiology*, 149 (1), 37-44.

- Valdez-Vázquez I., Acevedo-Benítez J. A. y Cuitlahuac Hernández S. (2010). Distribution and potential of bioenergy resources from agricultural activities in México. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14 (7), 2147-2153

- Van Loo J. y Hermans J. (2000). Inulin products with improved nutritional properties. *European Patent Application*. EP 1125507 A1.

- Vanholme R., Demedts B., Morreel K., Ralph J., Boerja W. (2010). Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant Physiology*, 153, 895-905.

- Vasiljevik T. y Shah N. P. (2008). Probiotics from Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, 18, 714-28.

- Vicent-Baudry S. y Deffort C. (2005). The MEDI-Rivage study: reduction of cardiovascular disease risk factors after a 3-month intervention with a Mediterranean-type diet or a low fat diet. *American Journal of Clinical Nutrition*. 82, 5, 964-71.

- Villareal L.P. (2005). Evolution of terrestrial animal and their viruses. Viruses and the evolution of life. *American Society for Microbiology Press*, 1: 341-344.

- Vincken J. P., Schols H. A., Oomen R. J. F. J., McCann M. C., Ulvskov P., Voragen A. G. J. y Visser R. G. F. (2003). If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiology*, 132,1781-1789.

- Volf I., Mamaliga I. y Popa V.I. (2006). Active principia with antioxidant character from vegetal by-products. II. Equilibrium study of the polyphenolic compounds extraction from wood of *Vitis* sp. *Cellulose Chemistry and Technology*, 40 (3-4), 211-215.

- Voragen F., Beldman G. y Schols H. (2001). Chemistry and enzymology of pectins. En: *Advanced Dietary Fiber Technology*. (Eds. McCleary B. V. y Prosky L.). Blackwell Science Ltd., Oxford, Reino Unido. pp. 379-398.

- Waldron K.W., Parker M. L. y Smith A. C. (2003). Plant cell walls and food quality. *Reviews an Food Science and Food Safety*, 2, 101-119.

- Walter J. (2008). Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications of fundamental biomedical research. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 4985-4996.

- Wang X. y Gibson G. R. (1993). Effects of the *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *Journal of Applied Bacteriology*, 75, 373-380.

- Wang Q. y Cui S. (2005). Understanding the physical properties of food polysaccharides. En: *Food Carbohydrates Chemistry, Physical Properties, and Applications*. (Ed. Cui S.W.). CRC Press, Boca Raton. pp.168-224.

- Wang T. T., Dabbas B., Laperriere D., Bitton A. J., Sovalhine H., Tavera-Mendoza L. E., Dionne S., Servant M.J., Bitton A., Seidman E. G., Mader S., Behr M. A. y White J. H. (2010). Direct and indirect induction by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ of the NOD2/CARD 15-defensin beta2 innate immune pathway defective in Crohn disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 285, 2227-2231.

- Ward I. M. (1990). *Mechanical Properties of Solid Polymers* (2º edición). John Wiley & Sons. New York.

- West N. P., Pyne D. B., Peake J. M. y Cripps A. W. (2009). Probiotics, immunity and exercise: a review. *Exercise Immunology Review*, 15, 107-126.

- Willats W. G. T., Knox P. y Mikkelsen J. D. (2006). Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 97–104.

- Williams D. J., Edwards D., Hamernig I., Jian L., James A. P. y Johnson S. K. (2013). Vegetables containing phytochemicals with potential anti-obesity properties: A review. *Food Research International*, 52 (1), 323-333.

- Wolin M. J. y Miller T. L. (1983). Carbohydrate fermentation. En: *Human Intestinal Microflora in Health and Disease* (Ed. Hentges D.J.). Academic Press, NuevaYork. pp. 147-65.

- Wood P. J. y Siddiqui L. R. (1971). Determination of methanol and its application for measurement of pectin ester content and pectin methyl esterase activity. *Analytical Biochemistry*, 39, 418-428.

- Wouters R. (2011). Inulin. En: *Food stabilisers, thickeners and gelling agents*. (Ed. Alan Imeson). Wiley-Blackwell, Oxford, Reino Unido. pp. 180-198.

- Wyman C. E., Decker S. R., Himmel M. E., Brady J. W., Skopec C. E. y Viikari L. (2005). Hydrolysis of Cellulose and Hemicellulose. En: *Polysaccharides: Structural diversity and Functional Versatility* (Ed. Dumitriu S.). Marcel Dekker, Nueva York.

- Zambrano Zaragoza M. y Gallardo Navarro Y. (2002). Caracterización fisicoquímica del nopal. En: *Temas en Tecnología de Alimentos. Vol. 2. Fibra dietética*. (Ed. Lajolo, F. y Wenzel, E.). Alfaomega, CYTED, Madrid, España.

- Zhang (2007). Microwave assisted extraction of secoisolariciresinoldiglucoside from flaxseed hull. *Journal of the science of Food and Agriculture* 87: 1455-1462.

- Zhang W., Azevedo M. S., Gonzalez A. M., Saif L. J., Van N., Guyen T., Wen K., Yousef A. E. y Van L. (2008). Influence of probiotic Lactobacilli colonization on neonatal B cell responses in a probiotic pig model of human rotavirus infection and disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 122, 175-181.

- Zhang H., Di Boise J. K., Zuccolo A., Kudrna D., Braidotti M., Yu Y., Parameswaran P., Crowell M.D., Wing R., Rittmann B. E. y Krajmalnik-Brown R. (2009). Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106:2365-70.

- Zhou H. (2008). Rapid determination of solanesol in tobacco by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection following microwave-assisted extraction. *Journal of chromatography B* 835: 119-122.

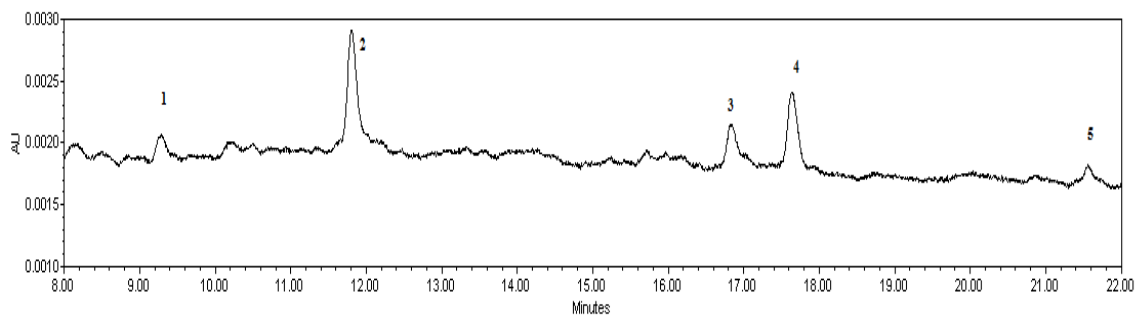
- Zimeri J. E. y Kokini J. L. (2003). Rheological properties of inulin-waxy maize starch systems. *Carbohydrate Polymers*, 52, No. 1, 67-85.

ANEXO

Identificación por HPLC

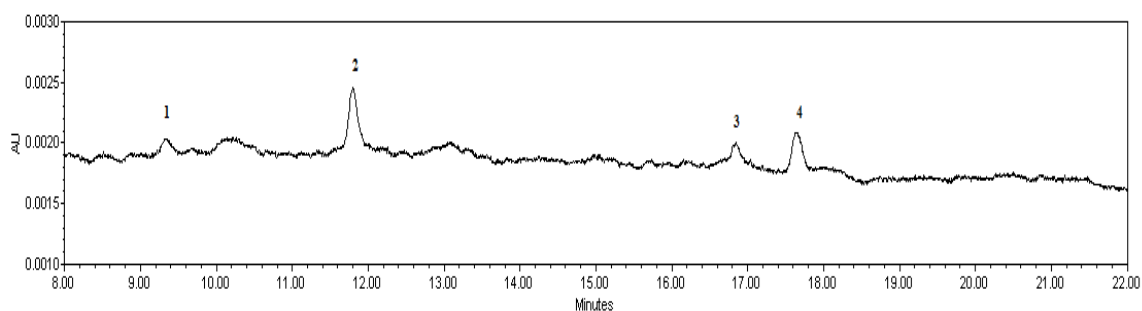
Fracciones obtenidas a partir de AIR-C

CB1



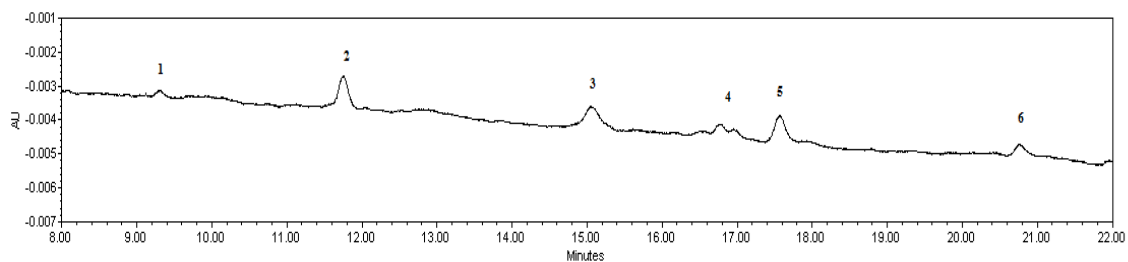
BRÁCTEAS	Número de Compuesto	Identidad Asignada	Tr (min)	Formula	PM
Fracción 1	1	Desconocido	9,3		
	2	Ácido Monocateoilquínico	11,8	$C_{16}H_{17}O_9$	353,09
	3	Apigenina 7-glucuronido I	16,8	$C_{21}H_{17}O_{11}$	445,08
	4	Pinoresinol 4-O-β-D-glucosido Pinoresinol-acetilhexosido (+)-Pinoresinol	17,6	$C_{26}H_{31}O_{11}$ $C_{28}H_{33}O_{12}$ $C_{20}H_{21}O_6$	519,19 561,20 357,13
	5	Desconocido	21,6		

CB2



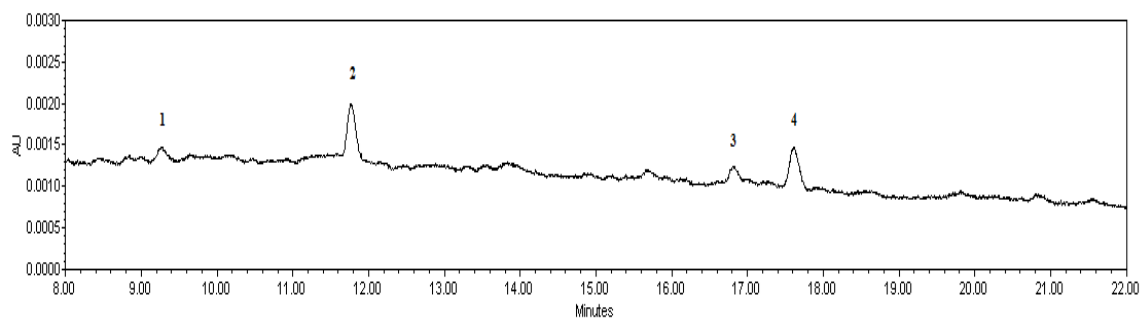
BRÁCTEAS	Número de Compuesto	Identidad Asignada	Tr (min)	Formula	PM
Fracción 2	1	Desconocido	9,3		
	2	Ácido Monocateoilquínico	11,8	$C_{16}H_{17}O_9$	353,09
	3	Apigenina 7-glucuronido I	16,8	$C_{21}H_{17}O_{11}$	445,08
	4	Pinoresinol 4-O-β-D-glucosido Pinoresinol-acetilhexosido (+)-Pinoresinol	17,6	$C_{26}H_{31}O_{11}$ $C_{28}H_{33}O_{12}$ $C_{20}H_{21}O_6$	519,19 561,20 357,13

CB3



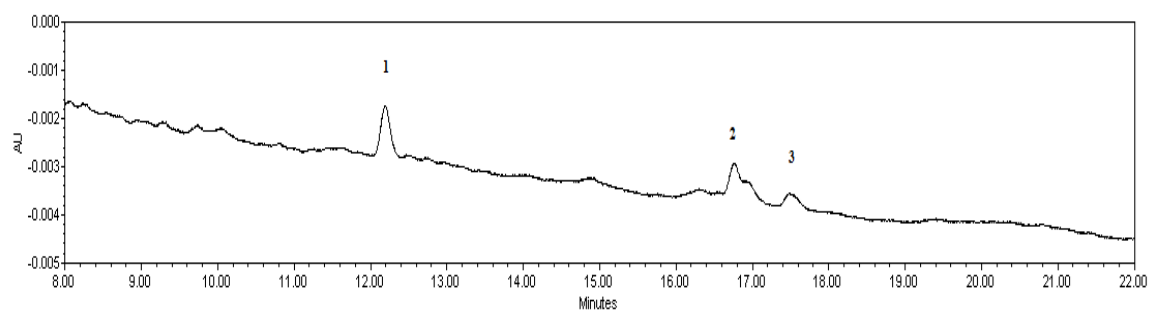
BRÁCTEAS	Número de Compuesto	Identidad Asignada	Tr (min)	Formula	PM
Fracción 3	1	Desconocido	9,3		
	2	Ácido Monocafeoilquínico	11,8	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353,09
	3	Ácido Dicafeoilquínico	15,0	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂	515,12
	4	Apigenina 7-glucuronido I	16,8	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₁	445,08
	5	Pinoresinol 4-O-β-D-glucosido Pinoresinol-acetilhexosido (+)-Pinoresinol	17,6	C ₂₆ H ₃₁ O ₁₁ C ₂₈ H ₃₃ O ₁₂ C ₂₀ H ₂₁ O ₆	519,19 561,20 357,13
	6	Desconocido	20,8		

CB4



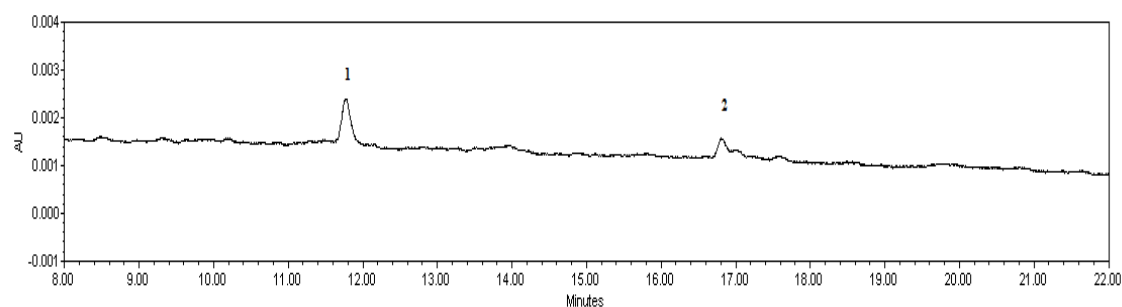
BRÁCTEAS	Número de Compuesto	Identidad Asignada	Tr (min)	Formula	PM
Fracción 4	1	Desconocido	9,3		
	2	Ácido Monocafeoilquínico	11,8	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353,09
	3	Apigenina 7-glucuronido I	16,8	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₁	445,08
	4	Pinoresinol 4-O-β-D-glucosido Pinoresinol-acetilhexosido (+)-Pinoresinol	17,6	C ₂₆ H ₃₁ O ₁₁ C ₂₈ H ₃₃ O ₁₂ C ₂₀ H ₂₁ O ₆	519,19 561,20 357,13

CS1



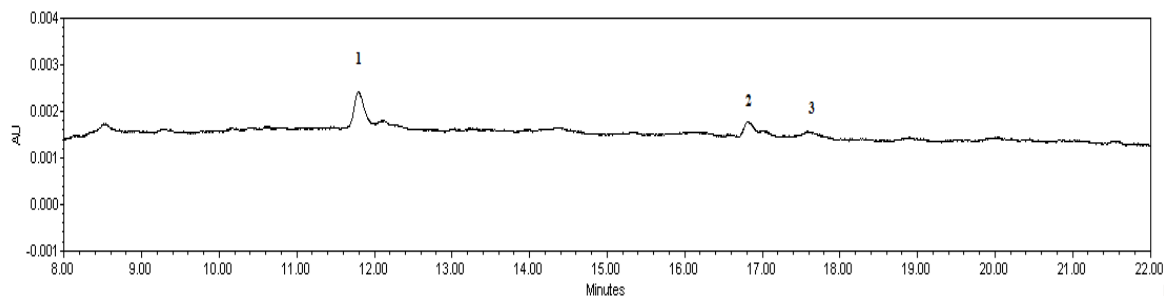
TALLO	Número de Compuesto	Identidad Asignada	Tr (min)	Formula	PM
Fracción 1	1	Ácido Monocateoilquínico	12,2	$C_{16}H_{17}O_9$	353,09
	2	Apigenina 7-glucuronido I	16,8	$C_{21}H_{17}O_{11}$	445,08
	3	Pinosinol 4-O- β -D-glucosido	17,5	$C_{26}H_{31}O_{11}$	519,19
		Pinosinol-acetilhexosido		$C_{28}H_{33}O_{12}$	561,20
		(+)-Pinosinol		$C_{20}H_{21}O_6$	357,13

CS2



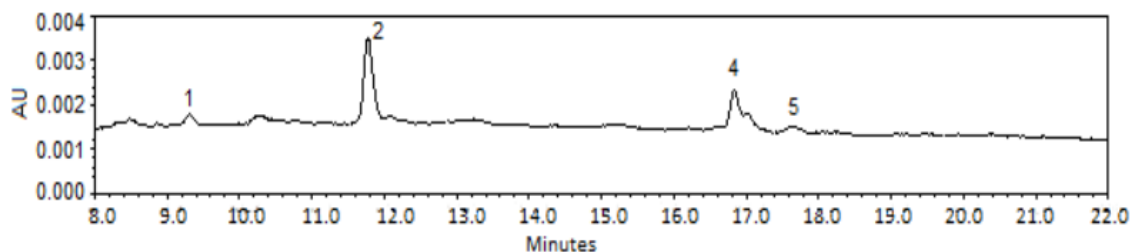
TALLO	Número de Compuesto	Identidad Asignada	Tr (min)	Formula	PM
Fracción 2	1	Ácido Monocateoilquínico	11,8	$C_{16}H_{17}O_9$	353,09
	2	Apigenina 7-glucuronido I	16,8	$C_{21}H_{17}O_{11}$	445,08

CS3



TALLO	Número de Compuesto	Identidad Asignada	Tr (min)	Formula	PM
Fracción 3	1	Ácido Monocateoilquínico	11,8	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353,09
	2	Apigenina 7-glucuronido I	16,8	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₁	445,08
	3	Pinosinol 4-O-β-D-glucosido Pinosinol-acetilhexosido (+)-Pinosinol	17,6	C ₂₆ H ₃₁ O ₁₁ C ₂₈ H ₃₃ O ₁₂ C ₂₀ H ₂₁ O ₆	519,19 561,20 357,13

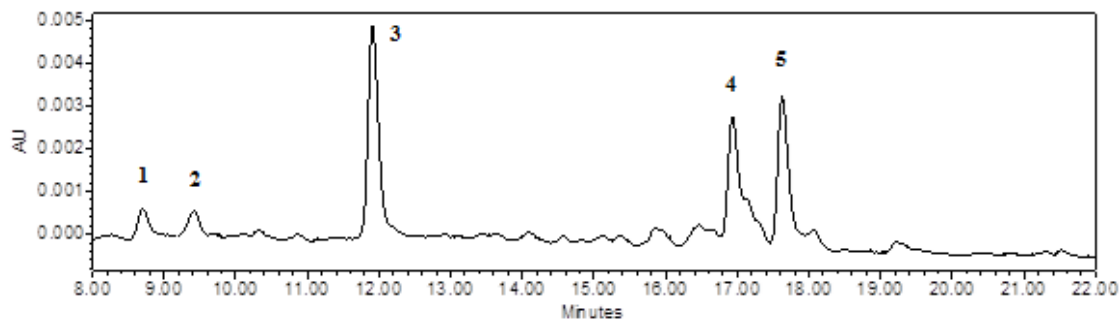
CS4



TALLO	Número de Compuesto	Identidad Asignada	Tr (min)	Formula	PM
Fracción 4	1	Desconocido	9,3		
	2	Ácido Monocateoilquínico	11,8	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353,09
	3	Apigenina 7-glucuronide I	16,8	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₁	445,08
	4	Pinosinol 4-O-β-D-glucosido Pinosinol-acetilhexosido (+)-Pinosinol	17,6	C ₂₆ H ₃₁ O ₁₁ C ₂₈ H ₃₃ O ₁₂ C ₂₀ H ₂₁ O ₆	519,19 561,20 357,13

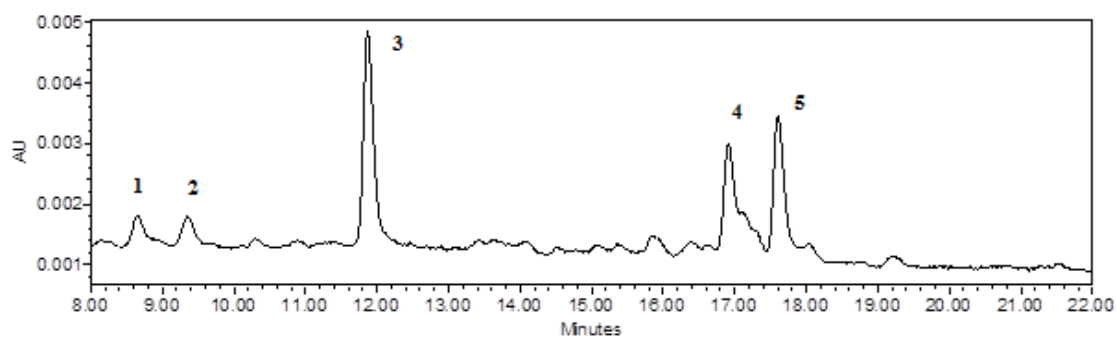
Fracciones obtenidas a partir de AIR-M

MB1



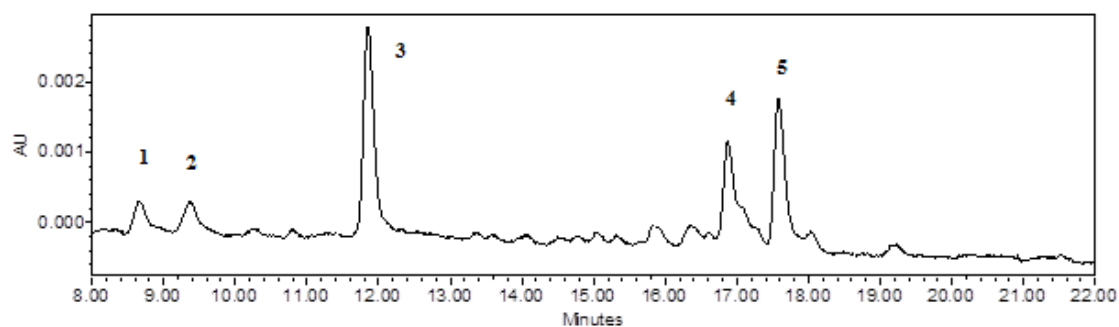
BRÁCTEAS	Número de Compuesto	Identidad Asignada	Tr (min)	Formula	PM
Fracción 1	1	Desconocido	8,7		
	2	Desconocido	9,4		
	3	Ácido Monocafeoilquínico	11,9	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353,09
	4	Apigenina 7-glucuronido I	16,9	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₁	445,08
	5	Pinoresinol 4-O-β-D-glucosido Pinoresinol-acetilhexosido (+)-Pinoresinol	17,6	C ₂₆ H ₃₁ O ₁₁ C ₂₈ H ₃₃ O ₁₂ C ₂₀ H ₂₁ O ₆	519,19 561,20 357,13

MB2



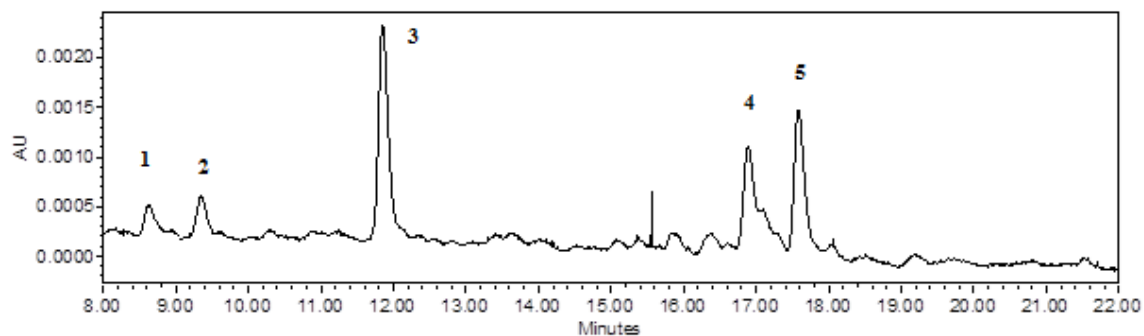
BRÁCTEAS	Número de Compuesto	Identidad Asignada	Tr (min)	Formula	PM
Fracción 2	1	Desconocido	8,6		
	2	Desconocido	9,4		
	3	Ácido Monocafeoilquínico	11,9	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353,09
	4	Apigenina 7-glucuronido I	16,9	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₁	445,08
	5	Pinoresinol 4-O-β-D-glucosido Pinoresinol-acetilhexosido (+)-Pinoresinol	17,6	C ₂₆ H ₃₁ O ₁₁ C ₂₈ H ₃₃ O ₁₂ C ₂₀ H ₂₁ O ₆	519,19 561,20 357,13

MB3



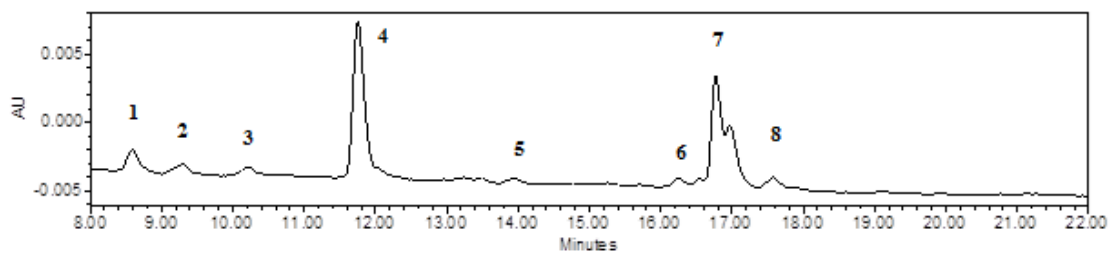
BRÁCTEAS	Número de Compuesto	Identidad Asignada	Tr (min)	Formula	PM
Fración 3	1	Desconocido	8,7		
	2	Desconocido	9,4		
	3	Ácido Monocateoilquínico	11,9	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353,09
	4	Apigenina 7-glucuronido I	16,9	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₁	445,08
	5	Pinoresinol 4-O-β-D-glucosido Pinoresinol-acetilhexosido (+)-Pinoresinol	17,6	C ₂₆ H ₃₁ O ₁₁ C ₂₈ H ₃₃ O ₁₂ C ₂₀ H ₂₁ O ₆	519,19 561,20 357,13

MB4



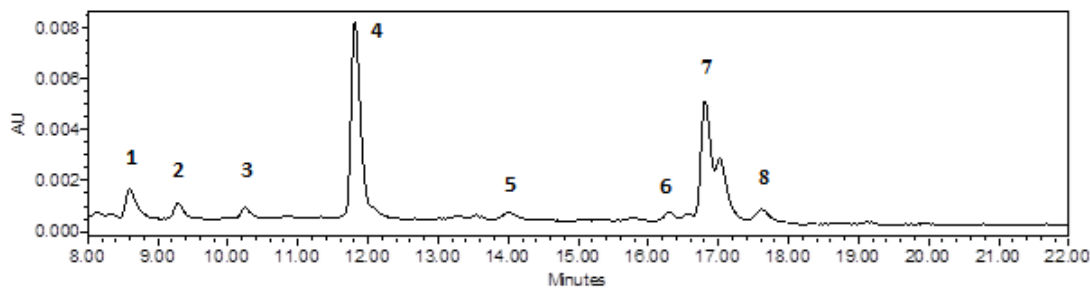
BRÁCTEAS	Número de Compuesto	Identidad Asignada	Tr (min)	Formula	PM
Fración 4	1	Desconocido	8,6		
	2	Desconocido	9,3		
	3	Ácido Monocateoilquínico	11,8	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353,09
	4	Apigenina 7-glucuronido I	16,9	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₁	445,08
	5	Pinoresinol 4-O-β-D-glucosido Pinoresinol-acetilhexosido (+)-Pinoresinol	17,6	C ₂₆ H ₃₁ O ₁₁ C ₂₈ H ₃₃ O ₁₂ C ₂₀ H ₂₁ O ₆	519,19 561,20 357,13

MS1



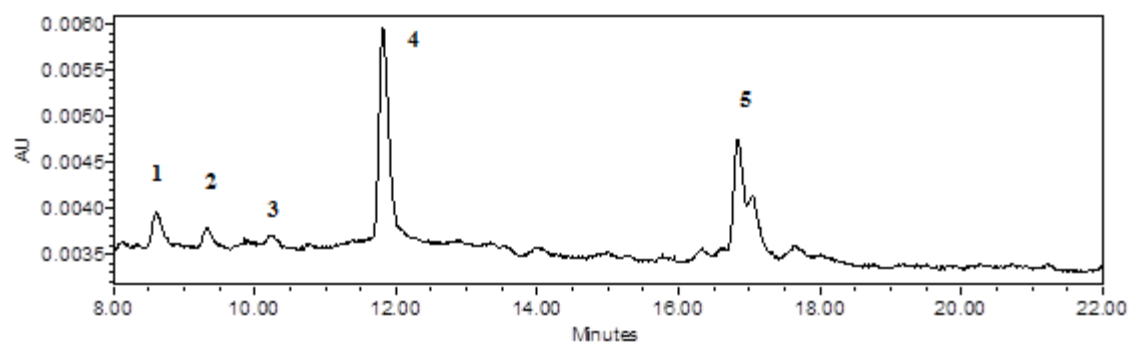
TALLO	Número de Compuesto	Identidad Asignada	Tr (min)	Formula	PM
Fracción 1	1	Desconocido	8,6		
	2	Desconocido	9,3		
	3	Desconocido	10,2		
	4	Ácido Monocafeoilquínico	11,8	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353,09
	5	Desconocido	13,9		
	6	Desconocido	16,3		
	7	Apigenina 7-glucuronido I	16,8	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₁	445,08
	8	Pinoresinol 4-O-β-D-glucosido Pinoresinol-acetilhexosido (+)-Pinoresinol	17,5	C ₂₆ H ₃₁ O ₁₁ C ₂₈ H ₃₃ O ₁₂ C ₂₀ H ₂₁ O ₆	519,19 561,20 357,13

MS2



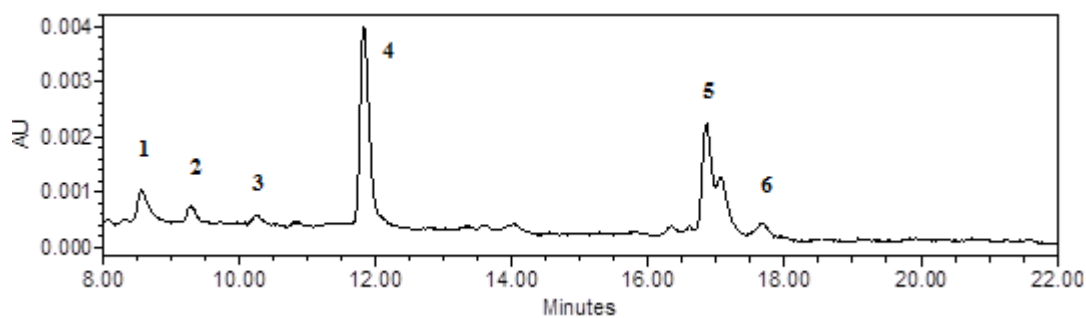
TALLO	Número de Compuesto	Identidad Asignada	Tr (min)	Formula	PM
Fracción 2	1	Desconocido	8,6		
	2	Desconocido	9,3		
	3	Desconocido	10,3		
	4	Ácido Monocafeoilquínico	11,8	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353,09
	5	Desconocido	14,0		
	6	Desconocido	16,3		
	7	Apigenina 7-glucuronido I	16,8	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₁	445,08
	8	Pinoresinol 4-O-β-D-glucosido Pinoresinol-acetilhexosido (+)-Pinoresinol	17,6	C ₂₆ H ₃₁ O ₁₁ C ₂₈ H ₃₃ O ₁₂ C ₂₀ H ₂₁ O ₆	519,19 561,20 357,13

MS3



TALLO	Número de Compuesto	Identidad Asignada	Tr (min)	Formula	PM
Fracción 3	1	Desconocido	8,6		
	2	Desconocido	9,3		
	3	Ácido Monocateoilquínico	11,8	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353,09
	4	Apigenina 7-glucuronido I	16,8	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₁	445,08
	5	Pinoresinol 4-O-β-D-glucosido Pinoresinol-acetilhexosido (+)-Pinoresinol	17,6	C ₂₆ H ₃₁ O ₁₁ C ₂₈ H ₃₃ O ₁₂ C ₂₀ H ₂₁ O ₆	519,19 561,20 357,13

MS4



TALLO	Número de Compuesto	Identidad Asignada	Tr (min)	Formula	PM
Fracción 4	1	Desconocido	8,6		
	2	Desconocido	9,3		
	3	Desconocido	10,2		
	4	Ácido Monocateoilquínico	11,8	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353,09
	5	Apigenina 7-glucuronido I	16,8	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₁	445,08
	6	Pinoresinol 4-O-β-D-glucosido Pinoresinol-acetylhexosido (+)-Pinoresinol	17,7	C ₂₆ H ₃₁ O ₁₁ C ₂₈ H ₃₃ O ₁₂ C ₂₀ H ₂₁ O ₆	519,19 561,20 357,13