

Tesis Doctoral

Caracterización y fotoestabilidad de compuestos fluorescentes y pardos generados en reacciones enzimáticas y no enzimáticas. Implicancias en la conservación de materiales orgánicos

Matiacevich, Silvia Beatriz

2008

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Matiacevich, Silvia Beatriz. (2008). Caracterización y fotoestabilidad de compuestos fluorescentes y pardos generados en reacciones enzimáticas y no enzimáticas. Implicancias en la conservación de materiales orgánicos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Matiacevich, Silvia Beatriz. "Caracterización y fotoestabilidad de compuestos fluorescentes y pardos generados en reacciones enzimáticas y no enzimáticas. Implicancias en la conservación de materiales orgánicos". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2008.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



*Universidad de Buenos Aires.
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Industrias*

Caracterización y fotoestabilidad de compuestos fluorescentes y pardos generados en reacciones enzimáticas y no enzimáticas. Implicancias en la conservación de materiales orgánicos.

**Tesis de Investigación para optar al Título
Doctor de la Universidad de Buenos Aires,
en el área Industrias**

Lic. Silvia Beatriz Matiacevich

Director: Dra. María del Pilar Buera

Consejero de estudios: Dra. María del Pilar Buera

Departamento de Industrias. Marzo de 2008

Caracterización y fotoestabilidad de compuestos fluorescentes y pardos generados en reacciones enzimáticas y no enzimáticas. Implicancias en la conservación de materiales orgánicos.

Las reacciones de pardeamiento no enzimático (reacción de Maillard) y enzimático (polimerización de polifenoles oxidados) generan productos fluorescentes y pigmentos pardos que contribuyen a las características físico-químicas de materiales orgánicos (biomoléculas, alimentos, fármacos).

El objetivo de esta tesis fue analizar las características cromáticas y de fluorescencia y la fotoestabilidad de los compuestos generados por la reacción de Maillard y de pigmentos polifenólicos, para dilucidar mecanismos de deterioro y control.

Se estudiaron sistemas modelo susceptibles de desarrollar productos pardos: pigmentos de Maillard (aminoácidos ó proteínas con azúcares) y polifenólicos (extraídos de té) y semillas sometidas a envejecimiento acelerado.

Los distintos tipos de pigmentos pardos tienen similares características cromáticas y fluorescentes. La observación más notable es la elevada fotoestabilidad de compuestos fluorescentes y pigmentos generados en la reacción de Maillard comparada con los polifenólicos. La irradiación en presencia del sensibilizante rosa de bengala produjo degradación tanto del colorante como de los pigmentos y permitió establecer diferencias en el mecanismo de fotodegradación de ambos tipos de pigmentos. El agregado de $MgCl_2$ afectó la cinética de desarrollo de pigmentos de Maillard pero no tuvo efecto sobre sus características espectroscópicas ni sobre su fotoestabilidad. El conocimiento del efecto de la luz y de la interacción de los pigmentos con distintos agentes es relevante para controlar y predecir la estabilidad de diferentes materiales orgánicos y ofrecer alternativas para modular la cinética de su generación.

Palabras claves: fotoestabilidad, fluorescencia, pardeamiento, reacción de Maillard, polifenoles, agentes sensibilizantes, conservación de semillas.

Characterization and photostability of fluorescent and pigment compounds from enzymatic and non-enzymatic reactions. Implications on the conservation of organic material.

Non-enzymatic (Maillard) and enzymatic (polymerisation of oxidized polyphenols) browning reactions generate fluorescent products and brown pigments that contribute to the physico-chemical properties of organic materials (biomolecules, foods, pharmaceuticals).

The objective of this Thesis was to analyse chromatic and fluorescent characteristics and photostability of brown products generated by Maillard reaction and of polyphenolic pigments, in order to elucidate deteriorative and controlling mechanisms.

Model systems susceptible to develop brown pigments were analysed: Maillard pigments (systems aminoacids or proteins with sugars) and polyphenolics (extracted from tea) and seeds submitted to accelerated aging.

The different types of brown pigments have similar chromatic and fluorescent characteristics. The most noticeable observation was the high photostability of fluorescent compounds and pigments from the Maillard reaction, in comparison to that of polyphenolic compounds. The irradiation in presence of the sensitizer rose bengal promoted colorant degradation and allowed to establish differences in the photodegradative mechanisms of both types of pigments. MgCl₂ addition affected the kinetics of brown pigments development by the Maillard reaction but it had no effect on the spectroscopic properties or on its photostability. The knowledge of the effects of light and of the interactions of pigments with different agents is relevant for controlling and predicting the stability of organic materials in order to offer alternatives to modulate the kinetics of its generation.

Key words: photostability, fluorescence, browning, Maillard reaction, polyphenols, sensibilizant agent, seed conservation.

AGRADECIMIENTOS

A todos los que hicieron posible este trabajo:

- *Mi directora, Dra. María del Pilar Buera, por su confianza y apoyo científico y humano indispensables para la realización del trabajo.*
- *El Dr. Claudio Borsarelli y su grupo, de la Univ. de Santiago del Estero, por el asesoramiento con el LFP, su paciencia y permitir mi visita a su laboratorio.*
- *El Dr. Horacio Corti, por el apoyo a la tesis y los viajes a través de los proyectos.*
- *La Dra. Sara Maldonado, Lic. Martina Castellión y Lic. Victor Panza por el asesoramiento con semillas.*
- *El Dr. Martín Desimone y Dr. Luis Diaz por el asesoramiento con encapsulados.*
- *Al Departamento de Industrias, por permitirme usar sus equipos e instalaciones.*
- *Al CONICET, por la beca doctoral recibida.*
- *Mis compañeros de laboratorio (Caro, Nuri, Lidia, Flor, Betty, Pato, Abel, Anita, Naty, Peggy, Cris), al grupo de Ana, de Rosita, de Lía, de Stella, de Sara, de Silvia y a Micky, por hacer del labo, pasillos y tantos festejos, lugares agradables durante tantas horas, y porque directa o indirectamente han colaborado en la realización de este trabajo.*
- *Nuri por ser mi amiga, por las dudas consultadas mutuas que nos hicieron aprender y los tiempos compartidos dentro y fuera del labo.*
- *Caro por ser una guía cada vez que necesité algo, hacerte extrañar tanto y ser una amiga.*
- *Pato, Marti y Abel, por tantas ayudas mutuas, favores extras y trabajos en colaboración.*
- *Juan por los sistemas de irradiación. Carlitos, Matías y Martín por cumplir casi todos los favores pedidos.*
- *Leandro, por tu paciencia, apoyo y amor.*

A todos los que apoyaron emocionalmente porque saben valorar lo que esto significa:

- *mis amigas de siempre, Vero y Kari.*
- *mis abuelos y mis suegros.*
- *Mi tía Liliana y mis primas. Mis hermanos por darme la alegría de ser tía.*
- *Mis amigos y colegas: Leopold, Pao, Clau, Nico y Polín, porque a pesar del tiempo y la distancia, los aprecio y respeto muchísimo.*

A Leandro

I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. Reacciones de pardeamiento no enzimático	1
I.1.A. Caramelización	1
I.1.B. Reacción de Maillard	2
I.1.B.1. Esquema de la reacción	2
I.1.B.2. Consideraciones cinéticas	4
I.1.B.3. Evaluación del grado de reacción.....	8
I.1.C. Pardeamiento enzimático	9
I.2. Reacciones químicas y movilidad molecular	13
I.2.1. Propiedades térmicas (DSC)	13
I.2.2. Procesos de relajación (RMN).....	17
I.3. Fluorescencia	20
I.3.1. Proceso de fluorescencia	20
I.3.2. Variables que afectan la fluorescencia	22
I.3.3. Evaluación de la fluorescencia.....	24
I.3.4. Fluorescencia del triptofano. Relación con los cambios conformacionales de proteínas.	26
I.4. Técnica de fotólisis de destello (LFP)	27
I.5. Agentes sensibilizantes.....	30
I.5.1. Rosa de bengala	30
I.5.2. Riboflavina	31
I.6. El color	31
I.6.1. La percepción del color.	31
I.6.2. Evaluación del color	32
I.7. Compuestos fluorescentes y pigmentos pardos en alimentos y sistemas biológicos.	33
I.7.1. Fluorescencia en reacción de Maillard	33
I.7.2. Estabilidad de pigmentos a la irradiación.....	36
I.7.3. Efecto de las sales sobre la cinética de la reacción de Maillard	37
I.7.4. Evidencia de la reacción de Maillard en sistemas biológicos.	38
I.7.4.1. Tejidos Animales.	38
I.7.4.2. Semillas	39
I.7.4.2.A. <i>Chenopodium quinoa</i>	40
I.7.4.2.B. <i>Araucaria angustifolia</i>	41
II. OBJETIVO.....	42
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
III.1. Preparación de sistemas estudiados.	43
III.1.1. Reacción de pardeamiento no enzimático: Sistemas modelo.	43
III.1.1.A. Sistemas líquidos.	43
III.1.1.B. Sistemas liofilizados.	44
III.1.1.C. Sistemas en soportes sólidos.	44
III.1.2. Reacción de pardeamiento enzimático: Polifenoles de hojas de té.	46
III.1.3. Sistemas biológicos. Semillas.	47
III.1.3.A. <i>Chenopodium quinoa</i>	47
III.1.3.B. <i>Araucaria angustifolia</i>	47
III.1.4. Agentes sensibilizantes.	47
III.2. Metodología.	48
III.2.1. Determinación de pH.	48
III.2.2. Medición de contenido de agua.	48
III.2.3. Tratamiento térmico.	48

III.2.4. Determinación del grado de formación de pigmentos pardos.	48
III.2.4.1. Medición de absorbancia.	48
III.2.4.2. Medición de color.	49
III.2.5. Determinación de fluorescencia.	50
III.2.5.1. Medición del rendimiento cuántico.	51
III.2.5.2. Cuantificación de compuestos fluorescentes.	53
III.2.6. Irradiación.	53
III.2.6.1. Irradiación directa de pigmentos.	53
III.2.6.2. Irradiación en presencia del agente sensibilizante rosa de bengala.	55
III.2.6.3. Irradiación en presencia del agente sensibilizante riboflavina.	56
III.2.7. Métodos de extracción.	57
III.2.7.1. Extracción de polifenoles de hojas de té.	57
III.2.7.2. Extracción de lípidos de semillas.	57
III.2.7.3. Extracción de proteínas.	57
III.2.8. Cuantificación de proteínas.	60
III.2.8.1. Método de Bradford.	60
III.2.5.2. Método de micro-Kjeldahl.	60
III.2.6. Análisis de la preservación de semillas.	61
III.2.6.1. Análisis de la germinación.	61
III.2.6.2. Análisis bioquímico de viabilidad.	61
III.2.10. Determinación de fenoles totales.	62
III.2.11. Selección de condiciones para la obtención de compuestos polifenólicos.	63
III.2.12. Fotólisis de destello (Laser Flash Photolysis).	65
III.2.13. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).	66
III.2.14. Resonancia nuclear magnética (RMN).	67
III.2.15. Electroforesis en gel de poli(acrilamida).	68
III.2.16. Registro de imágenes.	70
III.2.16. Tratamiento de datos.	71
IV. RESULTADOS	72
IV.1. CAPITULO 1. Generación y caracterización de compuestos fluorescentes y pigmentos pardos.	72
IV.1.1. Generación de compuestos fluorescentes y pigmentos pardos	73
IV.1.2. Caracterización de compuestos fluorescentes.	79
IV.1.2.1. Espectros de emisión y excitación.	79
IV.1.2.2. Fluorescencia sincrónica.	84
IV.1.2.3. Rendimiento cuántico de fluorescencia	87
IV.1.2.4. Corrimiento de Stokes.	95
IV.1.3. Modificaciones paralelas en el sistema modelo de proteínas.	98
IV.1.4. Comparación del desarrollo de fluorescencia y color como potenciales marcadores de la reacción de Maillard.	102
IV.1.5. Modificación de la cinética de Maillard por la presencia de MgCl₂	108
IV.1.5.1. Efectos sobre la fluorescencia y el pardeamiento	109
IV.1.5.2. Efecto sobre la cristalización de la trehalosa.	114
IV.1.5.3. Cambios de pH	117
IV.1.5.4. Relación entre el contenido de agua y la cinética de reacción.	117
IV.1.5.5. Efecto sobre la movilidad molecular (1H-RMN)	118

IV.2. CAPITULO 2. Fotoestabilidad de compuestos fluorescentes y pigmentos pardos....	121
IV.2.1. Irradiación directa con UV-Visible	123
IV.2.1.1. Sistemas modelo líquidos de Maillard	123
IV.2.1.2. Sistema compuestos polifenólicos de té.	132
IV.2.1.3. Sistemas modelo en soportes.	133
IV.2.2. Irradiación en presencia de agentes sensibilizantes.	142
IV.2.2.1. Rosa de bengala.	142
IV.2.2.1.A. Irradiación del rosa de bengala (RB)	142
IV.2.2.1.B. Irradiación de los pigmentos de Maillard en presencia de RB.	144
IV.2.2.1.C. Irradiación de los pigmentos polifenólicos de té en presencia de RB.	146
IV.2.2.1.D. Mecanismos de interacción propuestos para la fotodestrucción de pigmentos en presencia del sensibilizante RB.	151
IV.2.2.2. Riboflavina	153
IV.2.2.2.A. Irradiación de riboflavina (RF)	153
IV.2.2.2.B. Irradiación de los pigmentos de Maillard en presencia de RF.	156
IV.2.2.2.D. Mecanismos propuestos para la fotodestrucción de riboflavina.	159
IV.2.4. Chenopodium quinoa.	161
IV.2.4.1. Cambios observados durante el almacenamiento.	161
IV.2.4.2. Cambios provocados por la irradiación de las semillas	177
IV.2.4.3. Envejecimiento acelerado combinado con irradiación.	180
IV.2.4.4. Irradiación del extracto proteico.	183
IV.2.5. Araucaria angustifolia.	184
IV.2.5.1. Cambios provocados por la irradiación del prótalo.	184
IV.2.5.2. Envejecimiento acelerado combinado con irradiación.	187
IV.3. Resumen de resultados.	191
V. CONCLUSIONES.....	194
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	197

I. Introducción

Los cambios durante el procesamiento, almacenamiento y distribución de alimentos y materiales orgánicos en general, alteran las características físicas, químicas y/o biológicas que afectan en mayor o menor medida la calidad de los mismos. El pardeamiento (enzimático o no) es una de las principales causas de cambio de calidad y se puede deber a distintos tipos de reacciones químicas de deterioro. Por lo tanto es importante el conocimiento de mecanismos involucrados y factores determinantes de la cinética de las reacciones que lo generan tanto para diseñar métodos de estabilización como para ejercer acciones de control.

1.1. Reacciones de pardeamiento no enzimático.

Estas reacciones incluyen a la reacción de Maillard, la caramelización y la polimerización de derivados de ácido ascórbico o de polifenoles oxidados. En todas ellas se generan pigmentos pardos. Tanto la caramelización como la reacción de Maillard comprenden un grupo complejo de varias reacciones que comienzan con la apertura del anillo hemiacetalico de los azúcares reductores y la enolización de los mismos, seguida de una serie de transformaciones que conducen a la formación de pigmentos amarillos, rojos y/o marrones de naturaleza coloidal (Burton y col., 1963).

Los efectos del pardeamiento no enzimático producen modificaciones en la calidad y valor nutritivo a causa de:

- Cambios de color debidos a la producción de sustancias pardas y destrucción de pigmentos del alimento.
- Producción de aromas y sabores.
- Pérdida de solubilidad de proteínas, con los consiguientes cambios en la textura y alteración en el poder de reconstitución de los alimentos deshidratados.
- Pérdida del valor nutritivo al dañarse aminoácidos esenciales como la L-lisina, o vitaminas como el ácido ascórbico.
- Producción de metabolitos de acción potencialmente tóxica.
- Liberación de gas (CO₂).
- Disminución del pH.

1.1.A. Caramelización.

Cuando se almacenan azúcares en forma anhidra o en solución, éstos se descomponen formando un pigmento pardo de naturaleza polimérica, conocido como “caramelo”. Esta descomposición es catalizada por ácidos y bases. Los azúcares experimentan hidrólisis, enolización, isomerización, deshidratación, fragmentación y oxidación. De este modo, se

forman compuestos carbonílicos altamente reactivos que reaccionan entre sí dando polímeros insaturados de color pardo. De las diversas rutas posibles en las que continúa la reacción, en medio ácido predomina la deshidratación y los principales intermediarios son derivados del furfural. En medio alcalino las reacciones de enolización ocurren rápidamente, abundan los productos de fragmentación y oxidación, y como resultado el pardeamiento es rápido (Hodge y Osman, 1976).

1.1.B. Reacción de Maillard.

1.1.B.1. Esquema de la reacción.

La reacción entre azúcares reductores y grupos amino fue descrita por primera vez por Louis-Camille Maillard (Maillard, 1912). Maillard fue el primero en valorar el significado de la reacción en áreas tan diversas como patología vegetal, geología y medicina. La química de esta reacción comprende una serie compleja de reacciones que llevan a la formación de una gran variedad de compuestos, algunos de importancia a nivel industrial, como por ejemplo sabores y aromas, que definen la calidad de alimentos.

La incubación de proteínas o aminoácidos con glucosa lleva a la formación de productos de glicosilación a través de la reacción de Maillard. Productos e intermediarios de esta reacción compleja se caracterizan por su fluorescencia y con el tiempo llevan a la formación de pigmentos pardos y/o formación de entrecruzamientos entre proteínas, causando rigidez y pérdida de funcionalidad de las mismas (Graham, 1996). Mientras en el área de las ciencias de los alimentos los productos de esta reacción son considerados como un índice de pérdida de calidad, en ciencias médicas y biológicas se consideran indicadores del grado de daño producido en biomoléculas, a través del tiempo.

Después del esquema realizado por Hodge (1953), la reacción de Maillard generalmente se dividió en tres grandes etapas (Mauron, 1981; Labuza, 1994; van Boekel, 2001):

- I. La primera etapa involucra la condensación entre un azúcar y un grupo amino y la consiguiente isomerización (rearreglos de Amadori/Heinz). Este paso de reacción fue muy bien descrito y en él no hay formación de pigmentos.
- II. La segunda etapa incluye la reacción de los compuestos de Amadori para formar productos de deshidratación y fragmentación, y degradación de aminoácidos vía la reacción de Strecker (especialmente a altas temperaturas).
- III. Por último, en la etapa final, los productos de Amadori se degradan en compuestos α -dicarbonilos, que rápidamente reaccionan con grupos amino formando un

entrecruzamiento intra e inter molecular estable (Brownlee y col., 1988), que es responsable de la formación de los cromóforos.

La cascada de reacciones que le sigue a la formación de los intermediarios iniciales no conforman reacciones clásicas, sino que más bien representan una serie de reacciones consecutivas y paralelas que ocurren en el mismo grupo de reacción y que produce una compleja matriz de reacciones. Yaylayan (1997) introdujo una visión de la reacción mucho más realista que la de Hodge (1953). Su abordaje conceptual del proceso que ocurre mientras progresan las reacciones involucra la formación e interacción de grupos químicos coexistentes (reactivos, intermediarios y productos finales). La Figura I.1 representa el esquema de la reacción de Maillard, basado en el esquema de Hodge (Hodge, 1953), pero incorporando el concepto de grupo o *pool* desarrollado por Yaylayan (1997).

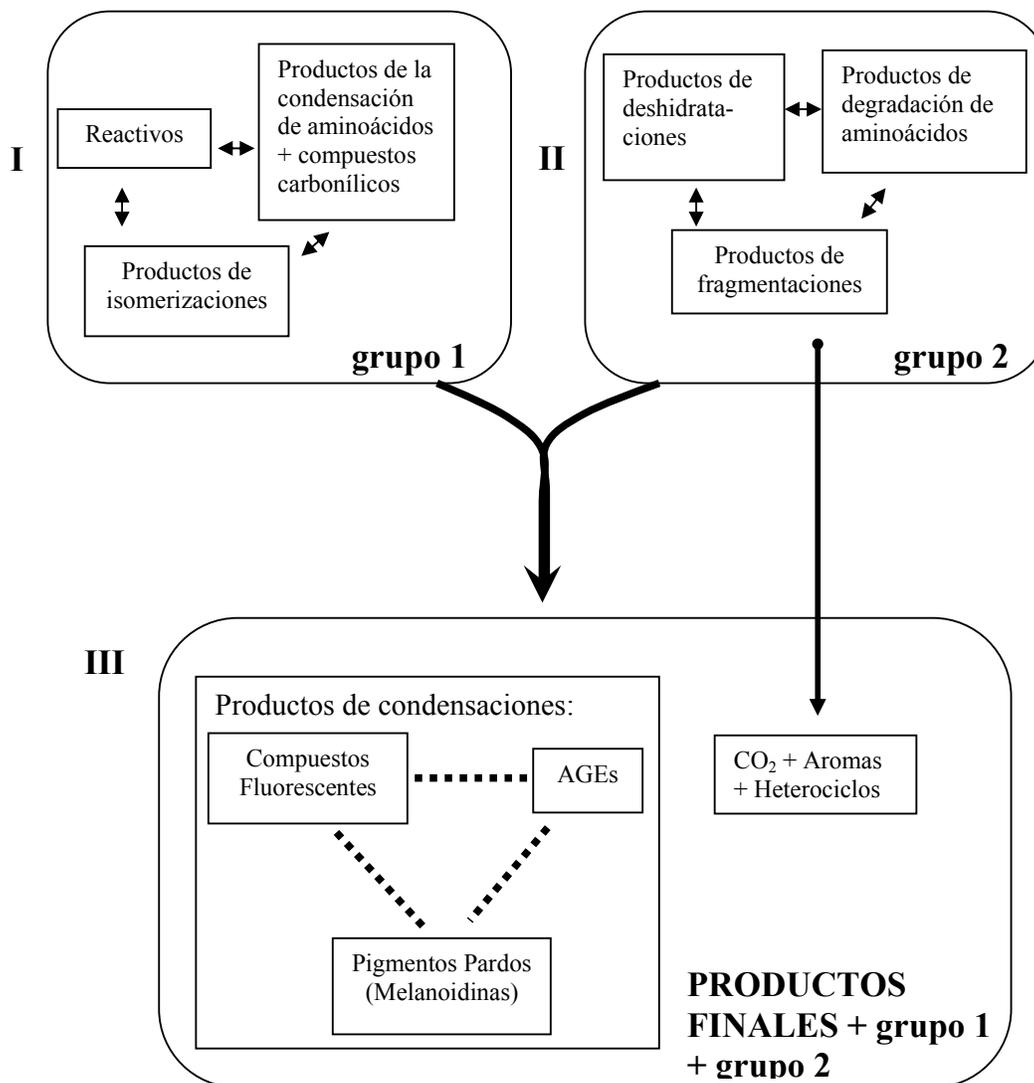


Figura I.1. Esquema de la reacción de Maillard, adaptado de Matiacevich y col., 2005. AGEs: productos finales avanzados de glicosilación.

Reactivos y productos de la primera etapa están incluidos en el grupo 1. El grupo 2 está compuesto por los productos de deshidratación y fragmentación derivados del grupo 1, y por la degradación independiente de azúcares y aminoácidos. Reactivos y productos de ambos grupos pueden posteriormente reaccionar y se encuentran también al final de la reacción junto con los productos finales.

Este esquema contempla resultados previos que indican que los compuestos fluorescentes pueden ser convertidos en AGEs (productos finales avanzados de glicosilación, del inglés, “*advanced glycosilated end products*”), y luego en pigmentos pardos, o que directamente pueden reaccionar para formar los pigmentos. Igualmente, si bien la estructura de muchos compuestos fluorescentes fue ya descrita, la estructura de los productos de glicosilación avanzada (AGEs) que fluorescen es todavía desconocida (Sander y Larsen, 1995; Obayashi y col., 1996; Leclère y Birlouez-Aragon, 2001; Tessier y col., 2002; Birlouez-Aragon y col., 2002).

En muchas áreas de las ciencias, la reacción de Maillard fue ganando una consideración importante ya que muchas de las patologías humanas son derivadas de la glicosilación no enzimática de proteínas (Monnier y Cerami, 1982; Monnier y col., 1984; Vlassara y col., 1986; Cerami, 1994; Baynes y Thorpe, 1999; Baynes, 2001).

1.1.B.2. Consideraciones cinéticas.

La cinética de la condensación amino-carbonilo inicial y la naturaleza de los productos de la reacción de Maillard está gobernada por el entorno químico inmediato de los reactivos, definido por la composición química del sistema (contenido de agua, pH, presencia y tipo de sales *buffer*, temperatura y exposición a la luz) (Cerruti y col., 1985; Buera y col., 1987a y b; Labuza y Baisier, 1993; Labuza, 1994; Bell, 1997; Ajandouz y Puigserver, 1999; van Boekel, 2001; Matiacevich y Buera, 2006). La reacción se acelera a humedades relativas intermedias, a pH neutro, en un medio con *buffer* y a alta temperatura (Labuza, 1994). Por lo tanto, la composición y concentración de pigmentos y sustancias que imparten olores y sabores es función de todas las variables mencionadas, y de la interrelación entre las mismas.

a) Contenido de agua y actividad de agua (a_w).

El agua es un factor importante en la reacción de Maillard, ya que ejerce su influencia controlando la viscosidad de la fase líquida, y la disolución, concentración o dilución de los reactivos (Warmbier y col., 1976; Labuza y col., 1977). Se comporta además como un agente

inhibidor, ya que es un producto de la reacción (Eichner y Karel, 1972; Labuza y Saltmarch, 1980; Labuza y col., 1977). Existe por lo tanto un compromiso entre la aceleración que produce el agua al disminuir la viscosidad y el efecto inhibitorio de la misma.

La actividad de agua, definida como $a_w = P/P_0$ donde P es la presión de vapor de agua en el alimento y P_0 es la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura, es otro parámetro que está relacionado con el contenido de agua en el sistema y que afecta la cinética de la reacción, ya que es una medida de la disponibilidad o reactividad del agua.

En sistemas líquidos la velocidad de pardeamiento disminuye asintóticamente con el aumento de a_w . A altos niveles de a_w una pequeña variación en el a_w tiene un efecto insignificante en la tasa de pardeamiento (Loncin y Merson, 1979; Cerrutti y col., 1985; Petriella y col., 1985).

b) pH.

El pH tiene un efecto muy significativo en la reacción de Maillard. Tanto el pH inicial del producto, como la capacidad *buffer* del sistema influyen sobre la velocidad y la dirección de la reacción (Ellis, 1959; Nursten, 1980, Bell, 1997). La velocidad de pardeamiento es baja a valores de pH ácido (inferiores a 6), y aumenta con el aumento de pH hasta un valor aproximado de $\text{pH} = 10$ (Wolfson y col., 1953; Ashoor y Zent, 1984; Bell, 1997). La disminución en la velocidad a pH inferiores a 6 se debe a que a estos valores de pH, el grupo amino se encuentra cargado positivamente y se inhibe la formación de la glicosilamina. La disminución en la velocidad de reacción a valores de pH mayores que 10 puede deberse a la deficiencia de iones H^+ que se requieren para catalizar el ordenamiento de Amadori (Isbell y Frush, 1958) y Heyns (Carson, 1955). Es importante destacar que durante la reacción, el pH del sistema disminuye debido a la desaparición de grupos básicos de los aminoácidos (Dworschak y Orsi, 1977) y a la naturaleza acídica de los intermediarios que se forman.

c) Temperatura.

La influencia de la temperatura sobre la velocidad de los procesos químicos fue interpretada por van't Hoff en 1884 y por Arrhenius en 1889. Como una regla general, la velocidad de reacción se duplica por cada 10°C de aumento de temperatura. El aumento de la temperatura tiene un efecto acelerador sobre la formación de color. Esto se debe a que el calor favorece cada una de las etapas de la reacción. Sin embargo, debido a cambios en las propiedades fisicoquímicas, la velocidad de reacción generalmente no puede ser obtenida simplemente por extrapolación cuando a temperaturas intermedias entre los datos empleados para el

cálculo y el rango experimental ocurren cambios de fase como cristalizaciones o fusiones (Pordal Poulsen, 1981).

Los cambios de fase provocan concentración de reactivos en la fracción no cristalizada, cambios de pH y fuerza iónica que afectan la dependencia de la reacción con la temperatura.

Un factor importante a tener en cuenta es que la temperatura además tiene efecto sobre otras reacciones paralelas a las de pardeamiento, en las que se pueden generar grupos reactivos que participan en las reacciones de formación de color. Por ejemplo, la oxidación de lípidos, hidrólisis de azúcares no reductores y cualquier otra reacción en la que se generen carbonilos reactivos, son reacciones que afectan la velocidad de pardeamiento.

d) Composición del sistema.

**** Azúcares:***

Existe una regla general y es que las pentosas son más reactivas que las hexosas y éstas son más reactivas que los disacáridos reductores (Shallenberger y Birch, 1975; Mauron, 1981). Los disacáridos no reductores primero deben hidrolizarse, y por lo tanto, se consideran menos reactivos.

**** Amino compuestos:***

Los aminoácidos o péptidos actúan como fuente de grupos amino, que reaccionan con azúcares para formar glicosilaminas en una reacción reversible (Reynolds, 1963), y además son catalizadores, que favorecen un reordenamiento posterior (llamado de Amadori, si se trata de una aldosa, y de Heyns, si se trata de una cetosa) (Reynolds, 1970; Shallenberger y Birch, 1975). La reactividad de los distintos aminocompuestos es variable, y depende entre otros factores, del azúcar usado.

e) Estado físico y transiciones de fase.

Las transiciones de fase y estado de los materiales tienen efectos significativos en sus propiedades físicas e influyen en la cinética de las reacciones que en ellos se desarrollan. Los biomateriales se presentan en la naturaleza en un estado que no siempre corresponde a su condición de estabilidad termodinámica, y exhiben muchos cambios dependientes del tiempo, que no son típicos de compuestos puros simples, y afectan significativamente la estabilidad fisicoquímicas de los mismos. En estos casos, el estado físico es extremadamente sensible a la humedad, la temperatura y el tiempo de observación, y las transiciones de fase o estado

ocurren en función del tiempo como consecuencia de cambios en la composición o en alguna de las variables mencionadas.

La presencia e importancia de componentes en estado amorfo (con un orden molecular azaroso no cristalino) en los alimentos ha sido reconocida en numerosos trabajos (Katz y Labuza, 1980; Flink, 1983; Blanshard y Franks, 1987; Roos, 1987; Karel y col., 1994). Este estado se da en alimentos deshidratados como leche en polvo, vegetales secados o ciertos panificados. Está caracterizado por su altísima viscosidad que lo convierte en un material rígido y quebradizo. Algunos autores introdujeron entonces los principios utilizados en la ciencia de los polímeros sintéticos a la ciencia de los alimentos (Levine y Slade, 1986, 1988, 1990; Franks, 1994) y consideraron a la transición vítrea (temperatura a la cual los vidrios inorgánicos empiezan a ablandarse y fluir (Sperling, 1986) como uno de los cambios más importantes en el estado físico de sistemas biológicos concentrados y materiales alimenticios amorfos (Slade y Levine, 1991). Se propuso que las transiciones vítreas afectan las reacciones químicas controladas por la difusión de los reactivos a través del aumento del coeficiente de difusión.

Las transiciones con cambios entálpicos, como cristalizaciones, en sistemas previamente amorfos, afectan drásticamente la cinética de las reacciones químicas que ocurren en las matrices protectoras. Las transiciones vítreas tienen efectos menos impactantes, pero deben tenerse en cuenta porque deben ocurrir necesariamente para permitir que se produzcan las transiciones de primer orden en tiempo real. Existen evidencias, además, del efecto de las transiciones de fase sobre las reacciones de pardeo no enzimático o reacción de Maillard (Karmas y col., 1992). En consecuencia, al ocurrir la transición vítrea, los materiales son más susceptibles a cambios físicos o químicos.

e) Inhibición.

Las aproximaciones prácticas y teóricas para prevenir los efectos adversos de la reacción de Maillard incluyen:

- (1) modificación y remoción de los reactivos primarios y productos finales de la reacción.
- (2) prevención del deterioro a través del uso de antioxidantes.
- (3) bloqueo de la formación *in vivo* de los productos potencialmente tóxicos por modulación en la dieta.
- (4) estimación de bajos niveles de productos y su remoción a través de complejarlos con anticuerpos.

(5) estimulación de la inactivación *in vivo* de los productos tóxicos por el uso de aminoácidos y proteínas ricas en grupos sulfhídricos.

Los sulfitos son ampliamente usados como preservantes en alimentos, bebidas y productos farmacéuticos. Sin embargo, debido a las numerosas evidencias de reacciones adversas de los agentes sulfitantes (Gunnison y Jacobsen, 1987; Lester, 1995) analizar la eficacia de inhibidores inocuos de la reacción tiene alto interés tecnológico. Se sabe, por ejemplo, que las sales afectan la cinética de producción de pigmentos y compuestos fluorescentes en sistemas modelo (Petriella y col., 1988; Matiacevich y Buera, 2006; Santagapita y Buera, 2006).

1.1.B.3. Evaluación del grado de reacción

El progreso de la reacción de Maillard se puede monitorear en las etapas iniciales, intermedias y finales.

a) Etapas iniciales de la reacción:

En la etapa inicial no se observa la aparición de color pero sí aumenta el poder reductor y se puede monitorear la desaparición de los reactivos (azúcar reductor o aminoácido), o la formación de productos del re-ordenamiento de Amadori. Se han aplicado numerosas metodologías para la detección de estos compuestos, tales como: cromatografía en placa, métodos enzimáticos, análisis de aminoácidos, cromatografía en fase gaseosa, HPLC, entre otros (Yaylayan y Huyghues-Despointes, 1994; Ge y Lee, 1996; Blanka y col., 2002).

b) Etapas intermedias:

Se consideran intermediarios aquellos compuestos que se forman durante la descomposición de azúcares y no son coloreados, pero se polimerizan fácilmente para dar macromoléculas de pigmentación marrón. Entre estos compuestos se encuentra el 5-hidroxiacetilfurfural que se forma en las reacciones que ocurren en medio ácido. Otros intermediarios, que se forman en solventes no acuosos o en medios deshidratados, son las llamadas reductonas, que son fuertes agentes reductores.

Generalmente los compuestos intermediarios se determinan por medición de densidad óptica en el rango ultravioleta (280 nm para furfurales), ya que en esta fase aparece un color amarillento y aumenta la absorción en la región UV cercana debido a la deshidratación del azúcar y a la formación de compuestos α -carbonílicos se puede medir también el desarrollo de fluorescencia, la determinación de volátiles por cromatografía gaseosa, y además

determinación de la disminución de pH que ocurre por bloqueo de los grupos aminos y por la generación de compuestos ácidos.

El desarrollo de fluorescencia durante la reacción de Maillard ha sido ampliamente comprobado en numerosos sistemas azúcar-amino (Burton y col., 1962; Adhikari, 1973; Leclere y Birlouéz-Aragon, 2001), verificándose además que este desarrollo es mucho mayor que en un sistema que contenga únicamente azúcar. Solamente se han determinado algunas de las estructuras de los múltiples compuestos fluorescentes que se generan, las cuales pueden observarse en la Figura I.3, entre ellos la pentosidina.

Overby y Frost (1951) y Ellis (1959) sugirieron que los pigmentos fluorescentes pueden ser precursores de los coloreados, pero no idénticos a estos. Chio y Tappel (1969) postularon que la estructura $N-C=C-C=N$ puede explicar las propiedades fluorescentes de los derivados de los compuestos de Schiff.

c) Etapas finales: Medición del grado de pardeamiento.

En las fases finales se observa la aparición de pigmentos de color pardo - rojizo intenso que no se decoloran por la presencia de agentes decolorantes como los sulfitos.

Los pigmentos generados tienen absorbancia en el espectro visible y para lograr una caracterización del color se desarrollaron sistemas de medida que permiten la especificación completa en un espacio tridimensional. La medida objetiva del color de un material puede obtenerse del análisis de su espectro visible (transmisión o reflexión).

La variable más frecuentemente empleada para medir el desarrollo de reacciones de pardeamiento no enzimático en alimentos o sistemas modelo es la densidad óptica del sistema pardeado a una longitud de onda particular (generalmente entre 390-500 nm) (Ellis, 1959; Lee y col., 1984). En presencia de proteínas los productos de glicosilación desarrollan un hombro de absorción a 300 nm, y fluorescencia azul a 460 nm (excitando a 370 nm).

I.1.C. Pardeamiento enzimático

El pardeamiento enzimático sucede cuando se produce la ruptura de células vegetales, cuando los tejidos son sujetos a cortes u otro tipo de daños. La principal enzima responsable del pardeamiento enzimático es la polifenoloxidasas, que cataliza reacciones diferentes de acuerdo con el sustrato, generando intermediarios inestables que posteriormente se oxidan con O_2 , y se polimerizan para dar melaninas. Las melaninas son las responsables del color marrón indeseable que se produce por ejemplo en bananas, manzanas, papas y champiñones. También se produce insolubilización de proteínas, y pérdida del valor nutricional por

interacción de los polifenoles oxidados con aminoácidos. Entre los sustratos de esta reacción se incluyen fenoles simples, derivados del ácido cinámico y flavonoides. Los tejidos tienen distinta predisposición al pardeamiento enzimático, y estas variaciones se deben al contenido de enzimas y al tipo y cantidad de sustratos fenólicos presentes.

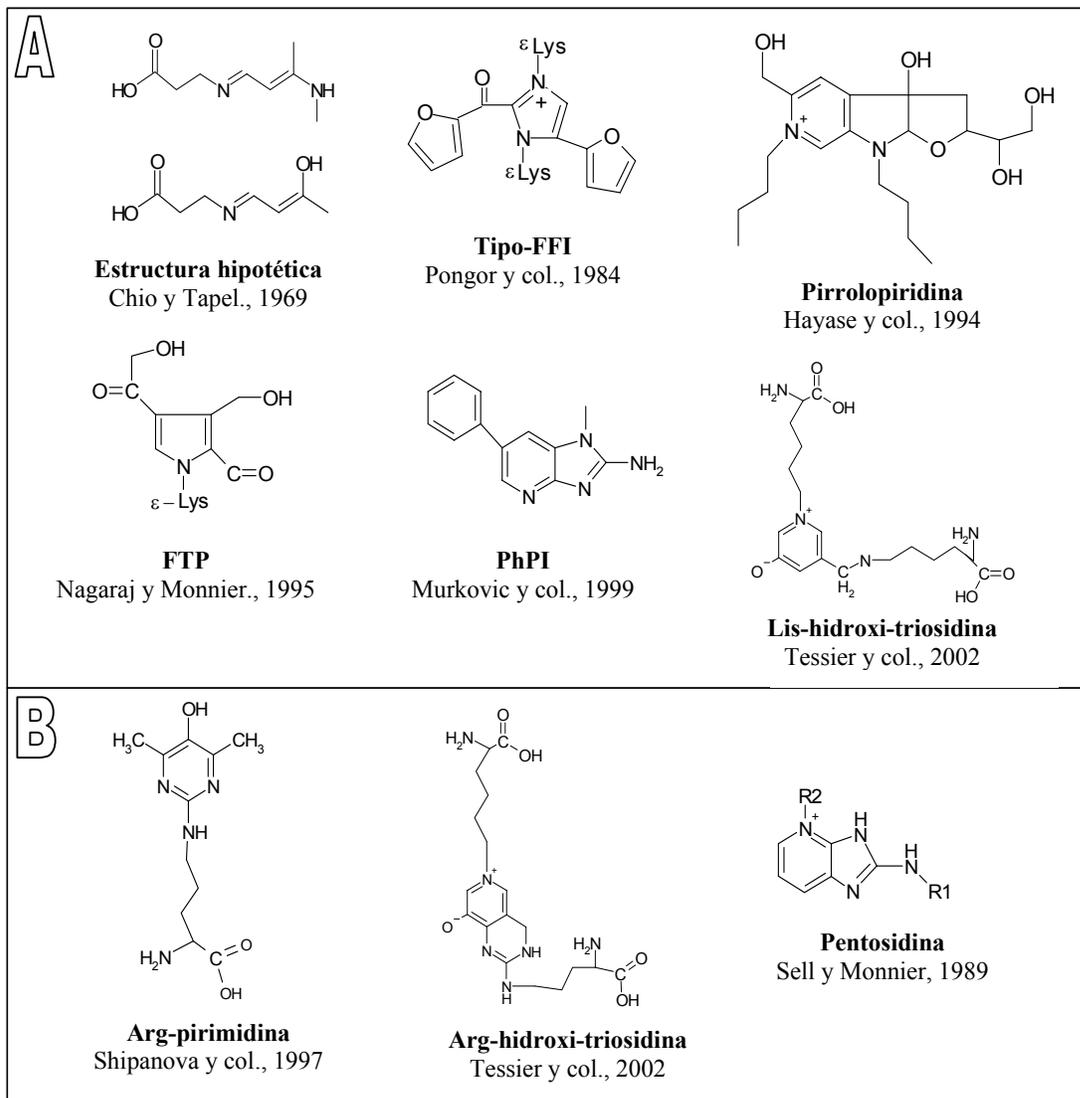


Figura I.3: Estructuras fluorescentes provenientes de la reacción de Maillard encontradas en alimentos, sistemas modelo y biológicos. **(A)** máximos de emisión y de excitación a 370/440 nm, respectivamente. **(B)** Máximos de emisión y de excitación a 320/380 nm, respectivamente.

Los métodos que se utilizan para minimizar esta reacción incluyen la exclusión de oxígeno, la aplicación de acidulantes, la inactivación térmica (escaldado), y el uso de inhibidores como el sulfito (Whitaker, 1996).

Otra enzima que participa indirectamente del pardeamiento enzimático es la lipoxigenasa, la cual produce la destrucción de clorofila y carotenos, y las reacciones oxidativas generan carbonilos que son precursores en las reacciones de pardeamiento no enzimático.

Los flavonoides están ampliamente distribuidos como metabolitos secundarios en las plantas, los cuales provienen de la adición de malonil CoA a la molécula de fenilpropanoid-coumaroil CoA (Figura 1.4.A).

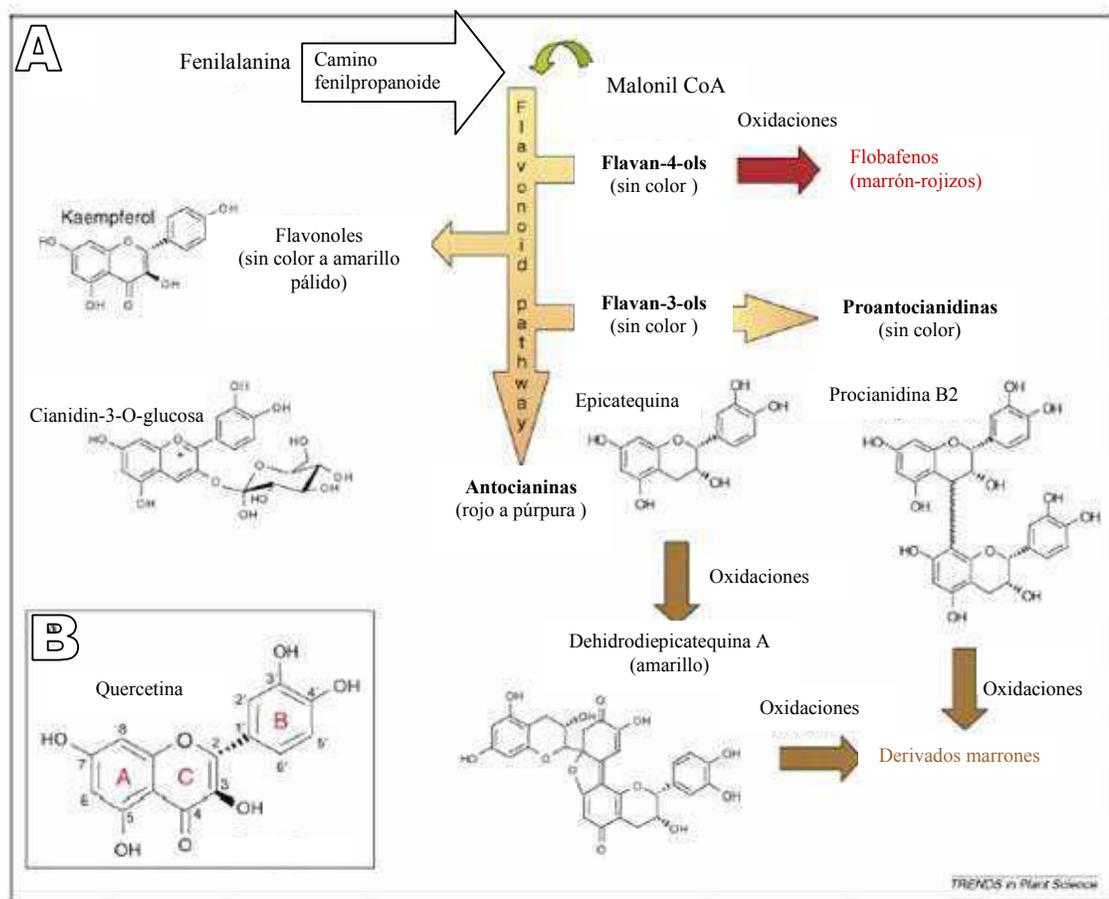


Figura 1.4. Estructura, biosíntesis y oxidación de flavonoides (Adaptado de Pourcel y col., 2007). **(A)** Esquema simplificado de la ruta de biosíntesis de los flavonoides. Las principales clases de productos finales con una estructura molecular ejemplo para cada clase. **(B)** La estructura molecular del flavonol llamado quercetina es utilizada como ejemplo del número de carbonos en la molécula.

Estos compuestos polifenólicos están caracterizados por dos ciclos aromáticos (anillos A y B) unidos por un heterociclo (anillo C) (Figura 1.4.B) y son clasificados según el grado de oxidación del anillo C en flavonoles, antocianinas y flavan-3-oles (Figura 1.4.A). Estas moléculas pueden tener posteriores modificaciones de sus ciclos aromáticos, como

hidroxilaciones, metilaciones, glicosilaciones ó acilaciones, lo cual produce una gran diversidad dentro de cada clase de compuestos.

Los mecanismos principales en la oxidación de los flavonoides que llevan a la formación de polímeros pardos se esquematizan en la Figura I.5. Los polifenoles obtenidos pueden reaccionar espontáneamente con fenoles, aminoácidos o proteínas, generando una gran cantidad de productos marrones (Figura I.5.A). A través de reacciones de oxidación acopladas (Figura I.5.B), las quinonas pueden oxidar a otros polifenoles que no pueden ser directamente oxidados por las enzimas, generando también productos finales pardos (Pourcel y col., 2007).

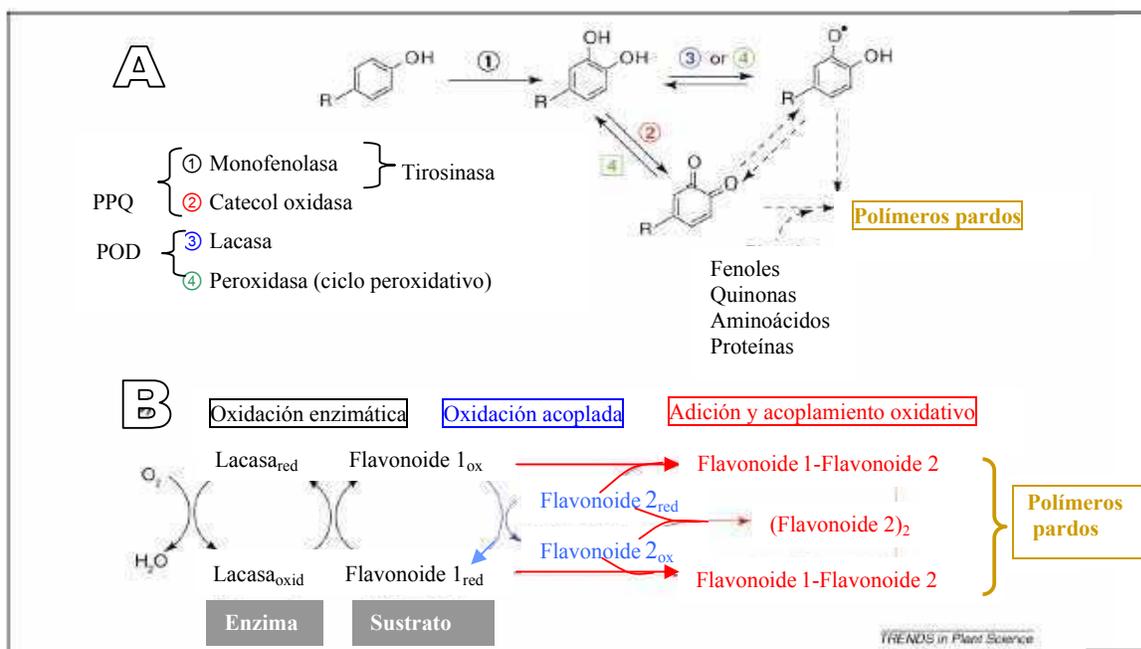


Figura I.5. Mecanismos en la oxidación de los flavonoides que llevan a la formación de polímeros pardos (Adaptado de Pourcel y col., 2007). **(A)** Interacciones enzimáticas que llevan al pardeamiento. **(B)** Oxidación acoplada de flavonoides. Como un ejemplo la reacción inicial es catalizada por la enzima lacasa. Flechas punteadas indican mecanismos de oxidación desconocidos. Abreviación: R: radical.

Las reacciones que involucran polifenoles en el procesamiento y almacenamiento de alimentos incluyen procesos bioquímicos y químicos. El más importante proceso bioquímico es la oxidación enzimática. El pardeamiento resultante está usualmente relacionado con el detrimento de la calidad. Sin embargo, en algunos casos, el pardeamiento enzimático es deseable, por ejemplo en los procesos de fermentación del té y el cacao, y en el secado de dátiles (Haard y Chism, 1996). Las reacciones químicas suceden simultáneamente y gradualmente comienzan a prevalecer mientras disminuye la actividad enzimática.

Los mecanismos y las estructuras de los productos resultantes del pardeamiento enzimático han sido ya estudiados particularmente en el té negro y el vino tinto, por su gran importancia económica.

Brevemente, el té (*Camelia sinensis* L.) es particularmente rico en polifenoles; los cuales representan el 30% de la hoja seca. La mayoría de los polifenoles que se encuentran en las hojas de té frescas son monómeros de flavanoles (un tipo de flavonoides), entre los cuales los más abundantes son las (-)-epicatequinas, (-)-epigallocatequinas y sus esteres gálicos. La llamada fermentación del té negro actualmente consiste en la oxidación enzimática de polifenoles provenientes de té verde nativo, catalizadas por la enzima polifenoloxidasas, seguida por reacciones químicas. Una mayor parte de los flavanoles del té son convertidos en varios tipos de productos, incluyendo teaflavinas, la cual es responsable del color pardo oscuro característico del té negro. El número de compuestos obtenidos por este proceso aún está en aumento debido a que regularmente se identifican nuevas estructuras (Cheynier, 2005).

1.2. Reacciones químicas y movilidad molecular.

En medios de alta viscosidad, la movilidad molecular de los reactivos y la matriz juega un papel relevante para definir la cinética de reacciones químicas, tal como se discutió en la sección 1.1.B.2.c). Las propiedades térmicas del medio constituyen una determinación indirecta de la movilidad molecular y ésta puede a su vez determinarse más directamente por resonancia nuclear magnética (RMN).

1.2.1. Propiedades térmicas (DSC).

a) Transición vítrea.

Distintas propiedades del sistema amorfo cambian al ocurrir la transición vítrea, por lo cual ésta puede ser detectada y estudiada por distintos métodos. Al ocurrir la transición vítrea, se producen cambios o discontinuidades en algunas propiedades dieléctricas, mecánicas y térmicas (White y Cakebread, 1966; Wunderlich, 1981; Sperling, 1986). Diferentes métodos pueden detectar alguno de estos cambios en función de la frecuencia de la perturbación, del tiempo o de la temperatura (Roos, 1995).

La técnica más utilizada para determinar la temperatura de transición vítrea (T_g) es la calorimetría diferencial de barrido (DSC), la cual detecta la transición vítrea en base al cambio en la capacidad calorífica (ΔC_p). La muestra se calienta a una velocidad constante en una cápsula sellada, y en general se utiliza una cápsula vacía como referencia. El instrumento

registra las diferencias en el flujo de calor entre la muestra y la referencia en función de la temperatura y del tiempo. En la Figura I.6 se muestra un termograma típico (obtenido por DSC) de un azúcar liofilizado que muestra sus transiciones de fase y cambios de estado (Roos, 1992). El ΔC_p que ocurre a la temperatura de transición vítrea de la muestra, se evidencia como un cambio en la línea de base del termograma. A temperaturas mayores que T_g , el azúcar se transforma en un líquido sobreenfriado. A medida que la temperatura y la movilidad aumentan y la viscosidad disminuye, las moléculas de azúcar pueden reorientarse hasta alcanzar un estado termodinámicamente más estable como lo es la estructura cristalina.

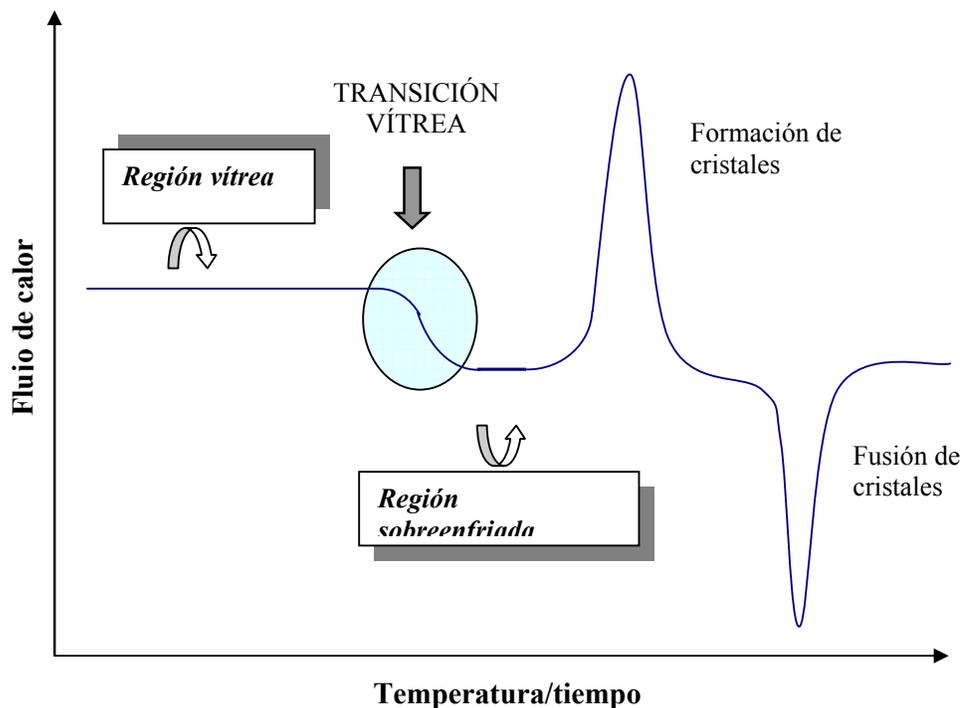


Figura I.6. Termograma típico de un azúcar liofilizado en estado amorfo (adaptado de Roos, 1992).

Existen otras técnicas para determinar T_g , como por ejemplo análisis dinámicos mecánicos (DMA, también referidos como análisis dinámicos termomecánicos, DMTA) (Kalichevsky y col., 1992), análisis dieléctricos (DEA, también referidos como análisis termodieléctricos, DETA) (Chan y col., 1986; Kalichevsky y col., 1992; Noel y col., 1992; Goff, 1995) y técnicas espectroscópicas como la resonancia magnética nuclear (NMR) y resonancia de espín electrónico (ESR), pero no se profundizará aquí sobre ellas.

Los factores más importantes que afectan la T_g son: 1) el contenido de agua y 2) la estructura química y masa molar de los sólidos.

La movilidad molecular de un sistema amorfo puede ser afectada por la adición de un agente plastificante. Un plastificante es una sustancia que al ser agregada a un material, aumenta su flexibilidad y extensibilidad y en general modifica sus propiedades térmicas (modifica la T_g del sistema y la posibilidad de cristalización). Para que un compuesto sea plastificante debe ser compatible con el material al que se incorpora. En los sistemas biológicos el plastificante más importante es el agua. En la Figura I.7 se muestra, para una matriz de azúcar, la curva de T_g en función del contenido de agua. Se puede ver, que a medida que aumenta el contenido acuoso, disminuye la T_g , lo que promueve la cristalización (Roos, 1992).

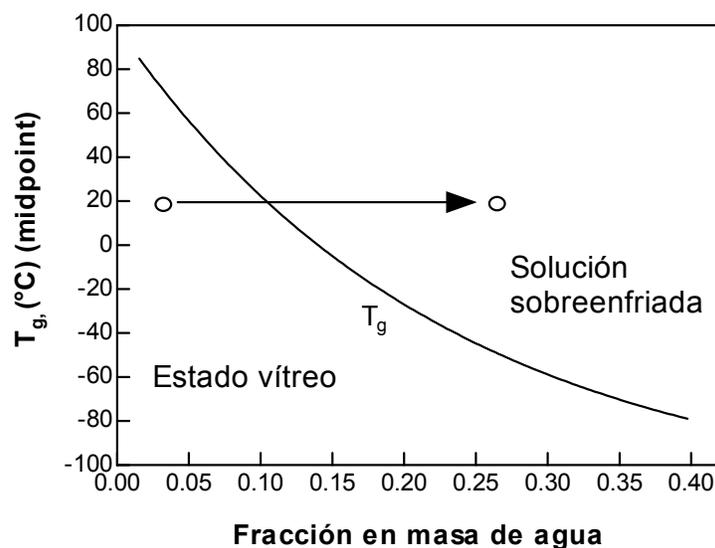


Figura I.7. Curva de temperatura de transición vítrea en función del contenido de agua para trehalosa (Adaptado de Cardona y col., 1997).

Las proteínas, al igual que los hidratos de carbono, muestran una transición dinámica “tipo vidrio”, con temperaturas de transición vítrea que disminuyen con la hidratación (Gregory, 1998). En el estado vítreo la proteína está fijada cinéticamente y la movilidad está restringida a transiciones de tipo local. Se postuló que en el estado seco las barreras para los reordenamientos conformacionales son tan altas que las transiciones entre dichos estados no son probables a temperaturas accesibles (antes de que se inicie la degradación térmica de la proteína). El agua plastifica la proteína y permite que las transiciones ocurran a temperaturas mucho menores (Gregory, 1998).

En cuanto al efecto de la estructura química y masa molar, Roos (1993) analizó el comportamiento de distintos azúcares (pentosas, hexosas y disacáridos) con respecto a la T_g , y observó que las pentosas tuvieron menor T_g que las hexosas, que a su vez tuvieron menor T_g

que los disacáridos. Además, observó que la T_g es mayor para las formas cíclicas y que el tipo de enlace glicosídico afecta los valores de T_g al modificar la conformación espacial de la molécula (Slade y Levine, 1991). En el caso de polímeros, Zeleznak y Hosenev (1987) observaron que el grado de entrecruzamiento del polímero afecta la temperatura de transición vítrea. Fox y Flory (1950), trabajando con poliestireno de distintas masas moleculares, observaron que el valor de T_g aumentaba rápidamente al aumentar la masa molecular.

b) Cristalización.

La cristalización es un cambio de fase que puede ocurrir durante el almacenamiento de hidratos de carbono amorfos deshidratados o congelados. La cristalización se manifiesta como un pico exotérmico en el termograma. Al incrementar aún más la temperatura, el azúcar funde produciendo un pico endotérmico (Figura I.6).

En el caso de alimentos, afecta en gran medida la calidad del producto (textura) y acelera incluso otros cambios deteriorativos como reacciones químicas o enzimáticas. Es una transición de fase de primer orden, generalmente controlada cinéticamente por el estado físico del sistema (Roos, 1995; Roos y col., 1996 y 1998). Si bien se observó que existe movilidad rotacional, relajaciones y “envejecimiento físico” en el estado vítreo, la movilidad no sería suficiente para permitir la difusión traslacional y los arreglos moleculares necesarios para que se produzca la nucleación y el crecimiento de los cristales. Como la movilidad traslacional aumenta rápidamente al ocurrir la transición vítrea, la velocidad de cristalización aumenta mucho a temperaturas mayores que T_g (Sperling, 1986; Slade y Levine, 1991; Roos, 1995). Se observó que la velocidad de cristalización depende de la temperatura, de la diferencia entre la temperatura de almacenamiento (T) y T_g ($T - T_g$), y del contenido de agua (Roos y Karel, 1990; Jouppila y Roos, 1997).

Los sistemas amorfos con bajo contenido de agua o congelados son meta-estables y sus componentes tienden a cristalizar debido a la sobresaturación. La cristalización de materiales amorfos es un proceso complicado que requiere del tiempo suficiente para la nucleación, propagación o crecimiento y maduración de los cristales formados, que puede involucrar transformaciones entre diferentes formas cristalinas y recristalización (Slade y Levine, 1987; Levine y Slade, 1992; Roos, 1995).

c) Desnaturalización de proteínas.

La técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC) ha probado ser un método de suma utilidad para el estudio de la desnaturalización térmica de proteínas, entre ellas la β -

lactoglobulina (β -lg) y otras proteínas globulares (Relkin, 1996; Baeza y Pilosof, 2002, Broersen y col., 2004).

El desplegamiento de la β -lg durante la desnaturalización de la misma, es acompañado por una exposición de grupos polares y no polares que se encuentran ocultos en el interior de la molécula. Una vez expuestos estos grupos, el principal mecanismo de agregación es por medio de uniones covalentes entre las moléculas desplegadas o por uniones predominantemente hidrofóbicas o no covalentes en moléculas parcialmente desplegadas (Hoffman y col., 1997). Por lo tanto, los cambios entálpicos correspondientes a la disociación de dímero y a la desnaturalización (ambos eventos endotérmicos) están superpuestos a la agregación de las moléculas (evento exotérmico) durante la escala de tiempo de las mediciones por DSC (Baeza y Pilosof, 2002).

1.2.2. Procesos de relajación (RMN).

Cualquier núcleo con un número cuántico de espín distinto de cero ($I \neq 0$), cuando es colocado en un campo magnético puede absorber y emitir energía a través de radiación electromagnética, lo que se detecta por espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN). El núcleo ^1H (protón), es el más utilizado en la espectroscopía RMN, debido a la facilidad de observación, a su alta abundancia natural y al hecho de que se encuentra presente invariablemente en los sistemas biológicos y biomateriales.

El experimento de RMN consiste en inducir la transición entre la energía de los niveles magnéticos de núcleos atómicos vecinos por absorción o emisión de un fotón con una energía determinada. Este requisito de energía se aplica en forma de un campo magnético rotatorio o por pulsos de radio frecuencia (RF), cuya frecuencia, ν , coincide exactamente con la frecuencia de Larmor, a la cual giran los núcleos y causa la absorción o emisión resonante de energía por los núcleos.

Luego de la absorción resonante causada por el pulso RF, la distribución de la población de los espines de los núcleos retorna a estado de equilibrio. La mayoría de la población originalmente en el nivel de menor energía retorna a su equilibrio por pérdida de energía en forma de una onda de radiofrecuencia o por procesos de transiciones no radiativas, llamados en conjunto procesos de relajación.

En el espacio el espín nuclear se puede descomponer en dos componentes magnéticas, una paralela al eje z , M_z y otra en el plano xy , $M_{x,y}$. En el campo magnético inicial el espín nuclear está orientado en la dirección del eje z con $M_{x,y}=0$. En la Figura I.8 se muestra la magnitud de los vectores versus el tiempo después de la aplicación de un pulso de 90° , es decir una

radiofrecuencia de una energía tal que modifica el vector magnetización en un ángulo de 90° . El crecimiento de la señal de la magnetización a través del eje z , M_z , indica una recomposición, ya que el vector fue primero orientado hacia la dirección del eje y y con $M_z=0$ por el pulso de 90° . La recomposición del M_z tiene una forma exponencial y eventualmente se equilibra a M_0 . La magnetización en el plano xy , M_{xy} , tiene un valor máximo (M_0) inmediatamente después del pulso de 90° , y luego decae a 0.

La señal obtenida de la recuperación o decaimiento es una característica de los procesos de relajación. Hay dos tipos de procesos de relajación: la longitudinal (espín-red) en el eje z y la relajación transversal o espín-espín en el plano xy . Las constantes de tiempo que describen los procesos de relajación exponencial son conocidas como tiempos de relajación. El tiempo de relajación longitudinal es designado como T_1 y el tiempo de relajación transversal como T_2 . El análisis de T_1 y T_2 de una muestra permite el estudio de propiedades químicas y físicas. Un tiempo largo T_1 o T_2 indica relajaciones lentas y tiempos cortos indican relajaciones rápidas.

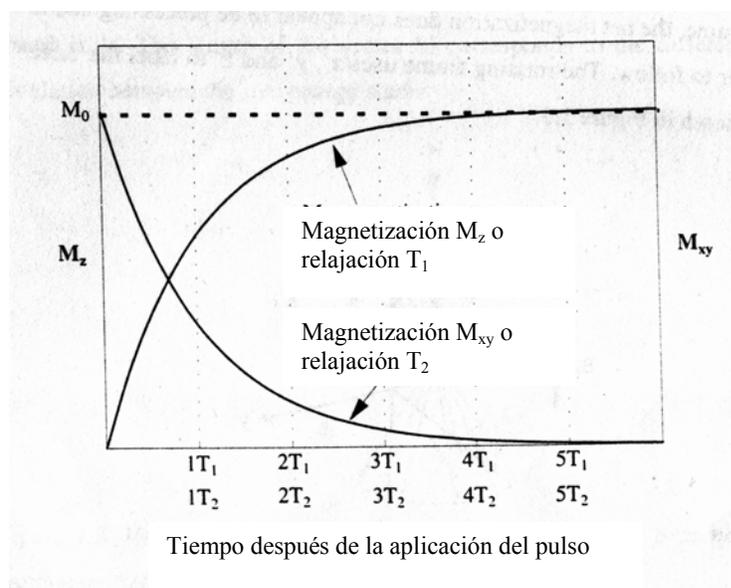


Figura I.8. Señales de relajación de RMN después de un pulso RF de 90° .

El tiempo de relajación T_2 describe el decaimiento en el plano xy (M_{xy}) y es fácilmente detectable. Un pulso de frecuencia a 90° impulsa la magnetización sobre el eje y y con una magnitud de $M_{xy} = M_0$. M_{xy} comienza a decaer en forma exponencial luego de la aplicación del pulso. La curva de decaimiento es normalmente llamada decaimiento de inducción libre o FID y puede ser descrita por la siguiente ecuación:

$$M_{xy} = M_0 e^{-\frac{t}{T_2}} \quad (\text{ecuación I.1})$$

El parámetro $1/T_2$ es entonces la constante de decaimiento de una magnetización causada por un pulso RF de 90° .

Sin embargo cuando se emplea un único pulso a 90° frecuentemente se obtienen resultados inesperados. Después de la aplicación del pulso, la magnetización neta decae más rápidamente que la predicha por la ecuación I.1. Esto puede suceder debido a inhomogeneidad del campo, difusión, etc. Para evitar el efecto de inhomogeneidad del campo, se utilizan métodos de eco de espines de Hahn (Hahn, 1950), el que consiste en dos pulsos, uno a 90° y uno a 180° , en la forma $90^\circ\text{-}\tau\text{-}180^\circ$ (Figura 1.9).

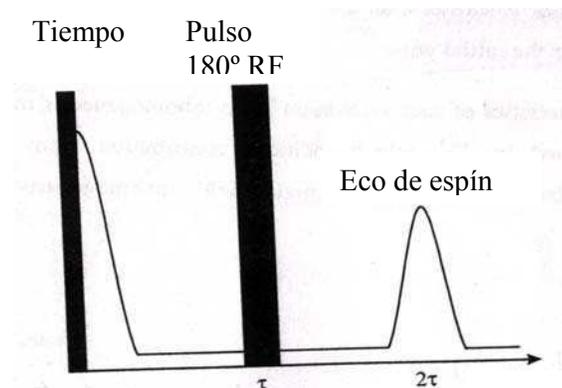


Figura I.9. El experimento eco de espín de Hahn ($90^\circ\text{-}\tau\text{-}180^\circ$) induce un pico de amplitud o eco a tiempo 2τ .

Carr y Purcell (1954) propusieron una variación del método de ecos de espín de Hahn, el cual reduce drásticamente el efecto de difusión. Este método involucra un pulso de 90° seguido por una serie de pulsos a 180° a tiempos τ , 3τ , 5τ , etc, los cuales se reenfocan en espines individuales para formar ecos a tiempos 2τ , 4τ , 6τ etc. Sin embargo, la imprecisión en el ancho del pulso de 180° generaba errores en la magnitud del eco de espín, los cuales podían ser acumulativos y comenzar a ser un problema cuando el número de pulsos a 180° aumentaba. La secuencia de Carr-Purcell fue modificada por Meiboom and Gill (1958) para eliminar los errores. La secuencia de pulsos llamada Carr-Purcell-Meiboom-Gill o CPMG, es el método más comúnmente utilizado para la determinación de T_2 . Este método utiliza la misma secuencia de pulsos de la técnica de Carr-Purcell, pero los pulsos de 180° son aplicados a lo largo del eje positivo y todos los subsiguientes reenfoques son a lo largo del eje y , siendo todos los ecos positivos (Figura I.10).

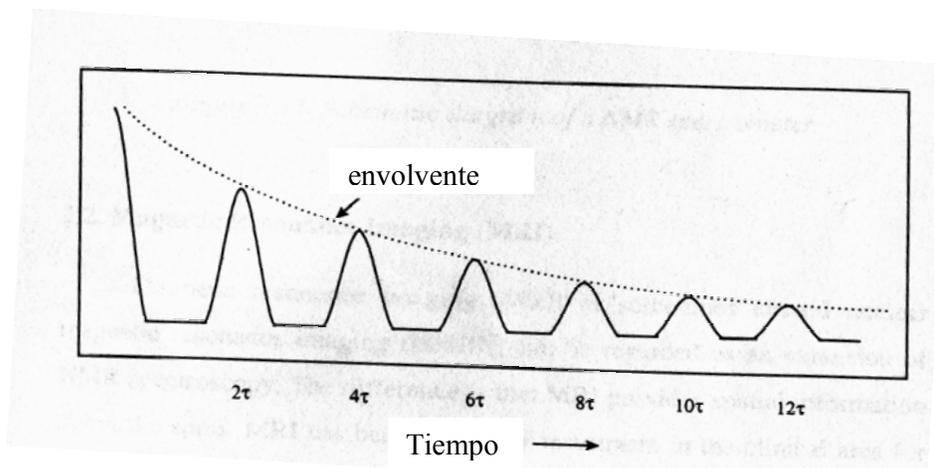


Figura I.10. Experimento CPMG ($90^\circ\text{-}\tau\text{-}180^\circ\text{-}3\tau\text{-}180^\circ\text{-}5\tau\text{-}180^\circ\text{...}$) produce un tren de ecos a tiempos 2τ , 4τ , $6\tau\text{...}$. La envolvente de las amplitudes de los múltiples ecos refleja la relajación transversa o decaimiento, a partir del cual T_2 puede ser medido.

1.3. Fluorescencia.

1.3.1. Proceso de fluorescencia.

Debido a las características fluorescentes de productos de la reacción de Maillard, y a la alta sensibilidad del método fluorimétrico, se elige la medición de fluorescencia para detectar las etapas tempranas de la reacción (Burton y col., 1962; Adhikari, 1973; Baker y Bradford, 1994; Leclere y Birlouez-Aragón, 2001).

El proceso de fluorescencia involucra dos procesos; absorción de energía a los niveles de energía electrónica y la subsecuente emisión de luz a longitudes de onda mayores debida a la pérdida de energía vibracional o térmica al medio. El proceso que ocurre entre la absorción y la emisión de luz es usualmente ilustrado por el diagrama de Jablonski (Figura I.11), el cual es un diagrama de niveles de energía parcial para una molécula fotoluminiscente característica.

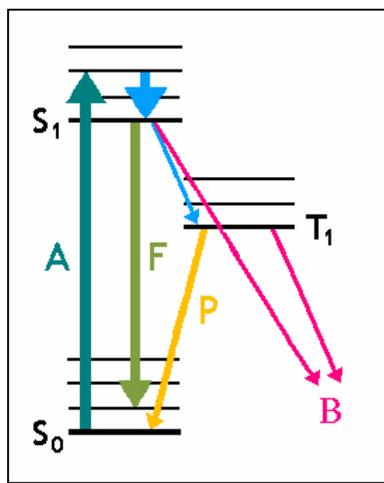


Figura I.11. Diagrama de Jablonski

La línea horizontal gruesa que se encuentra en la parte inferior de la figura representa la energía del estado fundamental de la molécula, que normalmente es un estado singulete y se designa S_0 . Las líneas gruesas superiores son los niveles de energía de los estados vibracionales fundamentales de los estados electrónicos excitados, los estados singulete primero (S_1) y triplete (T_1). Como ocurre normalmente, la energía del primer estado triplete es menor que la energía del correspondiente estado singulete excitado. Tal como sugieren las líneas horizontales finas, con cada uno de los estados electrónicos están asociados numerosos niveles de energía vibracionales.

Como muestra la Figura I.6, la excitación de la molécula da como resultado la conversión de la molécula a cualquiera de los diversos estados excitados vibracionales. Obsérvese que no se muestra la excitación directa a un estado triplete porque ésta transición no tiene lugar de manera significativa.

Una molécula excitada puede volver a su estado fundamental mediante la combinación de varias etapas mecánicas. Como muestran las flechas, dos de estas etapas son la fluorescencia (Flecha F) o la fosforescencia (Flecha P), que conllevan la emisión de un fotón de radiación. Las otras etapas de desactivación, son procesos no radiantes, como la relajación vibracional y el cambio irreversible a especies no-fluorescentes muestran en la figura como B. El camino más propicio hacia el estado fundamental es aquel que minimiza el tiempo de vida del estado excitado. Por ello, si la desactivación por fluorescencia es más rápida que los procesos no radiantes se observa tal emisión. Por otro lado, si la desactivación no radiante tiene una constante de velocidad más favorable, la fluorescencia desaparece o es menos intensa.

La fotoluminiscencia está limitada a un número relativamente pequeño de sistemas que incorporan características estructurales y ambientales que hacen que la velocidad de los procesos de relajación o desactivación no radiantes se retarden hasta el punto en el que la reacción de emisión puede competir cinéticamente con ellos.

Una molécula puede promocionarse a cualquiera de los diversos niveles vibracionales durante el proceso de excitación electrónico. Sin embargo, en disolución, el exceso de energía vibracional se pierde inmediatamente como consecuencia de las colisiones entre las moléculas de las especies excitadas y las del disolvente; el resultado es una transferencia de energía no radiante, o relajación vibracional. Una consecuencia de la eficacia de la relajación vibracional es que la banda de fluorescencia para una transición electrónica dada se desplaza hacia

menores frecuencias o longitudes de onda más largas respecto a la banda de absorción (el desplazamiento del pico máximo de emisión o desplazamiento Stokes).

La sensibilidad del método de fluorescencia es alta, debido a que la detección de la longitud de onda de emisión es diferente del incidente y no hay un ruido de fondo de la fuente de excitación.

1.3.2. Variables que afectan la fluorescencia.

Hay una relación lineal entre la intensidad de fluorescencia y la concentración del fluoróforo. El tiempo de vida de la fluorescencia y el rendimiento cuántico son las características más importantes del fluoróforo. El tiempo de vida del fluoróforo en el estado excitado está en el rango de los nanosegundos pero es suficiente para interactuar con el ambiente. El rendimiento cuántico de fluorescencia es la relación entre el número de fotones que emiten luminiscencia respecto al número de fotones absorbidos de la molécula.

Las interacciones del fluoróforo con las moléculas del solvente pueden afectar los parámetros de fluorescencia, por ejemplo, corrimiento del pico de la longitud de onda de emisión máxima, el tiempo de vida medio, la intensidad de fluorescencia.

Un efecto que se observa en las mediciones de fluorescencia es la dispersión de la luz dada por el agua del solvente, a otra longitud de onda, denominado pico de Raman, el cual es predecible matemáticamente por la siguiente fórmula:

$$\nu \text{ Raman} = \nu \text{ excitación} - 3600 \text{ cm}^{-1}$$

Las variables que afectan las mediciones fluorimétricas son:

- El rendimiento cuántico,
- La rigidez estructural: la fluorescencia se ve favorecida en moléculas que poseen estructuras rígidas,
- El pH,
- La temperatura: la eficacia cuántica disminuye en la mayoría de las moléculas al aumentar la temperatura, ya que al aumentar la frecuencia de las colisiones, aumenta la probabilidad de desactivación por conversión externa (ó amortiguación colisional con el disolvente)
- La intensidad de la radiación que se usa para excitar las moléculas,
- El efecto de filtro interno: a altas concentraciones de la muestra la radiación fluorescente es absorbida por otras moléculas de la muestra disminuyendo la fluorescencia detectada. La representación gráfica de la potencia fluorescente de una solución frente a la concentración de las especies emisoras debería ser lineal a bajas concentraciones. Cuando la concentración

es tan elevada que la absorbancia es mayor que aproximadamente 0,1, la linealidad se pierde; entonces la fluorescencia toma un valor inferior al obtenido en la extrapolación de la línea recta de la representación gráfica (Figura I.12). (Skoog y col., 2000). Por lo tanto, para medir fluorescencia, la concentración de la muestra debe ser tal que la absorbancia a la longitud de onda que se excita sea $\leq 0,1$.

- la desactivación o *quenching*, es un proceso en el cual sustancias extrañas pueden bajar o eliminar la fluorescencia por diferentes mecanismos: La desactivación colisional ocurre cuando el fluoróforo en el estado excitado es desactivado por contacto o por formación de complejos no fluorescentes con otras moléculas en solución, las cuales son llamadas desactivadores o *quenchers*. La desactivación también puede ocurrir por atenuación de la luz incidente por otras especies que absorben.

En la Figura I.12 se muestra una solución a diferentes concentraciones (C), C_0 es una solución blanco que no fluoresce, en C_1 no es afectada la medición de fluorescencia (flecha a 90° de la luz incidente) y en C_2 y C_3 , la fluorescencia disminuye, ya sea por un efecto de filtro interno o *quenching*. En un arreglo de 90° el centro emisor se desplaza hacia la superficie de la celda donde incide el haz de excitación. Como toda la óptica instrumental está enfocada al centro geométrico de la celda, si bien la muestra emite esta no es correctamente enfocada en el monocromador de detección (emisión).

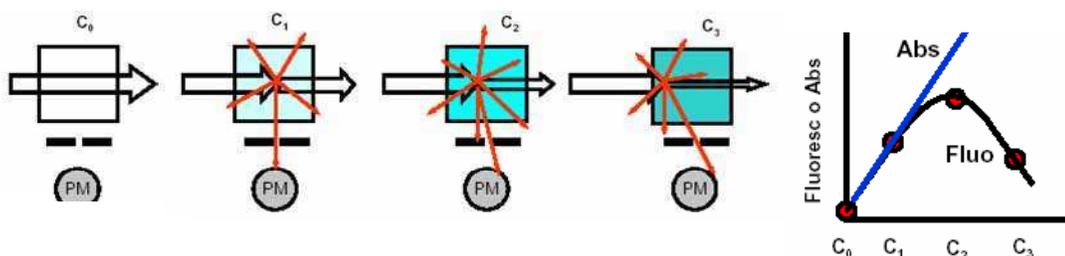


Figura I.12. Efecto de filtro interno.

Para evitar el efecto de de filtro interno, se puede utilizar un arreglo óptico de superficie o cara frontal o triangular (Figura I.13). Este tipo de arreglo permite trabajar con soluciones concentradas, o que presentan fenómenos de difusión (*scattering*) ó sólidas.

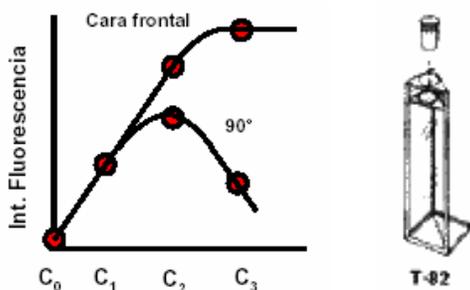


Figura I.13. Utilización de cubetas triangulares para evitar el efecto de filtro interno.

1.2.3. Evaluación de la fluorescencia.

Cuando se estudian mezclas de sustancias, es útil la medición de espectros de fluorescencia de excitación. La longitud de onda de emisión se mantiene constante y se realiza un barrido de las longitudes de onda de excitación. El barrido es usualmente llevado a cabo a través del rango de longitudes de onda de absorción del espectro de la muestra. El espectro que se obtiene debería corresponderse cercanamente con el espectro de absorción de la molécula que es la responsable de la fluorescencia. Estos espectros revelan si la muestra es homogénea y si el patrón de fluorescencia resulta de una única molécula.

a) Fluorescencia sincrónica.

La fluorescencia sincrónica se determina realizando un barrido de excitación y un barrido de emisión de fluorescencia al mismo tiempo, con una diferencia de ancho de banda variable entre la excitación y la emisión de 10, 20 ó 30 nm. Esta metodología permite detectar la presencia de varios compuestos fluorescentes presentes en la muestra.

b) Rendimiento cuántico.

Se define como rendimiento cuántico de fluorescencia a la relación entre la cantidad de fotones que son capaces de emitir fluorescencia del total de fotones que absorben energía en forma de luz. En la mayoría de los estudios que usan fluorescencia para propósitos analíticos, el conocimiento del rendimiento cuántico no es necesario. Sin embargo, en algunos otros estudios se quiere comparar las eficiencias de fluorescencia para relacionar la fluorescencia con propiedades estructurales y las interacciones de las moléculas. Esta es la situación cuando se estudia biomoléculas tales como proteínas o cuando es de interés conocer los parámetros fotofísicos del cromóforo.

La determinación del rendimiento cuántico, Φ_F , de una molécula por un método primario es muy difícil de realizar y ha sido sujeto a varias revisiones. El rendimiento cuántico de varias moléculas bajo rigurosas condiciones experimentales ha sido determinado y se utilizan como moléculas estándares o patrón. Algunas consideraciones se deben tener en cuenta para la medición del rendimiento cuántico de una muestra.

- Tanto la muestra como el patrón deben absorber a las mismas longitudes de onda de excitación.
- La absorbancia tanto de la muestra como del patrón debe ser menor que 0,1 a la longitud de onda de excitación, debido a que es importante minimizar el efecto de filtro interno.

- Cuando un patrón es elegido, las condiciones experimentales deben ser seguidas exactamente iguales en el patrón como en la muestra.

c) Corrimiento de Stokes.

El corrimiento de Stokes (Figura I.14) es la distancia entre el máximo de la primera banda de absorción ($S_0 \rightarrow S_1$) y el máximo de emisión de fluorescencia ($S_1 \rightarrow S_0$) (expresada en número de ondas, o frecuencia), según la ecuación:

$$\Delta\bar{\nu} = \bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f \quad (\text{ecuación I.2})$$

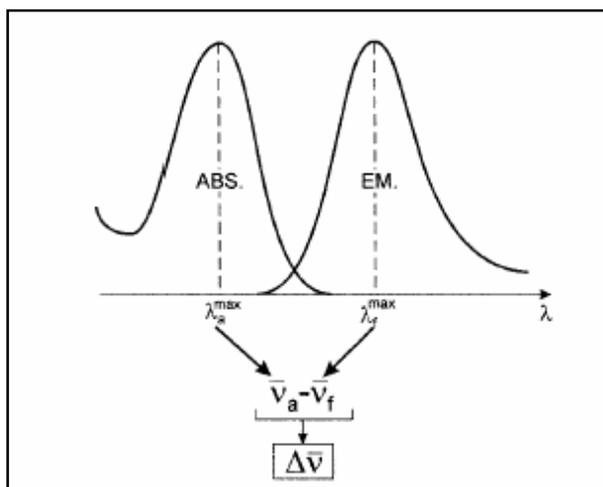


Figura I.14. Definición del corrimiento de Stokes ($\Delta\bar{\nu}$) de la ecuación I.2.

Según el principio de Franck-Condon, el corrimiento de Stokes tiene una relación con la geometría de los estados excitados, ya que al producirse la transición electrónica (10^{-15} s) desde el estado fundamental ($v''=0$) la configuración nuclear se mantiene inalterada. La transición más probable al estado excitado será aquella que coincida con las coordenadas nucleares del fundamental. Dependiendo de la geometría de la superficie del estado excitado, el mismo puede adquirir exceso de energía vibracional. En el caso donde las superficies de energía potencial sean coincidentes (Figura I.15.A) (se mantiene la separación internuclear de equilibrio, ej.: compuestos aromáticos, porfirinas, etc.). En cambio, en moléculas no rígidas, la distancia de equilibrio del estado excitado es mayor que el fundamental (disminución del orden de unión), por lo tanto luego de la transición electrónica la molécula adquiere exceso de energía vibracional (Figura I.15.B), generando el corrimiento de Stokes.

En resumen, el principio de Franck-Condon establece que las transiciones más probables son aquellas que ocurren en forma “vertical” desde el estado de equilibrio hasta el punto de retorno (*turning point*) de la superficie del estado final (máximo solapamiento). Este concepto

es aplicable tanto para la absorción como para la emisión. Los estados formados inmediatamente después de la transición y antes de la relajación vibracional se denominan estados de Franck-Condon (Lakowicz, 1999).

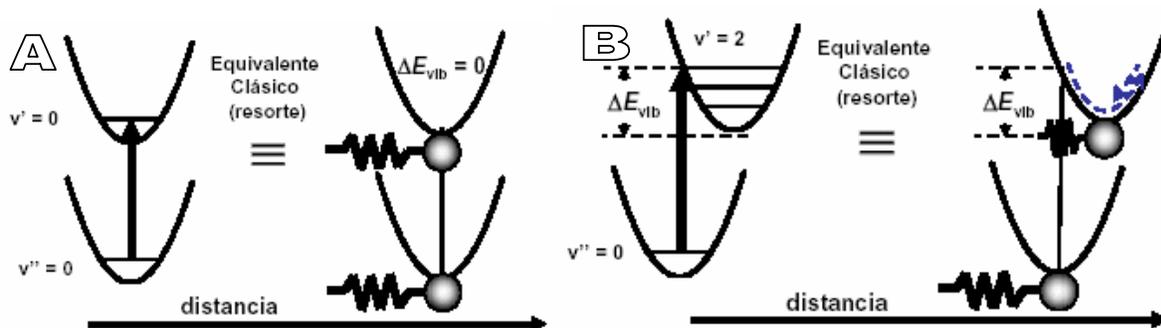


Figura I.15. Principio de Franck-Condon que explica la diferencia en la geometría espacial de los estados excitados. (A). Moléculas rígidas. (B). Moléculas no rígidas, las cuales presentan un mayor corrimiento de Stokes.

1.3.4. Fluorescencia del triptofano. Relación con los cambios conformacionales de proteínas.

La fluorescencia intrínseca de proteínas está originada por aminoácidos aromáticos, como triptofano, tirosina y la fenilalanina. Los grupos indoles de los residuos de triptofano son la fuente dominante de la absorbancia en el UV en las proteínas. La emisión de fluorescencia del triptofano es altamente sensible a su ambiente local, y esto es frecuentemente utilizado como grupo indicador para los cambios conformacionales de las proteínas, ya que el máximo de emisión de las proteínas refleja el promedio de los residuos de triptofano expuestos a la fase acuosa (Lakowicz, 1999).

Las propiedades de fluorescencia de los residuos intrínsecos en las proteínas invariablemente cambian al ocurrir la desnaturalización de las proteínas, sin embargo, no es posible predecir cómo puede cambiar la intensidad de la fluorescencia. Algunas proteínas, al desnaturalizarse, exhiben un gran aumento en la intensidad de fluorescencia, en cambio en otras ésta disminuye. Por ejemplo, proteínas con grupos prostéticos hemo, típicamente exhiben un aumento en la intensidad al desnaturalizarse debido a la pérdida del grupo hemo, el cual desactiva la emisión del triptofano en el estado nativo. La energía promedio de emisión de los residuos de triptofano usualmente cambia hacia el rojo con la desnaturalización debido a la exposición al solvente. En el estado desnaturalizado de las proteínas, los residuos de triptofano tienen un espectro en agua con un máximo a 355 nm, en vez de 340 nm que tienen en su estado nativo (Royer, 1995).

I.4. Técnica de fotólisis de destello (LFP).

La técnica de fotólisis de destello o *laser flash photolysis* (LFP) es un método para el estudio espectroscópico y cinético de compuestos transitorios con resolución temporal en la cual se emplea luz pulsada para generar especies transitorias. Habitualmente, la muestra se somete a un pulso intenso de luz láser de corta duración para producir una especie transitoria con la concentración adecuada para su observación espectroscópica de absorbancia en el tiempo a distintas longitudes de onda. Por lo tanto, es un poderoso instrumento para el estudio de varios estados de las moléculas y la transferencia de energía entre ellas.

En esta técnica la velocidad del pulso de luz es suficientemente rápida comparada con el experimento, por lo que se considera un proceso de absorción instantáneo, ya que la duración del pulso varía de 2 a 20 ns para los típicos láseres. El láser llamado Nd/YAG es muy utilizado ya que se obtienen longitudes de onda útiles a través de la generación de armónicos (532, 355, 266 nm) a partir de la longitud de onda fundamental (1064 nm).

En la Figura I.16 se muestra un esquema moderno de un sistema de LFP. El láser es instalado ortogonalmente al camino óptico, el cual tiene su foco en el frente de la cubeta. Los rayos originados por la fuente de xenón pueden ser interrumpidos por un bloqueador de luz o *shutter*. La unidad de detección está compuesta por un monocromador y un fotomultiplicador que está conectado a una computadora a través de un osciloscopio. El sistema es capaz de detectar la señal en función del tiempo a una longitud de onda seleccionada. El espectro es construido por monitoreo de la absorción resuelta en el tiempo a muchas longitudes de onda, y luego se extraen los datos de absorbancia a cada tiempo.

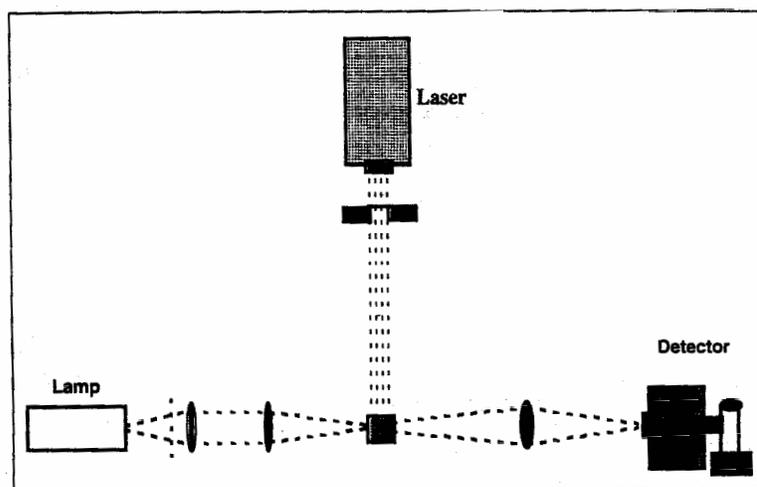


Figura I.16. Esquema del sistema de fotólisis de destello.

El principio de la fotólisis de destello está basado sobre la medición de la densidad óptica (OD, absorción) en función del tiempo. A un cierto tiempo se registran 500 puntos; 50 de ellos antes que el pulso del láser genere los foto-productos, y es llamado *time basis*. Después de los pulsos, la OD cambia debido a la diferente composición de productos ahora presentes en la muestra líquida.

Las especies reactivas se convierten en productos con diferentes velocidades. Este proceso puede ser observado por un aumento o disminución de la densidad óptica dependiente del tiempo. Un gráfico de OD (t) vs tiempo (t) a una determinada longitud de onda seleccionada es llamado traza del transiente (Figura I.17). Luego de la medición de base o nivel de pre-excitación (*time basis*), se considera tiempo inicial ($t=0$) al momento del disparo del destello de luz y como es un proceso instantáneo, la absorbancia debida al compuesto transiente generado por el destello aumenta. Posteriormente, se observa el decaimiento exponencial de la absorbancia con el tiempo del transiente generado. Si el producto generado absorbe luz a la longitud de onda seleccionada, la señal no retorna al nivel de pre-excitación. El tiempo de vida media (τ) de los transientes es calculado a partir de este gráfico ajustando con cinéticas de decaimiento exponencial de primer orden a través de un programa computacional (Microcal Origin v.7).

El espectro del transiente es obtenido por un gráfico de la diferencia de absorbancia antes y después de un único pulso de láser ($\Delta OD(\lambda, t)$) a un cierto tiempo (t) vs la longitud de onda (λ).

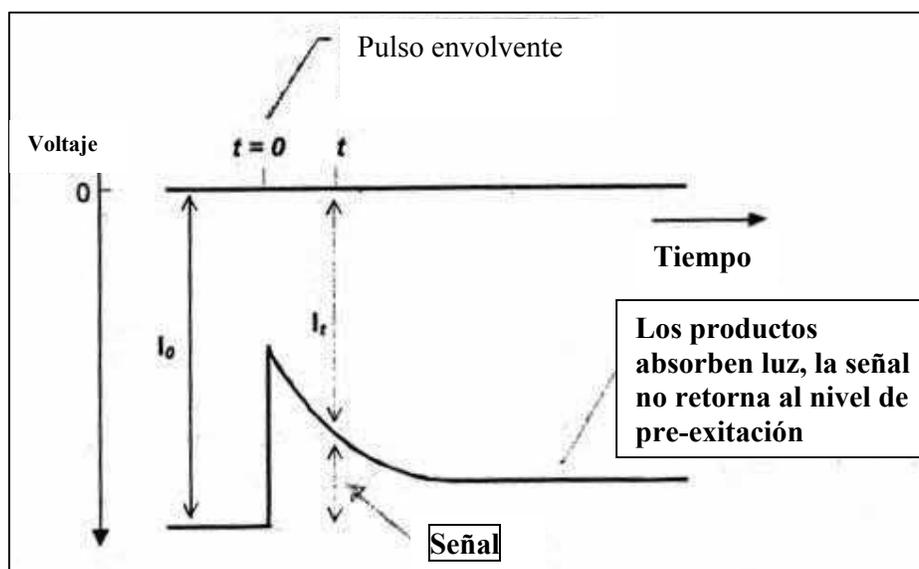


Figura I.17. Trazo del transiente obtenida por fotólisis de destello.

Las dos principales clases de oxigenación sensibilizada por luz o fotooxidación se han referido como reacciones de Tipo I y Tipo II (Figura I.18).

En las reacciones de Tipo I, el estado triplete del sensibilizador interactúa directamente con el sustrato en el sistema resultando en la transferencia de electrones como en átomos de hidrógeno. Los radicales libres producidos reaccionan con el oxígeno molecular para regenerar el sensibilizador y para formar radicales peróxidos o superóxidos llevando a la formación de productos oxidados.

En las reacciones de Tipo II está involucrada la interacción directa del estado excitado del sensibilizante con el oxígeno, generando oxígeno singlete por transferencia de energía que a su vez, reacciona directamente con el sustrato. (Tanielian, y col., 2000).

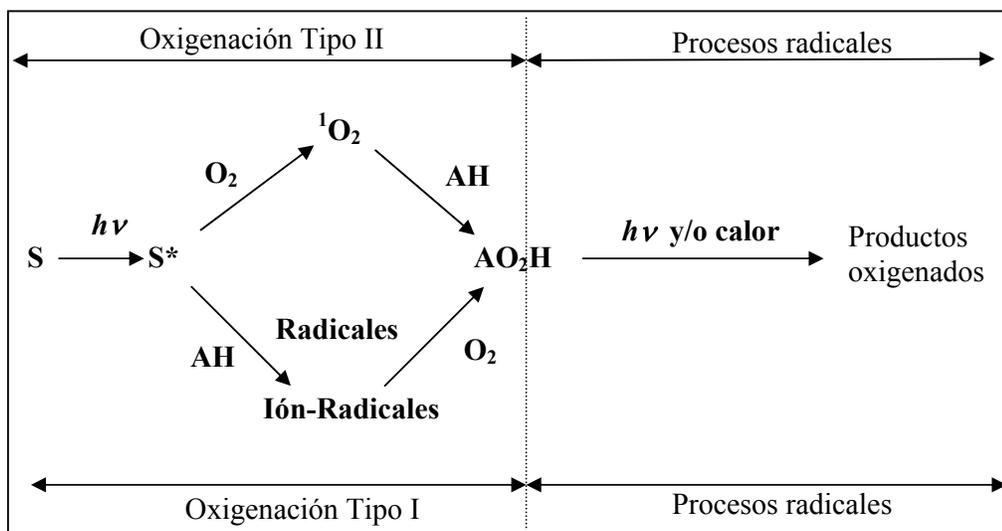


Figura I.18. Oxidación tipo I y tipo II generados por luz.

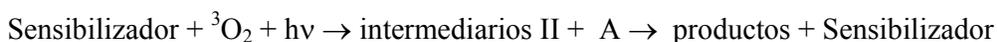
En muchas fotooxigenaciones el estado singlete del oxígeno (1O_2) es la especie involucrada para su iniciación. En el estado fundamental la molécula de oxígeno se encuentra en un estado triplete (3O_2) que interviene preferentemente en reacciones monoeléctricas con radicales. El estado singlete es más electrofílico que el triplete y puede reaccionar más rápidamente con entidades de alta densidad electrónica. Esto es debido a que en el estado triplete los dos electrones de la última órbita tienen el mismo espín pero están en suborbitales diferentes ($\uparrow\uparrow$), en cambio, en el estado singlete los dos electrones tienen espines opuestos ($\uparrow\downarrow$) y la repulsión electrostática será grande, por lo que es un estado excitado.

El oxígeno singulete puede generarse por muchos caminos pero uno de los más importantes en alimentos es vía fotosensibilización por pigmentos naturales. Para la oxidación fotosintetizada se proponen dos caminos:

-En la oxidación tipo I, el sensibilizador reacciona luego de la absorción de luz con el sustrato para formar intermediarios que luego reaccionan con el $^3\text{O}_2$ (estado triplete y fundamental) para dar los productos de oxidación



-En las reacciones de tipo II el oxígeno molecular es el que reacciona con el sensibilizador luego de la absorción de luz en vez del sustrato, consistiendo en la activación del oxígeno singulete.



Mediante la absorción de 92 kJ, el oxígeno pasa del estado fundamental al singulete de corta vida media.

Las fotooxidaciones de tipo I y tipo II compiten entre sí, cual de las dos reacciones predomina depende de la estructura del sensibilizador y también de los reaccionantes que van a ser oxidados. Las investigaciones han demostrado que los sensibilizadores naturales como la clorofila, feofitina y riboflavina favorecen la oxigenación de tipo II de los ácidos grasos insaturados (Nawar, 1996).

La mayoría de las técnicas disponibles para distinguir el mecanismo de fotooxidación (Tipo I o Tipo II) han sido concebidas para determinar si el oxígeno singulete es producido durante la reacción y si es el responsable de la oxigenación del sustrato. Un método consiste en examinar el efecto de los inhibidores de oxígeno singulete, como la azida de sodio (NaN_3), en la velocidad de fotooxidación. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la mayoría de los inhibidores también desactivan el estado excitado del sensibilizante.

1.5. Agentes sensibilizantes.

1.5.1. Rosa de bengala.

El colorante rosa de bengala es un colorante xántico que puede ser regenerado en un mecanismo que involucra la formación del oxígeno singulete debido a que la transferencia de energía simple ocurre a través del estado triplete, permitiendo al rosa de bengala retornar a su estado basal. El rosa de bengala en su estado basal (RB^{2-}) es el sensibilizante más popular usado en soluciones acuosas y muy utilizado por su alto rendimiento cuántico ($\Phi_T = \text{ca. } 1$), por el largo tiempo de vida media de su estado triplete ($\tau = 10\text{-}30 \mu\text{s}$) (Douglas y col., 1990) y porque su estado triplete es eficientemente desactivado por oxígeno, mostrando un alto

rendimiento cuántico en la formación del oxígeno singulete, $\Phi_{\Delta}=0,76$ (Wilkinson y col., 1993). La energía del estado triplete del rosa de bengala $^3(\text{RB}^{2-})^*$ es lo suficientemente elevada para transferir energía del estado triplete a moléculas con menor energía del estado triplete, siendo la reacción de transferencia del electrón dependiente de la polaridad y viscosidad del solvente (Shafiqul e Islam, 1999).

1.5.2. Riboflavina.

La riboflavina (RF) ó vitamina B₂ es un componente normal de la lente del ojo, se encuentra presente en baja concentración (alrededor de 3,6 μM en lentes de conejo (Batey y Eckhert, 1991) y 4,5 μM en lentes humanas (Le Grusse y Watier, 1993).

El espectro de absorción de la RF en medio acuoso exhibe cuatro picos centrados a 446, 375, 265 y 220 nm con altos coeficientes moleares de extinción ($>10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Heelis, 1982). La riboflavina es particularmente sensible a la luz UV-visible e induce mecanismos de oxidación fotosensibilizadas de Tipo I y Tipo II (Figura I.18). El sustrato semioxidado puede llevar a una oxidación en presencia de oxígeno. El proceso tipo II involucra la formación de oxígeno singulete ($^1\text{O}_2^*$) por transferencia de energía del estado triplete excitado ($^3\text{RF}^*$) al oxígeno molecular (Kim y col., 1993). Este proceso explica el efecto de deterioro por exposición a la luz de mezclas acuosa de nutrientes que contienen RF, como las soluciones entéricas o parentales (Laborie y col., 1998) o los alimentos líquidos complejos como la leche y las formulas infantiles (Lee y col., 1998). Los fotoprocesos sensibilizados por la riboflavina en la lente del ojo han sido también estudiados como uno de las causas de agregación de proteínas durante el envejecimiento y la caratogénesis (Ugarte y col., 1992; Mancini y col., 2000). La fotodegradación de la riboflavina y sus efectos fotosensibilizantes son altamente dependientes de las concentraciones de oxígeno molecular y ascorbato (AH) (La Rochette y col., 2000).

1.6. El color.

1.6.1. La percepción del color.

El color es una importante cualidad de los materiales y su percepción suele aportar datos sobre su calidad y estado de conservación.

La percepción del color de un objeto no es un fenómeno simple e intervienen varios factores:

1. La distribución de la energía espectral del iluminante, es decir, la clase de luz que ilumina el objeto: solar, luz de lámpara de tungsteno o mercurio, etc.

2. Las condiciones bajo las cuales el color es visto, el ángulo de la visión, el color del contorno, la extensión de la zona coloreada y el nivel de iluminación.
3. La sensibilidad del observador.
4. Las características espectrales del objeto con respecto a la absorción, reflexión y transmisión de la luz (que se llaman atributos geométricos), por los cuales se pueden clasificar a los objetos como opacos, transparentes o translúcidos.

Para lograr una adecuada caracterización de los colores se desarrollaron sistemas de medida que emplean "espacios de color" y "coordenadas de color" y permiten la especificación completa en el espacio tridimensional.

1.6.2. Evaluación del color.

De los sistemas propuestos para la especificación del color el más difundido universalmente es el de la CIE (*Comission Internationale de l'Eclairage*) (CIE, 1979), en el cual el color es indicado por tres variables X , Y , Z , conocidas como los valores triestímulo y que representan a tres colores primarios virtuales, donde el X se puede relacionar con el rojo, el Y con el verde y el Z con el azul. El valor de Y se tomó de tal forma que represente el valor de la luminosidad, es decir, vale 100% para una muestra blanco o transparente incolora, y 0% para el negro.

Para obtener este sistema de medida se definió el "observador patrón", como representativo de un observador de visión normal, y se asignó a cada color un conjunto de tres valores, índices de la contribución de cada uno de los primarios imaginarios. Para obtener la sensibilidad del observador patrón para cada color primario se realizaron experiencias con un número muy grande de observadores con los que se elaboraron curvas de intensidad de cada primario para todas las longitudes de onda y luego se promediaron los resultados.

En la especificación de un color es necesario considerar a) el factor de transmitancia o reflectancia espectral del objeto en función de la longitud de onda, el cual se obtiene mediante un espectrofotómetro, en el que se determina la luz transmitida o reflejada para cada λ , b) la distribución energética de la luz incidente o iluminante para cada longitud de onda, donde el iluminante C tiene una distribución energética similar a la luz blanca solar promedio. c) el análisis por el sistema visual de acuerdo a los tres primarios elegidos, o curva de sensibilidad del observador patrón, también en función de la longitud de onda.

Por lo tanto, el color queda determinado por un punto en un espacio tridimensional de coordenadas X , Y , Z , Sin embargo, la forma habitual de representación es calcular las llamadas coordenadas cromáticas x , y , definidas:

$$x = \frac{X}{X+Y+Z} \quad (\text{ecuación I.3})$$

$$y = \frac{Y}{X+Y+Z} \quad (\text{ecuación I.4})$$

El color definido por las coordenadas cromáticas (x, y) se representa en el diagrama cromático CIE 1931 (Figura I.19) donde sólo tiene lugar la cromaticidad del color en cuestión.

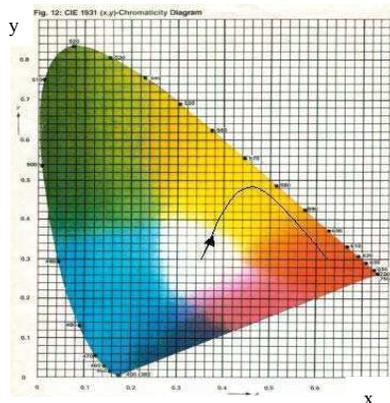


Figura I.19. Diagrama cromático (x, y) CIE 1931.

1.7. Compuestos fluorescentes y pigmentos pardos en alimentos y sistemas biológicos.

1.7.1. Fluorescencia en reacción de Maillard.

El desarrollo de productos fluorescentes fue descrito durante el almacenamiento de diferentes tipos de productos alimenticios y sistemas modelos. La Tabla I.1 muestra la longitud de onda de excitación (340-370 nm) y de emisión (420-470 nm) de compuestos provenientes de la reacción de Maillard obtenidos tanto en sistemas modelos, biológicos y alimentos en trabajos previamente publicados.

Las longitudes de onda correspondientes a los máximos de excitación y de emisión son propiedades importantes para caracterizar los productos fluorescentes provenientes de la reacción de Maillard, y sus intensidades son consideradas como índices del grado de modificación de proteínas. Sin embargo, ninguno de los trabajos reportados en la Tabla I.1 realizan una caracterización más exhaustiva de los compuestos fluorescentes, ya que sólo informan la característica de máximos de excitación y emisión. Las longitudes de onda correspondientes a los máximos de estos compuestos formados durante la reacción de Maillard son claramente distinguibles de la fluorescencia del aminoácido triptofano presente en las proteínas, el cual posee fluorescencia intrínseca (longitud de onda de los máximos de excitación y emisión de 290 y 336 nm, respectivamente). Sin embargo, algunos compuestos

fluorescentes reportados como provenientes de la reacción de Maillard muestran los máximos a longitudes de onda un poco corridas de las longitudes de onda típicas (Tabla I.1).

Tabla I.1: Longitudes de onda máximas de excitación y emisión reportados para productos fluorescentes presentes en sistemas modelos, alimentos y sistemas biológicos. ND: no descripto.

Sistemas	Exc. (nm)	Em. (nm)	Referencias
SISTEMAS MODELOS			
Glucosa-Alanina	347	415	Morales y Jimenez-Perez, 2001
Glucosa-Glicina	350	430	Adhikari, 1973
Glucosa-Glicina	365	440	Park y Kim, 1983
Glucosa-Glicina	347	415	Morales y Jimenez-Perez, 2001
Glucosa-Lisina	350	410	Cerruti y col., 1985
Glucosa-Lisina	375	440	Monnier y Cerami, 1983
Glucosa-polyLisina	370	440	Pongor y col., 1984; Sander y Larsen, 1995
Glucosa-Arginina-Lisina	335	385	Okano y col., 2001
Glucosa-BSA	350	430	Traverso y col., 1997
Glucosa-BSA	370	440	Masaki y col., 1999
Lactosa-proteínas de leche	347	415	Morales y col., 1996
Lactosa-caseína	347	415	Morales y col., 1996, 1997
Lactosa-BSA	360	430	Lèclere y Birlouez-Aragon, 2001
Lactosa-AcetilLisina	350	430	Lèclere y Birlouez-Aragon, 2001
Lactosa-Lisina	347	415	Morales y Jiménez-Pérez, 2001
Gliceraldehido-AcetilLisina	354	440	Tessier y col., 2002
Gliceraldehido-AcetilArginina	331	380	Tessier y col., 2002
Metilglioxal- <i>N</i> - α - <i>t</i> -BOC-arginina	320	380	Shipanova y col., 1997
ALIMENTOS			
crystalino-albúmina de huevo	365	ND	Olcott y Dutton, 1945
Extractos de pan blanco tostado y café	350	430	Adhikari, 1973
Aceite de soja (extractos etanólicos)	367	430	Park y Kim, 1983
Proteínas solubles de soja	350/395	440/450	Sun y Leopold, 1995
Glucosa-ISP (proteínas aisladas de soja)	365	475	Davies y col., 1998
Formulas enteras para bebés	345	415	Rufian-Henares y col., 2002
Leche	347	415	Morales y col., 1996
Leche	330	420	Birlouez-Aragón y col., 2002
SISTEMAS BIOLÓGICOS			
Productos de peroxidación lipídica a partir de arvejas	370	430	Pauls y Thompson, 1984
Ejes de diferentes semillas	370	440	Baker y Bradford, 1994; Wettlaufer y Leopold, 1991
Semillas de soja (<i>Glycin max var. Miyagisirome</i>)	370	440	Iida y col., 2002
Semillas de <i>Vigna Radiata</i>	350	420	Murthy y col., 2000, 2002

Pearce y Thistle (1942) fueron los primeros en proponer que la fluorescencia generada en un sistema alimenticio (extracto de huevo seco en polvo) podría ser utilizada como una medida del deterioro del alimento durante el almacenamiento. Pearce (1943) observó que soluciones de péptidos fueron altamente fluorescentes y también altamente coloreadas. El desarrollo de fluorescencia en extracto de huevo en polvo fue atribuido a pigmentos pardos formados durante la reacción de glucosa con aminoácidos libres de proteínas (Olcott y Dutton, 1945).

Burton y col. (1962) mostraron que azúcares incubados con amino-compuestos desarrollaron fluorescencia y el número de compuestos fluorescentes aumentaba con el tiempo de incubación. Como las características espectrales de algunos productos marrones (pan, café) observados fueron similares a los obtenidos en un modelo sistema glucosa-glicina, Adhikary (1973) remarcó la posibilidad de utilizar las mediciones de fluorescencia para seguir el progreso del pardeamiento en alimentos. Park y Kim (1983) investigaron la relación entre color y fluorescencia en un sistema modelo de pardeamiento por reacción de Maillard (glucosa-glicina, calentado a 100°C). Ellos observaron que la fluorescencia aumentó paralelamente con el color y proporcionalmente al tiempo de reacción, excepto para tiempos muy tempranos, donde el cambio de fluorescencia con el tiempo de reacción fue mayor que el de absorbancia. La determinación de fluorescencia pareció proveer un método más sensible que la absorbancia durante los estadios más tempranos de la reacción.

Las investigaciones más recientes sobre el desarrollo de fluorescencia proveniente de la reacción de Maillard en alimentos fueron realizadas en sistemas de leche. Morales y col. (1996, 1997) mostraron por análisis cromatográficos numerosos compuestos que contribuyen a la fluorescencia en sistemas lactosa-caseinato. Ellos observaron que los productos fluorescentes que se encontraban unidos covalentemente a proteínas eran cuantitativamente más importantes que los generados por compuestos fluorescentes libres, y mostraban un cambio en las propiedades de emisión durante el tiempo de calentamiento.

Leclère y Birlouez-Aragon (2001) analizaron el daño sufrido por la lisina bajo tratamiento térmico en sistemas modelo de leche y concluyeron que la fluorescencia temprana y en estados avanzados de la reacción de Maillard es un buen indicador del daño producido por calor a la lisina, o sea del valor nutricional del sistema. La intensidad de fluorescencia proveniente de la reacción de Maillard también fue propuesta como un índice rápido y simple para determinar el daño de los componentes de las formulas enteras (combinación de proteínas, carbohidratos, grasas, vitaminas y minerales que son administrados dentro del tracto gastrointestinal a través de un tubo) a la esterilización a altas temperaturas.

Aunque algunos compuestos fluorescentes (Chio y Tappel, 1969; Pongor y col., 1984; Hayase y col., 1994; Nagaraj y Monnier, 1995; Shipanova y col., 1997; Murkovic y col., 1999; Tessier y col. 2002) han sido investigados, los compuestos fluorescentes no fueron completamente caracterizados, por lo tanto, la fluorescencia no puede ser puesta en bases molares. De acuerdo con los datos reportados en los mecanismos de desarrollo de fluorescencia en función del tiempo, algunos muestran un máximo de fluorescencia (Pearce, 1950; Oberby y Frost, 1952; Baisier y Labuza, 1992; Namiki y col., 1993; Morales y van

Boekel, 1997), en otros la fluorescencia aumenta continuamente (Adhikari, 1973; Cerrutti y col., 1985; Morales y col., 1997; Matiacevich y Buera, 2006) y en otros la fluorescencia aumenta y luego se mantiene constante (Kato y col., 1989; Morales y Jiménez-Perez, 2001).

Sin embargo, debido a que productos finales pigmentados también podrían ser fluorescentes, es necesario estudiar para cada sistema en particular tanto las condiciones ambientales como la escala de tiempo del tratamiento.

1.7.2. Estabilidad de pigmentos a la irradiación.

Datos experimentales obtenidos por distintos autores indican que cromóforos específicos en proteínas glicosiladas pueden funcionar como fotosensibilizadores cuando ellos absorben radiación en la región del ultravioleta cercano (UV-A). La producción de especies reactivas de oxígeno durante la irradiación de proteínas glicosiladas con UV-A ha sido documentada por varios grupos de investigación. Hay varios autores que realizaron irradiación en distintos sistemas durante diferentes tiempos y en diferentes condiciones. Estos parámetros analizados son descriptos en la Tabla I.2.

Como se puede observar en la Tabla I.2, el efecto de la irradiación en melanoidinas se realizó en su mayoría en sistemas de lentes del cristalino de ojo de distintas especies normales y con cataratas. Debido a que las melanoidinas se encuentran en alimentos, que frecuentemente están expuestos a la luz y a condiciones de atmósferas en presencia de oxígeno, y también por su potencial actividad fotosensibilizadora, es de importancia estudiar la interacción entre las melanoidinas y la radiación. En los antecedentes mostrados en la Tabla I.2 se encuentra variabilidad en los tiempos de irradiación, temperatura y longitud de onda y potencia utilizada. Por lo tanto, los tiempos elegidos para la irradiación del sistema modelo de melanoidinas presentado en este trabajo (*lisina-glucosa-buffer*) fueron 5min, 15 min, 30min y 60 min, a una temperatura cercana a 30°C utilizando diferentes longitudes de onda y potencias (las condiciones precisas se encuentran indicadas para cada experimento).

Además de contribuir a las características sensoriales de diversos alimentos, tales como aroma, astringencia y color, los compuestos polifenólicos poseen efectos benéficos para la salud asociados a sus propiedades antioxidantes. Trabajos previos indicaron que al aplicar tratamientos fotoquímicos (irradiación con luz ultravioleta) a sistemas modelo de polifenoles o a jugos de fruta, su absorbancia en el espectro visible disminuye (Sander y Larsen, 1995; Ibarz y col., 2005), indicando que se produce oxidación de los polifenoles mediada por luz ultravioleta (fotooxidación de los pigmentos).

Tabla I.2. Antecedentes de irradiación en sistemas modelos. ND: no descripto.

<i>Sistema</i>	<i>λ de irradiación</i>	<i>T°</i>	<i>Tiempo de irradiación</i>	<i>Potencia</i>	<i>Referencia</i>
Colágeno de tendón de rata	254 nm	37°C	1 hs y 2 hs	16 W/cm ²	Sionkowska y col., 1999
aminoácido-azúcar	366 nm	ND	30 min	ND	Argirova, 2005
Lentes becerro	365 nm	35°C	125 min	8,5 mW/cm ²	Azzam y col., 2004
Lentes humanas	338-475 nm	20°C	1-24 hs	925 W/cm ²	Linetsky y col., 2003
Trp-Ascorbico-Riboflavina	365 nm	37°C	ND	98 mW	La Rochette y col., 2003
Lentes humanas	Visible	ND	1-8 hs	ND	Okano y col., 2001
Lentes humanas	320-380 nm	ND	2 hs	54 mW/cm ²	Ortwerth y Olesen, 1994
Lentes humanas	338 nm	17°C	6 hs ó 24 hs	ND	Ortwerth y col., 2002
Lentes humanas	338 nm	ND	30 min	ND	Lee y col., 1999
Lentes de ratón	366 nm	ND	2 min	20 mW/cm ²	Roberts y col., 1991
Lentes	335 nm	25°C	5-180 min	ND	Masaki, 1999

En el presente trabajo se analizó el efecto de la irradiación sobre sistemas modelo aminoácido-azúcar, sistemas modelo proteína-azúcar, utilizando como modelo de proteínas a las proteínas del lactosuero, las cuales poseen un alto interés biotecnológico y polifenoles oxidados provenientes de hojas de té.

1.7.3. Efecto de las sales sobre la cinética de la reacción de Maillard.

La adición de sales puede influenciar las propiedades de los sistemas azucarados, como las reacciones de hidrólisis y la cinética de la reacción (Mazzobre y Buera, 1999; Matiacevich y Buera, 2006). La presencia de la sal MgCl₂ en sistemas liofilizados de trehalosa y sacarosa con glicina (almacenados a 22% y 43% de humedad relativa, H.R.) aumentaron la retención de agua y disminuyó la cristalización de los azúcares. Mientras que en los sistemas conteniendo trehalosa se observó una inhibición del pardeamiento por la presencia de la sal, un efecto opuesto fue observado en los sistemas conteniendo sacarosa. (Santagapita y Buera, 2006).

Los sulfitos son utilizados en productos alimenticios con el fin de controlar el crecimiento microbiano e inhibir el pardeamiento no enzimático. Sin embargo, personas adultas asmáticas sufren una alta sensibilidad alérgica al sulfito (Lester 1995). Por lo tanto, el estudio del efecto de compuestos inocuos (como cloruros metálicos alcalinos, por ejemplo la sal MgCl₂) tiene un alto interés tecnológico, ya que podría ayudar como reemplazo del sulfito para la inhibición del pardeamiento.

1.7.4. Evidencia de la reacción de Maillard en sistemas biológicos.

1.7.4.1. Tejidos Animales.

Desde 1980, se reconoció la importancia de la reacción de Maillard en organismos vivos, incluso su acumulación en el cuerpo humano y su relación con los problemas del envejecimiento. Resultados de estudios recientes mostraron que los AGEs son responsables de un número de complicaciones patológicas en pacientes diabéticos y en el envejecimiento poblacional (Tabla I.3). El elemento más dañino de la formación de los AGEs es el entrecruzamiento entre proteínas, sobre todo en aquellas de larga vida (con baja tasa de recambio) como el colágeno (Vlassara y col., 1986; Cerami y col., 1987; Verzijl y col., 2000; Song y col., 2002) y el cristalino (Zigman y col., 1977; Ortweth y col., 2002). Es importante notar que las condiciones fisiológicas (37°C, pH cercano a neutro, presencia de glucosa y proteínas) son bastantes favorables para que la reacción de Maillard ocurra.

La formación *in vivo* de entrecruzamientos se incrementa con la edad y la diabetes (Obayashi y col., 1996). Mediciones de estructuras entrecruzadas en especímenes biológicos pueden proveer un índice de la edad y del desarrollo de las complicaciones diabéticas. Es posible también que la glucosa contribuya a la formación de la placa de ateroma, dado que causa el progresivo entrecruzamiento de los AGEs con el colágeno en las paredes de los vasos en la aterosclerosis (Cerami y col., 1987).

En colágeno, se produce fluorescencia de características semejantes a la de los compuestos de Maillard, ya sea de la aorta y la piel de tejidos de ratón, en animales “viejos” (= de edad) (Song y col., 2002). Además, también se hallaron AGEs en otras proteínas de larga vida, como por ejemplo proteínas de la matriz extracelular del cerebro (Smith y col., 1994; Sasaki y col., 1998), asociadas al cartilago (Verzijl y col., 2000), y de la membrana basal renal (Knecht y col., 1991; Makita y col., 1994).

Un exceso de AGEs en sangre o tejidos no es solo una característica de la diabetes (Monnier y Cerami, 1982; Vlassara y col., 1986; Fu y col., 1994) y aterosclerosis (Lee y col., 1993), sino que está asociada a muchas, sino todas, la enfermedades crónicas de la edad, incluyendo artritis reumatoide, amiloidosis, Alzheimer (Smith y col., 1994) y otras enfermedades neurodegenerativas (Sasaki y col., 1998).

Tabla I.3. Relación entre enfermedades humanas y la reacción de Maillard medida como la acumulación de fluorescencia tipo AGEs en diferentes sistemas. La determinación de fluorescencia se realizó por excitación a 370 nm y emisión a 440 nm.

Enfermedad	Sistema	Referencia
Alzheimer	Placas de Alzheimer	Smith y col., 1994; Sasaki y col., 1998
Placa de ateroma	Glucosa - Colágeno Placas ateroscleróticas Aorta de rata	Monnier y col., 1984; Vlassara y col., 1986 Lee y col., 1993 Song y col., 2002
Diabetes (Complicaciones)		
Daño ocular	Lentes humanas Lentes humanas - fotoproductos de triptofano	Lee y col., 1999; Ortweh y col., 2002; Cheng y col., 2001; Franke y col., 2003 Zigman y col., 1977
Daño en articulaciones	Proteínas del cristalino Lentes bovinas - glucosa Colágeno de tendón de cola de rata Cartilago articular humano Tendón de Aquiles - ribosa	Monnier y Cerami, 1983 Sander y Larsen, 1995 Fu y col., 1994 Verzijl y col., 2000 Reddy y col., 2002
Daño en riñón	Orina humana	Knecht y col., 1991; Makita y col., 1994
Envejecimiento prematuro	Fibroblasto dérmico - BSA - glucosa Tendones de colas de rata Fibroblasto dérmico de piel humana Colágeno de piel de rata	Masaki, y col., 1999 Sajithal y col., 1998; Sionkowska, 1999 Okano y col., 2001 Song y col., 2002

El mayor efecto biológico de la excesiva glicosilación no enzimática incluye:

- 1) inactivación de enzimas,
- 2) inhibición del complejamiento de moléculas regulatorias,
- 3) entrecruzamiento con proteínas glicosiladas y atrapamiento de las proteínas solubles por proteínas extracelulares glicosiladas,
- 4) disminución de la proteólisis,
- 5) reconocimiento y endocitosis de proteínas modificadas con glucosa por macrófagos,
- 6) anormalidades en la funcionalidad de los ácidos nucleicos y posible aumento en la respuesta inmunológica y citotoxicidad en los tejidos (Vlassara y col., 1986).

I.7.4.2. Semillas.

Las semillas son consideradas sistemas adecuados para analizar los efectos de las reacciones de deterioro durante el almacenamiento a largo plazo a temperaturas intermedias, ya que la viabilidad de las semillas decrece sensiblemente cuando sus proteínas son modificadas (Sun y Leopold, 1995; Murthy y Sun, 2000). Proteínas, azúcares y lípidos son los componentes

mayoritarios de los embriones de las semillas, y si bien su contenido de agua es bajo en la mayoría de ellos, la reacción de Maillard procede y sus efectos son claramente detectables.

Modificaciones de las proteínas por la reacción de Maillard durante el almacenamiento de las semillas se estudiaron por análisis de fluorescencia de proteínas (Wettlaufer y Leopold, 1991; Baker y Bradford, 1994; Sun y Leopold, 1995; Murthy y Sun, 2000; Murthy y col., 2002). El incremento de la fluorescencia de las proteínas a 395/450 nm (excitación/emisión) fue y es usado como una medida de la reacción de Maillard en numerosos estudios de viabilidad de semillas después del almacenamiento, pero con resultados contradictorios. Wettlaufer y Leopold (1991) observaron que la germinación de las semillas decrece con la acumulación de productos de Maillard en el eje (embrionario) de la soja durante un envejecimiento acelerado, pero no es posible confirmar esta correlación entre viabilidad de semillas y acumulación de productos de Maillard en condiciones naturales (zanahoria, tomate, cebolla y coliflor) o artificiales (brócoli y ejes de lechuga) o en semillas “viejas” (Baker y Bradford, 1994). Sin embargo, la acumulación de productos de Maillard en los ejes de la soja y en los cotiledones sí se correlaciona con la pérdida de germinabilidad en condiciones no aceleradas de envejecimiento (Sun y Leopold, 1995).

Existen semillas llamadas ortodoxas, que conservan su viabilidad cuando se deshidratan y por lo tanto pueden conservarse por períodos de tiempo prolongados a temperaturas cercanas a la ambiental. En cambio, las llamadas recalcitrantes no pueden deshidratarse sin perder una alta proporción de poder germinativo y entonces deben almacenarse húmedas a temperaturas de refrigeración. Es interesante analizar las respuestas al almacenamiento de semillas de distinta tolerancia a la desecación.

I.7.4.2.A. *Chenopodium quinoa*.

Quinoa es un pseudocereal nativo de la región andina de Sudamérica. Las semillas de quinoa tienen un alto valor nutricional, ya que su composición proteica reúne y sobrepasa las recomendaciones de la OMS (Organización mundial de la salud). Quinoa ha sido un importante cultivo en los Andes por centurias realizado por campesinos de comunidades de escasos recursos, utilizado como agricultura de subsistencia. Sin embargo, hoy en día, el cultivo de quinoa está ganando popularidad debido a sus excelentes características y su adaptabilidad a diferentes condiciones agroclimáticas. Distintos cultivares de quinoa han sido explotados por sus diferentes características (por ej. tamaño del grano, bajo amargor, tolerancia a la sequía) (Salinas Sanjinés, 2004). Los cultivos extensivos, como el comercio

internacional conlleva a la consideración de estudios sobre de la diversidad genética y a las propiedades de conservación de las semillas *in-situ* y *ex-situ*.

Las semillas de quinoa tienen un comportamiento ortodoxo (Ellis y col., 1988). En semillas secas, las reacciones no enzimáticas, tales como la reacción de Maillard, puede ocurrir aún a muy bajos contenidos de agua (Wettlaufer y Leopold, 1991; Sun y Leopold, 1995).

Es relevante el estudio de los mecanismos de deterioro en estas semillas, el seguimiento y la cinética de los mismos, con el fin de establecer métodos que permitan conservar su germoplasma. Por estos motivos se seleccionó como uno de los sistemas biológicos modelo diferentes cultivares de la semilla de *chenopodium quinoa*.

I.7.4.2.B. *Araucaria angustifolia*.

Araucaria angustifolia es una especie amenazada de Paraguay, Argentina y Brasil, de alto valor económico, forestal y alimenticio. Sus semillas tienen un alto contenido acuoso (aprox. 50%) y un a_w de 0,985 a 23°C. Su deshidratación mejoraría su conservación pero provoca pérdida total de la viabilidad (son semillas recalcitrantes). Por lo tanto el almacenamiento de estas semillas en cámaras a 4°C conservando su contenido de agua es actualmente la única alternativa, aunque sólo permite la conservación de un porcentaje limitado, que depende del tiempo. Estudios previos (Panza y col., 2002) muestran que los embriones subsisten en el almacenaje fundamentalmente a expensas del gametófito femenino y la disminución de las reservas en éste sería uno de los factores limitantes para el tiempo de almacenamiento.

Durante el almacenamiento de estas semillas por largo tiempo, es factible que se produzca la reacción de Maillard, pudiendo resultar nocivos y/o inutilizables los productos de esta reacción para la subsistencia del embrión.

Es relevante el estudio de los mecanismos de deterioro en estas semillas, el seguimiento y la cinética de los mismos, con el fin de establecer métodos que permitan conservar su germoplasma. Por esos motivos se seleccionó como uno de los sistemas biológicos modelo la semilla de *Araucaria angustifolia*.

Los compuestos fluorescentes provenientes de semillas se extraen en soluciones acuosas o etanólicas (Park y Kim, 1983; Ngammongkolrat y col., 1985; Klim y Nagy, 1988).

El trabajo realizado en estas semillas es parte de un estudio más amplio que incluye la integración entre distintos grupos de trabajo que investigan diversos pero complementarios aspectos de esta semilla.

II. Objetivos

Objetivos:

Hipótesis de trabajo: Los productos de la reacción de Maillard, pueden ser susceptibles a radiaciones UV-Vis. La susceptibilidad puede ser beneficiosa desde el punto de vista que se destruyan intermediarios o negativa en el caso que se acelere la reacción o se generen intermediarios no deseables.

Objetivo general: Determinar la cinética de formación y fotoestabilidad de los compuestos generados por la reacción de Maillard, tanto para dilucidar mecanismos de deterioro como para ejercer acciones de control.

Objetivos particulares:

- Determinar las características de los compuestos fluorescentes y pigmentos generados por reacciones no enzimáticas (reacción de Maillard) y enzimáticas (polifenoles).
- Analizar el efecto de la sal cloruro de magnesio sobre la cinética de formación de compuestos fluorescentes y pigmentos en sistemas modelo.
- Estudiar la respuesta a la irradiación ultravioleta-visible de compuestos fluorescentes y pigmentos en distintas formas de presentación. Se emplearán sistemas modelos en forma líquida, absorbidos ó encapsulados y sistemas biológicos (semillas).
- Caracterizar la interacción de compuestos fluorescentes y pigmentos con colorantes artificiales.

III. Materiales y Métodos

III.1. Preparación de sistemas estudiados.

III.1.1. Reacción de pardeamiento no enzimático: Sistemas modelo.

III.1.1.A. Sistemas líquidos.

El estudio se realizó en soluciones de un sistema modelo conteniendo un azúcar (D-glucosa principalmente) y un aminoácido (L-lisina ó L-glicina) ó proteínas (proteínas del lactosuero) en soluciones tampón ó *buffers*. Con la presencia de estos reactivos, las reacciones de pardeamiento no enzimático factibles son las de Maillard y/o caramelización.

La L-lisina (Sigma), además de ser frecuentemente el aminoácido limitante (Dworschak, 1980), desde el punto de vista nutricional, posee un grupo ϵ -amino de gran reactividad frente a carbonilos provenientes de azúcares reductores (Eichner, 1975; Labuza y Baisier, 1993).

Las proteínas del lactosuero (WP), principalmente constituidas por α -lactoalbumina (α -lac) y β -lactoglobulina (β -lg) son ampliamente estudiadas y utilizadas como una mezcla modelo compleja de proteínas.

Los grupos carbonilos fueron aportados por D-glucosa.. Se eligió este azúcar reductor por ser, junto con D-fructosa, el monosacárido que se encuentra más frecuentemente en forma libre en los alimentos naturales y sistemas biológicos (Hodge y Osman, 1982). Otros grupos carbonilos utilizados con el objetivo de comparación de la cinética de reacción fueron trehalosa y sacarosa, las cuales son disacáridos no reductores formados por unidades de glucosa-glucosa y glucosa-fructosa, respectivamente y su participación en la reacción de Maillard sólo puede ocurrir por hidrólisis de los mismos.

Para mantener el pH constante durante el transcurso de los tratamientos térmicos se emplearon soluciones reguladoras, *buffers* o tampón a diferentes pHs.

Los sistemas modelo aminoácido-glucosa se prepararon disolviendo los siguientes componentes:

- Glucosa (Merck) ó trehalosa (Hashashibara) ó sacarosa (Merck) utilizadas en diferentes rangos de concentración (5 al 70% m/v)
- Glicina 0,5 M (Mallinckrodt) o lisina 0,084 M (Sigma), ambas al 0,5% m/v.
- Sales: $MgCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,28 M) (Mallinckrodt).
- *Buffers* ó soluciones tampón: fosfato de sodio y potasio 0,1 M (pH 6,84 ó pH 5) ó Acetato de sodio 0,1 M (pH 6,84 ó pH 5) ó citrato de sodio (pH 6,84 ó pH 5) (Merck).

El sistema modelo proteína-glucosa se preparó disolviendo los siguientes componentes:

- Proteínas de lactosuero (WP) al 1,25% m/v (Foremost 389, Daritek NBV).
- Glucosa al 5% m/v (Merck).
- *Buffer* ó solución tampón: fosfato de sodio y potasio 0,1 M pH 6,84 (Merck).

Todos los reactivos empleados fueron grado analítico y fueron utilizados como fueron provistos por el proveedor.

Se distribuyeron alícuotas de 2,5 mL de cada sistema en viales de vidrio de 5 mL y se sellaron utilizando cinta de teflón y tapas herméticas. Cada sistema se analizó luego de su almacenamiento a distintos tiempos y temperaturas a las cuales se realizaron los diferentes análisis.

III.1.1.B. Sistemas liofilizados.

Los sistemas modelo líquidos de trehalosa-glicina-*buffer* sin tratamiento de temperatura ó sistemas modelo de proteína-glucosa fueron congelados durante 24 h y luego liofilizados durante 24 h utilizando un liofilizador Heto Holten A/S, con trampa de enfriamiento modelo CT 110 (Heto Lab Equipment, Denmark) que opera a una presión en cámara de 4.10^{-4} mbar y con temperatura de placa condensadora de -111°C .

Luego, se procedió a rehumidificar los sistemas de trehalosa deshidratados colocándolos en desecadores conteniendo soluciones salinas saturadas, logrando así atmósferas de presión de vapor relativa (HR) a 25°C de 22% (CH_3COOK ; $a_w=0,22$), 43% (K_2CO_3 ; $a_w=0,43$); 52%, (MgNO_3 ; $a_w=0,52$), 75% (NaCl ; $a_w=0,75$); 84% (KCl , $a_w=0,84$); 88% (SrNO_3 , $a_w=0,88$) y 97% (KNO_3 ; $a_w=0,97$) (Greenspan, 1977). Se rehumidificaron durante una semana a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, tiempo a partir del cual se obtuvo peso constante de las muestras. Se sellaron los viales con tapones de goma y precintos de aluminio, para garantizar la hermeticidad de los mismos.

Posteriormente, se procedió al tratamiento de almacenamiento para su posterior análisis.

III.1.1.C. Sistemas en soportes sólidos.

III.1.1.C.1. Absorbidos en papel de filtro.

En un conjunto de experimentos, el producto de reacción de Maillard, se absorbió sobre un soporte de papel de filtro. Se preparó el sistema modelo lisina-glucosa-*buffer* fosfato 0,1 M pH 6,84, a dos tiempos diferentes de almacenamiento a 55°C (10 h, donde el color visual del sistema era amarillento y 90 h, donde el sistema era de color pardo):

- Sistema B, incoloro, (0 h. No almacenado en estufa).
- Sistema A, de color amarillento, (10 h).
- Sistema P, de color pardo, (90 h).

En primer lugar, con la intención de buscar las mejores condiciones de preparación de la muestra, se realizó una prueba de irradiación con la lámpara de luz a 365 nm con distinta concentración de material absorbido (25, 50 ó 100 μL).

Alícuotas de 25 μL de cada sistema fueron absorbidas en papel de filtro Whatman (tipo 0,859, Scheicher & Schiill $\Phi_{\text{cm}}=9$, Alemania) hasta llegar a un total de 25, 50 ó 100 μL , permitiendo que entre cada alícuota se absorba completamente ayudado con secador de aire frío. La elección de absorber hasta 100 μL de cada muestra se debió a que al absorber volúmenes mayores, se producían pliegues del papel de filtro y diferencias en la homogeneidad del color absorbido.

En la Figura III.1 se observa que el índice de pardeamiento (IP) (ecuación III.5) aumentó significativamente con el tiempo para todos los sistemas, inclusive en las condiciones del control de oscuridad. Sin embargo, las variaciones obtenidas por los distintos tiempos de irradiación no fueron significativas. Las mayores diferencias obtenidas en el índice de pardeamiento se obtuvieron cuando se realizó la absorción de 100 μL de cada sistema en el papel de filtro, por lo tanto, se eligió esta cantidad para los ensayos de irradiación.

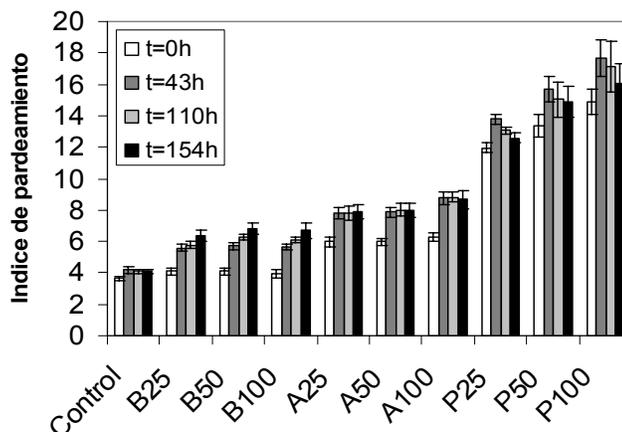


Figura III.1. Irradiación de muestras lisina-glucosa-buffer (25, 50 ó 100 μL) absorbidas a papel de filtro. La irradiación a distintos tiempos (horas) fue realizada con lámpara de luz a 365 nm. El control fue realizado en oscuridad.

En la Figura III.2, se muestra además el esquema de disposición de las muestras para la irradiación con fuente de luz a 350 nm, siendo la distancia entre la fuente de luz y las muestras de

15 cm. El efecto de la irradiación de las muestras a diferentes fuentes de luz se realizó por sextuplicado.



Figura III.2: Esquema de disposición de las muestras para irradiación, siendo la distancia entre la fuente de luz (350 nm) y las muestras de 15 cm del sistema lisina-glucosa-*buffer* fosfato con distintos tiempos de almacenamiento a 55°C absorbido en papel de filtro.

III.1.1.C.2. *Sistemas encapsulados en matrices sol-gel de tetraetoxisilano (TEOS).*

Los sistemas lisina-glucosa-*buffer* fosfato pH 6,84 tratados durante distintos tiempos a 70°C, se encapsularon en matrices sol-gel de tetraetoxisilano (TEOS) proveniente de FLUKA.

El sol fue preparado por sonicación en un Ultrasonic mix (Transsonic 540 (35 kHz) Elma, Singen, Alemania) de una mezcla de 1 mL de TEOS, 0,2 mL de agua (milli Q) y 0,06 mL de 0,04 M HCl durante 30 minutos. Luego, 0,1 mL del sol obtenido fue mezclado, en una cubeta multicelda de 96 posiciones, con un volumen equivalente de la solución conteniendo los pigmentos de Maillard. Las soluciones se dejaron a 25°C hasta su gelación y envejecimiento que permitió el desprendimiento de la placa de las gotas (Figura III.3) para el posterior análisis de desarrollo de color y de los efectos de la irradiación.

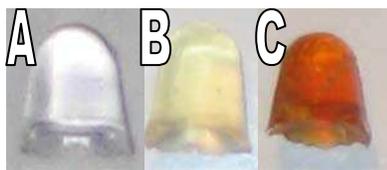


Figura III.3. Sistema de lisina-glucosa almacenado a 70°C por diferentes tiempos encapsulado en una matriz de tetraetoxisilano (TEOS) con forma de gota. **(A)** Control de TEOS+sistema sin almacenamiento **(B)** TEOS+sistema (2 h). **(C)** TEOS+sistema (8 h).

III.1.2. *Reacción de pardeamiento enzimático: Polifenoles de hojas de té.*

Con el objetivo de realizar una extracción de polifenoles oxidados provenientes de hojas de té, se utilizaron hebras de un té negro comercial (tipo ASSAM. Green Hills. Alto Verde, Misiones, Argentina). El material fue almacenado en oscuridad y utilizado como fue provisto por el proveedor comercial, sin ningún tipo de procesamiento hasta la realización de la extracción.

III.1.3. Sistemas biológicos. Semillas.

III.1.3.A. Chenopodium quinoa.

Se estudiaron semillas de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd., Chenopodiaceae) de distintos cultivares (Cvs. Baer II, Ollagüe y 2-Want,). Cv. Baer II, línea mejorada a partir de cv. Baer, es originaria de las tierras bajas cercanas a Temuco en el Sur de Chile. Cv. Ollagüe es originaria de la zona Andina en el Norte de Chile. Cv. 2-Want es originaria del Norte de Chile y Bolivia. Las semillas fueron obtenidas del campo experimental de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires. Las semillas utilizadas para todos los experimentos fueron pre-elegidas y limpiadas a mano, descartando las excesivamente pequeñas y las dañadas a la vista. Las semillas fueron mantenidas en las condiciones de cosecha (contenido de agua= 5% en base seca) en el freezer (-18°C) hasta la realización de los experimentos.

III.1.3.B. Araucaria angustifolia.

Se analizó el prótalo (gametófito femenino, de función similar al endosperma de las angiospermas) de semillas provenientes de las cosechas de 1995 hasta 2002, las mismas estuvieron mantenidas a 4°C hasta que se les separó manualmente el prótalo (Figura III.4), se congelaron y se liofilizaron (liofilizador Heto Holten A/S, Allerød, Dinamarca). Los prótalos liofilizados se molieron finamente con mortero, manteniéndose en freezer (-18°C) hasta la realización de los experimentos.

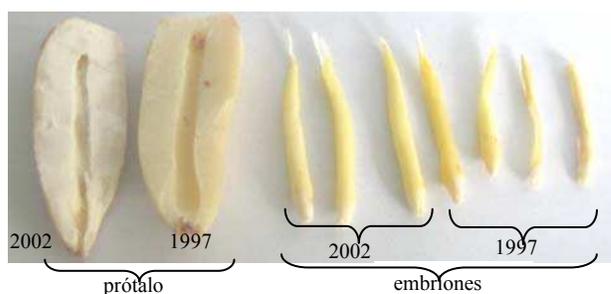


Figura III.4. Fotografía digital de semillas de *Araucaria araucana* antes de la liofilización, en las que se separó el prótalo del embrión. Se muestran dos semillas de distinta cosecha (2002 y 1997, respectivamente).

III.1.4. Agentes sensibilizadores.

Se utilizaron los siguientes agentes sensibilizadores a la irradiación:

- Rosa de bengala (Anedra)
- Riboflavina (Fisher, USA)

Los reactivos se utilizaron como fueron entregados por cada proveedor sin previa purificación.

III.2. Metodología.

III.2.1. Determinación de pH.

La medición del pH de los distintos sistemas líquidos se realizó a tiempo cero y en el último tiempo de almacenamiento con un electrodo de superficie (Mettler Toledo 427, Suiza) y un pHmetro (Mettler Delta 320, Suiza) calibrado con soluciones tampón de pH 4 y 7 (Merck).

En todos los casos en que fue necesario un ajuste final de pH cuando se prepararon las soluciones tampón o *buffers*, éste se realizó por agregado de soluciones concentradas de NaOH ó ácido clorhídrico según correspondiera.

III.2.2. Medición de contenido de agua.

El contenido de agua fue determinado después de rehumidificar las muestras a través de la diferencia de peso antes y después del secado de los sistemas en estufa de vacío durante 48 h en presencia de perclorato de magnesio. Para los sistemas con trehalosa la temperatura de secado fue de $96\pm 2^{\circ}\text{C}$ y para los sistemas con sacarosa de $62\pm 3^{\circ}\text{C}$. El cálculo realizado fue el siguiente:

$$\% \text{H}_2\text{O} = \frac{P_i - P_f}{P_f - P_r} \times 100 \quad (\text{Ecuación III.1})$$

Donde,

P_i es el peso de la muestra antes del tratamiento,

P_f es el peso de la muestra después del tratamiento,

P_r es el peso del vial de 5 mL correspondiente vacío.

III.2.3. Tratamiento térmico.

Las muestras (por duplicado ó triplicado), se almacenaron en baños de arena en estufa con circulación forzada de aire a temperatura constante de $55\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Memmert) ó $70\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Gallenkamp, U.K.) ó $120\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Memmert), indicándose en cada caso la temperatura utilizada. A distintos tiempos de almacenamiento se tomaron las muestras y se realizaron las determinaciones correspondientes.

III.2.4. Determinación del grado de formación de pigmentos pardos.

III.2.4.1. Medición de absorbancia.

Para determinar la concentración de un dado pigmento, la medición de absorbancia a una longitud de onda (λ) seleccionada es aplicable a muestras transparentes. A diferencia de lo que

ocurre con un pigmento que presenta tonalidad neta, los pigmentos pardos no absorben selectivamente a una λ fija, si no que lo hacen en el rango entre 400 y 600 nm. Por lo tanto, se puede seleccionar una λ en ese rango.

Luego del almacenamiento a la temperatura y tiempo correspondientes, se determinó la cinética de desarrollo de absorbancia a 365 nm ó 340 nm (longitud de onda de excitación para la medición de fluorescencia), y de color pardo (por mediciones de absorbancia a 445 nm y/o espectros de absorbancia en todo el rango visible).

Las mediciones de los espectros de absorbancia de cada muestra se realizaron en diferentes espectrofotómetros, indicando en cada caso que instrumento se utilizó para todo el experimento.

Los espectrofotómetros utilizados y las condiciones utilizadas en cada uno fueron:

- Espectrofotómetro Ocean Optics, USB 2000, Ocean Optics Co., U.S.A. Condiciones: Tiempo de integración 30 mseg., Average 50. Programa OOibase 32.
- Espectrofotómetro Hewlett Packard 8453. Programa Agilent 8453 Spectroscopy System, Agilent Technologies. U.S.A.
- Espectrofotómetro UV-VIS Shimadzu 1620.

El intervalo de confianza, al igual que en otros trabajos previos fue del 3% para un 95% de certeza.

III.2.4.2. Medición de color.

Se obtuvieron los valores triestímulo X, Y, Z a partir del fotocolorímetro Minolta CM-508d (Minolta Co. Ltd., Japón) con los siguientes parámetros: ángulo=2°, iluminante=D65, Sistema X, Y, Z, sobre fondo blanco.

Por el método de las coordenadas seleccionadas, se pueden obtener los valores triestímulos X, Y, Z a partir de la medición a algunas λ seleccionadas en una muestra líquida transparente. Para productos pardo-amarillos, Huidrobo y Simal (1985) propusieron realizar las lecturas a 445, 495, 550 y 625 nm, y luego calcular los valores triestímulos mediante las siguientes fórmulas:

$$X = T_{625} * 0,42 + T_{550} * 0,35 + T_{445} * 0,21 \quad (\text{ecuación III.2})$$

$$Y = T_{625} * 0,2 + T_{550} * 0,63 + T_{495} * 0,17 \quad (\text{ecuación III.3})$$

$$Z = T_{495} * 0,24 + T_{445} * 0,94 \quad (\text{ecuación III.4})$$

Se encontró que a partir de los valores triestímulos X, Y, Z se puede obtener la función "Índice de Pardeamiento", IP,

$$IP = 100 * (x - 0,31) / 0,172 \quad (\text{ecuación III.5})$$

Donde $x = \frac{X}{X + Y + Z}$ (ecuación I.4)

la cual fue adecuada para seguir las reacciones de pardeamiento no enzimático en sistemas modelo (Buera y Resnik, 1990), siendo IP_0 = desarrollo de color de la muestra sin tratamiento térmico.

Los intervalos de confianza de X, Y, Z e IP, fueron calculados a partir de 3 mediciones de 3 sistemas preparados de la misma manera. El intervalo de confianza, al igual que en otros trabajos previos fue del 3% del valor medido para un grado de significancia del 95%.

III.2.5. Determinación de fluorescencia.

Las distintas muestras analizadas se diluyeron con agua destilada en forma tal que la absorbancia fuera $< 0,1$ a la longitud máxima de excitación utilizada (365 ó 340 nm) (Scoog y col., 2001). Esto es para evitar el efecto de filtro interno, ya que los pigmentos absorben a la λ de excitación de los compuestos fluorescentes.

Las mediciones de los espectros de emisión y excitación de fluorescencia para la caracterización de las muestras se realizaron en un espectrofluorímetro Hitachi F-2500 (Hitachi, Ltd., Tokio, Japón), el cual utiliza una lámpara de xenón, libre de ozono, de 700 W. Las mediciones se realizaron en celdas de cuarzo cuadradas o triangulares de 3 mL ó 1,5 mL de capacidad, respectivamente (NSG Precision Cells, Inc., Farmingdale, N.Y).

Los espectros informados corresponden al barrido realizado por el equipo a partir de dos mediciones por muestra, y habiendo realizado automáticamente la corrección matemática por la potencia de la lámpara en cada longitud de onda.

Las mediciones de emisión de fluorescencia, tanto para el seguimiento de la cinética de la reacción de Maillard como para analizar el efecto de las irradiaciones, se realizaron en un espectrofluorímetro Shimadzu RF-540 (Shimadzu, Japón) equipado con una lámpara de xenón (150 W) y acoplado a un registrador de datos Shimadzu DR-3 (programa CRF-1).

Se midió fluorescencia de superficie antes y después de la irradiación en los sistemas adsorbidos en papel de filtro utilizando el espectrofluorímetro Ocean Optics con filtro de banda a 340 nm (Edmund) como filtro de excitación, y fibras ópticas de reflectancia (R400-7-VIS/NIR, Ocean Optics), en una geometría que toma la emisión a 45°C (Figura III.5), para evitar el efecto de reflexión directa del haz de excitación y la reflexión generada por el color de la muestra.



Figura III.5. Dispositivo de medición de fluorescencia de superficie con geometría de excitación y medición de la emisión a 45°.

III.2.5.1. Medición del rendimiento cuántico.

A. Equipo y Reactivos

Reactivos puros de grado analítico y agua tridestilada.

Fluorómetro Hitachi F-2500 ó espectrofluorómetro Ocean Optics.

Cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

B. Selección del patrón.

La Tabla III.1 es una lista de patrones de rendimientos cuánticos conocidos. El material patrón fue seleccionado teniendo en cuenta que el espectro de absorción y de fluorescencia del patrón y de la muestra deben ser similares, por lo tanto, el patrón elegido fue sulfato de quinina en H_2SO_4 0,1 N, 25°C, el cual posee un rango de absorción y excitación de 260-390 nm y un rango de emisión de fluorescencia entre 380-580 nm.

PATRÓN: sulfato de quinina en 0,1 N de H_2SO_4 , $\Phi_F = 0,546$ (Szabo, 2000).

C. Medición de absorbancia

Se realizó el espectro de absorbancia de la muestra y del patrón, ajustando la concentración de ambos tal que la absorbancia a las longitudes de onda de excitación fuera menor que 0,05, ya que hasta este valor de absorbancia se mantiene la linealidad del rendimiento cuántico.

D. Medición de fluorescencia

1- Se fijó el paso de banda (*slit*) de la excitación y de la emisión a 5 nm cada uno.

2- Se midió la fluorescencia de la muestra y del patrón en idénticas condiciones (longitud de onda de excitación y emisión, absorbancia de las muestras, temperatura).

3- La condición de tiempo de integración o velocidad de barrido a 300 nm/seg fue elegido de tal manera de minimizar el ruido del espectro.

Tabla III.1. Soluciones de patrones utilizados para el cálculo de rendimiento cuántico (Szabo, 2000).

Soluciones patrón	Rango excitación (nm)	Rango emisión (nm)	Rendimiento cuántico Φ_F
Sulfato de quinina/ 0,1 N H ₂ SO ₄ , 25°C	260-390	380-580	0,546
2-aminopiridina/ 0,1 N H ₂ SO ₄ , 20°C	250-300	315-480	0,66
Triptofano/ agua pH 7,2, 25°C	280	340	0,13
Fluoresceína/0,1 M NaOH		500-600	0,79
N-acetilriptofanamida/ agua pH 6-7, 20°C	280-300	300-450	0,14
9,10-difenilantraceno/ etanol, 20°C	320-380	390-530	0,95

E. Cálculos

1- Se resta el espectro del solvente respectivo a cada uno de los espectros de fluorescencia obtenidos.

2- Se integra el área bajo la curva de cada espectro de emisión, para obtener la fluorescencia integrada, $I_M(\lambda)$, para la muestra y $I_S(\lambda)$, para el patrón.

3- Se calcula el rendimiento cuántico Φ_{FM} , de la muestra por sustitución de los valores apropiados en la siguiente ecuación:

$$\phi_{FM} = \phi_{FS} * \frac{I_{M(\lambda)}}{I_{S(\lambda)}} * \frac{A_S}{A_M} * \frac{n_M^2}{n_S^2} \text{ (ecuación III.6)}$$

Donde: Φ_{FM} , es el rendimiento cuántico de la muestra; Φ_{FS} , es el rendimiento cuántico del patrón; $I_{M(\lambda)}$, es la fluorescencia integrada de la muestra; $I_{S(\lambda)}$, es la fluorescencia integrada del patrón;

A_s , es la absorbancia del patrón a la longitud de onda de excitación; A_M , es la absorbancia de la muestra a la longitud de onda de excitación; n , es el índice de refracción de la muestra n_M o del patrón, n_S .

4- Para obtener un resultado del rendimiento cuántico con mayor valor estadístico, se realizaron curvas de intensidad de fluorescencia vs absorbancia, tanto para el patrón como para cada sistema a los distintos tiempos de almacenamiento. Se realizó una regresión lineal con los datos obtenidos y la pendiente obtenida es la relación: $\frac{I_{M(\lambda)}}{A_M}$ para la muestra. En cambio, para el patrón, mediante la inversa de la pendiente se obtiene la relación: $\frac{A_S}{I_{S(\lambda)}}$. El índice de refracción de la muestra y el patrón es el mismo, ya que ambos fueron diluidos con agua destilada para obtener el rango de absorbancia menores a 0,05 a la longitud de onda de excitación.

III.2.5.2. Cuantificación de compuestos fluorescentes.

Las fracciones solubles proteicas obtenidas a partir de semillas de quinoa fueron analizadas utilizando el método de fluorescencia. Las fracciones solubles fueron diluidas de manera tal de obtener una absorbancia a 380nm menor que 0,1 de manera de evitar el efecto de filtro interno. Los espectros de fluorescencia fueron obtenidos utilizando el espectrofluorímetro Shimadzu RF-540 (Shimadzu, Japón). La intensidad máxima obtenida del espectro de emisión (excitación a 380 nm) fue calculada siguiendo la siguiente ecuación (Matiacevich y Buera, 2006):

$$UF = \frac{UF_x \cdot f \cdot d - b}{m \cdot g} \quad (\text{ecuación III.7})$$

Donde UF_x fue la medida de intensidad de fluorescencia obtenido para cada fracción soluble; f , el factor de sensibilidad del instrumento; d , el factor de dilución; b , ordenada al origen de la curva de calibración realizada de sulfato de quinina en 0,1 N H_2SO_4 (BDH); m , la pendiente de la curva de calibración; y g , el peso de las semillas (g) utilizadas para la extracción de las proteínas. Todos los reactivos fueron de grado analítico.

III.2.6. Irradiación.

III.2.6.1. Irradiación directa de pigmentos.

- **Irradiación a 365 nm:** Los sistemas fueron irradiados utilizando una lámpara de luz negra PHILLIPS 160W, la cual posee un máximo de emisión a 365 ± 5 nm (lámpara). La potencia de la lámpara fue constante durante todo el tiempo de irradiación de los experimentos a $1,76 \pm 0,01$ mW/cm² (Melles Griot Broad Band Power/Energy meter 13PEM001).

- **Irradiación a 350 nm:** Los sistemas fueron irradiados utilizando un tubo de luz negra PHILLIPS TLD 18W/08, el cual posee un máximo de emisión a 350 ± 5 nm (tubo). Potencia constante de $0,28\pm 0,02$ mW/cm².
- **Irradiación con luz visible:**
 - a) Los sistemas fueron irradiados utilizando un proyector (Paximat Int., Braun, Nurnberg) con lámpara de tungsteno 150W (luz visible) (proyector). Potencia constante de $16,02\pm 0,02$ mW/cm².
 - b) Se utilizó en algunos experimentos como un control a los sistemas irradiados con un tubo de luz blanca PHILLIPS a una distancia de aproximadamente 1,5 mts de las muestras. Potencia constante de $1,0\pm 0,1$ mW/cm².
 - c) Se utilizó en algunos experimentos como un control a los sistemas irradiados una lamparita de luz blanca PHILLIPS a una distancia de aproximadamente 15 cm de las muestras. Potencia constante de $5,76\pm 0,02$ mW/cm².
- **Irradiación a 515 nm:** Los sistemas fueron irradiados utilizando el proyector de luz visible, el cual posee una lámpara de tungsteno de 150W a la cual se le acopló un filtro de corte amarillo ($\lambda > 515$ nm, OG-505, Jenger Glaswek Schott & Gen, Mainz). Potencia constante de $19,0\pm 1,4$ mW/cm².
- **Irradiación a 340 nm:** Los sistemas fueron irradiados utilizando el proyector de luz visible, el cual posee una lámpara de tungsteno de 150W a la cual se le acopló un filtro de banda de $\lambda = 340$ nm (Edmund Optics, EEUU). Potencia constante de $14,1\pm 1,8$ mW/cm².
- **Irradiación a 330 nm y 550 nm:** Los sistemas fueron irradiados a longitud de onda elegida (± 5 nm) con un espectrofluorímetro Shimadzu RF-540 (Shimadzu, Japón) equipado con una lámpara de xenón (150 W). La potencia de la lámpara fue constante durante todo el tiempo de irradiación de los experimentos, ya que no varió la intensidad de fluorescencia del actinómetro utilizado (sulfato de quinina a 330 nm).
- **Oscuridad:** Se utilizó como control de irradiación a sistemas sin irradiarlos mantenidos en oscuridad.

III.2.6.2. Irradiación en presencia del agente sensibilizante rosa de bengala.

a) Pigmentos de Maillard.

La Tabla III.2 esquematiza la composición, condiciones y mediciones realizadas para las muestras con los pigmentos de Maillard irradiadas a 515 nm y a 340 nm ó mantenidos en oscuridad como control de irradiación.

Tabla III.2.

Sistema Maillard ^a	Colorante ^b	Condiciones	Mediciones
Lis-Glu- <i>Buffer</i> 6 h a 55°C	Rosa de Bengala (RB)	- Atmósfera - Atmósfera + azida de sodio 50mM -Atmósfera de Nitrógeno	- Absorbancia ^d
Lis-Glu- <i>Buffer</i> 40 h a 55°C	RB	- Atmósfera - Atmósfera + azida de sodio 50mM -Atmósfera de Nitrógeno	
<i>Buffer</i>	RB		
Lis-Glu- <i>Buffer</i> 40 h a 55°C	---		

^a**Sistema Maillard:** lisina (0,086 M)-glucosa (0,28 M)-*buffer* pH 6,85, almacenados en baño de arena en estufa a 55°C±2°C. El sistema modelo fue diluido en el mismo *buffer* de tal manera que la absorbancia a 280 nm fuera aproximadamente 1,15 (espectrofotómetro H.P).

^b**Colorante:** rosa de bengala diluido en el mismo *buffer* tal que la absorbancia a 550 nm fuera aproximadamente 0,71.

^c**Azida de Sodio:** Se agregó al sistema azida de sodio (NaN₃) sólida de tal manera que al disolverse quede en una concentración 50 mM en el sistema. Esta concentración induce un 98% de desactivación de oxígeno singulete (¹O₂).

^d**Absorbancia:** Se realizó el espectro de absorbancia (promedio de 30 espectros) de las muestras durante la irradiación cada 2 minutos utilizando la configuración Time Acquisition del programa OOIBase32 del espectrofotómetro Ocean Optics.

b) Pigmentos polifenolicos de té.

La Tabla III.3 esquematiza la composición, condiciones y mediciones realizadas para las muestras con los polifenoles (H5)^a irradiadas a 515 nm y a 340 nm ó mantenidos en oscuridad como control de irradiación.

Tabla III.3.

Colorante ^b	Absorbancia ^c	Color visual	Irradiación	Condiciones	Mediciones
---	$A_{330} \leq 0,1$	inoloro	-330 nm -visible	Aire	Absorbancia ^c Fluorescencia ^d
---	$A_{445} = 0,225$	amarillento	-oscuridad		(exc330nm/em440nm)
RB	$A_{555} = 0,3-0,5$	rosado	550 nm	- Aire -Aire+NaN ₃ -Atm N ₂	Absorbancia ^c

^a**Sistema polifenoles H5:** los análisis se realizaron con las muestras extraídas del té comercial con agua (sección III.2.7.1)

^b**Colorante:** rosa de bengala diluido tal que la absorbancia a 550 nm estuviera entre 0,3 y 0,5.

^c**Absorbancia:** Se midió absorbancia a 445 nm en los sistemas irradiados a 330 nm en espectrofotómetro Shimadzu UV-Vis. Se realizó el espectro de absorbancia (promedio de 30 espectros) de las muestras durante la irradiación cada 1 minuto utilizando la configuración Time Acquisition del programa OOIBase32 del espectrofotómetro Ocean Optics.

^d**Fluorescencia:** Se midió la fluorescencia de emisión a 440 nm por excitación a 330 nm, utilizando un espectrofluorímetro Shimadzu RF-540.

III.2.6.3. Irradiación en presencia del agente sensibilizante riboflavina.

La Tabla III.4 esquematiza la composición, condiciones y mediciones realizadas para las muestras con los pigmentos de Maillard irradiadas a 340 nm y con luz visible (proyector) ó mantenidos en oscuridad como control de irradiación.

Tabla III.4.

Sistema Maillard ^a	Colorante ^b	Condiciones	Mediciones
Lis-Glu-Buffer 40 h a 55°C	Riboflavina (RF)	- Aire -Aire+50 mM NaN ₃	-Absorbancia ^c
Buffer	RB		

^a**Sistema Maillard:** lisina (0,086 M)-glucosa (0,28 M)-buffer pH 6,85, almacenados en baño de arena en estufa durante 40 h a 55°C±2°C. El sistema modelo fue diluido en el mismo *buffer* de tal manera que la absorbancia a 280 nm fuera aproximadamente 1,15 (espectrofotómetro H.P).

^b**Colorante:** riboflavina diluido en el mismo *buffer*

^c**Absorbancia:** Se realizó el espectro de absorbancia (promedio de 30 espectros) de las muestras durante la irradiación cada 2 minutos utilizando la configuración Time Acquisition del programa OOIBase32 del espectrofotómetro Ocean Optics.

III.2.7. Métodos de extracción.

III.2.7.1. Extracción de polifenoles de hojas de té.

Se realizó la extracción de polifenoles provenientes de hebras de té negro en relación 0,5:10 ó 1:10 g sólido: mL solvente utilizando tres solventes diferentes:

- **E:** Etanol/agua (70/30 p/p) (Lapornik y col., 2005)
- **A:** Acetona/agua (70/30 p/p) (Vrhovsek y col., 2004)
- **H:** Agua a 100°C (Sava y col., 2001).

Para cada relación se trabajó con 1,5 mL de solvente, se agitó con vortex Genie2 (Scientific Industries, Inc., N.Y.) durante una hora en oscuridad y a 25°C. Se centrifugó a 15000 g por 10 minutos utilizando una centrifuga Eppendorf 5424 (Hamburgo, Alemania). Se separó el sobrenadante con pipeta Pasteur. Se repitió la operación tres veces, juntando los sobrenadantes obtenidos. La extracción y el análisis del sistema se realizaron por cuadruplicado.

III.2.7.2. Extracción de lípidos de semillas.

Se obtuvo embriones de semillas de quinoa por remoción cuidadosa del perisperma, endosperma y cubierta utilizando una lupa estereoscópica (Kenko Co. Ltd., Tokio, Japón). Los lípidos de los embriones fueron removidos utilizando una solución 2:1 de cloroformo: methanol (Merck) (3 ml por gramo) (Williams y Leopold, 1989) durante 30 minutos en agitación (3 veces), separando y juntando los sobrenadantes (fracción lipídica) por centrifugación durante 10 minutos a 10000g (Centrifuga Eppendorf 5424, Hamburg, Alemania). El precipitado se secó por evaporación del solvente bajo campana (embriones deslipidados).

III.2.7.3. Extracción de proteínas.

III.2.7.3.A. Chenopodium quinoa.

Debido a que las propiedades de las proteínas pueden diferir por el pH y la fuerza iónica de la solución de extracción, es posible obtener fracciones de proteínas enriquecidas por extracción de las muestras con solventes específicos que remueven las proteínas de interés, mientras que otras proteínas quedan en el residuo del extracto. Las proteínas fueron fraccionadas utilizando una modificación del procedimiento tradicional de extracción secuencial de proteínas de Osborne (Osborne, 1924).

Las proteínas fueron extraídas de semillas con o sin tratamiento. Aproximadamente 30 mg de semillas molidas fueron incubadas con 1,5 mL de una serie secuencial de soluciones de extracción: 50 mM Tris-HCl (Sigma), 200 mM NaCl (Merck) *buffer* (pH 8.3) (Low Salt, LS) por 20 minutos en hielo (dos veces); 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl *buffer* (pH 8.3) (High Salt, HS) por 20 minutos en hielo; 70% alcohol etílico (Merck) por 30 minutos a 65 °C (Etanol, E); y 0,1 M NaOH (Merck) (Hydroxide, H) por 30 minutos en hielo. Un cóctel inhibidor de proteasas de uso general (Sigma) (0,6 µl) fue adicionado a las soluciones en cada paso de extracción. Los sobrenadantes obtenidos luego de 10 minutos de centrifugación a 15000g (Eppendorf 5424, Hamburg, Alemania) fueron guardados en freezer (-18°C) hasta su posterior análisis.

Las proteínas que se extraen en cada paso son (Aluko, 2004):

LS: albuminas; HS: globulinas; Etanol: prolaminas o gliadinas; H: glutelinas

III.2.7.3.B. *Araucaria angustifolia*.

Debido a que los compuestos fluorescentes se extraen en soluciones acuosas o etanólicas (Park y Kim, 1983; Ngammongkolrat, y col, 1985; Klim y Nagy, 1988) con el objetivo de poner a punto el método de extracción de proteínas en este sistema, se utilizaron dos solventes de extracción diferentes y la extracción se realizó antes y después de la irradiación:

Solvente LS (Low Salt): *Buffer* Tris-HCl 50 mM pH 8,3, 0,2 M NaCl., según el primer paso de extracción de proteínas solubles de Osborne (Osborne, 1924).

Solvente A: Alcohol etílico 65% v/v, según (Park y Kim, 1983).

Se realizó la extracción de proteínas por cuadruplicado utilizando los dos solventes mencionados anteriormente, LS y A. Se midió el color de los extractos líquidos obtenidos por absorbancia utilizando las ecuaciones III.2, III.3, III.4 para la obtención de los valores triestímulos y a partir de ellos determinar el índice de pardeamiento de cada muestra (*ecuación III.5*) y la fluorescencia (excitación a 380 nm, emisión a 422 nm) después de 1 hora de irradiación con la misma lámpara y del mismo sistema sin irradiar como control de tiempo cero de irradiación.

En la Figura III.5 se muestra los dispositivos de irradiación de las muestras, siendo el espesor en ambos el mismo (1 cm) y elegidos al azar. Un ejemplo de sistema durante la irradiación (lámpara, lente y dispositivo) de diferentes ángulos de vista se puede observar en las Figuras III.6 C, D y E.

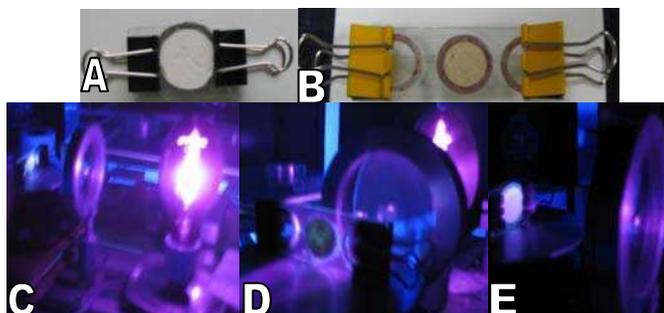


Figura III.6. A y B. Dispositivos de irradiación de muestras de año 2002 y 1995, respectivamente. C, D y E. Ejemplo de un sistema durante la irradiación (lámpara, lente y dispositivo) de diferentes ángulos de vista.

En la Figura III.7 A y B se observan los resultados obtenidos para color y fluorescencia, correspondientemente, ambos normalizados por la cantidad de muestra utilizada para realizar la extracción. Los datos presentados son los valores promedio obtenidos y el error fue calculado por las derivadas parciales de los desvíos estándares obtenidos en cada determinación (peso y medición). Se observó que la mayor extracción de pigmentos y de compuestos fluorescentes se obtuvo utilizando el solvente LS para todas las muestras analizadas y fue independiente de la irradiación. Por lo tanto, se eligió el solvente LS para la extracción de proteínas del prótalo de *Araucaria*.

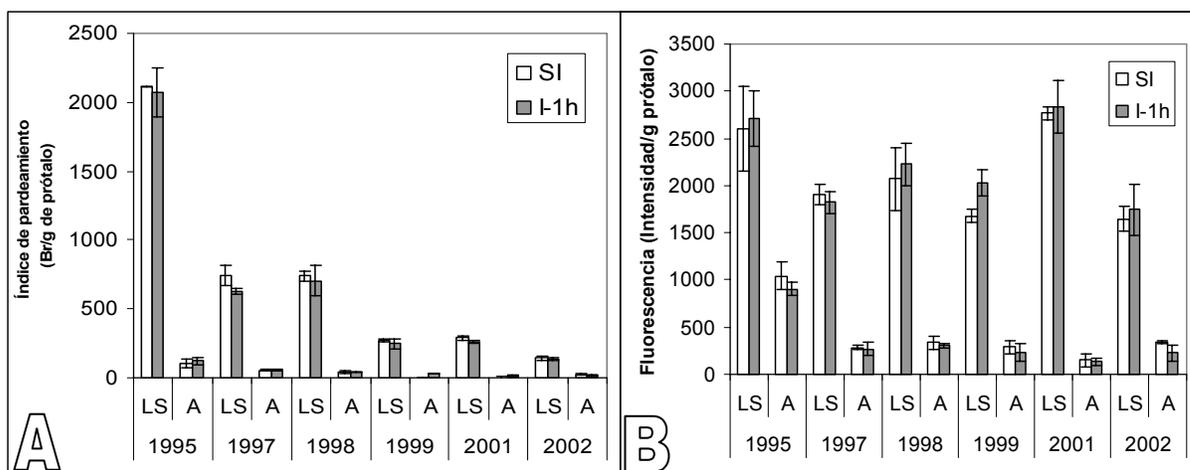


Figura III.7. Comparación del método de extracción en el pardeamiento y fluorescencia de proteínas solubles de prótalo. **A.** Índice de pardeamiento normalizado por gramo de prótalo utilizado para la extracción. **B.** Intensidad de fluorescencia calculada según ecuación III.7 (excitación a 380 nm, emisión a 422 nm). Solventes de extracción: LS: Tris-HCl pH 8,3 50 mM, 0,2 M NaCl; A: alcohol etílico 65% v/v.

III.2.8. Cuantificación de proteínas.

III.2.8.1. Método de Bradford.

Las proteínas solubles extraídas en las distintas fracciones de extracción de semillas (III.2.7.2.A ó B) se cuantificaron mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

La solución de trabajo se preparó mezclando 85% de agua destilada, 3,9% de 96% etanol (Merck), 7,7% de 85% ácido fosfórico (Anedra) y 3,4% de solución madre de Bradford (33% de 96% etanol, 67% de 85% ácido fosfórico y 0,12% m/v azul de Coomassie G-250 (Anedra).

Brevemente, el ensayo se realizó pipeteando la solución conteniendo la muestra de proteínas o de la solución patrón, adicionando agua destilada hasta completar el volumen final de 200 μ L. Se adicionó 2 mL de la solución de trabajo, se agitó y se realizó la medición de absorbancia a 595 nm después de los dos minutos de reacción y antes de 1 hora.

Distintas concentraciones (0-36 μ g/ml) de seroalbumina bovina (BSA) (Merck) se utilizaron como soluciones patrón para la obtención de la curva de calibración, la cual se realizó cada vez que se midió cuantificación de proteínas. Las mediciones de absorbancia se realizaron a 595 nm en un espectrofotómetro UV-VIS Shimadzu 1620 (Shimadzu, Japón). Las mediciones se realizaron por triplicado y los resultados se presentaron como el promedio \pm el desvío estándar. La concentración de proteínas se expresó en mg de BSA/100 g de semilla molida.

III.2.5.2. Método de micro-Kjeldahl.

La técnica de cuantificación de nitrógeno total ó micro-Kjeldahl (Kjeldahl, 1883) fue realizada con un analizador Kjeltex Auto 1030. (Tecator, Höganäs, Sweden) en semillas enteras (proteínas totales), la fracción de extractos solubles (proteínas solubles) y la fracción insoluble (proteínas insolubles). La fracción de extractos solubles fueron obtenidas como se describió anteriormente (III.2.7.2.A), excepto por el agregado del combinado inhibidor de proteasas (ya que agregaría nitrógeno no proveniente de las semillas) y combinando los cinco extractos por cuadruplicado (LS, HS, E, H), con el objetivo de obtener el total de proteína soluble. La fracción insoluble fue obtenida a partir de los correspondientes precipitados obtenidos luego de la extracción de solubles, por cuadruplicado.

El contenido de proteínas fue estimado por la siguiente ecuación III.8:

$$P = \frac{(V_{HCl} - V_{HCl-blank}) \times f \times N_{HCl} \times 10^{-3} \frac{l}{ml} \times 14g \times 6,25}{m} \times 100 \quad (\text{ecuación III.8})$$

donde P es el contenido de proteínas (g/ 100 g semillas); m es la masa de muestra de semilla (g); V_{HCl} , es el volumen del ácido estándar (mL) (ácido clorhídrico), $V_{HCl-blank}$, es el volumen del ácido estándar necesario para la titulación del reactivo blanco (mL); N_{HCl} , es la normalidad del ácido estándar; y f, factor de normalidad del ácido estándar; 6,25 es el factor utilizado para transformar los valores de nitrógeno orgánico total en valores de proteínas y 14 g es la masa molar del nitrógeno.

III.2.6. Análisis de la preservación de semillas.

III.2.6.1. Análisis de la germinación.

El poder germinativo de las semillas se analizó por germinación de las mismas. Tres replicados de 50 semillas de las distintas variedades de *Chenopodium quinoa* utilizadas en este trabajo fueron pre-incubados a 100% de humedad relativa (H.R.) a 25°C durante 4 h, de manera de evitar el daño por imbibición durante la germinación (Bray, 1995). La superficie de las semillas fue desinfectada con una solución de hipoclorito de sodio (5,5g Cl/l) durante 10 min. Luego se lavaron con agua destilada y se pusieron a germinar sobre papel de filtro mojado con agua destilada en cajas de Petri a 24±1°C por 72 h.

La germinación fue evaluada según reglas ISTA (2004), en la cual:

- a) Se consideran semillas no germinadas aquellas que son:
 - semillas duras por no haber absorbido agua
 - semillas frescas que se embeben pero tienen el proceso de germinación bloqueado
 - semillas muertas, usualmente blandas, enmohecidas o sin signos de desarrollo de la plántula.
- b) Se consideran semillas germinadas normales o anormales a aquellas que al tiempo de evaluación posean estructura radicularia mayor a 1 cm y/o demás estructuras de la plántula.

III.2.6.2. Análisis bioquímico de viabilidad.

El análisis de tetrazolio es un medio rápido para determinar el potencial de germinación de una muestra de semilla. Este análisis se basa sobre el principio que todo tejido vivo contiene enzimas deshidrogenasas activas que catalizan reducciones químicas. En presencia de enzimas

deshidrogenadas la sal incolora de tetrazolio es transformada en una sustancia roja y no difusible denominada formazán.

La viabilidad de las semillas fue analizada por análisis de tetrazolio sólo en las semillas almacenadas, debido a que no fueron observadas semillas no germinadas en los lotes de semillas frescas.

Siguiendo las reglas ISTA (2004) para el análisis de tetrazolio de cereales, las semillas fueron cortadas longitudinalmente a través del centro del embrión para exponer las hojas embrionarias y la raíz. Cada mitad fue embebida en una solución al 1% 2,3,5- cloruro de trifeníl-2H-tetrazolio (Merck) en *buffer* fosfato pH 7 y fueron incubados en oscuridad a 25°C y evaluados a las 24 h en viables (coloración roja del tejido embrionario) o no viables (tejido sin coloración).

III.2.10. Determinación de fenoles totales.

Se realizó el micro-método Folin Ciocalteau para la determinación del contenido de polifenoles totales según fue descrito por Slinkard y Singleton (1977). El protocolo utilizado se describe en la siguiente tabla (Tabla III.5):

Tabla III.5.

	Acido gálico	Muestra	Agua destilada	Solución Folin		Medición
Curva de calibración	20 μ L (0-500 mg/mL)	---	1,58 mL	100 μ L	Agitación. 40°C 30min	Abs. a 765 nm
Muestras extraídas	----	2 μ L	1,598 mL	100 μ L		

Para cada punto de la curva de calibración o de las muestras extraídas, se pipeteó 20 μ L de ácido gálico ó 2 μ L de muestra extraída + 18 μ L de agua destilada, respectivamente, se adicionó 1,58 mL de agua destilada y luego 100 μ L del reactivo Folin (Sigma). Se agitó bien y se colocó a 40°C durante 30 minutos antes de leer la absorbancia de cada solución a 765 nm. La curva de calibración fue realizada por cuadruplicado con ácido gálico (Merck) en el rango de concentración de 0 a 500 mg/mL de ácido gálico (Figura III.8). Los resultados son reportados como GAE, ácido gálico equivalente, debido a que los polifenoles provenientes del té contiene cantidades significativas de catequinas provenientes del gálico (Wang y col., 2000).

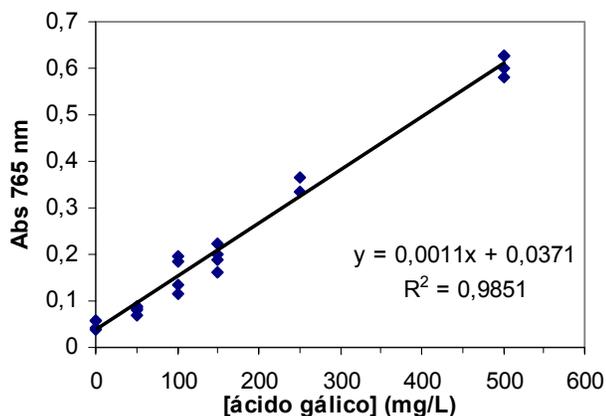


Figura III.8. Curva de calibración de ácido gálico para la determinación de contenido de polifenoles por el micro método de Folin-Ciocalteu. En el inserto se muestra la ecuación y el R^2 que indica el buen ajuste de los datos experimentales a la recta obtenida a partir de regresión lineal.

III.2.11. Selección de condiciones para la obtención de compuestos polifenólicos.

Con el objetivo de la elección de las mejores condiciones de extracción para la obtención de compuestos polifenólicos, se obtuvieron los extractos de té utilizando los distintos solvente (**E**: etanol/agua; **H**: agua; **A**: acetona/agua) en concentraciones de sólidos de té de 0,5 y 1 g/10 mL (Figura III.9). Para cada solvente se observó saturación visual del color marrón rojizo y una mayor extracción de pigmentos con la concentración de 1 g/10 mL (Figura III.9.B) para todos los solventes. Para los distintos extractos en ambas concentraciones (Figura III.9.A) se corroboró que no hubo diferencias significativas de índice de pardeamiento entre los distintos solventes, pero sí entre las concentraciones utilizadas. El alto valor observado del índice de pardeamiento y el hecho de que no existan diferencias entre los extractos se debió a la saturación del color. Por tal motivo, para un análisis cuantitativo, se analizó la absorbancia a 445 nm como medida de la concentración de los pigmentos extraídos (Figura III.10).

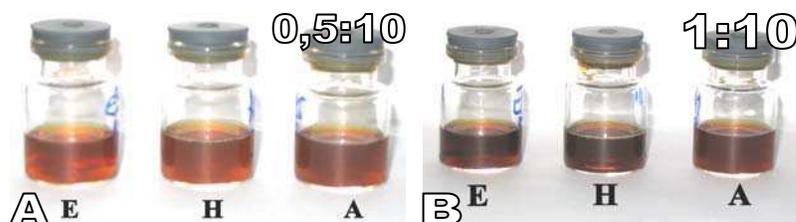


Figura III.9. Fotografías de los extractos obtenidos con diferentes solventes a partir de té. Solventes utilizados: E: etanol/agua (70/30% p/p), 25°C; H: Agua 100°C; A: acetona/agua (70/30% p/p), 25°C. Las relaciones de concentración sólido:solvente (g sólido: mL solvente) fueron 0.5:10 (Figura III.8.A) y 1:10 (Figura III.8.B).

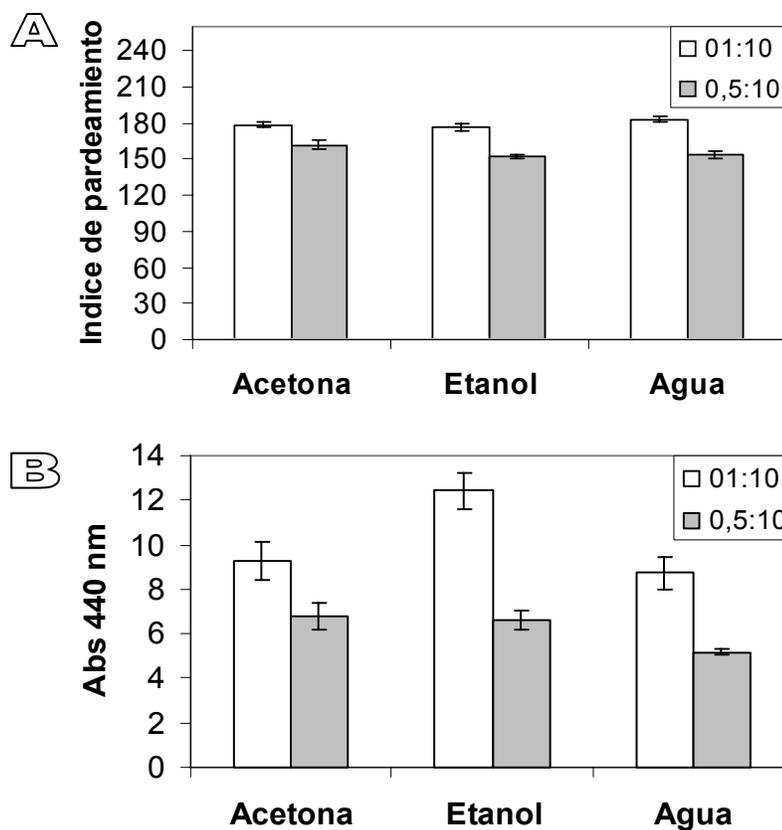


Figura III.10. Caracterización del color de los extractos obtenidos a partir de té con diferentes solventes. Solventes utilizados: etanol: etanol/agua (70/30% p/p), 25°C; agua: agua 100°C; acetona: acetona/agua (70/30% p/p), 25°C. Las relaciones de concentración sólido:solvente (g sólido: ml solvente) fueron 0,5:10 y 1:10. **(A)** Índice de pardeamiento medido según ecuación III.5. **(B)** Absorbancia a 440 nm (multiplicado por la dilución realizada).

En la Figura III.11 se representaron las concentraciones de polifenoles obtenidos con los diferentes solventes de extracción. La mayor concentración de polifenoles se obtuvo con diferencias significativas ($p < 0,05$) con la extracción de agua a 100°C. El análisis estadístico se realizó por análisis de varianza de un factor utilizando Microsoft Excel.

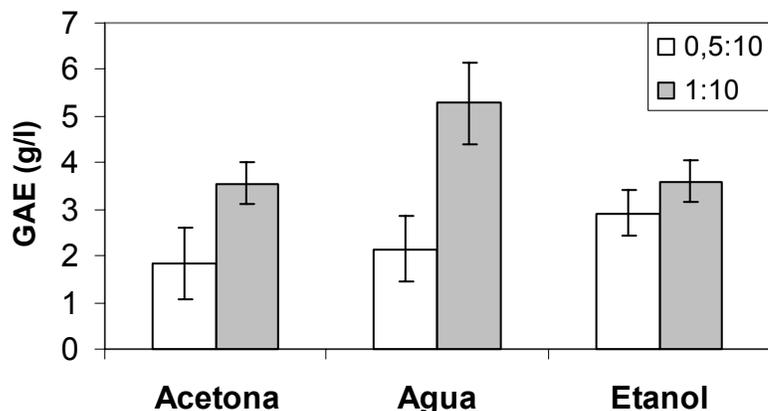


Figura III.11. Concentración de polifenoles totales según método Folin-Cicoulteau, expresados como GAE, equivalentes de ácido gálico, para los distintos extractos obtenidos con diferentes solventes. Solventes utilizados: A: acetona/agua (70/30% p/p), 25°C; H: Agua 100°C; E: etanol/agua (70/30% p/p), 25°C. Las relaciones de concentración sólido:solvente (g sólido: ml solvente) fueron 0.5:10 y 1:10.

A partir de las Figuras III.10 y III.11 se pudo observar que la utilización de etanol como solvente produjo mayor extracción de pigmentos, sin embargo, en la extracción con agua se obtuvo mayor cantidad de polifenoles totales. Esto es consecuencia de que todos los polifenoles no son pigmentados. Por lo tanto, en función de los resultados obtenidos en base al color y la concentración de polifenoles se eligió el sistema de polifenoles extraídos con agua a 100°C, que a su vez es el tipo de extracción utilizado habitualmente para el consumo humano, por lo que los estudios en base a estos polifenoles extraídos podrían llegar a tener importancia tecnológica.

III.2.12. Fotólisis de destello (*Laser Flash Photolysis*).

El espectro de absorción de transientes del estado triplete de los compuestos de Maillard en soluciones saturadas con N₂ (por burbujeo con N₂ durante 20 minutos) se midió con un sistema Luzchem m-LFP 112. El esquema y una fotografía del sistema utilizado se muestran en la Figura III.12.A y III.12.B, respectivamente.

El sistema Luzchem m-LFP incluye la lámpara de Xenón libre de ozono, el monocromador (MC), el fotomultiplicador (PM), el osciloscopio y la PC. Como fuente de excitación posee un láser Continuum Minilite II Nd-YAG, el cual genera pulsos a 355 nm ó 532 nm, con una duración de 10 ns/pulso (*Laser Flash Photolysis*). El ancho de emisión del láser fue ajustado con una rendija o *slit* (0,5 mm alto x 0,5 mm ancho). La máxima energía del láser después de la rendija fue <120 μJ/pulso (15Hz), medido con un medidor de energía piroeléctrico Melles-Griot

modelo 13PEM001. La temperatura fue $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. El tiempo de vida de los estados transientes (τ) fue calculada por el programa Origin v.7 utilizando cinéticas de primer orden.

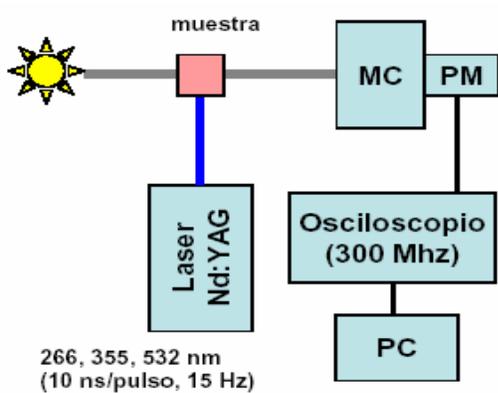


Figura III.12. (A) Esquema del sistema Laser Flash Photolysis: ☀: lámpara de xenón (Xe), MC: monocromador, PM: fotomultiplicador, PC: computadora. (B) Fotografía indicando las distintas partes del sistema.

III.2.13. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Se utilizó un calorímetro diferencial de barrido (DSC) Mettler 822 con software para análisis térmico Star^e v6.0. Una fotografía del equipamiento utilizado se muestra en la Figura III.13. El barrido de calentamiento se realizó en el rango desde -140°C a 120°C . Para evitar fenómenos de distorsión observados al comienzo y final del calentamiento o enfriamiento, las determinaciones se realizaron en todos los casos comenzando el barrido por lo menos 30°C por debajo de la temperatura esperada para el inicio de una dada transición y finalizando por lo menos a una temperatura 10°C mayor. El enfriamiento del equipo se obtiene por utilización de nitrógeno líquido a una presión en el tanque de 150 kPa.

El equipo se calibró con indio (punto de fusión $156,6^\circ\text{C}$), plomo (punto de fusión $327,5^\circ\text{C}$) y zinc (punto de fusión $419,6^\circ\text{C}$). Las muestras se colocaron en cápsulas ó crisoles de aluminio (Mettler, 40 μl) herméticamente cerradas, se pesaron para determinar la masa (7-15 mg/cápsula según el tipo de material) y se midieron utilizando como referencia una cápsula de aluminio cerrada pinchada y vacía en todas las mediciones. Una corriente continua de nitrógeno gaseoso de 200 mL/min medido con un caudalímetro (Bruno Shillig, Argentina) fue utilizada para evitar condensación de agua sobre las cápsulas y sobre el sensor. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado y se informó el valor promedio.

Las temperaturas de transición vítrea (T_g) y las transiciones entálpicas (cristalizaciones, fusiones, etc.) de los sistemas estudiados se determinaron en forma dinámica durante el calentamiento, utilizando una velocidad de calentamiento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ a partir de las discontinuidades detectadas en las curvas de flujo de calor versus temperatura. La T_g se consideró como la temperatura a la cual comienza el cambio en el calor específico (valor “onset”) que se detecta en el termograma como un corrimiento endotérmico en la línea de base. Los valores de entalpía de las transiciones entálpicas (ΔH) se obtuvieron calculando el área de la transición exotérmica o endotérmica respectivamente, en relación a la masa de muestra (J/g).



Figura III.13. Fotografía del equipo de calorimetría diferencial de barrido (DSC).

III.2.14. Resonancia nuclear magnética (RMN).

Para distinguir poblaciones de agua con distinta movilidad se empleó resonancia magnética nuclear resuelta en el tiempo ($^1\text{H-NMR}$). Se utilizó un equipo Bruker Minispec mq20 (20 MHz) (Figura III.14).

Se analizaron muestras de 3 mL de cada sistema (glicina-glucosa, glicina-trehalosa ó glicina-sacarosa) en *buffer* fosfato pH 5, líquidas o liofilizadas equilibradas a distintas humedades (en el rango 11-97% HR), tratadas a distintos tiempos de almacenamiento a $70\pm 1^\circ\text{C}$. Se midió el tiempo de relajación transversal spin-spin (T_2) (Figura I.8) utilizando el método de Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) (Meiboom and Gill, 1958).

Previamente a las mediciones las muestras se equilibraron a 25°C en un baño de agua termostático (Haake PhoenixII C35P, Alemania). Los datos obtenidos fueron de un promedio de

cuatro adquisiciones de 256 puntos, con ciclado de fases, usando una ganancia de 68 y un tiempo de interpulso (τ) de 0,5. Se registraron suficientes ecos de manera que la línea de base fuera cero y que el T_2 fuera determinado por el envolvente del decaimiento del eco utilizando el programa exponencial provisto por el proveedor del equipo.



Figura III.14. Equipo de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Minispec 20 (Bruker) y PC (H.P.).

III.2.15. Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida de método discontinuo en condiciones nativas (PAGE) según el método de Ornstein-Davis (Ornstein, 1964) y en condiciones desnaturizantes con dodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE) según el método de Laemmli (Laemmli, 1970), siguiendo las instrucciones descriptas en el manual del MiniProtean3 Cell (BioRad Laboratories). Se utilizaron las siguientes condiciones:

- Espesor del gel: 0,75 mm
- volumen de siembra: 20 μ L
- Gel separador (*running*): 10-15% acrilamida
- Gel apilamiento (*stacking*): 4% acrilamida
- Relación %T %C: 30% T, 2,67% C.
- Corriente constante: 200 mA
- Equipo: Mini-Protean 3 Cell (BioRad, USA), utilizando celda doble, por lo que se realizan dos geles idénticos por corrida.

-Preparación de muestras: Las muestras de proteínas solubles de cada fracción extraída de semillas fueron obtenidas luego de la precipitación con ácido tricloroacético (TCA)-acetona. Brevemente, 2 volúmenes de solución fría de 13,3% TCA (Sigma) y 0,093% de 2-mercaptoetanol en acetona (Merck) fueron adicionados a cada extracto e incubados toda la noche a -20°C. Las muestras fueron centrifugadas por 15 minutos a 4000g a 25°C y los precipitados fueron resuspendidos en acetona fría conteniendo 0,07% 2-mercaptoetanol. Luego, se centrifugaron nuevamente (15 minutos a 4,000 g a 25°C) y los precipitados secados y resuspendidos en solución de siembra en condiciones desnaturizantes conteniendo 2% (w/v) de dodecilsulfato de sodio (SDS) (Merck), 10% glicerol (Sigma), 5% 2-mercaptoetanol y 0,01 mg/mL azul de bromofenol (Sigma) en una solución 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8). La solución de siembra para condiciones nativas es igual a la descripta para condiciones desnaturizantes excepto por la presencia de SDS y 2-mercaptoetanol.

-Controles: El marcador de peso molecular (Broad range Catalog N° 161-0317, Biorad) (1 µL) e invertasa (1%v/v) (Solvay SA, Buenos Aires, Argentina) (como control de detección de glicoproteínas) fueron resuspendidos en la solución de siembra. Sólo en condiciones desnaturizantes, las muestras fueron calentadas previamente a la siembra a 99°C por 6 minutos.

-Tinción: Luego de la corrida electroforética, los 2 geles fueron teñidos con dos metodologías diferentes, uno se teñió con el método de azul de Coomassie, el cual tiñe de azul todas las proteínas presentes y el otro gel fue teñido con el método de PAS, el cual tiñe glicoproteínas presentes de color rosado. Para la tinción con Coomassie, en primer lugar, las proteínas fueron fijadas al gel con una solución metanol/ác. acético/agua (20%. 10%/ , v/v/v) durante 3 días, luego teñidos por 1 hora con 0,125% p/v Coomassie Blue R-250 (Sigma) en una mezcla metanol/ác. acético/agua (50%/10%/ , v/v/v) (Merck) y finalmente desteñidos con una solución metanol/ác. acético/agua (20%. 10%/ , v/v/v). Para la tinción de PAS, el gel fue teñido siguiendo el protocolo de reactivo de PAS (Segrest y Jackson, 1972), con las siguientes modificaciones:

a) La fijación de las glicoproteínas se realizó por 5 días en oscuridad a 4°C en solución fijadora de etanol/acético/agua (40%/5%/55%, v/v/v).

b) Se lavó durante 1 minuto con agua destilada y se colocó durante 1 hora en solución de 1% ácido periódico en 5% ácido acético glacial.

c) Se lavó durante 1 minuto con agua destilada y se colocó durante 1 hora en solución de 0,5% metabisulfito de sodio en 5% ácido acético glacial.

d) Se realizó otro lavado durante 1 minuto con agua destilada y se colocó en el reactivo de Schiff durante 1 día a 4°C en oscuridad.

e) Se destiñó con la misma solución desteñidora utilizada en la tinción de Coomassie.

Los valores de peso molecular para cada una de las bandas proteicas obtenidas se obtuvieron realizando el cálculo de Rf utilizando el marcador de peso molecular (Figura III.15).

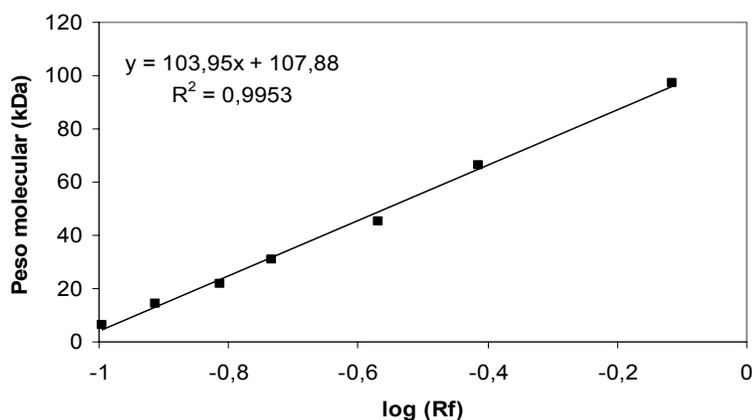


Figura III.15. Curva de calibración de Rf utilizando el marcador de peso molecular.

III.2.16. Registro de imágenes.

a) Para registrar la coloración obtenida en cada uno de los experimentos realizados, se tomaron fotografías digitales de un tamaño de imagen de 1600 x 1200 con una cámara digital Fujifilm Fine Pix 2300 (3,2 Mpíxeles).

b) El procesamiento y análisis de las imágenes obtenidas digitalmente se realizó utilizando el programa Photoshop v7.0 (Adobe Systems, USA). El sistema de visión computarizada adquirió los colores como señales RGB, y para asegurar la correcta reproducción del color se convirtieron en coordenadas de color del sistema CIELab (de la escala Hunter), con parámetros del iluminante D65 y un ángulo del observador de 2°. A partir de las coordenadas L, a y b de Hunter se obtuvieron las coordenadas X, Y, Z y a partir de éstas el índice de pardeamiento a través de la ecuación III.5.

c) Se realizaron estudios sobre la presencia de cristales en las soluciones modelo sólidas utilizando una lupa óptica con filtros polarizadores (Kenko Co. Ltd., Tokio, Japón), con aumentos entre 1 y 10X (Unitron Inc., N.Y., U.S.A), la cual se encontraba acoplada a la cámara digital. Bajo la luz polarizada y empleando un analizador, los cristales se distinguen por provocar la difracción de la luz y se perciben brillantes y coloridos sobre un fondo oscuro.

III.2.16. Tratamiento de datos.

El análisis de los datos experimentales y regresiones presentados se realizó mediante el empleo del Programa Microcal Origin v.6, Microsoft Excel o Gradpad Prism v.3 a través de correlación lineal o no lineal, ó análisis de varianza informado en cada caso. El análisis estadístico fue realizado por el programa STATISTICA v6 utilizando un T-test de muestras independientes para la comparación entre cada tiempo.

IV. Resultados

IV. Capítulo 1.

*Generación y caracterización de compuestos
fluorescentes y pigmentos pardos.*

IV.1. Generación de compuestos fluorescentes y pigmentos pardos

Se trabajó con sistemas modelo líquidos compuestos por lisina, glicina o proteína de suero lácteo con el agregado de glucosa en *buffer* de pH 6,84. El almacenamiento se realizó durante diferentes tiempos a temperaturas de 55, 70 ó 120°C. Los sistemas modelo utilizados fueron elegidos en base a estudios previos, que mostraron que en dichas condiciones se encuentra favorecido el desarrollo tanto de compuestos fluorescentes como de pigmentos provenientes de la reacción de Maillard (Matiacevich y Buera, 2006).

En la Figura 1.1 puede visualizarse cualitativamente que la variación del color obtenido durante el almacenamiento en estufa con circulación forzada de aire a $70\pm 1^\circ\text{C}$ en función del tiempo de reacción fueron: incoloro \rightarrow amarillo \rightarrow dorado \rightarrow canela \rightarrow marrón rojizo.



Figura 1.1. Fotografías digitales del sistema modelo líquido de lisina (0,086 M)-glucosa (0,28 M) en *buffer* fosfato 0,1 M pH 6,84, almacenado en estufa a $70\pm 1^\circ\text{C}$ durante diferentes tiempos (0-6 h).

Para obtener una medida cuantitativa del color obtenido luego del tratamiento, se midió la absorbancia a las 4 longitudes de onda (445, 495, 550 y 625 nm), tal como fue descrito para otros sistemas en los que se generan tonalidades parecidas a las observadas, como vino blanco o miel (Buera y Resnik, 1990; Pereira Gonzales y col., 1999). Mediante las ecuaciones III.2, III.3, III.4 (sección Materiales y Métodos) se obtuvieron los valores triestímulo X, Y, Z, necesarios para obtener las coordenadas cromáticas x e y, a partir de las ecuaciones I.3 e I.4, respectivamente (sección Introducción). Las coordenadas cromáticas se representaron en un diagrama de color CIE 1931, según se observa en la Figura 1.2. La flecha en esta figura indica que los colores sucesivos obtenidos en las muestras a medida que aumentó el tiempo de almacenamiento describieron una trayectoria cromática similar a la de otros sistemas en los que se desarrolló la reacción de Maillard (Buera y Resnik, 1990; Matiacevich y Buera, 2006). Estos resultados se observaron en todos los sistemas analizados a las distintas temperaturas, variando entre ellos únicamente la velocidad de la reacción.

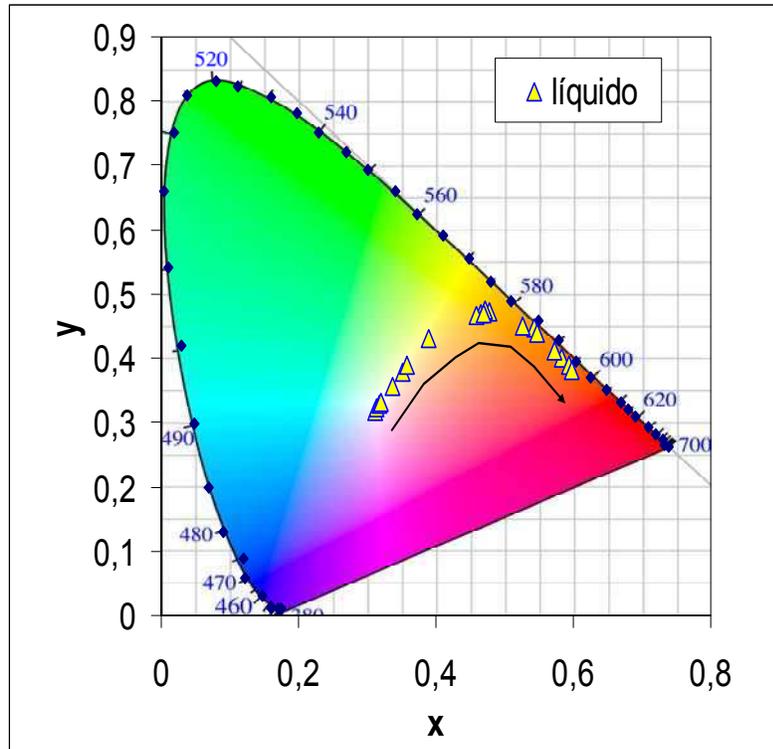


Figura 1.2. Diagrama CIE 1931. Ubicación de las coordenadas cromáticas del sistema líquido en el diagrama CIE durante el tiempo almacenamiento. La flecha inserta indica la dirección del aumento del tiempo durante la reacción de Maillard.

Los sistemas de proteínas de suero lácteo en presencia de glucosa describieron una curva cromática en función del tiempo de almacenamiento como la mostrada en la Figura 1.2. Sin embargo, la cinética de la reacción fue diez veces más lenta que en el sistema modelo de aminoácido-glucosa analizado, debido a la menor disponibilidad y concentración de grupos amino libres en las proteínas.

Los espectros de absorbancia a los distintos tiempos se observan en la Figura 1.3.A y la absorbancia a la longitud de onda de máxima de absorción (300 nm) se muestra en la Figura 1.3.B. Al aumentar el tiempo de almacenamiento se obtuvo un aumento significativo de la absorbancia correspondiente al máximo sin modificación del espectro de absorción y también aumentó la absorbancia en el rango de los 400-500 nm, debido a la aparición de pigmentos pardos. La Figura 1.3 muestra el sistema almacenado a 55°C, y los mismos resultados fueron obtenidos a las otras temperaturas, variando únicamente la velocidad de la reacción.

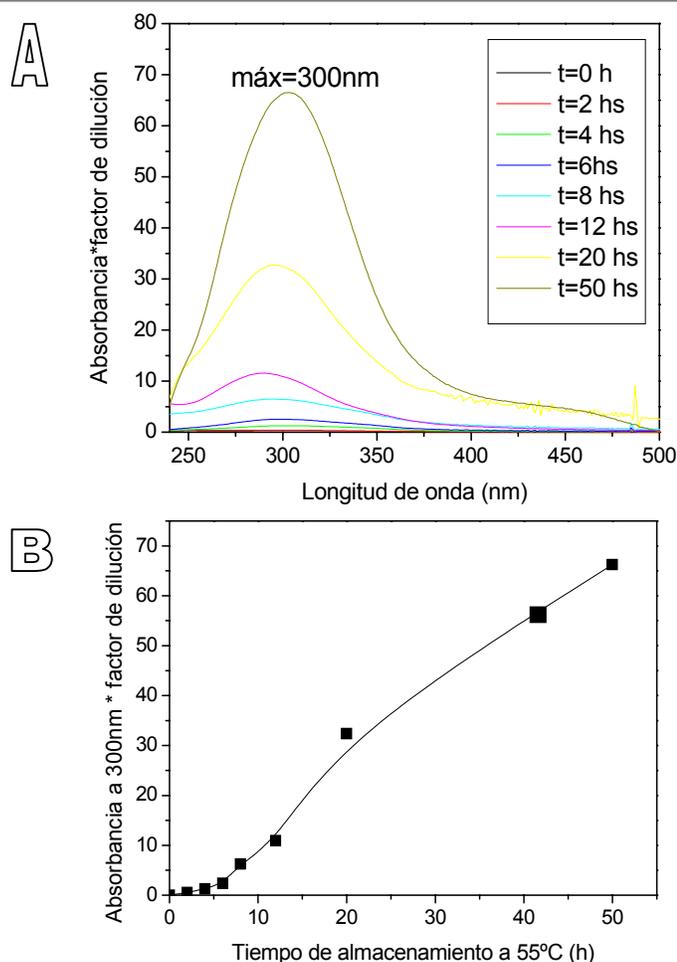


Figura 1.3. Absorbancia en función del tiempo de almacenamiento a 55°C del sistema aminoácido-glucosa. **(A)** Espectros de absorbancia multiplicado por el factor de dilución realizado. **(B)** Absorbancia a la longitud de onda máxima (300 nm).

Es conocido que el aumento de la temperatura tiene un efecto acelerador sobre la formación de color, pero las figuras anteriores muestran que no varían las características espectrales y cromáticas de los pigmentos generados a las distintas temperaturas. Sin embargo, no hay estudios que caractericen los compuestos fluorescentes provenientes de la reacción de Maillard.

Para realizar las mediciones de fluorescencia, las muestras se diluyeron en todos los casos de manera que a la longitud de onda de excitación (370-380 nm) la absorbancia fuera menor que 0,1 para evitar el efecto de filtro interno producido por los pigmentos generados por la reacción. La comparación de los espectros de fluorescencia de excitación y emisión (corregidos por la dilución realizada) se muestran en la Figura 1.4 para los sistemas almacenados a 55°C y en la Figura 1.5 para dos concentraciones diferentes del sistema

modelo (lisina:glucosa 0,1 M: 0,28 M y 0,01 M: 0,028 M, respectivamente) almacenados a 120°C.

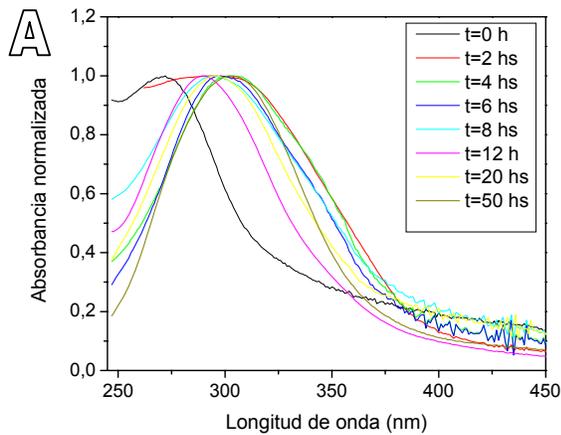
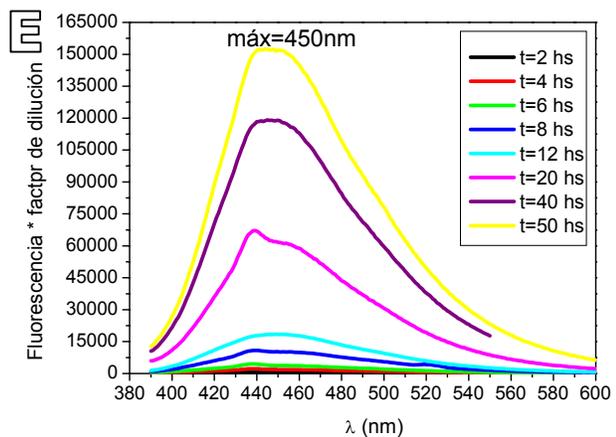
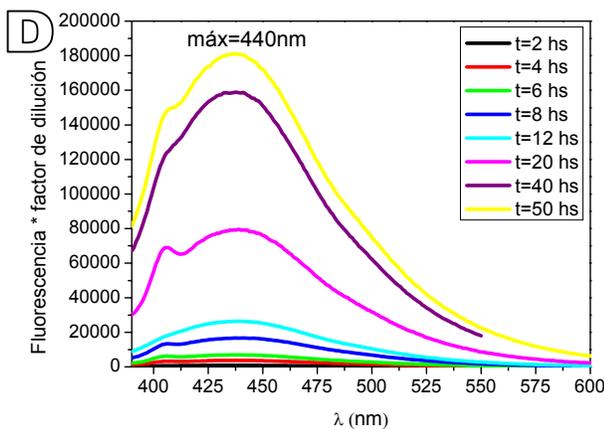
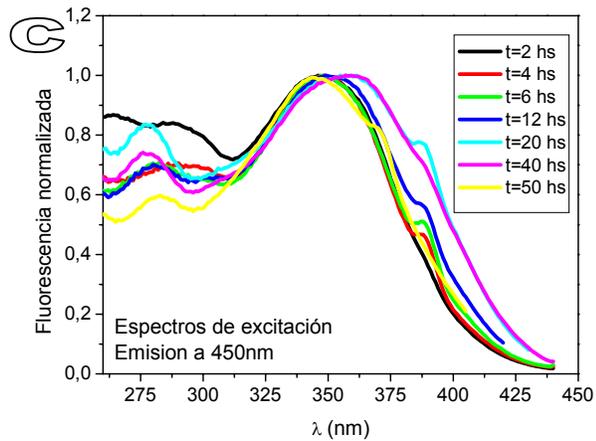
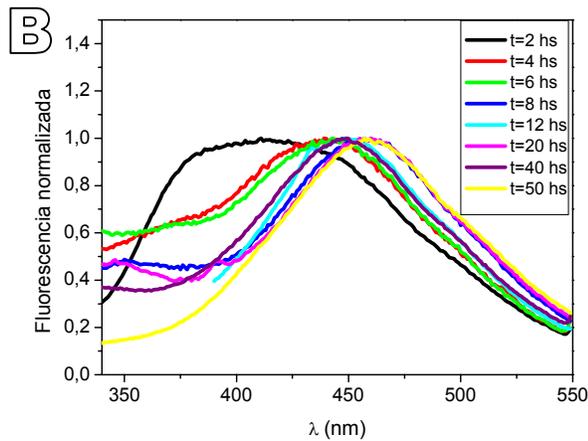
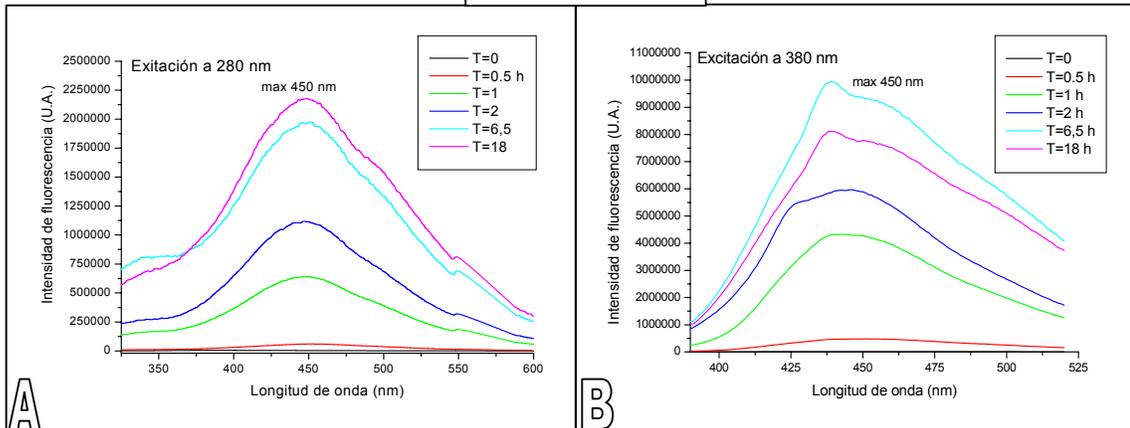


Figura 1.4. Comportamiento de los compuestos fluorescentes del sistema modelo aminoácido-glucosa en función del tiempo de almacenamiento. A Espectros de absorbancia normalizada. **B.** Espectros de emisión (excitación 280 nm) **C.** Espectros de excitación (medición de la emisión a 450 nm). **D, E.** Espectros de emisión, excitando a 380 nm ó 355 nm, respectivamente.



Lisina: Glucosa
0,1M: 0,28M



Lisina: Glucosa
0,01M: 0,028M

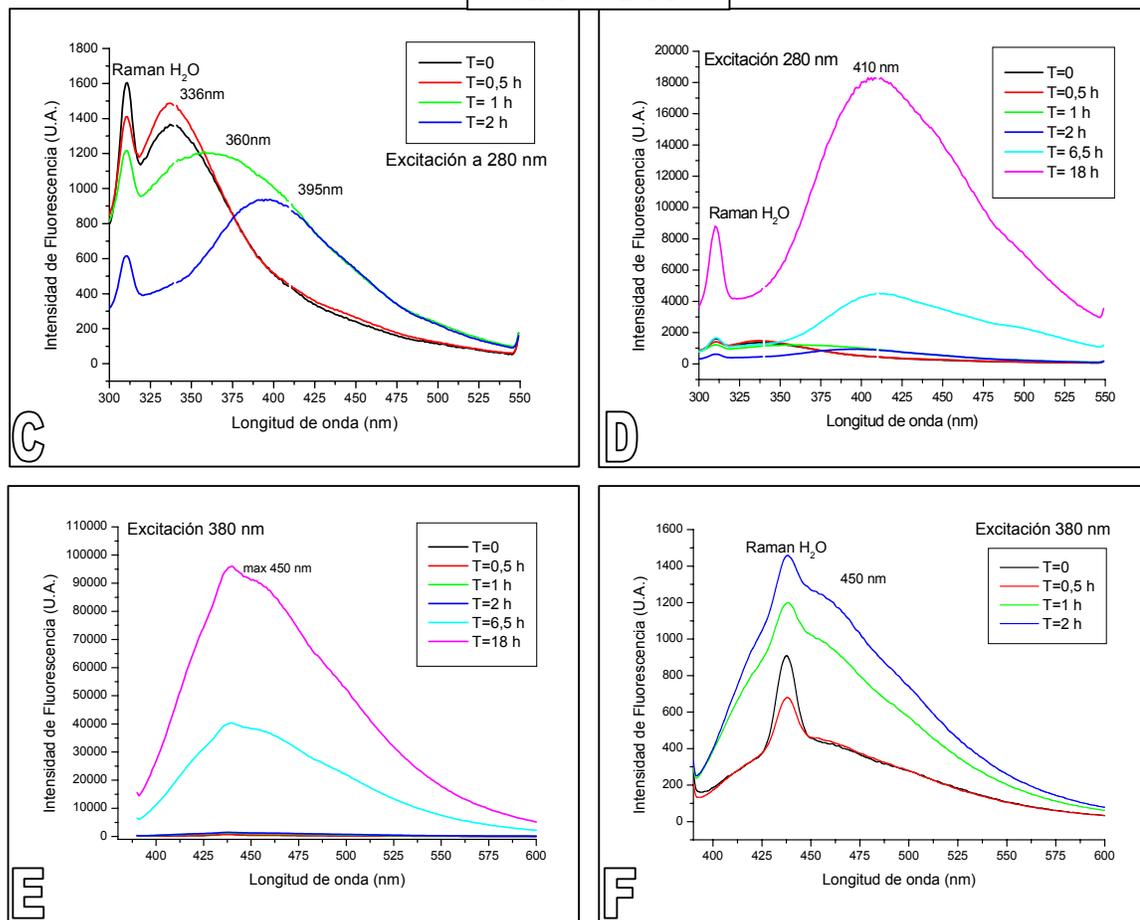


Figura 1.5. Espectros de emisión de fluorescencia para distintas concentraciones de aminoácido-glucosa a distintos tiempos de almacenamiento a 120°C. Los espectros fueron corregidos por la dilución realizada y por la absorbancia correspondiente a cada longitud de onda en los espectros de emisión.

Si bien no se observó variación del espectro de absorbancia con el tiempo (Figura 1.3), cuando se realizó la normalización de los espectros, se apreció un leve corrimiento de la longitud de onda de máxima absorción (de 270 nm a 303 nm) al aumentar el tiempo de almacenamiento (Figura 1.4.A).

Los resultados observados en las Figuras 1.4 y 1.5 para ambas temperaturas mostraron que la intensidad de fluorescencia aumentó al aumentar el tiempo de almacenamiento. Tanto la emisión como la excitación a tiempo inicial (sin almacenamiento) son despreciables frente a la intensidad de fluorescencia obtenida al aumentar el tiempo de tratamiento.

En ambas temperaturas, y a las distintas concentraciones la máxima longitud de onda de emisión fue 450 nm cuando se excitó a 380 nm. A baja concentración de reactivos la intensidad obtenida fue menor y la emisión Raman del agua interfirió en algunos casos (ver Figura 1.5.F). Los espectros de excitación analizados en las muestras tratadas a 55°C (Figura 1.4.C) mostraron que por lo menos dos componentes mayoritarios son responsables de la emisión de fluorescencia a 450 nm. Sin embargo, en muestras de ambas temperaturas, la excitación a 280 nm produjo principalmente un corrimiento del pico máximo de fluorescencia con el tiempo (de 336 a 450 nm), sin aumentar su intensidad y luego, comenzó a aumentar la intensidad de fluorescencia a 450 nm con el tiempo, sin desplazarse la posición del máximo. Este resultado estaría indicando que hay una modificación de las características espectrales del compuesto a lo largo del tiempo a ambas temperaturas.

Se observó también una variación del máximo de emisión al excitar a diferentes longitudes de onda, que es indicativo de la presencia de diferentes compuestos fluorescentes.

A mayor concentración de reactivos, el tiempo de inducción para la aparición de compuestos fluorescentes fue menor, y la intensidad de fluorescencia obtenida al mismo tiempo fue mayor (Figura 1.6). Debido a que los espectros obtenidos a las diferentes concentraciones son similares, esto indica que se generaron mayor cantidad de compuestos y no se generaron compuestos fluorescentes diferentes. La caracterización de compuestos fluorescentes se realizará con mayor detalle en la siguiente sección (IV.1.2).

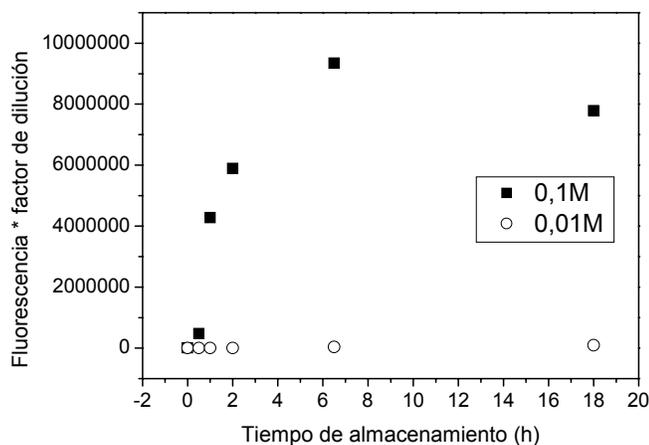


Figura 1.6. Comparación del desarrollo de fluorescencia del sistema lisina-glucosa-*buffer* a 120°C a dos concentraciones diferentes de reactivos: 0,1 M lisina-0, 28 M glucosa; 0,01M lisina-0,028 M glucosa

IV.1.2. Caracterización de compuestos fluorescentes.

IV.1.2.1. Espectros de emisión y excitación.

a) Patrón: sulfato de quinina.

Para la determinación de un importante parámetro de fluorescencia como es el rendimiento cuántico (relación entre el número de fotones que emiten fluorescencia respecto al número de fotones excitados) de los compuestos fluorescentes, se requiere la corrección del espectro de emisión a través de un patrón fluorescente conocido. El patrón debe poseer propiedades espectrales fluorescentes cercanas al material de estudio. Por este motivo se eligió al sulfato de quinina en 0,1 N de H₂SO₄ como solución patrón, que cumple con estas características. El rendimiento cuántico informado en la literatura para esta solución patrón es $\Phi_{FS} = 0,546$ (Szabo, 2000).

En la Figura 1.7 se observa el espectro de emisión de la solución utilizada como patrón de fluorescencia; sulfato de quinina en 0,1 N H₂SO₄, a diferentes longitudes de onda de excitación, obtenida con el espectrofluorímetro Hitachi F-2500. La solución patrón utilizada posee absorbancia menor que 0,1 a todas las longitudes de onda de excitación empleadas de manera de evitar el efecto de filtro interno.

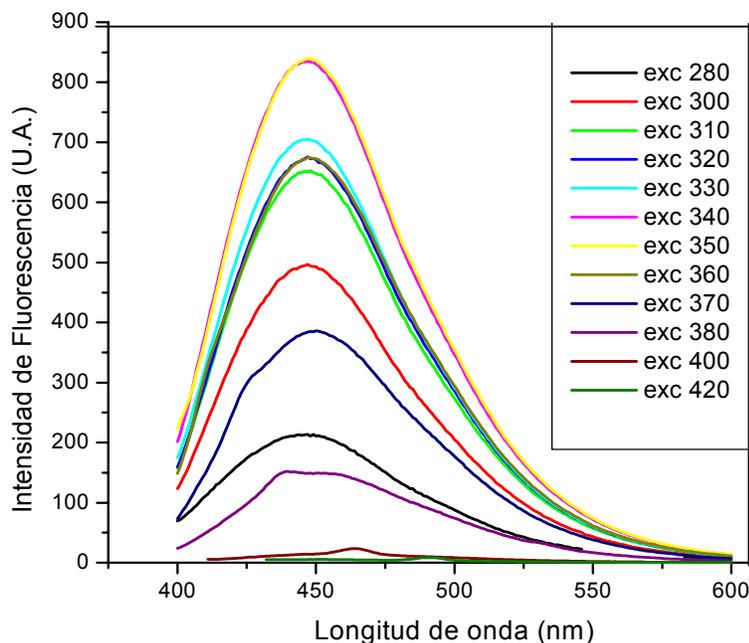


Figura 1.7. Espectros de emisión a diferentes longitudes de onda de excitación de una solución de sulfato de quinina en 0,1 N H₂SO₄. El barrido del espectro de emisión se realizó entre 400 y 600 nm. La absorbancia fue menor que 0,1 a todas las longitudes de excitación. La temperatura fue constante a 25°C.

Se observó que el máximo de emisión ocurre a la longitud de onda de 450 nm cuando se irradió en cualquiera de las longitudes de onda entre 280 y 380 nm. Al excitar a longitudes de ondas más altas no se observó fluorescencia apreciable de la solución de quinina. Se observa también a partir de esa figura que la máxima intensidad de fluorescencia se obtuvo al irradiar a 340-350 nm, lo que indica que estas longitudes de onda son cercanas al máximo de excitación de las moléculas de quinina.

b) Controles de la reacción de Maillard.

Para poder realizar estudios sobre las características y cinética de la generación de compuestos fluorescentes provenientes de la reacción de Maillard, en primer lugar se analizó el espectro de emisión y excitación de distintos sistemas.

En la Figura 1.8 se muestra los espectros de absorbancia y en el inserto los espectros de emisión de fluorescencia obtenidos excitando a 380 nm un sistema lisina-glucosa-*buffer* (lys-gluc-PBS) a tiempo cero de almacenamiento, o sistemas control compuestos por *buffer* sólo (PBS) ó lisina-*buffer* (lys-PBS).

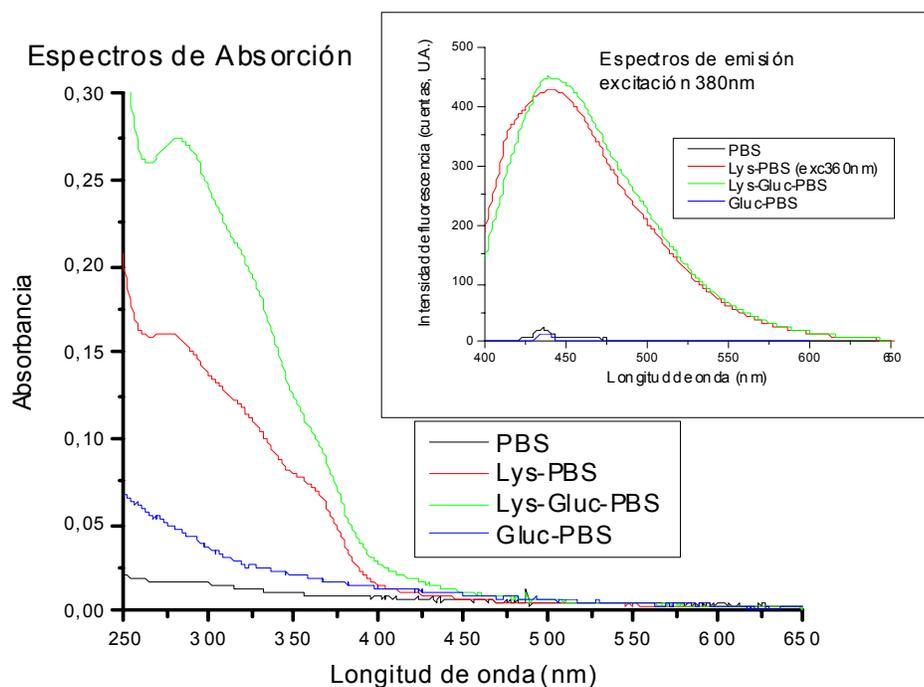


Figura 1.8. Espectros de Absorbancia del sistema lisina-glucosa-*buffer* y controles sin almacenamiento (tiempo=0). Inserto: Espectros de emisión de fluorescencia (excitación 380 nm). La flecha indica la emisión Raman del agua.

En esta figura se observa que había absorbancia y fluorescencia en el sistema (lisina-glucosa-*buffer*) a tiempo cero de almacenamiento. En los espectros de emisión se manifestó el pico correspondiente a la emisión producida por la dispersión Raman del agua, que varió según la longitud de onda de excitación. Cuando se excitó a 380 nm, el pico debido a emisión Raman se encontró a 430 nm, cercano al valor máximo de fluorescencia de 450 nm.

Los controles realizados con *buffer* solo y glucosa-*buffer* no presentaron fluorescencia, indicando que la fluorescencia observada a tiempo inicial es debida a fluorescencia provocada por la presencia del aminoácido lisina. Sin embargo, la lisina es un aminoácido básico, alifático y su estructura molecular no es capaz de generar fluorescencia intrínseca, pero sí podría contener impurezas producidas por reacción de Maillard en el producto seco.

c) Sistemas modelo de la reacción de Maillard.

Para los sistemas modelo analizados (lisina ó proteínas + glucosa) la forma de los espectros de emisión fue similar para cada longitud de onda de excitación, variando la longitud de onda para la máxima emisión (Figura 1.9). En el rango de excitación 340-380 nm (correspondiente a compuestos fluorescentes provenientes de la reacción de Maillard) las longitudes de onda para máxima emisión estuvieron en el rango entre 405 y 490 nm en ambos sistemas, dependiendo del grado de reacción. Se observó que existe una dependencia casi lineal entre la longitud de onda de excitación y la longitud de onda del máximo de emisión en ambos sistemas. Estos resultados serían un indicio que hay varios componentes que se excitan involucrados en la emisión. Si se tratara de un solo compuesto, cambiaría la intensidad de la fluorescencia, pero el máximo no debería cambiar. El corrimiento de la longitud de onda de emisión máxima y la intensidad de fluorescencia pueden variar, por ejemplo, por interacciones de las moléculas fluorescentes con las moléculas del solvente, pero en este caso el solvente es el mismo en todos los sistemas analizados.

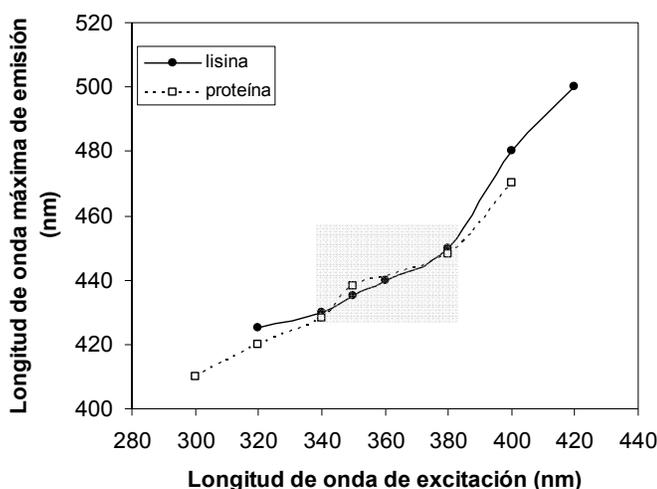


Figura 1.9. Longitud de onda del máximo de emisión a cada longitud de onda de excitación para los sistemas lisina-glucosa-*buffer* ó proteína-glucosa-*buffer*.

Cuando se compararon los espectros de excitación (Figura 1.10) se observaron algunas diferencias entre ambos sistemas. Sin embargo, ambos sistemas presentan componentes que se excitan a 280 nm y otros que se excitan en el rango 350-366 nm. La emisión de fluorescencia a 450 nm fue debida a un compuesto con máximo de excitación a 350 nm en ambos sistemas, lo que indicaría la presencia del mismo compuesto en los dos sistemas analizados.

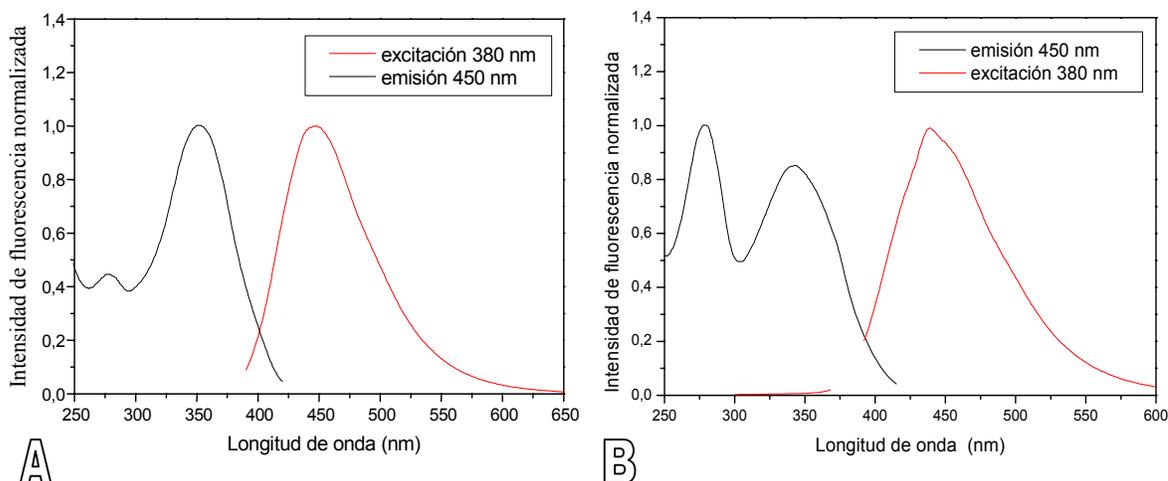


Figura 1.10. Espectros de excitación (emisión a 450 nm) y emisión (excitación a 380 nm) de sistemas modelo (A) lisina-glucosa-buffer (B) proteína-glucosa-buffer.

d) Sistema de compuestos polifenólicos provenientes de té.

La Figura 1.11 muestra los espectros de emisión y de excitación de los compuestos polifenólicos provenientes de té.

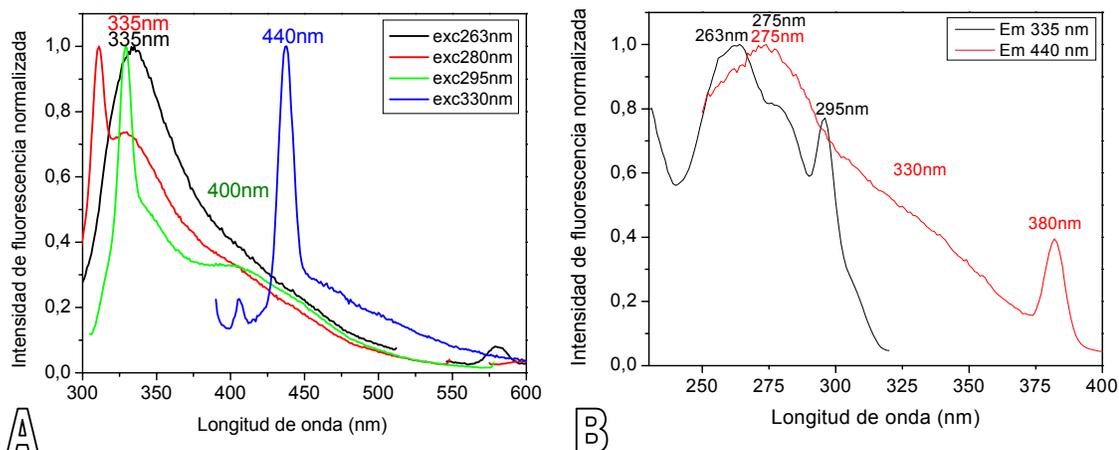


Figura 1.11. (A) Espectros de emisión a distintas longitudes de onda de excitación, normalizados a 1 con el valor máximo de fluorescencia obtenido. Se insertó arriba de cada pico obtenido el valor (en nm) del máximo de emisión para cada longitud de onda de excitación (263, 280, 295, 330 nm). (B) Espectros de excitación, variando la longitud de onda de emisión, normalizados a 1 con el valor máximo de fluorescencia obtenido. Se insertó arriba de cada pico obtenido el valor (en nm) del máximo de excitación para cada longitud de onda de emisión (335 ó 440 nm).

En el espectro de emisión (A) correspondiente a una excitación en el rango de 260 a 330 nm se obtuvieron diferentes picos de emisión, los cuales están indicados en el gráfico. Esto indica la presencia de varios compuestos fluorescentes con diferentes características fluorimétricas. Cuando se excitó a una longitud de onda de 330 nm se obtuvo un claro pico angosto a 440 nm, el cual pertenecería a un único compuesto fluorescente. También se obtuvo un pico a 335 nm con un hombro a 400 nm al excitar a 263 nm. En este gráfico también se puede observar para cada espectro de emisión el pico característico perteneciente a la emisión por dispersión Raman del agua (pico agudo a la izquierda de cada espectro, que varía con la longitud de onda de excitación).

Ambos máximos de emisión, a 335 nm y a 440 nm obtenidos por excitación a 263 y 330 nm, respectivamente, no coinciden con los máximos de emisión pertenecientes a aminoácidos con fluorescencia intrínseca, como el triptofano (280/348 nm exc/em), tirosina (274/303 nm exc/em), ni fenilalanina (257/282 nm exc/em). Lo que indicaría que la fluorescencia obtenida se debió a compuestos polifenólicos complejos.

En la Figura 1.11.B se muestra el espectro de excitación de los compuestos polifenólicos fluorescentes que emiten a 335 nm ó 440 nm. Se observa claramente que existen varios compuestos fluorescentes que emiten a estas longitudes de onda, debido a que los espectros de excitación obtenidos presentan varios picos a distintas longitudes de onda y espectros anchos. Tanto la excitación a 330 nm como a 340 nm generan el mismo espectro de emisión, con el pico máximo a 440 nm, siendo menor la intensidad de fluorescencia obtenida cuando se excita a 340 nm, lo que indica que en ambas condiciones se excita un único tipo de compuesto fluorescente.

Se eligió como representante de la fluorescencia provocada por los compuestos del sistema de polifenoles, al compuesto con las características fluorimétricas de excitación a 340 nm y emisión de fluorescencia a 440 nm, debido los equipos fluorimétricos disponibles.

IV.1.2.2. Fluorescencia sincrónica.

Las determinaciones de fluorescencia sincrónica permiten establecer si la fluorescencia observada se debe a la presencia de uno o más compuestos fluorescentes presentes en el sistema.

La Figura 1.12 muestra los espectros de fluorescencia sincrónica obtenidos de los sistemas modelo aminoácido-glucosa (A), proteína-glucosa (B) y del sistema de polifenoles (C). En esta figura (A y B) se observa que hubo por lo menos dos compuestos bien diferenciados, ya que se observa claramente dos picos diferentes en esta región, uno que absorbe a 280 nm y

otro que absorbe en el rango de 365-400 nm. En el sistema proteico (Figura 1.12.B) se evidencia la presencia de al menos 2 posibles fluoróforos, con máximos de emisión a 280 y 290 nm. Sin embargo, se puede observar un espectro ancho en la región 340-400 nm, lo que indicaría la presencia de al menos dos compuestos diferentes, uno que tiene un máximo de emisión a 350 nm y otro a 360-370 nm.

Las diferencias observadas en los máximos de emisión por el experimento sincrónico, corroboran por lo tanto la presencia de diferentes compuestos que generan fluorescencia en los sistemas modelo de la reacción de Maillard (aminoácido-glucosa y proteína-glucosa).

Por otro lado, en el sistema de compuestos polifenólicos extraídos se observa que también existen por lo menos dos compuestos bien diferenciados, uno que absorbe a 280 nm y otro que absorbe a 310 nm (Figura 1.12.C).

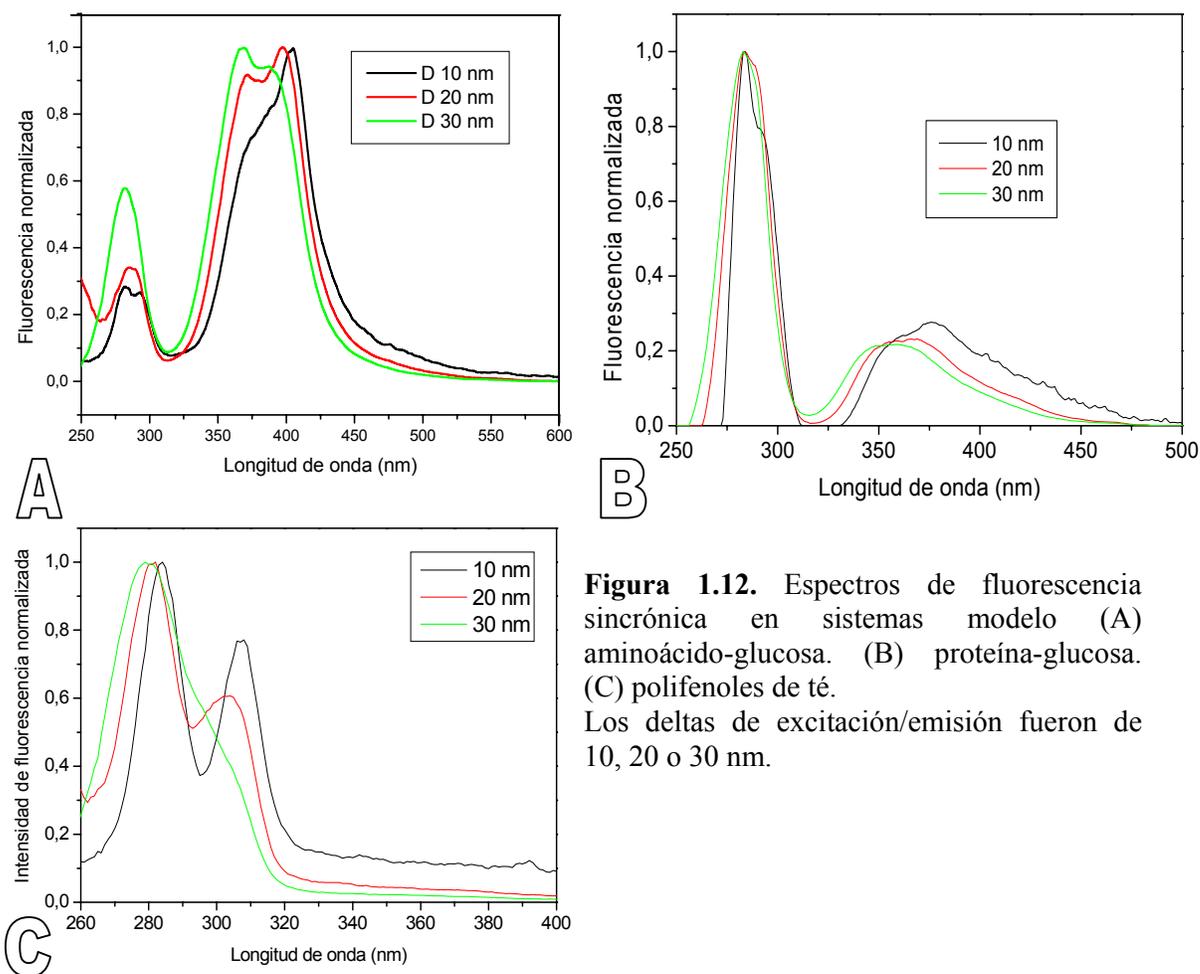


Figura 1.12. Espectros de fluorescencia sincrónica en sistemas modelo (A) aminoácido-glucosa. (B) proteína-glucosa. (C) polifenoles de té. Los deltas de excitación/emisión fueron de 10, 20 o 30 nm.

Se realizó además la comparación de los pigmentos de Maillard provenientes de sistemas modelo de aminoácido ó proteínas con glucosa y en función del tiempo de reacción (Figura 1.13). Se observaron variaciones del espectro sincrónico con el tiempo de almacenamiento para ambos sistemas, lo que indica la generación de diferentes compuestos fluorescentes que varían su concentración con el tiempo de almacenamiento. En la región de 280-300 nm la intensidad de fluorescencia fue mayor en el sistema modelo de proteínas que en el de aminoácido debido a la alta concentración de aminoácidos con fluorescencia intrínseca, observándose un aumento significativo de los compuestos asociados a la reacción de Maillard (región 350-450 nm).

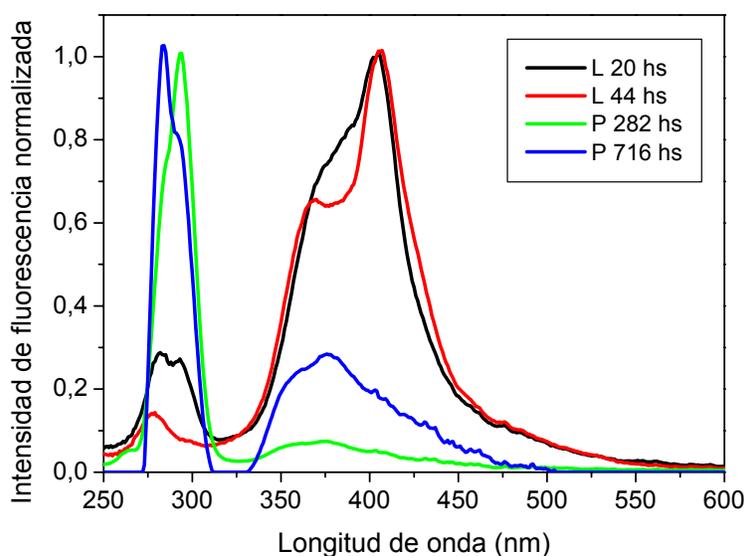


Figura 1.13. Espectros sincrónicos normalizados (Delta de 10 nm) de los sistemas modelo aminoácido-glucosa (L) ó proteína-glucosa (P) a diferentes tiempos de almacenamiento a 55°C.

Ancho de banda y área relativa de fluorescencia

Con el objetivo de profundizar la caracterización de los compuestos fluorescentes provenientes de la reacción de Maillard en el sistema modelo de aminoácido, se estudió el ancho de banda del espectro de emisión, que junto con el área relativa del mismo bajo la curva, son parámetros indicativos de la cantidad de compuestos que fluorescen en esa región.

El ancho de banda se analizó en el sistema lisina-glucosa-*buffer* con 20 h de almacenamiento a 55°C (factor de dilución 40).

En la Figura 1.14 se muestra el espectro de absorbancia del sistema analizado (A) y el área relativa y ancho de banda para cada longitud de onda de excitación (B).

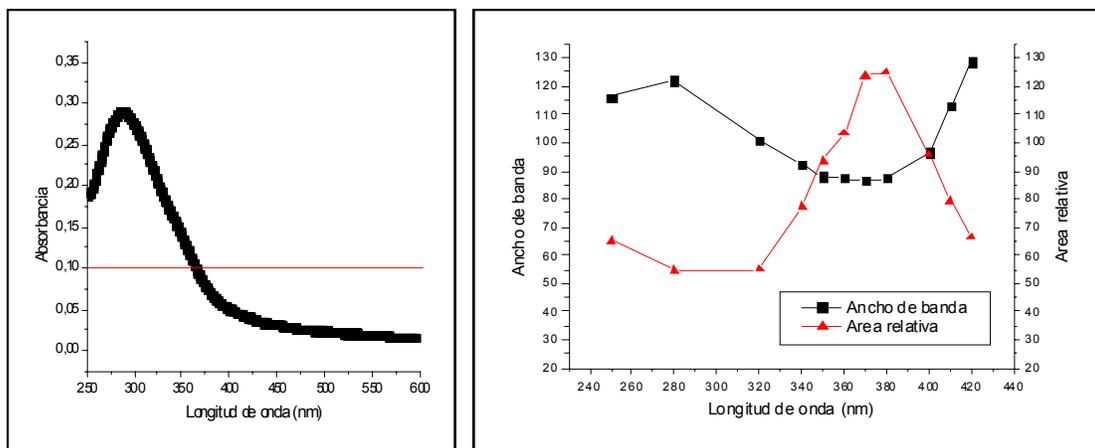


Figura 1.14. Sistema lisina-glucosa-*buffer* almacenado durante 20 h a 55°C, dilución 40. **(A)** Espectro de absorción. **(B)** Relación del ancho de banda y el área relativa de fluorescencia con la longitud de onda de excitación.

En la Figura 1.14.B se observa que en el sistema analizado, el mayor rendimiento de fluorescencia (área de fluorescencia/absorbancia) se obtiene cuando se excita a 380 nm. El ancho de banda de los espectros de fluorescencia a cada longitud de onda indica que en el rango de excitación de 340-380 nm, habría un único compuesto fluorescente, ya que es el ancho mínimo obtenido, y a las otras longitudes de onda de excitación, habría más de un compuesto involucrado, debido al mayor ancho de banda observado.

IV.1.2.3. Rendimiento cuántico de fluorescencia

Se calculó el rendimiento cuántico utilizando la ecuación III.6. Como patrón se utilizó sulfato de quinina en 0,1 N H₂SO₄. Debido a que tanto la muestra como el patrón se encuentran en medio acuoso, en la ecuación III.6 se cancela el índice de refracción perteneciente al solvente ($n=1,33$ para el agua, Lakowicz, 1999).

Se realizaron diferentes diluciones de cada sistema analizado a distintos tiempos de almacenamiento obtenido de tal manera que la absorbancia fuera menor que 0,05 (absorbancia máxima utilizada en mediciones de rendimientos cuánticos para evitar el efecto de filtro interno) y se midieron los espectros de emisión a 450 nm excitando a 360 nm o a 380 nm. En los insertos de las figuras para cada sistema se muestran las pendientes de la regresión lineal ajustada a los datos experimentales para cada longitud de onda de excitación. La pendiente obtenida según cada gráfico es la relación de intensidad de fluorescencia/absorbancia, por lo tanto, se obtuvo con mucho mayor valor estadístico esta relación necesaria en la ecuación

III.6. Se calculó el rendimiento cuántico de los compuestos fluorescentes modificando la ecuación III.6 a la ecuación IV.2, según:

$$\phi_{FM} = \phi_{FS} * \frac{I_{M(\lambda)}}{I_{S(\lambda)}} * \frac{A_S}{A_M} * \frac{n_M^2}{n_S^2} \quad (\text{ecuación III.6}) \quad \rightarrow \quad \phi_{FM} = \phi_{FS} * \frac{I_{M(\lambda)}}{A_M} * \frac{A_S}{I_S(\lambda)} \quad \rightarrow$$

$$\phi_{FM} = \phi_{FS} * \text{pendiente}(M) * \frac{1}{\text{pendiente}(S)} \quad (\text{ecuación IV.1})$$

Donde: Φ_{FM} , es el rendimiento cuántico de la muestra; Φ_{FS} , es el rendimiento cuántico del patrón (0,55); $I_{M(\lambda)}$, es la fluorescencia integrada de la muestra; $I_{S(\lambda)}$, es la fluorescencia integrada del patrón; A_S , es la absorbancia del patrón a la longitud de onda de excitación; A_M , es la absorbancia de la muestra a la longitud de onda de excitación; n , es el índice de refracción de la muestra n_M o del patrón, n_S ; *pendiente (M) ó (S)* es el valor obtenido de pendiente de la regresión lineal a partir del gráfico intensidad de fluorescencia vs absorbancia de las muestras o del patrón, respectivamente.

El error para los valores del rendimiento cuántico se calculó a partir del desvío estándar (para un intervalo de confianza del 95%, aplicando el t de Student) realizado por sextuplicado a un tiempo de 40 h ó 512 h para los sistemas modelo de aminoácido o de proteínas, respectivamente.

a) Sistema modelo de aminoácidos.

Se realizó la medición de fluorescencia a 450 nm excitando a 360nm ó 380 nm de cada tiempo de almacenamiento del sistema modelo aminoácido-glucosa almacenado a 55°C y del patrón. A partir de los resultados obtenidos (Figura 1.15 y Tabla 1.1), se observó que no hubo diferencias significativas del rendimiento cuántico de los compuestos fluorescentes durante el almacenamiento y tuvo un valor aproximado de 0,15 al excitar a 360 nm. Por lo tanto, el aumento de la intensidad de fluorescencia observado con el tiempo de almacenamiento se debe a un aumento en la cantidad de compuestos fluorescentes con el tiempo y no a que existe un aumento de la intensidad de fluorescencia (por aumento del rendimiento cuántico) por cambios en el tipo de compuestos formados con el tiempo de reacción (Figura 1.16).

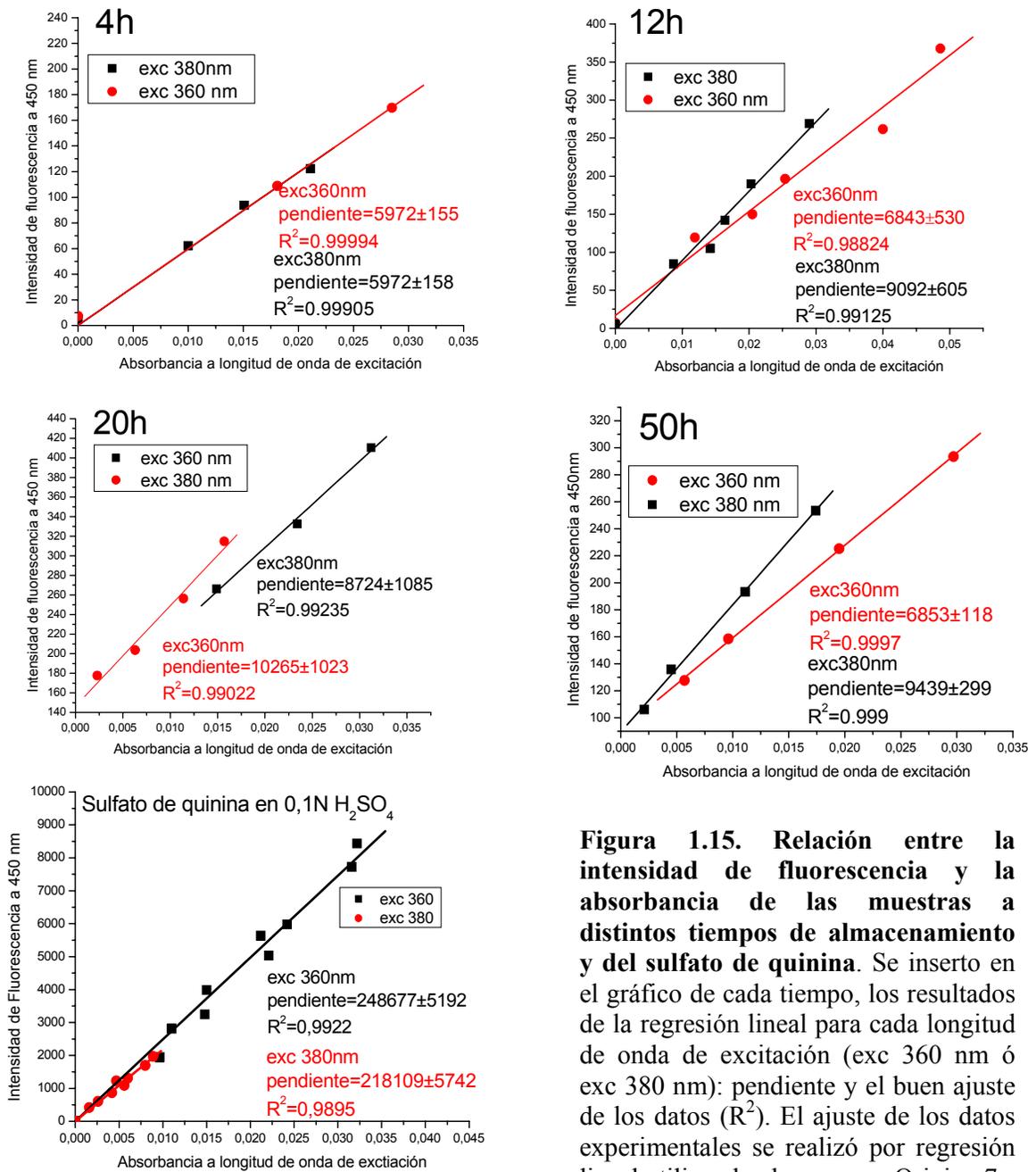


Figura 1.15. Relación entre la intensidad de fluorescencia y la absorbancia de las muestras a distintos tiempos de almacenamiento y del sulfato de quinina. Se inserto en el gráfico de cada tiempo, los resultados de la regresión lineal para cada longitud de onda de excitación (exc 360 nm ó exc 380 nm): pendiente y el buen ajuste de los datos (R^2). El ajuste de los datos experimentales se realizó por regresión lineal utilizando el programa Origin v7.

Tabla 1.1 Datos utilizados en la ecuación IV.1 para el cálculo del rendimiento cuántico de los compuestos fluorescentes en el tiempo de almacenamiento.

λ exc.	360 nm	380 nm	360 nm	380 nm
Tiempo a 58°C (h)	Pendiente (I. fluo vs abs.)		Φ_{FM} $\pm 0,008$	Φ_{FM} $\pm 0,008$
4	5972 \pm 155	5972 \pm 158	0,013	0,015
6	4074 \pm 189	3491 \pm 68	0,009	0,0087
12	6843 \pm 530	9092 \pm 605	0,015	0,023
20	10265 \pm 1023	8724 \pm 1085	0,023	0,022
40	6146	7435	0,0135	0,019
50	6853 \pm 118	9439 \pm 299	0,015	0,024
Quinina	248677 \pm 5192	218109 \pm 5742		

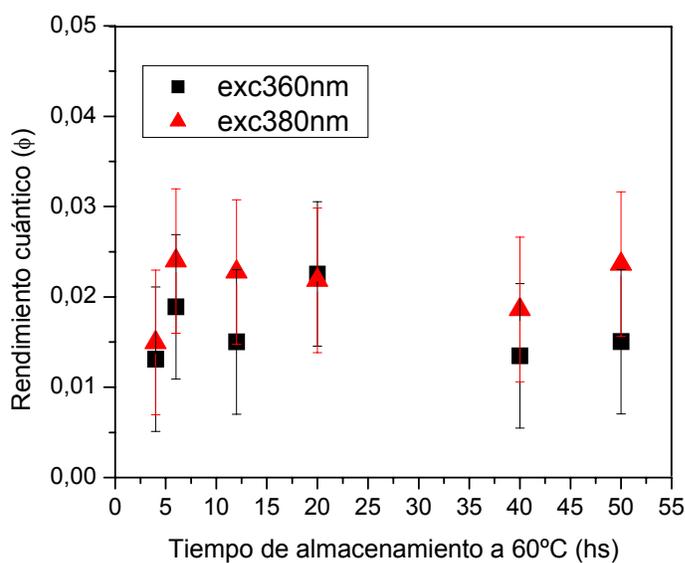


Figura 1.16. Relación del rendimiento cuántico (calculado con la ecuación IV.1) con el tiempo de almacenamiento a dos longitudes de onda de excitación, 360 nm y 380 nm.

Desactivación de la fluorescencia por filtro interno

De las variables que podrían afectar las mediciones fluorimétricas analizadas hasta el momento, se mantuvieron constantes:

- el pH a 6,84 \pm 0,05,
- la temperatura de 25 \pm 1°C,
- la intensidad de la radiación que se usa para excitar las moléculas,
- la humedad relativa del sistema, a 75% HR, en atmósfera de aire.

Sin embargo, el rendimiento cuántico puede variar con la longitud de onda de excitación y

por efecto de filtro interno. Estos dos parámetros se analizaron en el sistema lisina-glucosa-*buffer*.

La intensidad de fluorescencia y la distribución espectral puede ser dependiente tanto de la densidad óptica o absorbancia de la muestra como del arreglo geométrico utilizado para la iluminación de la muestra.

Para corroborar que no existe efecto de filtro interno o “*quenching*” en los sistemas en los cuales se realiza una dilución tal que a 370-380 nm la absorbancia sea menor que 0,1 pero la absorbancia a 280 nm es mayor que a 370-380 nm. Se estudia el sistema modelo de aminoácido lisina-glucosa-*buffer* almacenado durante 20 h a 55°C, al cual se le realizó una dilución 1:40. Se midió el espectro de emisión a diferentes longitudes de onda de excitación en el espectrofluorímetro Hitachi F-2500, utilizando dos tipos diferentes de arreglos geométricos de cubetas de cuarzo:

1) Fluorescencia clásica: cubeta cuadrada de 1cm de paso óptico, geometría comúnmente mas utilizada, en la cual se realiza la observación en ángulo recto del centro de una cubeta centralmente iluminada (Figura 1.17.A).

2) Fluorescencia frontal (*front-face illumination*): cubeta triangular con la cual, las intensidades esperadas son independientes de la concentración a altas densidades ópticas. Bajo estas condiciones, toda la luz incidente es absorbida cerca de la superficie de la cubeta y se evita el efecto de filtro interno (Figura 1.17.B). Esta geometría es útil en los estudios de muestras con alta densidad óptica o soluciones con alta difusión de luz interna o “*scattering*”.

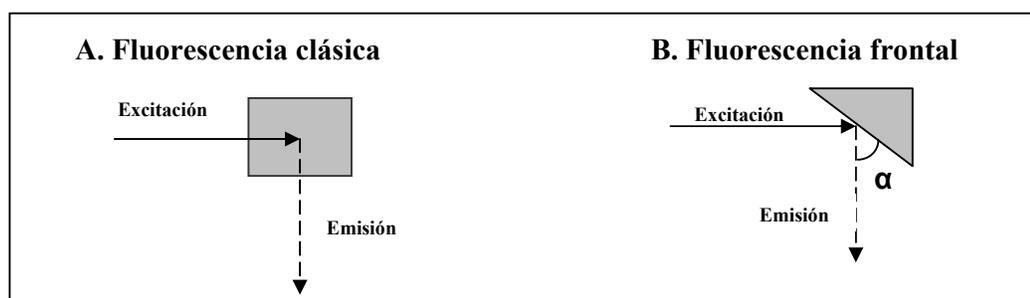


Figura 1.17. Esquema de fluorescencia clásica (A) utilizando cubeta cuadrada y fluorescencia frontal (B) utilizando cubeta triangular.

Para cada arreglo geométrico, utilizando la misma muestra, se midió la intensidad de fluorescencia a las diferentes longitudes de onda, y luego se calculó el área bajo la curva de cada espectro de emisión y se dividió por la absorbancia correspondiente a cada longitud de onda de excitación, determinando de esta manera la fluorescencia relativa o área relativa a cada longitud de onda (Figura 1.18).

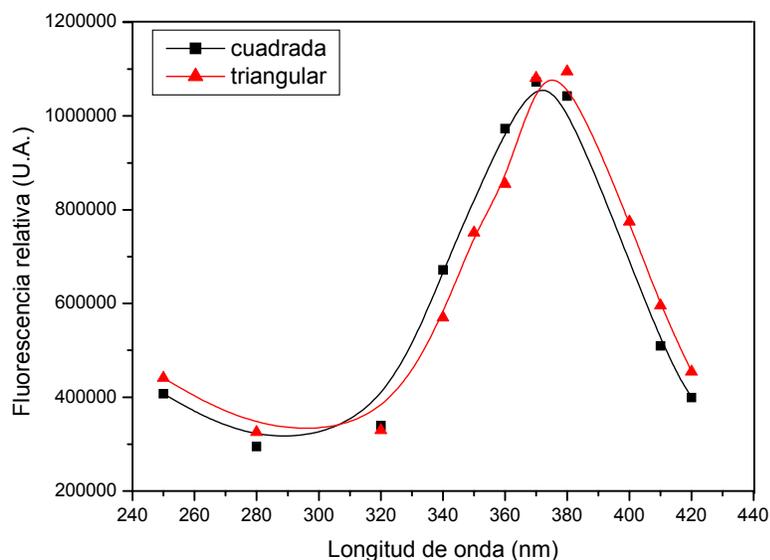


Figura 1.18. Efecto de filtro interno. Fluorescencia relativa (área bajo el espectro de emisión/absorbancia) a cada longitud de onda de excitación. Comparación de mediciones del sistema modelo lisina-glucosa-*buffer* almacenados durante 20 h a 55°C, factor de dilución 40, utilizando cubetas de cuarzo de distintos arreglos geométricos; cuadrada (■), medición por fluorescencia clásica ó triangular (▲), medición por fluorescencia frontal.

No se obtuvieron diferencias significativas según el arreglo geométrico utilizado para la medición de fluorescencia y por lo tanto no habría efecto de filtro interno en las muestras analizadas. Entonces, se puede utilizar el arreglo geométrico cuadrado para excitar muestras a 370 nm con absorbancia menor que 0,1 y a la misma muestra a 280 nm con absorbancia mayor que 0,1. Se pudo corroborar además que el mayor rendimiento de fluorescencia se obtuvo al excitar las muestras a 370-380 nm.

b) Sistema modelo de proteínas

Se obtuvieron los espectros de emisión a 492 nm excitando a 340 nm del sistema modelo de proteínas almacenado durante diferentes tiempos a 55°C. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 1.19 y 1.20 y en la Tabla 1.2.

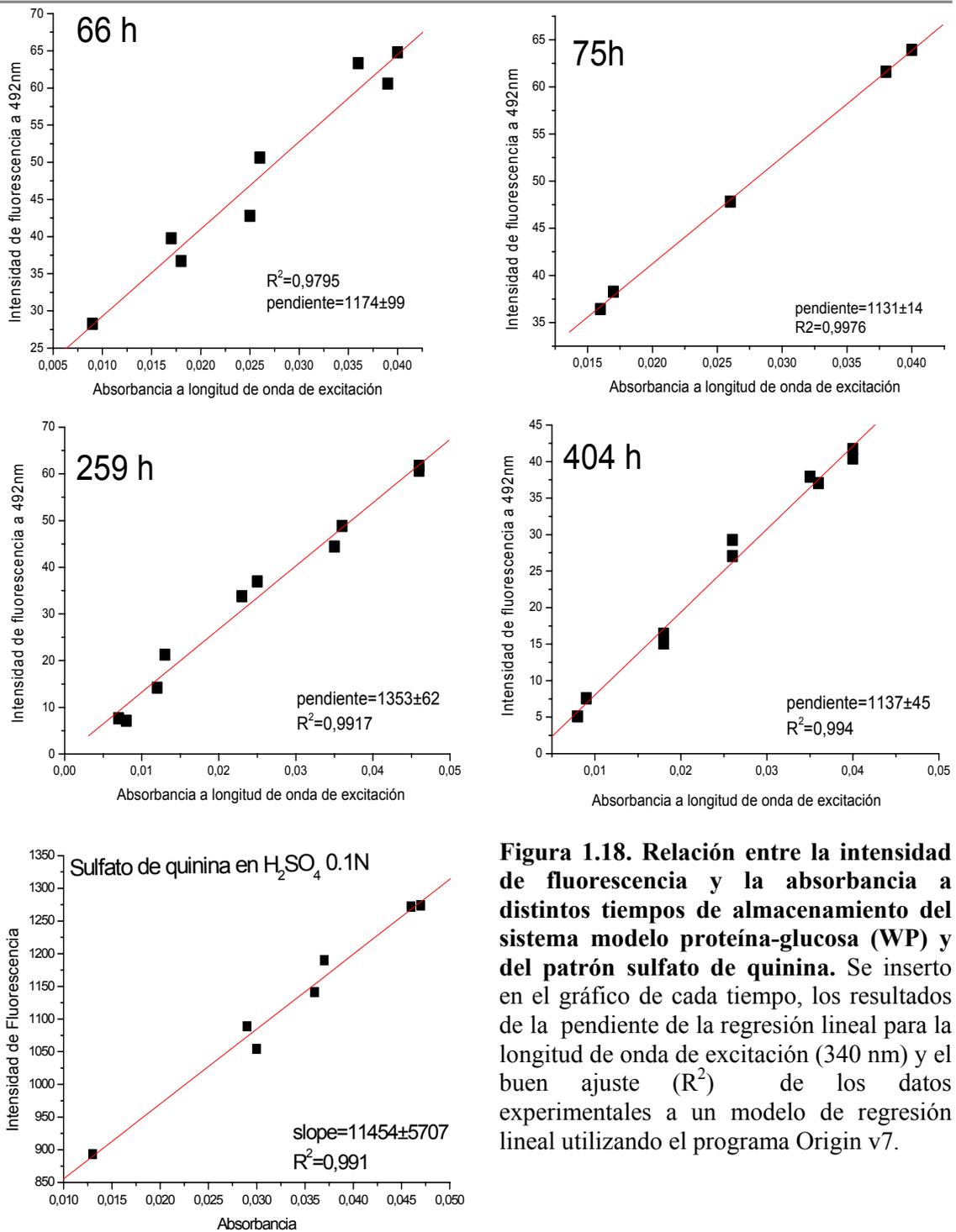


Figura 1.18. Relación entre la intensidad de fluorescencia y la absorbancia a distintos tiempos de almacenamiento del sistema modelo proteína-glucosa (WP) y del patrón sulfato de quinina. Se inserto en el gráfico de cada tiempo, los resultados de la pendiente de la regresión lineal para la longitud de onda de excitación (340 nm) y el buen ajuste (R^2) de los datos experimentales a un modelo de regresión lineal utilizando el programa Origin v7.

Tabla 1.2. Datos utilizados en la ecuación IV.2 para el cálculo del rendimiento cuántico, Φ_{FM} , de los compuestos fluorescentes en el tiempo de almacenamiento del sistema modelo proteína-glucosa. La longitud de onda de excitación fue 340 nm y la de emisión a 492 nm.

Tiempo a 58°C (h)	Pendiente (I. fluo vs abs.)	Φ_{FM} $\pm 0,008$
66	1174 \pm 99	0,056
75	1132 \pm 14	0,054
93	1148 \pm 83	0,055
102	1431 \pm 104	0,068
148	1450 \pm 52	0,069
244	1580 \pm 73	0,075
411	1696 \pm 94	0,081
502	1603 \pm 60	0,076
Quinina	11454 \pm 781	

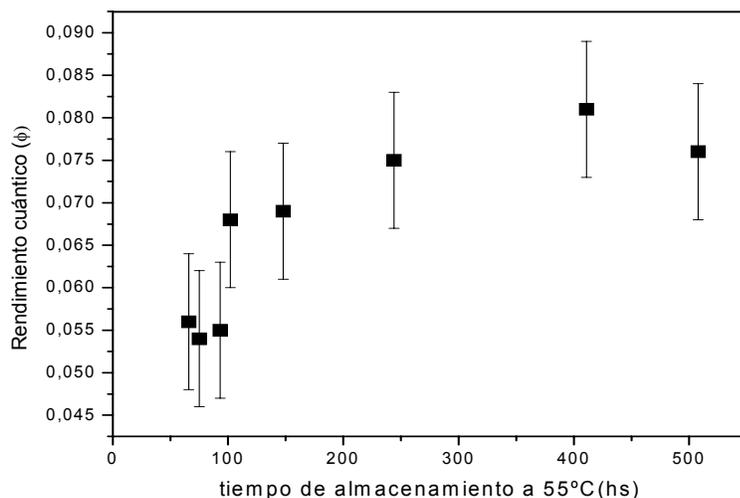


Figura 1.19. Relación del rendimiento cuántico (Φ) con el tiempo de almacenamiento del sistema modelo de proteína-glucosa. Excitación a 340 nm, emisión a 492 nm.

A partir de los resultados obtenidos se puede observar que, a diferencia de los sistemas de aminoácidos, en el sistema proteico analizado hay dos tipos de compuestos fluorescentes generados a distintos tiempos durante el almacenamiento que tienen características espectrofluoriméticas similares (igual longitud de onda de excitación y emisión) pero con distintos rendimientos cuánticos, observándose un leve aumento del rendimiento cuántico de los compuestos fluorescentes durante el almacenamiento que luego se mantiene constante, lo que indica que el aumento de fluorescencia observado se debe en primera instancia a un cambio en la fluorescencia por diferencias en la estructura del tipo de compuestos que se forman durante el almacenamiento y luego a un aumento en la cantidad de los mismos compuestos fluorescentes.

c) Sistema de compuestos polifenólicos.

En el sistema de polifenoles provenientes de la extracción de té, no se realizaron estudios cinéticos, ya que se dispone de un solo tipo de muestra. Por lo tanto, en este sistema no es posible realizar un estudio del rendimiento cuántico en función del tiempo de almacenamiento. El rendimiento cuántico en este sistema se calculó a partir de la ecuación III.6, ya que al realizar el gráfico de intensidad de fluorescencia en función de la absorbancia, no se obtuvo una relación lineal entre estos parámetros, por lo tanto se realizó el cálculo sin rigurosidad estadística utilizando las áreas integradas de la emisión de fluorescencia y el valor de absorbancia. Esta observación se debió al muy bajo rendimiento cuántico obtenido en los polifenoles (Tabla 1.3).

Tabla 1.3. Datos utilizados en la ecuación III.6 para el cálculo del rendimiento cuántico, Φ_{FM} , de los compuestos fluorescentes del sistema conteniendo compuestos polifenólicos provenientes de té. La longitud de onda de excitación fue 340 nm y la de emisión a 492 nm.

Sistema	Área de fluorescencia	Absorbancia	Φ_{FM}
Polifenoles	990±66	0,047±0,002	0,0027±0,0002
Quinina	201563,7±100	0,046±0,002	0,546

IV.1.2.4. Corrimiento de Stokes.

Este importante parámetro, calculado a partir de la ecuación I.2, puede proveer información de los estados excitados, ya que el espectro de absorbancia da información de los niveles vibracionales del estado excitado (S_1) y el espectro de emisión de fluorescencia da información sobre los niveles vibracionales del estado fundamental (S_0). Las transiciones electrónicas puras llamadas transiciones 0-0 poseen varias transiciones vibracionales. Las transiciones 0-0 son usualmente las mismas para la absorción y la fluorescencia en moléculas rígidas (por ej. compuestos orgánicos resonantes). Sin embargo, se observa en las muestras modelos que el espectro de fluorescencia está localizado a mayores longitudes de onda (menor energía) que el espectro de absorción y esto es debido a la pérdida de energía en el estado excitado por relajación vibracional. Por lo tanto, cuando las transiciones 0-0 están desplazadas, o sea que existe un corrimiento de Stokes, se debe a las diferentes geometrías entre el estado fundamental y el excitado, indicando que las moléculas no son rígidas.

Se utilizó muestras de 40 h y 716 h de almacenamiento a 55°C de los sistemas modelo de aminoácido y de proteínas, respectivamente y muestras del sistema de polifenoles de té

extraídos con agua, a los cuales se le realizó una dilución para la medición de ambos espectros, de manera tal que la absorbancia a 340 nm fuera menor que 0,1 para la medición de fluorescencia.

En la Figura 1.20 (A y B) se muestra los espectros de absorbancia y fluorescencia de los sistemas modelo lisina-glucosa, proteína-glucosa, respectivamente y en la Figura 1.21 del sistema de polifenoles. El cálculo del corrimiento de Stokes para cada sistema se realizó utilizando la ecuación 1.2 y los resultados se muestran en la Tabla 1.4.

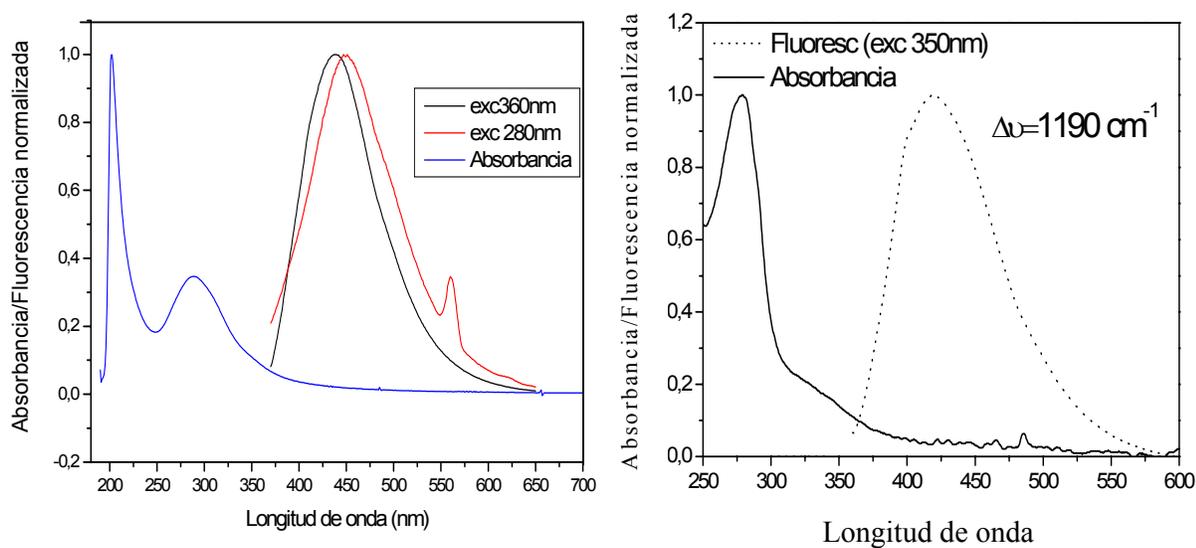


Figura 1.20. (A) Espectros de absorbancia y de emisión de fluorescencia (excitación a 280 ó 360 nm) del sistema lisina-glucosa-*buffer* almacenado durante 40 h a 55°C (B) Espectros de absorbancia y de emisión de fluorescencia (excitación a 350 nm) del sistema wp-glucosa-*buffer* almacenado durante 712 h a 55°C.

En los tres sistemas analizados se observó que el espectro de fluorescencia está localizado a mayores longitudes de onda (menor energía) que el espectro de absorción debido a la pérdida de energía en el estado excitado por relajación vibracional. Por lo tanto, se ven reflejadas en diferentes geometrías entre el estado fundamental y el excitado, indicando que las moléculas en los sistemas analizados no son rígidas.

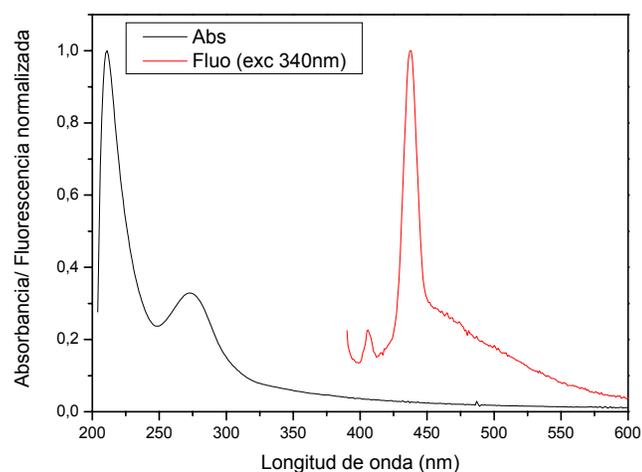


Figura 1.21. Corrimiento de Stokes en sistema polifenólico proveniente de té extraído con agua a 100°C.

Tabla 1.4. Cálculo del corrimiento de Stokes para los sistemas modelo analizados.

Sistema	$\bar{\nu}_a$ (cm^{-1})	$\bar{\nu}_f$ (cm^{-1})	$\Delta\bar{\nu} = \bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f$ Corrimiento de Stokes (cm^{-1})
Lisina-glucosa- <i>buffer</i>	3418	2272	1175
WP-glucosa- <i>buffer</i>	3571	2381	1190
polifenoles	3666	2286	1380

Es importante notar que el corrimiento observado en el sistema de polifenoles fue significativamente mayor que en los sistemas modelos aminoácido-glucosa como proteína-glucosa (Tabla 1.4) lo que indica que la pérdida de energía por caminos no radiativos (como la relajación vibracional y pérdida de energía por intercambio con el medio), es mayor en los compuestos fluorescentes polifenólicos. Esto puede deberse a la presencia de grupos aromáticos en la estructura de los pigmentos polifenólicos (Pourcel y col., 2007).

IV.1.3. Modificaciones paralelas en el sistema modelo de proteínas.

Además de los cambios cromáticos y de intensidad de fluorescencia de la reacción de Maillard, en los sistemas modelo proteicos se analizaron los cambios producidos en la fluorescencia proveniente de residuos triptofano de las proteínas en función del tiempo de reacción, en el perfil electroforético en condiciones nativas y en las transiciones térmicas obtenidas por DSC.

a) Fluorescencia de residuos triptofano.

La medición de emisión de fluorescencia del aminoácido triptofano ha probado ser un método de suma utilidad para analizar los cambios en la estructura y conformación de proteínas debido a que depende de los factores ambientales (pH, temperatura, polaridad del solvente) como también del estado de agregación o plegado de las proteínas (Lakowicz, 1999).

En la Figura 1.22.A se observa que en el sistema de proteínas de suero lácteo y glucosa no se produjo variación cualitativa del espectro de emisión de fluorescencia de triptofano en función del tiempo, pero aumentó la intensidad de fluorescencia a medida que aumentaba el tiempo de tratamiento. En la figura 1.22.B se muestra la variación de la intensidad del pico máximo de emisión (excitación a 280 nm/emisión a 340 nm) en función del tiempo de reacción.

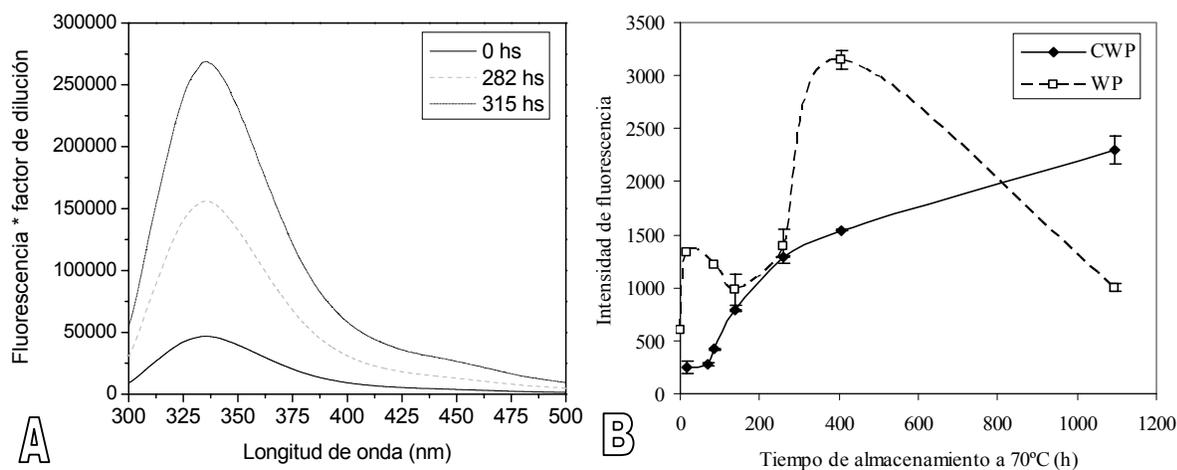


Figura 1.22. Fluorescencia del triptofano proveniente del sistema proteínas de suero lácteo (WP)-glucosa. **(A)** Espectro de emisión de fluorescencia a distintos tiempos de reacción (excitación a 280nm). **(B)** Intensidad de fluorescencia (excitación a 280 nm/emisión a 340 nm) en función del tiempo de reacción para el sistema proteína-glucosa-buffer (WP) ó el control proteína-buffer (CWP).

El aumento de fluorescencia con el tiempo estaría indicando la desnaturalización de las proteínas durante el desarrollo de la reacción. Un aumento de la intensidad de fluorescencia sin variación del espectro de emisión es indicativo de una mayor cantidad de residuos de triptofano expuestos al solvente. Al ser de naturaleza hidrofóbica, estos residuos se encuentran inicialmente ocultos o “desactivados” por la misma proteína y la desnaturalización hace que queden expuestos al agua de la solución sin un cambio en el máximo de emisión hacia longitudes de onda mayores (Lakowicz, 1999). Este efecto se corroboró en el sistema control de proteína en ausencia de glucosa (CWP), donde la intensidad de fluorescencia aumenta con el tiempo de almacenamiento térmico. Sin embargo, en la Figura 1.22.B se observa que la intensidad de fluorescencia varió con el tiempo de almacenamiento, pero sin variar el espectro de emisión (Figura 1.22.A), este resultado es indicativo de que la desnaturalización y agregaciones de las proteínas generan un ocultamiento o *quencheo* de los residuos triptofano.

b) Perfil electroforético.

Una estrategia para la visualización de estados agregados es la electroforesis en gel de poliacrilamida de proteínas nativas.

En la Figura 1.23 se muestra un gel nativo al 10% de acrilamida teñido con azul brillante de Coomassie. En la primer calle se observa la presencia de bandas correspondientes a las principales proteínas nativas del lactosuero (β -lactoglobulina a 18 kDa; seroalbúmina bovina a 66 kDa, α -lactoalbumina a 14 kDa e inmunoglobulina, I-g a >146 kDa) (Morr y Ha, 1993), las cuales van disminuyendo en función del tiempo de almacenamiento (menor intensidad en las bandas) y aparecen agregados de alto peso molecular, que quedan en el gel de apilamiento o *stacking* sin llegar a entrar al gel de separación por su tamaño mayor a 200 kDa.

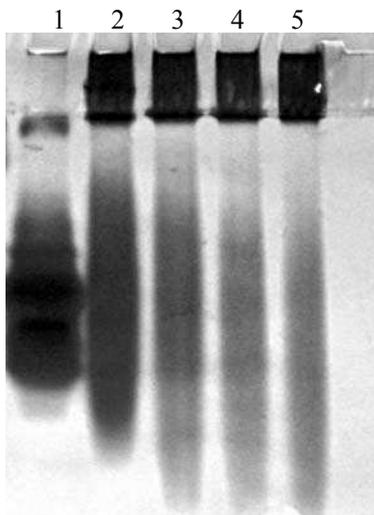


Figura 1.23. Electroforesis en gel de poliacrilamida nativo de proteínas de suero láteo (WP) en función del tiempo de almacenamiento a 70°C. Calle 1: WP tiempo cero de almacenamiento (t=0h). Calle 2: t=87h; Calle 3: t=259h; Calle 4: t=404h; Calle 5: t=739h.

Se realizó un gel de mayor tamaño de poro (6% de archilamida), empleando muestras de menores tiempos de almacenamiento (16 h, 70 h) y se observó el mismo resultado que el observado en el gel del 10% de acrilamida.

c) Propiedades térmicas.

El comportamiento de los parámetros térmicos de las proteínas de suero lácteo o de su componente principal, la β -lactoglobulina (β -lg) han sido estudiadas en relación a la gelificación (Perez y col., 2006; Baeza y col., 2003), o al efecto del tratamiento con pulsos eléctricos en la gelificación de la β -lg (Perez y Pilosof, 2004) ó su interacción con polisacáridos (Baeza y Pilosof, 2002). Sin embargo, cambios en las propiedades térmicas causadas por la glicosilación debida a la reacción de Maillard fueron estudiados sólo en β -lg en presencia de glucosa (Broersen y col., 2004; Van Teeffelen y col., 2005) y no en el conjunto de proteínas de suero lácteo. Broersen y col. (2004) observaron que la β -lactoglobulina glicosilada fue más termoestable a la desnaturalización que la proteína no modificada y que la glicosilación afecta la estabilidad de la estructura secundaria más que la estructura terciaria de la proteína.

Para lograr una concentración adecuada para la observación de las transiciones térmicas en el DSC, se liofilizaron alícuotas (1 ml) de los sistemas de proteínas de suero lácteo con glucosa (WP-glucosa) sometidos previamente a distintos tiempos de almacenamiento a 70°C, que luego se resuspendieron en 200 μ l de agua. La liofilización y posterior rehidratación no modifica significativamente la estructura nativa de las proteínas, ya que las proteínas principales del lactosuero (α -lactoalbumina y β -lactoglobulina) restablecen la conformación nativa luego de la rehidratación (desnaturalización reversible por la desnaturalización) (Carpenter y col., 1999).

En la Figura 1.24 se muestra los termogramas obtenidos de las proteínas de suero lácteo a distintos tiempos del tratamiento térmico. Se observa a tiempo inicial principalmente dos eventos endotérmicos. El segundo pico a $83\pm 1^\circ\text{C}$ puede atribuirse a la desnaturalización de la β -lg glicosilada (Broersen y col., 2004).

Las transiciones térmicas observadas en función del tiempo muestran eventos exotérmicos (asociados a la agregación) y endotérmicos (asociados a la desnaturalización). Es sabido que la β -lg por ser la proteína más abundante del suero lácteo domina el comportamiento térmico de este sistema (Hoffman y Van Mil, 1999). El desplegamiento de la β -lg durante la desnaturalización de la misma, provoca la exposición de grupos polares y no polares que se encuentran ocultos en el interior de la molécula. Una vez expuestos estos grupos, el principal

mecanismo de agregación es por medio de uniones covalentes entre las moléculas desplegadas o por uniones predominantemente hidrofóbicas o no covalentes en moléculas parcialmente desplegadas (Hoffman y col., 1997). Por lo tanto, los cambios entálpicos correspondientes a la disociación del dímero y a la desnaturalización (ambos eventos endotérmicos) están superpuestos a la agregación de las moléculas (evento exotérmico) en la escala de tiempo de las mediciones (Baeza y Pilosof, 2002). La superposición de eventos exo y endotérmicos y el hecho de que estos procesos (sobre todo los exotérmicos, que tienen una barrera de energía) se desarrollan fuera del equilibrio, hace que los termogramas muestren repetitibilidad reducida por encima de la temperatura de la primera desnaturalización.

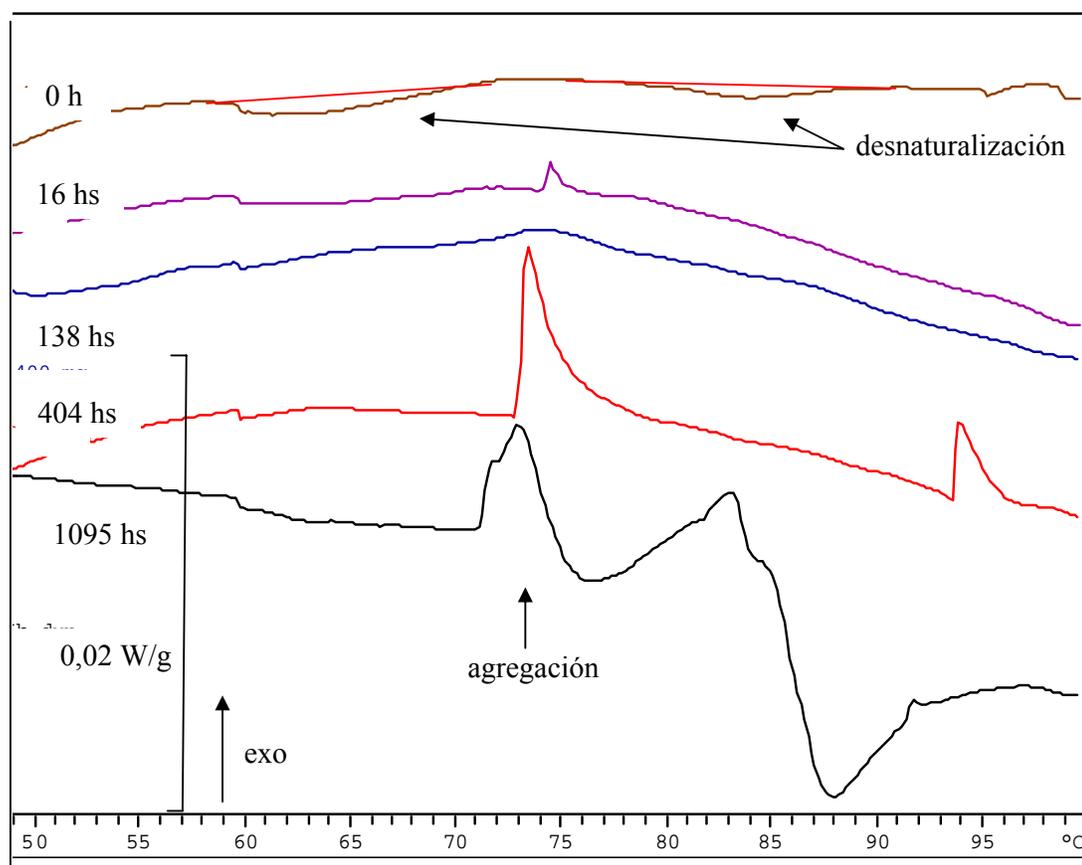


Figura 1.24. Termogramas obtenidos por DSC del sistema proteína-glucosa a diferentes tiempos de almacenamiento a 55°C. Escán a 10°C/min desde 20°C a 100°C.

La entalpía de desnaturalización del primer pico disminuyó con el tiempo de almacenamiento, indicando que las proteínas ya se encontraban parcialmente desnaturalizadas al momento de la corrida en el DSC. En la Tabla 1.5 se resumen los resultados obtenidos, mostrando que la

temperatura del primer pico endotérmico disminuyó levemente, probablemente por una menor estabilidad a la temperatura (la temperatura de inicio de la transición no varió). La entalpía asociada al evento exotérmico (atribuido a la agregación) aumentó con el tiempo de almacenamiento.

En el sistema modelo analizado, los resultados de mediciones de fluorescencia y DSC, junto con la electroforesis permitieron observar las distintas manifestaciones de la agregación de las proteínas durante la reacción de Maillard.

Tabla 1.5. Análisis de los resultados obtenidos de los eventos térmicos observados en los termogramas de DSC. NO: No observado.

Tiempo a 70°C (horas)	Evento térmico	Entalpía (J/g muestra)	Temperatura pico ± 1 (°C)
0	Endoterma inicio a 59°C (desnaturalización)	32×10^{-3}	64
16		22×10^{-3}	7
138		5×10^{-3}	60
404		4×10^{-3}	60
1095		2×10^{-3}	60
0	Exoterma (agregación)	NO	NO
16		$4,25 \times 10^{-3}$	75
138		30×10^{-3}	74
404		56×10^{-3}	73
1095		79×10^{-3}	73

IV.1.4. Comparación del desarrollo de fluorescencia y color como potenciales marcadores de la reacción de Maillard.

Los productos fluorescentes provenientes de la reacción de Maillard son claramente distinguibles de la fluorescencia proveniente del triptofano, como se vio en las secciones anteriores. Con el objetivo de comparar el desarrollo de fluorescencia y color como potenciales marcadores de la reacción de Maillard, se estudió la cinética de la reacción en diferentes condiciones de un sistema modelo glicina-glucosa-*buffer*. Se emplearon diferentes condiciones de reacción cambiando el tipo de *buffer* utilizado (fosfato, acetato, citrato), el pH del mismo (4, 5 ó 6) y el agregado de sales al medio (NaCl, MgCl₂, KCl y LiCl).

Las características espectrales de fluorescencia fueron similares a las del sistema lisina-glucosa ya analizado e independientes del tipo de *buffer*, pH o sal agregada al sistema, siendo la longitud de onda de emisión máxima de 445 nm en todos los casos.

El desarrollo de fluorescencia (Figura 1.25.A) y de pardeamiento (Figura 1.25.B) en función del tiempo de almacenamiento presentaron curvas típicas a las observadas en sistemas modelo de la reacción de Maillard (Park y Kim, 1983; Pongor y col., 1984; Cerruti y col., 1985; Buera y col., 1987a; van Boekel, 2001). Estas curvas muestran un estado inicial de baja velocidad de reacción (denominada “período de inducción”) seguido por una evolución casi lineal con el tiempo de almacenamiento.

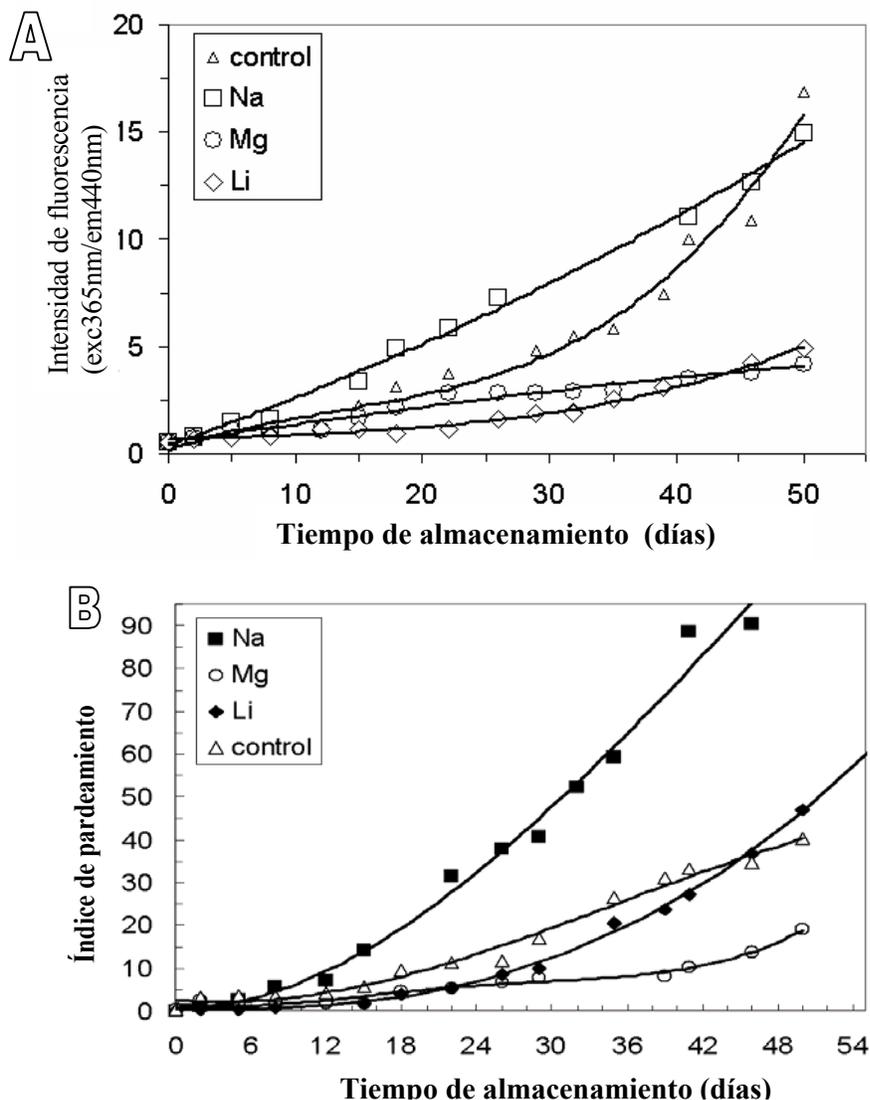


Figura 1.25. Desarrollo de fluorescencia (A) y pardeamiento (B) en función del tiempo de almacenamiento a 55°C de los sistemas glicina-glucosa-*buffer* acetato 0,1 M pH 6,84 (control) y con el agregado de cloruros de sodio (Na, ■), magnesio (Mg, ○) ó litio (Li, ◆). Curva predicha utilizando ecuación IV.3 (—).

Petriella y col. (1985) y Buera y col. (1987a) emplearon un modelo cinético de orden mixto que describe la forma de las curvas obtenidas, y se utilizó para comparar el efecto de los distintos componentes sobre la cinética de desarrollo de pardeamiento y de fluorescencia, separadamente, en las porciones inicial e intermedia de las curvas en función del tiempo.

La ecuación integrada del modelo es:

$$t = \frac{1}{K_0} \cdot (\phi - \phi_0) + \frac{1}{K_1} \cdot \ln(\phi - \phi_0) \quad (\text{ecuación IV.2})$$

Donde K_0 y K_1 son los coeficientes cinéticos de orden cero y 1, respectivamente (determinados a través de un programa de regresión no lineal que minimiza el cuadrado de las diferencias entre los valores predichos y los observados).

La ecuación IV.2 propuesta demostró describir los datos experimentales obtenidos tanto para el desarrollo de pardeamiento como de fluorescencia a lo largo del tiempo de almacenamiento (Figura 1.9). Los coeficientes K_0 y K_1 aumentaron significativamente con el aumento de pH. Además, los sistemas conteniendo *buffer* fosfato tuvieron un mayor desarrollo de color y fluorescencia que los otros *buffers* utilizados. El efecto de aceleración del fosfato en las reacciones de pardeamiento ha sido previamente observado por varios autores (Saunders y Jervis, 1966; Bobbio y col., 1973; Potman y Van Wijk, 1989; Bell, 1997; Matiacevich y Buera, 2006). Bell y Wetzal (1995) sugirieron que, en contraste con los *buffers* citrato o acetato, el aumento en la velocidad de reacción fue debida a la capacidad del anión fosfato para donar y aceptar simultáneamente protones necesarios en la compleja serie de reacciones que llevan al pardeamiento no enzimático.

Como se puede observar en la Figura 1.25, el coeficiente K_1 se encuentra relacionado al período inicial de la reacción. El sistema conteniendo NaCl tuvo mayor valor de K_1 , esto representó un menor período de inducción cuando se compara con los sistemas conteniendo LiCl o MgCl₂. Estos últimos presentaron similar grado de reacción en los primeros estadios (similar K_1), sin embargo, el coeficiente K_0 de los sistemas conteniendo LiCl fue mayor que el de los sistemas conteniendo MgCl₂. Estos resultados muestran que ambos coeficientes cinéticos deberían ser considerados para determinar el efecto de un dado componente de la mezcla (sal o *buffer*) en las condiciones globales de la reacción.

La relación (K_{1Br} / K_{1Fluo}), mostrada en la Tabla 1.6, se puede utilizar como una medida de las velocidades relativas de desarrollo de fluorescencia y color en el primer estadio (“período de inducción”). Cuando la relación es cercana a 1, el periodo de inducción o “lag” para ambas

reacciones es similar. Cuando la relación fue menor que 1, el desarrollo del pardeamiento es menor que el desarrollo de fluorescencia y cuando la relación es mayor que 1 se observa lo contrario. Los resultados indican que en los sistemas a pH 4, el pardeamiento se desarrolló a una velocidad mayor en las etapas iniciales de la reacción que el desarrollo de fluorescencia. Además, la presencia de la sal de magnesio, actuó como un inhibidor de la reacción (Figura 1.25 y Tabla 1.6) promoviendo el desarrollo de pardeamiento más rápido que el de fluorescencia en los primeros estadios. En los sistemas de mayor pH, los productos fluorescentes fueron detectados antes que cualquier cambio visible de pardeamiento. Estos resultados indican que la acumulación de productos fluorescentes depende tanto del tipo de *buffer* como del pH utilizado en el sistema.

Tabla 1.6: Relación entre los coeficientes cinéticos del desarrollo de pardeamiento (K_{1Br}) y de fluorescencia (K_{1F}) de los primeros estadios de la reacción para sistemas de diferente composición tratadas a 55°C. Efecto: $\uparrow Br$ = el desarrollo de pigmentos es más rápido que el de fluorescencia; $\uparrow Fluo$ = el desarrollo de fluorescencia es más rápido que el de pardeamiento; (=) = el desarrollo de ambos índices es parejo.

Sistema		K_{1Br} / K_{1Fluo}	Efecto
Buffer 0,1 M	sal		
Acetato pH 6,84	-	3,5	$\uparrow Br$
Acetato pH 5	-	0,93	(=)
Acetato pH 6,84	Sodio (acelerador)	0,8	$\uparrow Fluo$
Acetato pH 6,84	Magnesio (inhibidor)	2,4	$\uparrow Br$
Fosfato pH 6,84	-	0,6	$\uparrow Fluo$
Fosfato pH 5	-	4,1	$\uparrow Br$
Fosfato pH 4	-	25	$\uparrow Br$
Citrato pH 5	-	0,4	$\uparrow Fluo$
Citrato pH 4	-	8,7	$\uparrow Br$

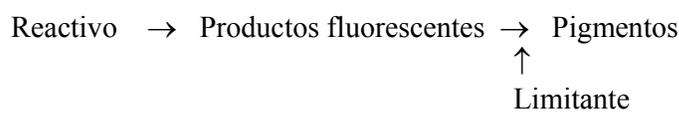
Es importante notar que si los compuestos fluorescentes fueran productos intermediarios de la reacción, deberían ser detectados siempre antes que los productos pardos. Sin embargo, cuando la reacción ocurre en condiciones desventajosas para su desarrollo (bajo pH o presencia de sales inhibidoras o retardantes de la reacción), la medición de pigmentos fue más sensible que las mediciones de fluorescencia en estadios tempranos de la reacción. Se puede proponer entonces que, en estas condiciones, los compuestos fluorescentes se consumen

rápidamente (a pesar de la baja velocidad de reacción para el desarrollo de color) ó que su formación es menos favorable.

Los siguientes esquemas de la reacción son propuestos para explicar los resultados obtenidos:

a) Los fluoróforos y pigmentos se forman en reacciones consecutivas (generalmente aceptado)

Si el proceso limitante de la reacción fuera la transformación de productos fluorescentes en pigmentos, la constante cinética $K_{\text{Fluorescencia}}$ debería ser mayor que la $K_{\text{Pardeamiento}}$, y debería ocurrir acumulación de productos fluorescentes, lo cual fue observado sólo en condiciones ventajosas para la reacción.



La mayoría de los trabajos que estudiaron la reacción de Maillard analizaron esta situación y por lo tanto, los productos fluorescentes fueron propuestos como marcadores tempranos para seguir la cinética la reacción, cuando no hay cambios visibles (Overby y Frost, 1951; Baisier y Labuza, 1992; Labuza, 1994). Es importante notar que la disminución de la fluorescencia no se observó en etapas avanzadas, lo cual hubiera sido esperable si fueran realmente intermediarios de la reacción.

b) El desarrollo de compuestos fluorescentes y pigmentos pardos ocurre en reacciones paralelas.

Reactivos \rightarrow Productos fluorescentes.

Reactivos \rightarrow Pigmentos.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este y otros trabajos recientes, los productos fluorescentes se pueden considerar como productos finales de la reacción de Maillard (Obayashi y col., 1996; Morales y van Boekel, 1997; Tessier y col., 2002; Song y col., 2002). En condiciones favorables, la constante cinética del desarrollo de productos fluorescentes sería mayor que la de productos pigmentados. Sin embargo, en condiciones desventajosas, la reacción global es más lenta y el desarrollo de pigmentos se encuentra favorecido.

Por lo tanto, los compuestos fluorescentes no pueden considerarse indicadores tempranos universales de la reacción de Maillard y para cada sistema en particular se debe definir el índice que refleje el grado de reacción.

El diagrama presentado en la Figura 1.26 (Matiacevich y col. 2005) muestra dos casos hipotéticos de desarrollo relativo de la reacción de Maillard y el daño funcional de biomoléculas, en función del tiempo (en unidades arbitrarias). El daño funcional en sistemas biológicos se manifiesta por inactivación enzimática, entrecruzamiento de proteínas, deterioro de la salud o disminución de la viabilidad de las semillas, mientras que en alimentos puede observarse al desarrollo de color y/o sabores, cambios en textura (debidas a entrecruzamiento de proteínas) o daño nutricional.

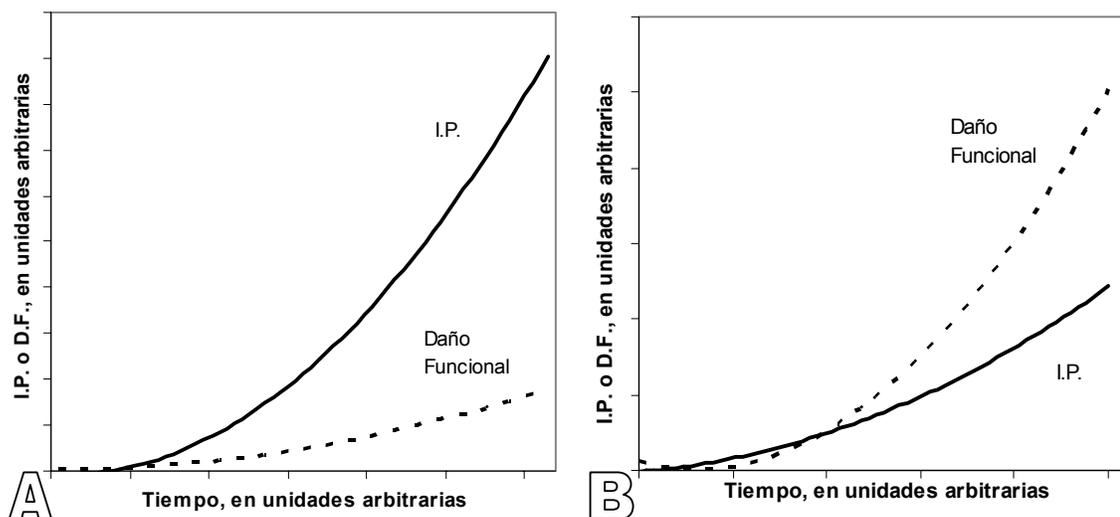


Figura 1.26. Diagrama hipotético de desarrollo de la reacción de Maillard y el daño funcional en función del tiempo (en unidades arbitrarias). **(A)** Desarrollo de la reacción de Maillard en condiciones favorables para la misma. **(B)** Desarrollo de la reacción de Maillard en condiciones no favorables para la misma. **I.P.:** Índice de pardeamiento; **D.F.:** Daño funcional. (Matiacevich y Buera, 2006).

Los compuestos de Maillard pueden desarrollarse antes que un daño funcional (Figura 1.26.A), o pueden detectarse después de otras manifestaciones de cambios de deterioro (Figura 1.26.B).

Cuando se compararon la cinética del desarrollo de los compuestos de Maillard y otros cambios deteriorativos, como por ejemplo pérdida nutricional (Figura 1.26.A), se observó que en sistemas expuestos a condiciones favorables (alta temperatura, y/o pH neutro y/o en

presencia de especies altamente reactivas), los productos de Maillard son detectables antes de cualquier cambio funcional o nutricional. Por otro lado, la Figura 1.26.B representa la situación observada en sistemas bajo condiciones desfavorables para la reacción (bajo pH, presencia de sales inhibidoras, baja temperatura). En este caso, los productos de Maillard recién aparecen en las etapas finales, cuando biomoléculas importantes ya han sufrido daño (Matiacevich, y col. 2005; Matiacevich y Buera, 2006).

Es importante aclarar que el desarrollo de productos intermediarios de la reacción de Maillard y el deterioro nutricional (por lo tanto, de biomoléculas de interés) pueden ocurrir aunque la formación de pigmentos esté inhibida (Adhikary, 1973; Oberby y Frost, 1952). La ausencia de color no asegura la ausencia de reacción ni de pérdida del valor nutritivo. Por ejemplo, la funcionalidad de las proteínas puede estar alterada, ya que los aminoácidos básicos reaccionan con los azúcares al principio del proceso, es decir, mucho antes de que se desarrollen los pigmentos. En consecuencia, cualquier sistema que contenga proteínas y azúcares y se someta a tratamiento térmico, aunque sea a temperaturas no muy altas y durante corto tiempo, puede sufrir pérdidas de aminoácidos esenciales y, por lo tanto de su valor nutritivo y funcionalidad de componentes (Hodge y Osman, 1982).

IV.1.5. Modificación de la cinética de Maillard por la presencia de $MgCl_2$

En base a estudios previos sobre la modificación de la cinética de la reacción de Maillard por la presencia de ciertas sales (sección 1.4; Petriella y col., 1985; Santagapita y Buera, 2006; Matiacevich y Buera, 2006) el propósito de este estudio fue investigar el efecto del $MgCl_2$ incluyendo además el análisis de la movilidad molecular sobre los cambios relativos de fluorescencia y color en sistemas de distinto contenido acuoso almacenados a 70°C. Se analizaron los siguientes sistemas:

- A. Sistemas líquidos glucosa-glicina (5-70% p/v)
- B. Sistemas líquidos sacarosa-glicina (5-70% p/v)
- C. Sistemas líquidos trehalosa-glicina (5-70% p/v)
- D. Sistemas liofilizados trehalosa-glicina (almacenados en el rango de 0 a 97% de humedad relativa, con lo que se obtiene sistemas de 6 a 30% de contenido acuoso).

IV.1.5.1. Efectos sobre la fluorescencia y el pardeamiento

La Figura 1.27 muestra los espectros de emisión de fluorescencia de los distintos sistemas analizados con y sin la sal $MgCl_2$. La intensidad de fluorescencia a 492 nm (excitación a 340 nm) fue insignificante a tiempo cero de incubación y aumentó con el tiempo de almacenamiento. El pico, producido por la dispersión Raman del agua fue observado cercano a 420 nm y no interfirió con las mediciones de los productos fluorescentes generados por la reacción de Maillard. Además, las muestras control sin aminoácidos no desarrollaron fluorescencia y sólo se obtuvo un leve color amarillento en las condiciones estudiadas. Así, la caramelización debida a la reacción del azúcar en cada sistema no contribuyó significativamente ni a la fluorescencia ni al desarrollo de pardeamiento. Los resultados observados en la Figura 1.12 para todos los sistemas indicaron que la presencia de la sal no afectó el tipo de fluoróforo generado durante la reacción. Además, como el espectro es cualitativamente semejante para todos los sistemas estudiados, los compuestos fluorescentes formados poseen las mismas características espectrofluorimétricas independientemente del azúcar utilizado como reactivo.

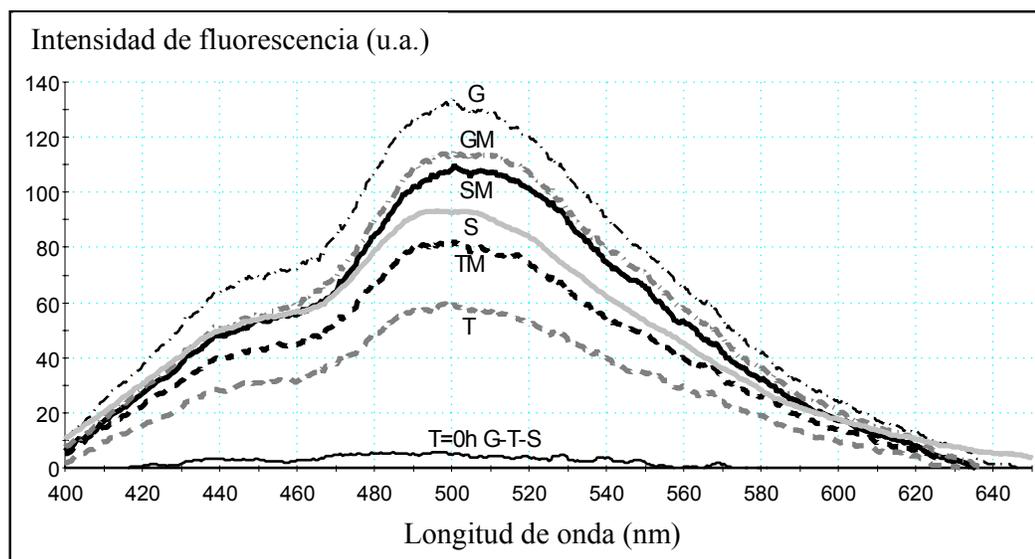


Figura 1.27. Espectros de emisión de fluorescencia (excitación 340 nm). Sistemas líquidos de una concentración de 40% p/v, al mismo tiempo de almacenamiento a 70°C (120 h). Los espectros no fueron normalizados por la dilución correspondiente (Absorbancia a 340 nm menor que 0,1): glucosa-glicina (G); glucosa-glicina- $MgCl_2$ (GM); sacarosa-glicina (S); sacarosa-glicina- $MgCl_2$ (SM); trehalosa-glicina (T); trehalosa-glicina- $MgCl_2$ (TM); sistema control sin almacenamiento que fue igual para todos los sistemas e igual al control de caramelización (T=0h G-T-S).

El cambio visual del color en el tiempo fue el mismo mostrado en la Figura 1.2, pero con diferentes velocidades (Figura 1.28). Al igual que lo observado previamente, la composición de los sistemas, tipo de azúcar y presencia de sal, afectó la cinética de la reacción sin afectar las características cromáticas o fluorescentes de sus productos e intermediarios.



Figura 1.28. Fotografía digital del sistema trehalosa-glucosa-*buffer* en ausencia (A) ó presencia de 0,28 M de $MgCl_2$ (B) a distintos tiempos (0 a 144 h) de almacenamiento a $70^\circ C$, como ejemplo del cambio visual observado durante la reacción de Maillard.

En la Figura 1.29, se muestra el desarrollo de pardeamiento de los sistemas para una concentración de azúcar de 40% p/v en ausencia de sal. La velocidad relativa entre los azúcares fue igual a las otras concentraciones estudiadas.

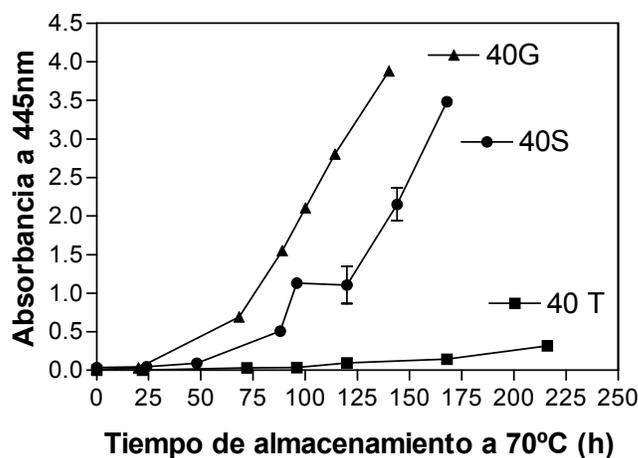


Figura 1.29 Desarrollo de pardeamiento (absorbancia a 445 nm) en función del tiempo de almacenamiento a $70^\circ C$ de los tres sistemas líquidos analizados a una concentración de azúcar de 40% p/v: glucosa-glicina (G); sacarosa-glicina (S); trehalosa-glicina (T). La absorbancia fue multiplicada por el factor de dilución correspondiente realizado a cada tiempo.

En la Figura 1.30 se muestra el desarrollo de fluorescencia (i) (excitación 340 nm/ emisión 492 nm) y de pigmentos pardos (absorbancia a 445nm) (ii) observado durante el almacenamiento de sistemas con y sin $MgCl_2$ para los sistemas líquidos glucosa-glicina (A), sacarosa-glicina (B) y trehalosa-glicina (C), todas a una concentración de azúcar de 70% p/v.

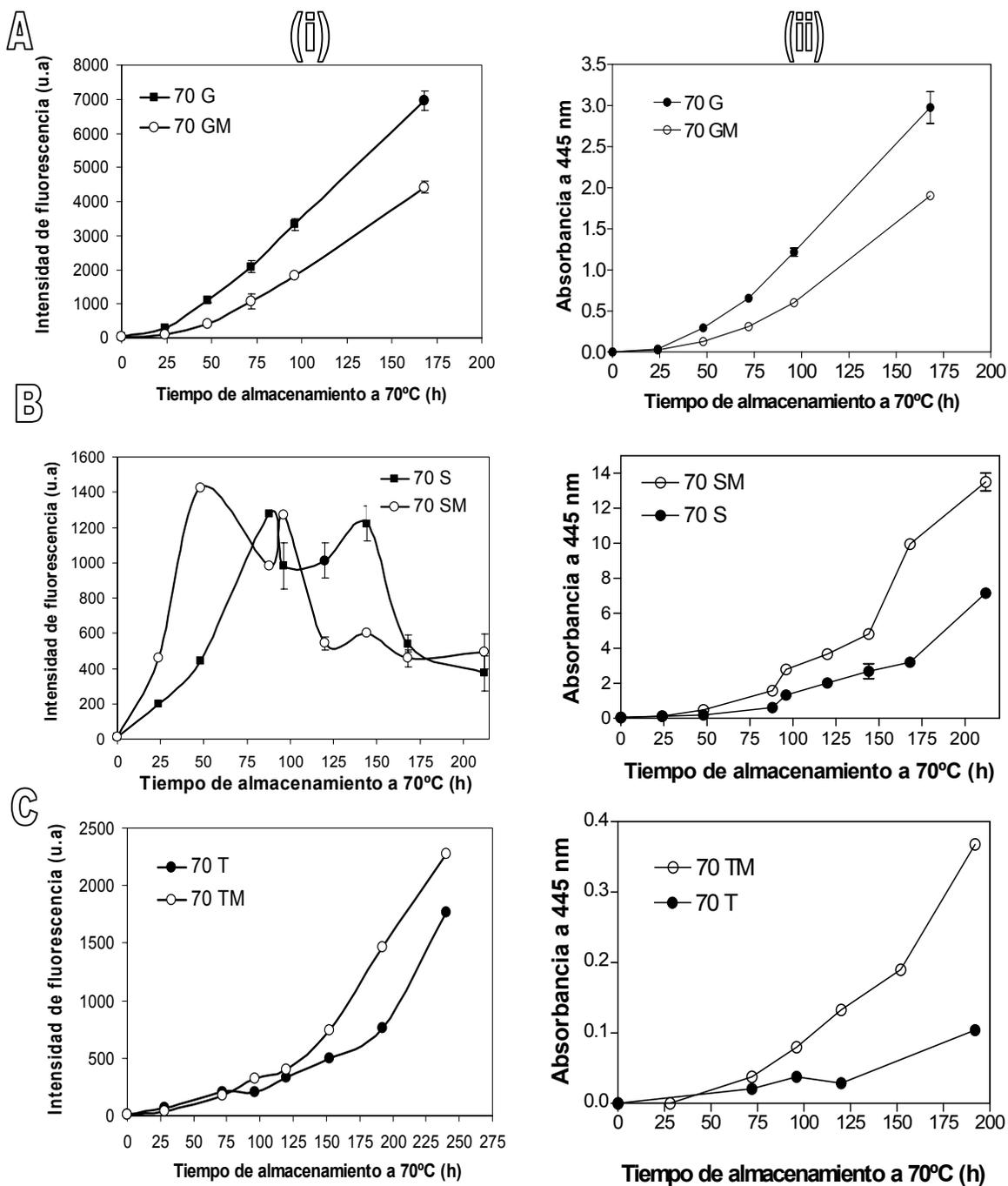


Figura 1.30. Desarrollo de compuestos fluorescentes (i) ó de pardeamiento (ii) durante el almacenamiento a 70°C con y sin la presencia de $MgCl_2$ para los sistemas líquidos trehalosa-glicina (A), sacarosa-glicina (B) y glucosa-glicina (C). La absorbancia fue multiplicada por el factor de dilución correspondiente realizado a cada tiempo.

Si bien las Figuras 1.29 y 1.30 muestran una de las concentraciones estudiadas (70% p/v ó 40% p/v) para todos los sistemas, el progreso de la reacción fue dependiente de la composición (azúcar) del sistema líquido. El efecto de la sal sobre el desarrollo de compuestos fluorescentes y pardeamiento fue cualitativamente similar a las concentraciones de azúcar utilizadas en este estudio (5-70% p/v).

El sistema conteniendo trehalosa desarrolló un grado de pardeamiento despreciable, comparado con el de glucosa (Figura 1.28) como era esperado, debido a que la trehalosa es un azúcar no reductor y su participación en la reacción de Maillard sólo ocurre luego de su hidrólisis (por la cual se generan dos moléculas de glucosa). Es conocido que la trehalosa es muy estable a la hidrólisis (Schebor y col., 1999), pero durante el tratamiento a 70°C se detectó un grado de hidrólisis apreciable. El desarrollo de pardeamiento fue dos veces más rápido en los sistemas conteniendo MgCl₂.

En cambio, en el sistema glucosa-glicina, la presencia de sal produjo una disminución significativa tanto de los compuestos fluorescentes (excitación a 340 nm/ emisión a 492 nm) como de los pigmentos pardos para todas las concentraciones analizadas (Figura 1.29). El resultado obtenido de inhibición de la reacción por la presencia de la sal fue acorde con lo discutido en el punto 1.4, extendiéndolo así un rango amplio de concentraciones.

El MgCl₂ tuvo una alta capacidad de inhibir la reacción de pardeamiento en los sistemas líquidos conteniendo glucosa (5-70 % p/v) pero en los sistemas conteniendo trehalosa (5-70 % p/v) la reacción fue acelerada. Es interesante notar que en ambos sistemas participa el mismo reactivo (glucosa) en la reacción de pardeamiento, y se puede hipotetizar que la presencia de trehalosa en los sistemas conteniendo el MgCl₂ y/o sus interacciones con el agua podrían jugar un rol importante en el desarrollo de la reacción.

La participación de la sacarosa en la reacción ocurre luego de su hidrólisis por la generación de moléculas de glucosa y de fructosa. El desarrollo de pardeamiento en el sistema de sacarosa fue mayor que el sistema conteniendo trehalosa (Figura 1.29) y esto fue debió a la mayor velocidad de hidrólisis de la sacarosa y a la presencia de fructosa en el sistema, debido a su mayor reactividad en la reacción de Maillard, en comparación con la glucosa (Reyes y col., 1982). La presencia de sal en este sistema produjo un aumento del desarrollo de pardeamiento, al igual que lo observado en el sistema de trehalosa.

Para analizar los efectos de la sal y tipo de azúcar en sistemas de humedad restringida, se liofilizaron sistemas de trehalosa-glicina-*buffer* (20% p/v) con y sin MgCl₂, se equilibraron a diferentes humedades relativas (22-84% HR) y se trataron a 70°C por diferentes tiempos.

En la Figura 1.31 se muestran las fotografías digitales de los sistemas almacenados a humedades relativas de 52% (A) y 84% (B).



Figura 1.31. Fotografías digitales de los sistemas trehalosa-glicina al 20% p/v almacenados a 70°C durante diferentes tiempos de almacenamiento a una humedad relativa de 52% (A) ó 84% (B) en presencia (i) o no (ii) de $MgCl_2$.

Como se observa en la figura, se produjo encogimiento estructural o colapso de la matriz liofilizada en todas las humedades relativas estudiadas, lo que se debe a que se encontraban inicialmente vítreas al final de la liofilización pero al exponerse a temperatura y humedad pasaron al estado sobre-enfriado. Se observó también un máximo pardeamiento en el sistema almacenado a 52% de humedad relativa. La reacción de Maillard tiene velocidad máxima a humedades relativas intermedias, ya que a bajas humedades hay impedimentos difusionales de los reactivos y a altas humedades la mayor cantidad de agua en la matriz produce inhibición de la reacción por que el agua es producto final en las reacciones de condensación que generan los pigmentos pardos (Labuza y col., 1977).

El desarrollo de pardeamiento fue menor en los sistemas que contenían $MgCl_2$ en todas las humedades relativas estudiadas. Se observa una mayor absorción de agua en los sistemas con sal, la cual estaría actuando como inhibidora por producto final.

Para las determinaciones de fluorescencia y de pardeamiento de los sistemas sólidos almacenados a diferentes humedades relativas, los sistemas liofilizados fueron resuspendidos en agua. En la Figura 1.32 se muestra el desarrollo de fluorescencia (A) (excitación 340 nm/emisión 492 nm) y de pigmentos pardos, a través de la absorbancia a 445 nm (B) para los sistemas resuspendidos.

Se puede observar que para todas las condiciones de almacenamiento del sistema sólido, la presencia de la sal produjo una importante inhibición del desarrollo de pardeamiento, ampliando el rango de humedades relativas a las cuales se obtuvo el mismo resultado en estudios previos (Santagapita y Buera, 2006).

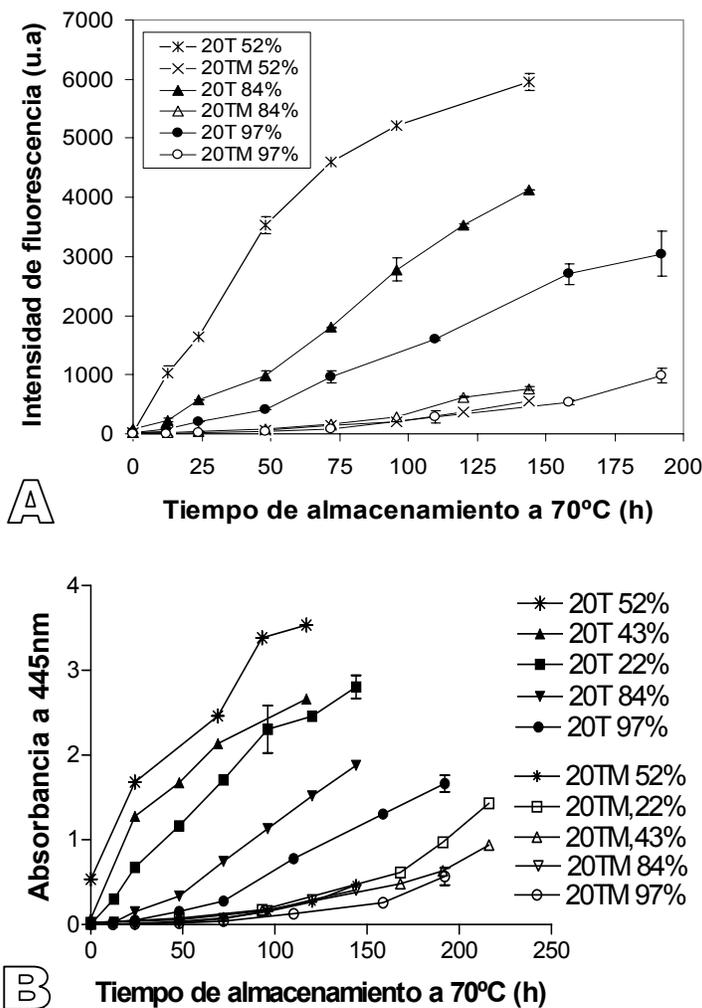


Figura 1.32. Desarrollo de compuestos fluorescentes **(A)** ó de pardeamiento **(B)** durante el almacenamiento a 70°C con (TM) y sin (T) la presencia de MgCl₂ para los sistemas liofilizados trehalosa-glicina 20% p/v almacenado a diferentes humedades relativas (%). Los sistemas fueron resuspendidos en agua y la absorbancia fue multiplicada por el factor de dilución correspondiente.

IV.1.5.2. Efecto sobre la cristalización de la trehalosa.

Debido que los estados sobresaturados o sobre-enfriados en los que se encontraban las muestras son susceptibles de inducir cristalización de azúcar, los sistemas liofilizados fueron

observados bajo la lupa (aumento de 23X), utilizando filtros polarizadores para la visualización de cristales (Figura 1.33). Se observa que en ausencia de sal la matriz se encuentra principalmente en forma cristalina (A) ya que se detectan cristales pertenecientes al azúcar, los cuales se observan en menor cantidad en algunas zonas dentro de una matriz amorfa (B) en el sistema que contiene la sal.

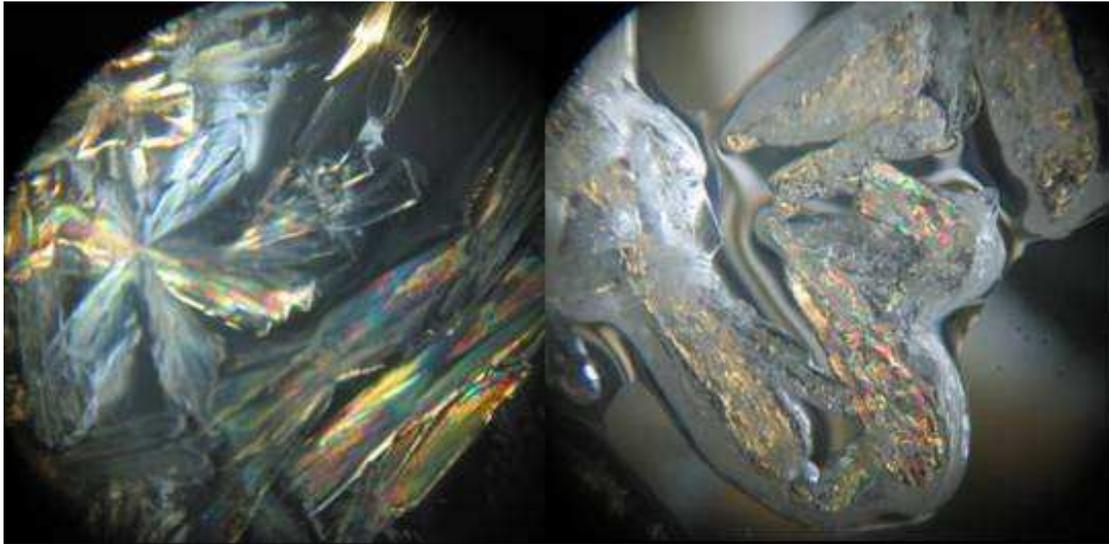


Figura 1.33. Fotografía digital obtenido bajo la lupa (23X) de los sistemas trehalosa-glicina (A) y trehalosa-glicina-MgCl₂. (B) almacenados durante 150 h a una humedad relativa de 44%.

Este resultado fue corroborado por calorimetría diferencial de barrido (Figura 1.34). Se observa en los termogramas obtenidos que la presencia del MgCl₂ produjo menor entalpía de fusión de cristales presentes del azúcar (que ocurre aproximadamente a 90°C). Ya que la fusión refleja la cantidad de azúcar cristalizada, esto indica un retardo o inhibición de la cristalización de trehalosa. Estudios previos a 22% y 44% HR., mostraron que la presencia de la sal MgCl₂ inhibió/retrasó la cristalización de la trehalosa a esas humedades (Mazzobre y Buera, 1999; Santagapita y Buera, 2006).

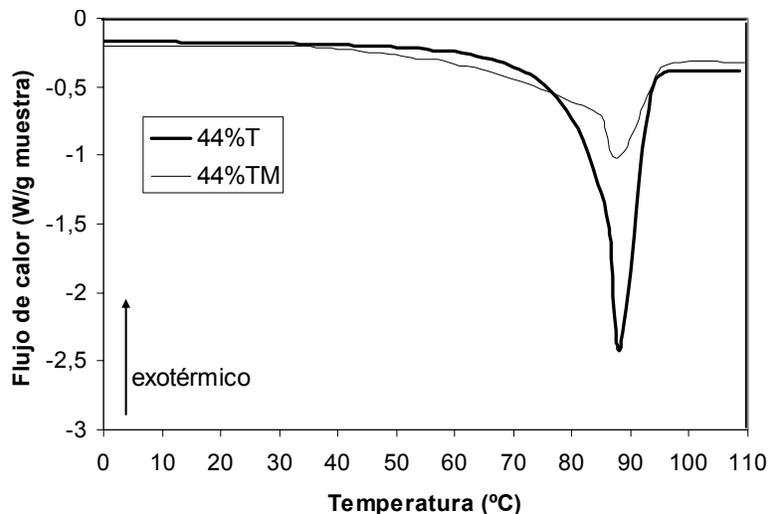


Figura 1.34. Termograma obtenido por calorimetría diferencial de barrido durante el calentamiento desde 0 a 110°C de los sistemas trehalosa-glicina (T) y trehalosa-glicina-MgCl₂ (TM) almacenados durante 150 h a 44% de humedad relativa.

El porcentaje de cristalización de trehalosa en presencia o no de la sal en los sistemas almacenados a las diferentes humedades relativas estudiadas fue calculado a partir de la ecuación IV.3:

$$\phi = \left(\frac{\Delta H_{f\text{muestra}}}{139} \right) * 100 \quad (\text{ecuación IV.3})$$

Donde ϕ es el porcentaje de cristalización de trehalosa, $\Delta H_{f\text{muestra}}$ es la entalpía de fusión de la muestra, 139 es la entalpía de fusión de una muestra de trehalosa cristalina pura en las mismas condiciones de medición que las muestras.

La Tabla 1.7 muestra los valores de temperatura del pico correspondiente a la fusión de los cristales de trehalosa y el porcentaje de cristalización de trehalosa para los distintos sistemas almacenados. Se observó una disminución significativa del porcentaje de trehalosa cristalizada en los sistemas conteniendo la sal, sin afectar significativamente la temperatura del pico de fusión. Se observó además una tendencia a la disminución del porcentaje de cristalización de la trehalosa con el aumento de la humedad relativa de almacenamiento. Esto se debe a una mayor solubilización de trehalosa al aumentar la cantidad de agua disponible.

Tabla 1.7. Valores de temperatura obtenidos atribuidos al pico correspondiente a la fusión de los cristales de trehalosa (T° pico) y el porcentaje de cristalización de trehalosa (ϕ) para los sistemas trehalosa-glicina en ausencia (T) o presencia (TM) de la sal $MgCl_2$ almacenados a distintas humedades relativas (HR).

	HR (%)	T° PICO	ϕ (%)
20T	44	87,82	69,3
20TM	44	87,63	47,08
20T	52	90,61	73,73
20TM	52	93,06	43,07
20T	84	83,7	48,20
20TM	84	78,83	33,55
20T	97	78,37	45,76
20TM	97	80,73	38,37

IV.1.5.3. Cambios de pH

El desarrollo de la reacción de Maillard causa la reducción del pH debido al bloqueo de los grupos amino y a la formación de compuestos ácidos. A pesar de que en todos los sistemas se utilizó una solución tampón o *buffer* (0,1 M), se observó un decrecimiento del pH durante el transcurso de la reacción (Figura 1.35). El cambio de pH en función del tiempo fue mayor en ausencia de la sal para ambos sistemas (glucosa o trehalosa) que en presencia de ésta, reflejando su correlación con el transcurso de la reacción.

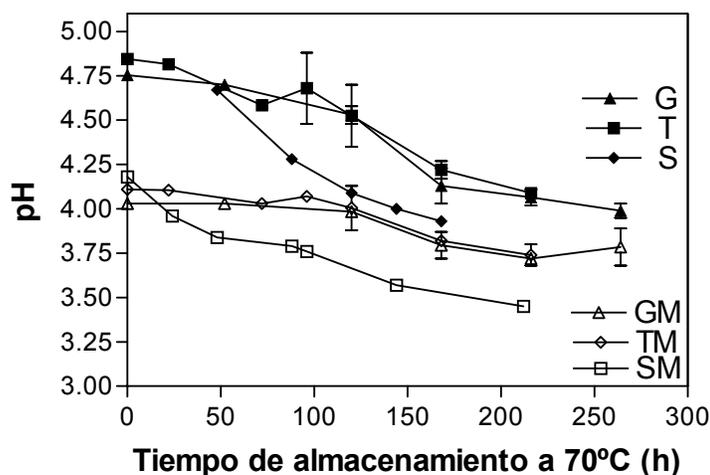


Figura 1.35. Valor de pH con el tiempo de almacenamiento a 70°C del sistema trehalosa-glicina (T) ó glucosa-glicina (G) con o sin el agregado de $MgCl_2$.

IV.1.5.4. Relación entre el contenido de agua y la cinética de reacción.

En la Figura 1.36 se muestra la relación entre la constante cinética desarrollo de pigmentos pardos para el sistema trehalosa-glicina en función del contenido de agua de los sistemas. En este caso se observó que el desarrollo de pigmentos se adaptaba más a una relación cuadrática ($R^2 > 0,98$) con el tiempo de reacción. Una dependencia de este tipo indica una reacción de orden $\frac{1}{2}$, que es una solución global del análisis que implica desdoblar las etapas entre orden 0 y 1 (sección 1.4).

Se observó que la presencia de $MgCl_2$ produjo inhibición en la cinética de Maillard a bajas concentraciones de agua en la matriz (sistemas sólidos), sin embargo, a medida que la cantidad de agua en la matriz fue mayor, (sistemas líquidos) el magnesio aceleró la reacción.

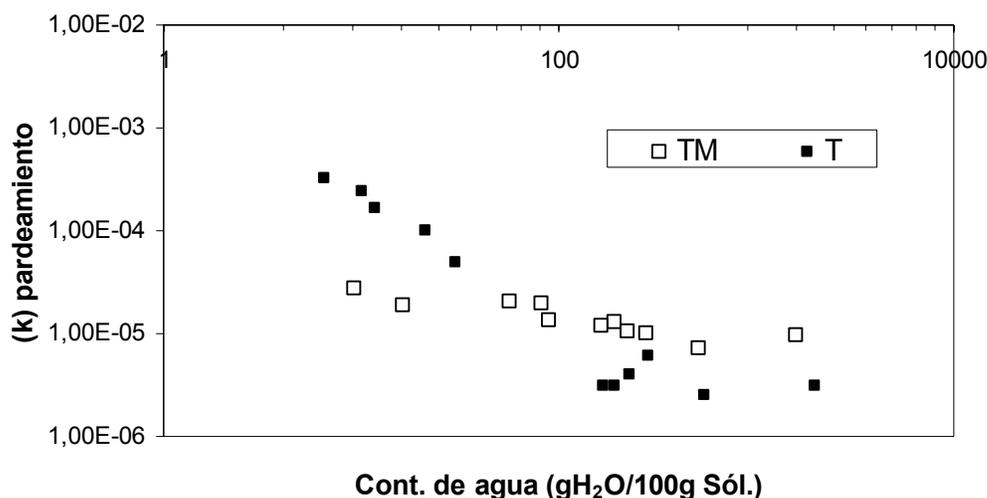


Figura 1.36. Constante cinética de pardeamiento en función del contenido de agua del sistema trehalosa-glicina con (TM) y sin (T) la presencia de $MgCl_2$.

IV.1.5.5. Efecto sobre la movilidad molecular (1H -RMN)

Ciertos efectos del $MgCl_2$ sobre la cinética de desarrollo de color y fluorescencia se atribuyeron a la interacción de la sal con el agua ya que ésta influye sobre la reacción de diferentes maneras.

El estudio del tiempo de relajación transversal espín-espín (T_2) por 1H -RMN puede proveer información acerca de la movilidad y de la disponibilidad de los protones del sistema.

Los valores de T_2 obtenidos por el método CPMG para los sistemas con glucosa, sacarosa o trehalosa se muestran en la Tabla 1.7 y su respectivo análisis se muestra en la Tabla 1.8.

En todos los sistemas analizados se obtuvieron dos poblaciones de valores con tiempos de relajación T_2 (T_{2S} y T_{2L}) que se relacionan con poblaciones de protones con diferentes grados de movilidad. Los protones correspondientes a los sólidos o al agua interactuando fuertemente con ellos presentan menores tiempos de relajación, y se designaron T_{2S} . Los protones del agua que interactúa menos fuertemente con los sólidos (libre o *bulk*) presentan mayores tiempos de relajación y se designaron T_{2L} . La población T_{2S} tuvo valores en el rango entre 140 y 500 ms (comprendiendo el 5-25% de la población total) y la otra con T_{2L} entre los 800 y 2500 ms (representando el 75-95% de la población total).

Tabla 1.7. Datos de tiempo de relajación transversal espín-espín obtenido por resonancia magnética nuclear (T_{2L}). T_{2L} corresponde a la relajación del agua libre.

Sistema (glicina +)	Concentración (% p/v)	Tiempo (h)	Sin MgCl ₂		Con MgCl ₂	
			T_{2S} (ms)	T_{2L} (ms)	T_{2S} (ms)	T_{2L} (ms)
Glucosa	50	0	138±7	2184±8	190±20	859±4
		168	374±5	1033±4	290±10	926±4
	60	0	160±20	693±4	200±10	728±4
		168	285±5	864±3	250±8	811±4
	70	0	130±20	589±3	90±20	569±3
		168	261±4	764±2	120±10	623±3
Sacarosa	5	0	440±30	2470±10	380±30	2249±10
		168	460±60	1943±10	500±100	2000±10
	40	0	249±2	1386±2	235±2	1306±2
		168	388±6	1203±3	433±6	1111±4
	70	0	127±3	794±3	88±9	681±6
		168	210±5	796±3	150±10	656±4
Trehalosa	50	0	230±2	1191±2	180±5	1035±5
		192	214±2	1176±2	171±5	998±4
	60	0	184±1	1009±1	150±10	1065±10
		192	186±1	1021±2	154±2	860±3
	70	0	164±1	895±1	142±3	840±3
		192	155±1	887±1	128±2	740±3

Los sistemas conteniendo trehalosa y sacarosa tuvieron mayores valores de T_2 (T_{2S} y T_{2L}) que los sistemas conteniendo glucosa, como una consecuencia de la mayor proporción de moléculas de azúcar por moléculas agua en el sistema conteniendo glucosa para igual concentración en masa de sólidos.

Al aumentar la concentración de azúcar, ambos valores de T_2 disminuyeron para todos los sistemas analizados, como consecuencia del aumento de una movilidad reducida de los protones del sistema debida a la mayor concentración (Figura 1.37).

Tabla 1.8. Análisis de los datos de tiempo de relajación transversal espín-espín obtenido por resonancia magnética nuclear (T_{2L}) en función de la interacción agua-azúcar ($f(\text{MgCl}_2)$) y en función de la interacción pigmentos-agua ($f(\text{pigmentos})$).

Sistema	% p/v	$f(\text{MgCl}_2)^a$ (%)	$f(\text{pigmentos})^b$ (%)				
			sin MgCl_2		con MgCl_2		
Sacarosa	5	0,91 ^c	MgCl ₂ redujo la movilidad del agua	0,79	Los pigmentos disminuyeron la movilidad molecular	0,89	MgCl ₂ redujo la movilidad del agua
	40	0,94		0,87		0,85	
	70	0,86		1		0,96	
Glucosa	50	1,02	Interacción agua-azúcar: no se modificó por MgCl ₂	1,21	Los pigmentos aumentaron la movilidad del agua	1,08	Los pigmentos aumentaron levemente la movilidad del agua
	60	1,05		1,15		1,10	
	70	0,97		1,16		1,09	
Trehalosa	5	0,92	MgCl ₂ redujo la movilidad del agua	0,88	Los pigmentos no modificaron la movilidad del agua	0,84	MgCl ₂ redujo la movilidad del agua
	20	0,87		1,02		1,04	
	40	0,92		0,95		1,01	
	50	0,87		0,99		0,82	
	60	0,89		1,04		0,94	
	70	0,94		1,09		0,84	

^a $f(\text{MgCl}_2) = T_{2L}$ inicial con MgCl_2 / T_{2L} inicial sin MgCl_2 .

^b $f(\text{pigmentos}) = T_{2L}$ en presencia de pigmentos / T_{2L} en ausencia de pigmentos.

^c Valores < 1 indica mayor orden de las moléculas y menor movilidad del agua.

Valores > 1 indica lo opuesto.

La presencia de la sal MgCl_2 tuvo un efecto diferente en los valores de T_2 en los sistemas conteniendo glucosa que en los sistemas conteniendo trehalosa o sacarosa: mientras que en el sistema conteniendo glucosa, los valores de T_2 fueron poco afectados (la interacción agua-glucosa no fue modificada por la sal), en los sistemas conteniendo trehalosa o sacarosa, los valores de T_2 fueron entre un 6 y 14% menores en presencia de la sal. Estos menores valores de T_2 obtenidos reflejan que la sal impuso un cierto orden local a las moléculas de agua, reduciendo su movilidad (Tabla 1.8, columna $f(\text{Mg})$). De acuerdo con los estudios de Miller y de Pablo (2000) el ambiente cercano a los iones contenidos en un sistema de trehalosa tiene más moléculas de agua respecto a las correspondientes a una distribución uniforme del agua. Esto explica los menores valores de T_2 obtenidos.

Para una dada concentración de pigmentos (fijada por un valor de absorbancia de 0,18) se comparó el efecto de la sal (Tabla 1.8, columna $f(\text{BP})$). En el sistema conteniendo trehalosa sin sal, la presencia de pigmentos marrones no modifican los valores de T_2 , mientras que en presencia de sal, los valores de T_2 disminuyeron, de acuerdo al efecto de la sal previamente analizado. En los sistemas con glucosa, en cambio, la presencia de pigmentos marrones aumentó los valores de T_2 (con o sin la presencia de Mg), aunque fue observado un menor

aumento en presencia de MgCl_2 (Tabla 1.8, columna f(BP)). Esta modificación de los valores de T_2 en el sistema glucosa-pigmentos- MgCl_2 puede estar asociado a una interacción pigmento- MgCl_2 (considerando que la interacción glucosa-agua no fue modificada por la presencia de la sal), lo cual reduce la interacción pigmento-agua. Esta interacción pigmento- MgCl_2 coincide con estudios previos de O'Brian y Morrissey (1997), los cuales observaron una complejación entre el magnesio y los productos de Maillard.

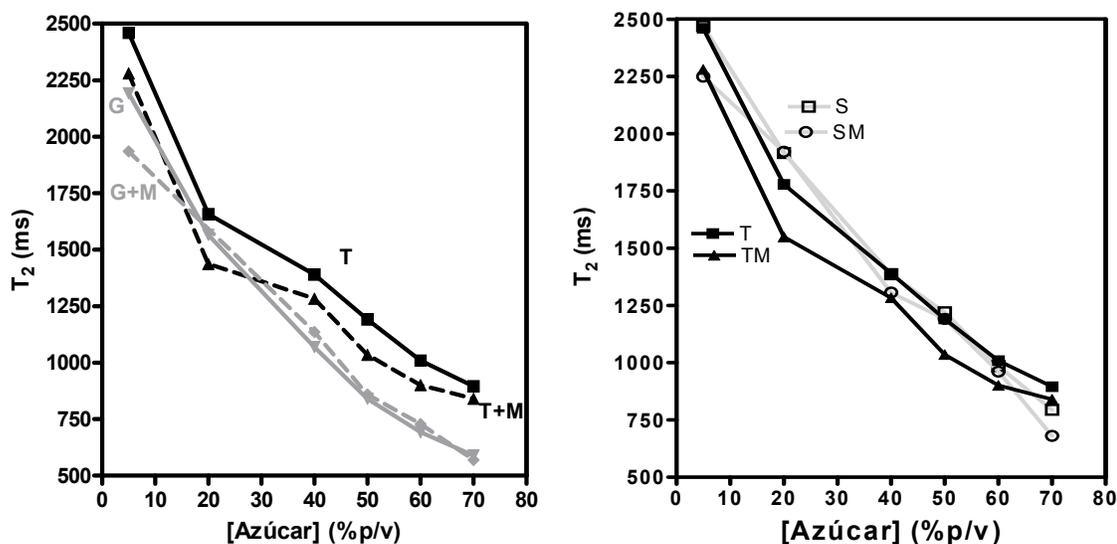


Figura 1.37. Variación de T_2 en función de la concentración de azúcar en presencia o ausencia de MgCl_2 (M).

Se puede proponer que la diferente interacción con el agua dependiendo del tipo de azúcar (Suggett y col. 1976, Birch y col. 1989) y la interacción/complejación entre el MgCl_2 y los pigmentos generados durante la reacción de Maillard en los sistemas conteniendo glucosa (O'Brian y Morrissey, 1997) y en los sistemas de trehalosa a bajas concentraciones de agua podría ser responsable de la inhibición de la reacción de pardeamiento en estos sistemas, aún cuando el sistema sin sal tuvo mayor movilidad que en presencia de sal. En los sistemas conteniendo trehalosa con alto contenido de agua, la reacción de pardeamiento fue acelerada por la presencia de MgCl_2 debido a la reducción de la movilidad del agua causada por la presencia de sal (menores valores de T_2 obtenidos), reduciendo el efecto de inhibición por producto generado por el agua.

*IV. Capítulo 2.
Fotoestabilidad de compuestos
fluorescentes y pigmentos pardos*

IV.2.1. Irradiación directa con UV-Visible

En esta sección se analiza la fotoestabilidad de compuestos fluorescentes y pardos generados por la reacción de Maillard (provenientes de sistemas modelo aminoácido-glucosa o proteína-glucosa) y de compuestos pardos polifenólicos, empleando irradiación directa a la longitud de onda de excitación de los fluoróforos ó realizando irradiación del agente sensibilizante agregado al sistema. En todos los casos la máxima variación de temperatura fue de $\pm 2^{\circ}\text{C}$, por lo que no influyó en los resultados.

IV.2.1.1. Sistemas modelo líquidos de Maillard

a) Efectos sobre el color

Se analizaron sistemas líquidos modelo lisina-glucosa-*buffer* ó proteína de suero lácteo (WP)-glucosa- *buffer*.

Al cabo del almacenamiento a distintos tiempos de los sistemas a 55 ó 70°C , en que se desarrolló la reacción de Maillard, se realizó la irradiación durante 1 h con:

- i) tubo de luz a 350 nm de potencia $0,28 \pm 0,02 \text{ mW/cm}^2$.
- ii) lámpara de luz a 365 nm de potencia $1,76 \pm 0,01 \text{ mW/cm}^2$.
- iii) lámpara de luz a 340 nm de potencia de $14,1 \pm 1,8 \text{ mW/cm}^2$.
- iv) tubo de luz visible de potencia de $4,5 \pm 0,5 \text{ mW/cm}^2$.
- v) lámpara de luz visible de potencia $16,02 \pm 0,02 \text{ mW/cm}^2$.
- vi) lámpara de luz amarilla ($\lambda > 515 \text{ nm}$) de potencia $7,0 \pm 0,6 \text{ mW/cm}^2$.
- vii) controles mantenidos en oscuridad.

Se realizaron mediciones de absorbancia a 4 longitudes de onda para obtener las coordenadas cromáticas de color utilizando las ecuaciones III.2, III.3 y III.4 y se calculó el índice de pardeamiento utilizando la ecuación III.5.

Además, se realizaron controles de caramelización (compuestos por glucosa y *buffer*), de aminoácido (compuestos por lisina y *buffer*) y de *buffer* solo (conteniendo únicamente *buffer* fosfato), los cuales fueron expuestos a las mismas condiciones de almacenamiento y se les realizaron los mismos tratamientos de irradiación. En los resultados obtenidos no se observaron diferencias significativas por efecto de la irradiación (todas las condiciones analizadas) con respecto a los controles mantenidos en oscuridad.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado, siendo la menor diferencia significativa menor que 3% entre réplicas.

Tanto en el sistema de aminoácido como el de proteínas analizados, no se observaron diferencias significativas en el índice de pardeamiento y en la fluorescencia por el tratamiento de irradiación a 350 nm (i), 365 nm (ii), y luz visible de baja potencia (iv), como se observa cualitativa y cuantitativamente en las Figuras 2.1 y 2.2, respectivamente (como ejemplo para la irradiación a 365 nm del sistema de aminoácido) y la Tabla 2.1 para el sistema de proteínas. Al irradiar con una fuente de luz UV (340 nm) de mayor potencia (iii), sólo una disminución del 2% de absorbancia (con una cinética de decaimiento de primer orden) fue obtenido en un sistema de aminoácido con pigmentos pardos (Figura 2.3.B), pero este resultado no fue observado cuando los pigmentos del sistema eran amarillentos (Figura 2.3.A).

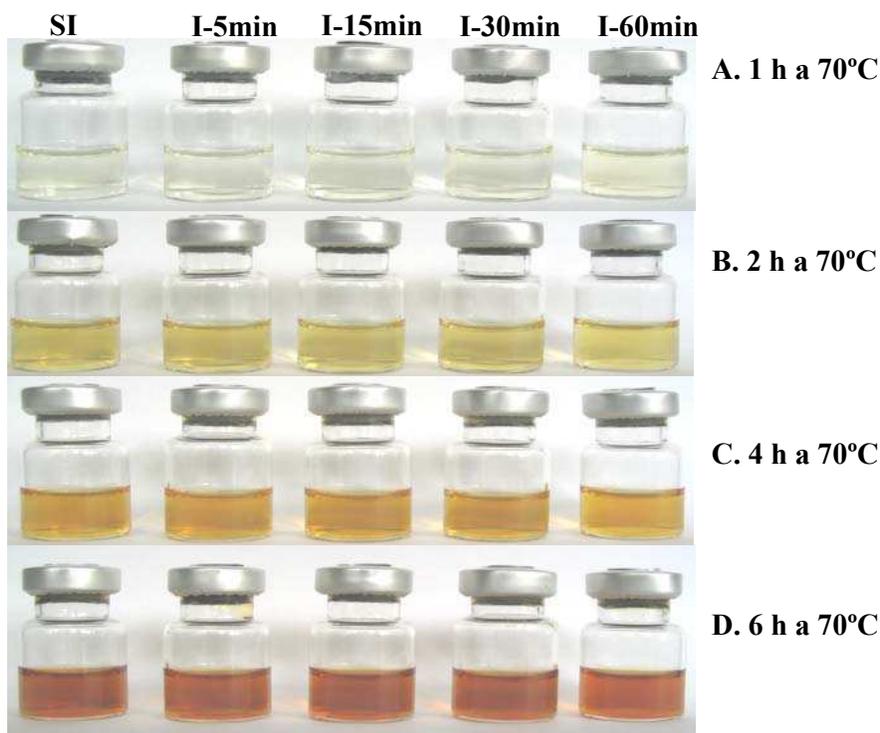


Figura 2.1. Fotografías digitales de los sistemas líquidos modelo lisina-glucosa-*buffer* a diferentes tiempos de almacenamiento a 70°C (A. 1 h; B. 2 h; C. 4 h; D. 6 h) irradiados después del almacenamiento a 365 nm durante diferentes tiempos (I-5min; I-15min; I-30min; I-60min) y sin irradiar (SI).

Tabla 2.1. Índice de pardeamiento a tiempo inicial y final (60 min) bajo distintas condiciones de irradiación del sistema modelo líquido proteína-glucosa-*buffer* 0,1 M pH 6,84, almacenado durante 716 h a 55°C. La absorbancia de este sistema a 445 nm fue de 0,722. Una fotografía digital del sistema utilizado se encuentra a la derecha de la tabla.

Condiciones de irradiación	Tiempo inicial	Tiempo final
Irradiación a 350 nm (i)	50±2	51±2
Irradiación a 365 nm (ii)		50±3
Irradiación con luz visible (iv)		49±2
Control oscuridad (vii)		50±2



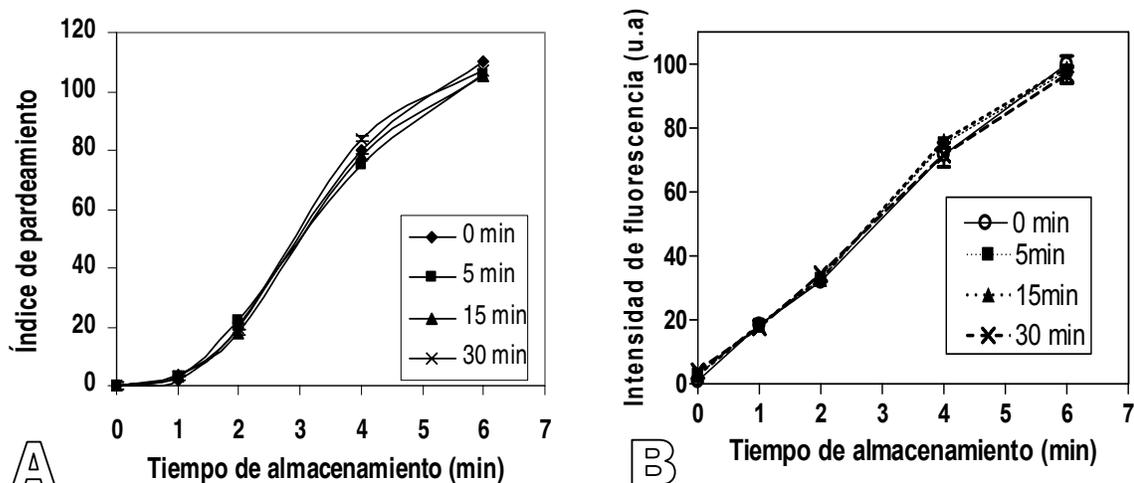


Figura 2.2. Índice de pardeamiento, IP, (A) ó intensidad de fluorescencia (B) en función del tiempo de almacenamiento a 70°C de los sistemas líquidos modelo lisina-glucosa-*buffer* sin irradiar (0 min) e irradiados después del almacenamiento durante diferentes tiempos (5, 15, 30 min).

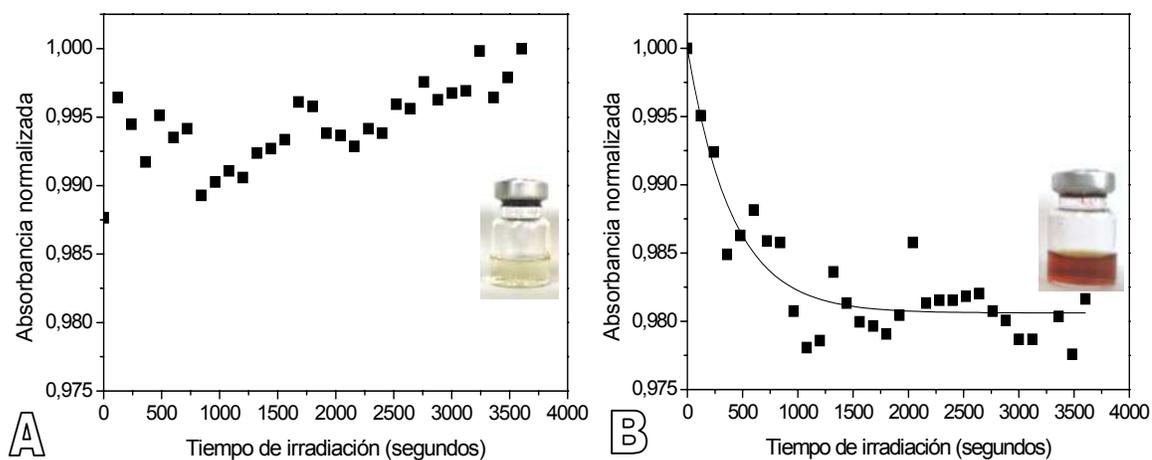


Figura 2.3. Variación de la absorbancia a 280 nm por la irradiación a 340 nm (iii) del sistema lisina-glucosa-*buffer* pH 6,84 almacenado durante 6 h (A) ó 40 h (B) a 55°C. En cada gráfico se encuentra insertada una fotografía digital del color del sistema al tiempo de almacenamiento utilizado. Los sistemas se diluyeron en el mismo *buffer* de la muestra hasta obtener una absorbancia máxima de 0,8.

Las Figuras 2.4 y 2.5 muestran los resultados obtenidos midiendo la absorbancia en forma simultánea con la irradiación utilizando luz de alta potencia visible (370-700 nm) (v) y luz amarilla ($\lambda > 515$ nm) (vi), respectivamente. El análisis de los resultados obtenidos se muestra en la Tabla 2.2.

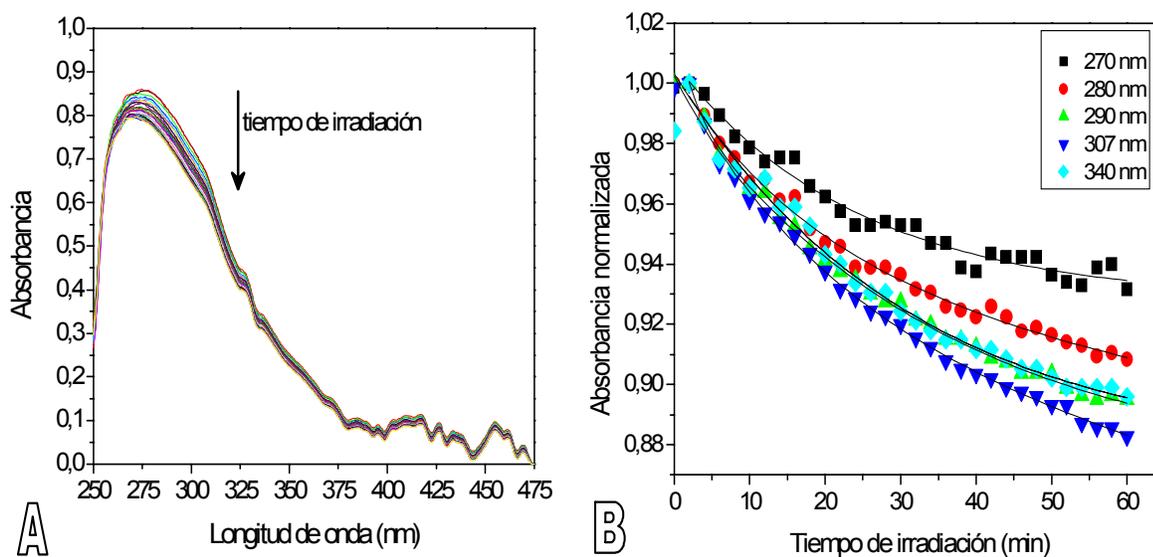


Figura 2.4. Variación de la absorbancia en forma simultánea con la irradiación con luz visible ($16,02 \pm 0,02$ mW/cm²) en sistema lisina-glucosa-*buffer* pH 6,84 almacenado durante 40 h a 55°C. (A) Espectros de absorbancia. (B) Cinética de variación de la absorbancia a diferentes longitudes de onda por efecto de la irradiación.

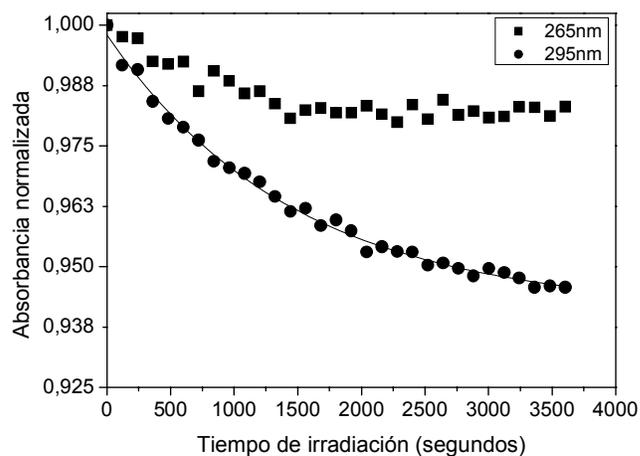


Figura 2.5. Variación de la absorbancia en forma simultánea con la irradiación de luz amarilla ($\lambda > 515$ nm a $7,0 \pm 0,6$ mW/cm²) en sistema lisina-glucosa-*buffer* pH 6,84 almacenado durante 40 h a 55°C.

Tabla 2.2. Análisis del efecto de la irradiación con luz visible ó luz amarilla ($\lambda > 515$ nm).

Tipo de irradiación	Longitud de onda (nm)	^a τ (min)	^b R^2	% disminución de absorbancia
Luz visible	270	24±5	0,976	7
	280	29±2	0,993	9
	290	36±3	0,998	11
	307	33±2	0,996	11
	340	32±2	0,992	12
Luz amarilla	280	12±2	0,995	1,6
	290	25±2	0,9976	5,4

^a τ : tiempo medio de degradación del pigmento

^b R^2 : indica el buen ajuste de los datos experimentales a un modelo de decaimiento exponencial de primer orden calculado a partir del programa Origin v7.0.

Los resultados obtenidos muestran una disminución entre el 7 y 12% de la absorbancia de la muestra debido a la irradiación con luz visible a alta potencia, sin embargo sólo se obtuvo hasta un máximo de 5% de disminución cuando se irradió con luz amarilla (longitud de onda mayor a 515 nm) a la misma potencia. Por lo tanto, la mayor disminución de absorbancia fue debida a la irradiación con luz de longitudes de onda en el rango de 370-515 nm, ya que en el rango de luz UV no hubo diferencias significativas con respecto al control mantenido en oscuridad.

b) Efectos sobre la fluorescencia

Los sistemas irradiados con las distintas condiciones de irradiación mencionadas anteriormente (sección 2.1.1.a) fueron diluidos para estudiar el efecto de la irradiación sobre la fluorescencia. Se observó para ambos sistemas analizados (lisina y proteínas) que si bien hubo un aumento de la fluorescencia (excitando a 380 nm y midiendo la emisión a 445 nm ó a 475 nm) con el tiempo de irradiación, las diferencias no fueron significativas con respecto a los controles (Figura 2.6).

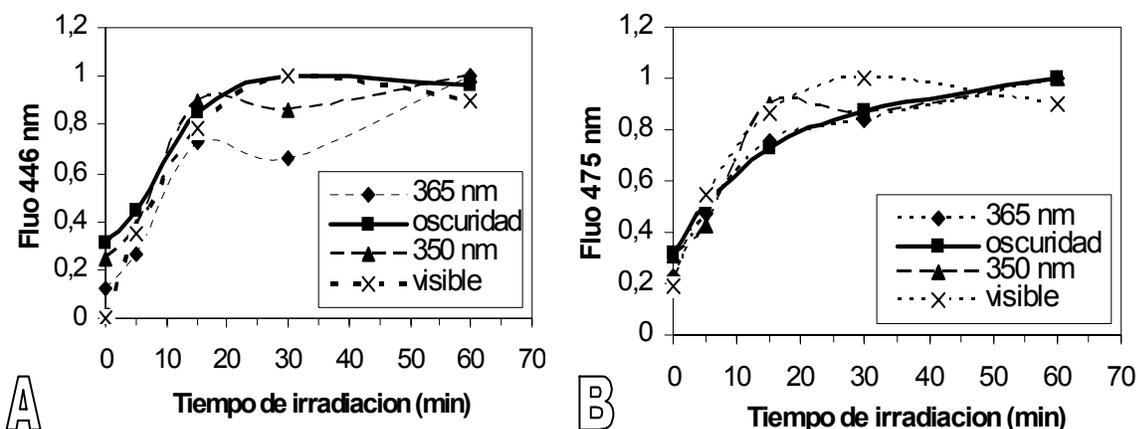


Figura 2.6. Fluorescencia normalizada a 1 en función del tiempo de irradiación del sistema modelo líquido proteína-glucosa almacenado durante 716 h a 55°C. Excitación a 380 nm. **A.** Emisión a 446 nm. **B.** Emisión a 475 nm. La irradiación fue con las fuentes i), ii) vi) y el control vii).

Se estudió también el efecto sobre la fluorescencia de la irradiación utilizando una fuente de alta potencia (lámpara de tungsteno de 150W del espectrofluorímetro) midiendo la fluorescencia en forma simultánea con la irradiación, con la dilución adecuada para evitar el efecto de filtro interno generado por la presencia de pigmentos. Las muestras se equilibraron durante 20 minutos en atmósfera de aire o de nitrógeno. Se utilizó una solución de sulfato de quinina en 0,1 N de H_2SO_4 como actinómetro para determinar que la potencia de la lámpara fue constante en el tiempo de irradiación (Figura 2.7.C). Los valores experimentales fueron ajustados a un modelo de decaimiento exponencial de primer orden. El análisis de los resultados se muestra en la Tabla 2.3.

Los resultados obtenidos (Figura 2.7) muestran una disminución de aproximadamente un 10% de la fluorescencia por el efecto de la irradiación y un tiempo medio de degradación comparable, independientemente de la intensidad de color de las muestras (amarillento o pardo), o de la cantidad de luz de excitación (dado por la mayor o menor amplitud de la rendija utilizada). En condiciones de equilibración de la muestra en atmósfera de nitrógeno se observó una disminución de fluorescencia y del tiempo de degradación levemente mayor que en condiciones de atmósfera de aire. Por lo tanto, la disminución de la fluorescencia utilizando esta fuente de luz no sería debida a la presencia de oxígeno en el medio.

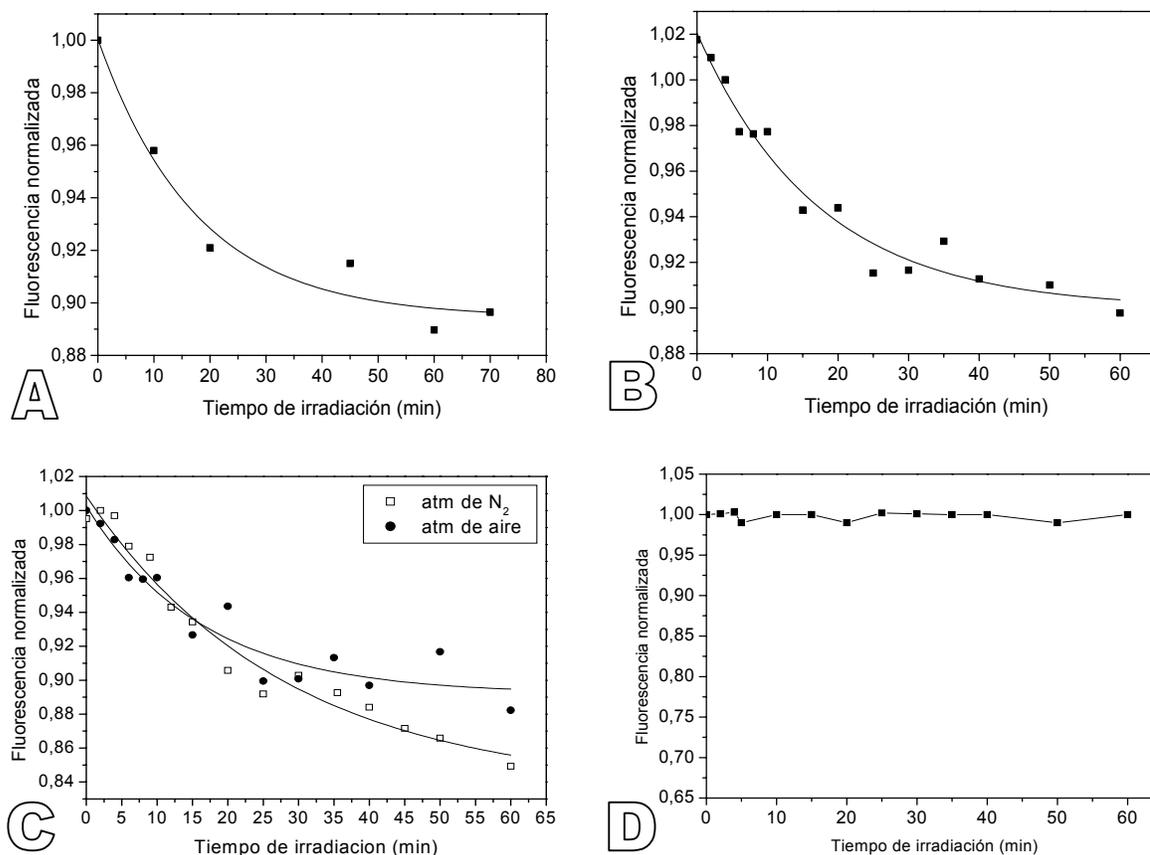


Figura 2.7. Variación de la fluorescencia con el tiempo de irradiación del sistema lisina-glucosa-*buffer* pH 6,84 almacenado a 55°C durante 6 h (A y B) ó 40 h (C) y de una solución de sulfato de quinina (D). La irradiación se realizó a través de la luz de excitación a 380 nm \pm 5 nm (A) ó \pm 10 nm (A, B y C) y se registró la emisión a 450 \pm 5 nm. Los valores de fluorescencia fueron normalizados a 1 con el valor máximo de intensidad a tiempo inicial. Los valores experimentales fueron ajustados a un modelo de decaimiento exponencial de primer orden.

Tabla 2.3. Análisis de los resultados obtenidos de la variación de fluorescencia con el tiempo de irradiación del sistema modelo líquido lisina-glucosa-*buffer* pH 6,84 almacenados durante 6 h ó 40 h a 55°C equilibrados en atmósfera de aire o de nitrógeno. La irradiación se realizó a 380 nm \pm la rendija de excitación durante 60 min.

Sistema a 70°C	Excitación: 380 \pm (nm)	^a τ (min)	^b R ²	% disminución de fluorescencia
6 h	\pm 5	17 \pm 5	0,92	10
6 h	\pm 10	17 \pm 3	0,97	12
40 h	\pm 10	16 \pm 5	0,97	11
40 h (atm N ₂)	\pm 10	22 \pm 4	0,92	15

^a τ : tiempo medio de degradación (minutos)

^bR²: buen ajuste de los datos experimentales a un modelo de decaimiento de primer orden

c) Efecto de la presencia de sal en la fotoestabilidad de pigmentos.

La presencia de la sal $MgCl_2$ en los sistemas modelo aminoácido-azúcar produjo efectos sobre la cinética de formación de compuestos fluorescentes y pigmentos pardos provenientes de la reacción de Maillard, afectando únicamente la cinética de la reacción, sin afectar las características espectroscópicas de los compuestos fluorescentes o pigmentos generados. Con el objetivo de estudiar si la presencia de sal modificaba el comportamiento del sistema frente a la irradiación, se analizó la variación de absorbancia de sistemas modelo aminoácido-azúcar-sal en etapa avanzada de reacción con presencia de pigmentos pardos sujetos a irradiación.

Se realizó la irradiación con luz visible utilizando una lámpara de alta potencia y temperatura constante de $16,02 \pm 0,02$ mW/cm² y $28 \pm 2^\circ C$, respectivamente.

Los resultados obtenidos del efecto de la irradiación con luz visible en ausencia o presencia de la sal se muestran en la Figura 2.8 para los sistemas modelo analizados conteniendo trehalosa (A y B), sacarosa (C y D) y glucosa (E y F), respectivamente.

En todos los sistemas analizados se observó que la presencia de la sal no modificó significativamente el comportamiento de los sistemas frente a la irradiación con luz visible. La disminución observada en la absorbancia fue menor que 2% a todas las longitudes de onda de irradiación empleadas (280, 290, 340, 400, 445 nm) en los sistemas conteniendo trehalosa o glucosa, siendo levemente mayor (una disminución máxima del 6%) en los sistemas conteniendo sacarosa. se observó una disminución máxima del 10% para el sistema glucosa-lisina

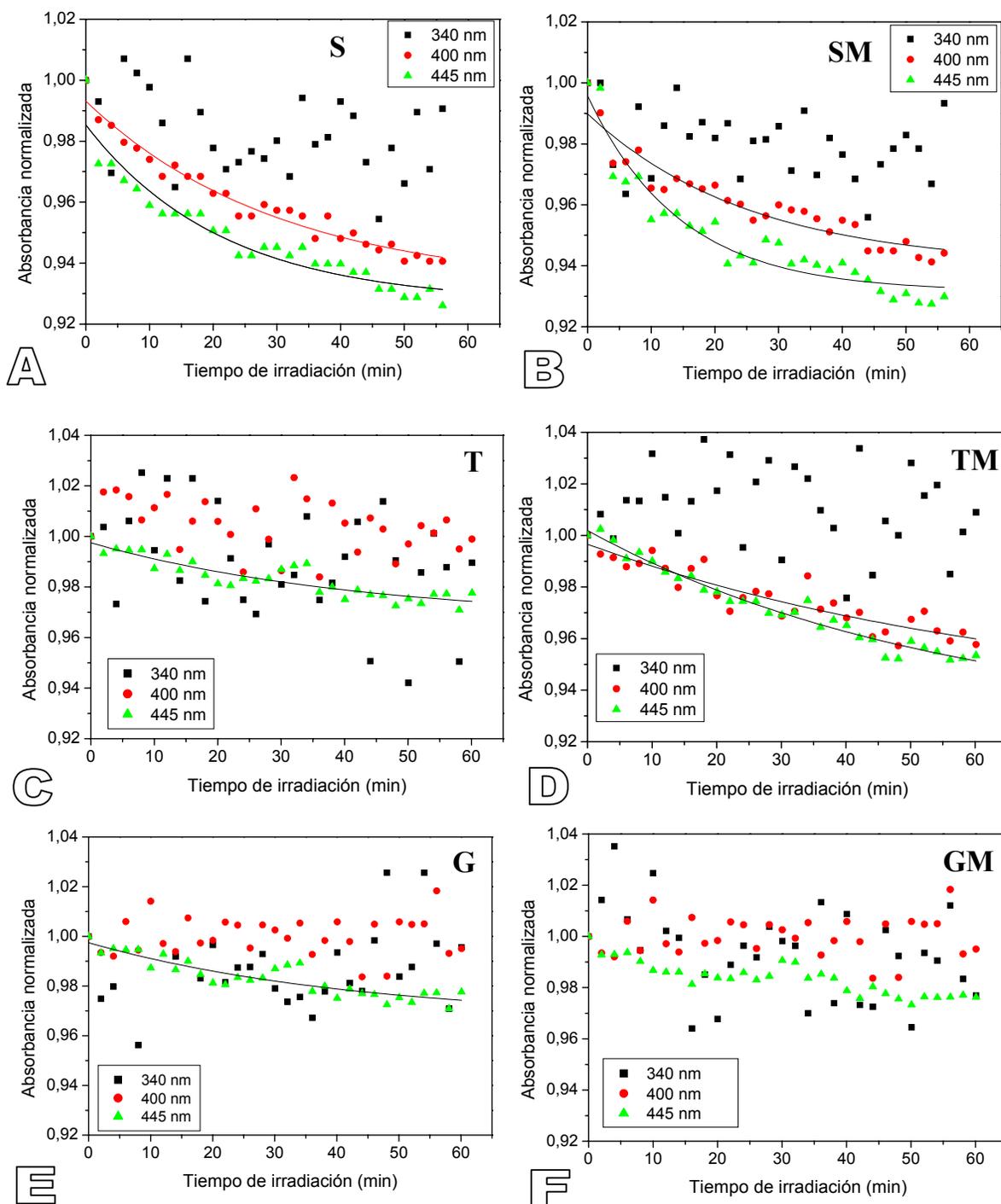


Figura 2.8. Variación de la absorbancia por efecto de la irradiación con luz visible de sistemas modelo glicina-azúcar de trehalosa (T), sacarosa (S), ó glucosa (G) en ausencia (A, C y E) ó presencia (B, D y F) de la sal MgCl₂, respectivamente.

d) Efecto sobre el pH.

La Figura 2.9 muestra que el pH de los sistemas modelo líquido (tanto para aminoácidos como para proteínas) disminuyó levemente con el tiempo de irradiación, pero las diferencias no fueron significativas con respecto a las muestras no irradiadas (máximo de 0,2 unidades de pH).

Por lo tanto, se concluye que en el sistema proteína-glucosa (tanto liofilizado como líquido) posee compuestos fluorescentes y pigmentos estables a la irradiación ultravioleta-A, al igual que lo observado en el sistema modelo líquido de aminoácido-glucosa.

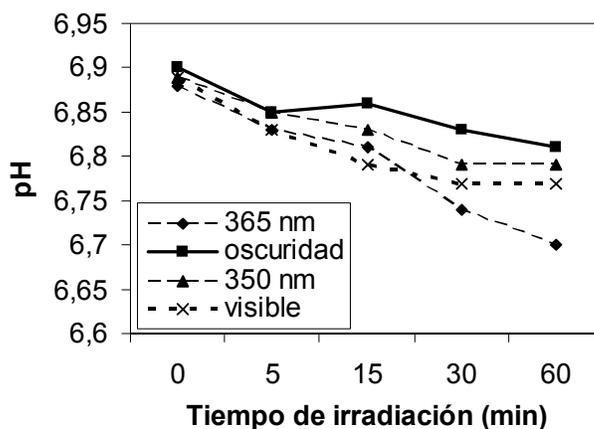


Figura 2.9. Variación de pH en sistema modelo líquido proteína-glucosa-buffer durante diferentes tratamientos de irradiación mencionados anteriormente en la sección 2.1.1.a.

IV.2.1.2. Sistema compuestos polifenólicos de té.

En la Figura 2.10 se comparan los resultados obtenidos de la intensidad de fluorescencia por la irradiación en las distintas condiciones de tratamiento del sistema líquido de polifenoles extraídos con agua a 100°C. La irradiación fue realizada en los sistemas equilibrados en aire con lámpara de tungsteno (150W) del espectrofluorímetro durante un máximo de 60 min. Se observa que la irradiación a 330 nm (longitud de onda de excitación elegida de los compuestos fluorescentes) se produjo mayor disminución o fotólisis de los fluoróforos (12,2%) que en las condiciones de los controles (2,6% para luz visible y 0,4% para los almacenados en oscuridad). El fotoblanqueo de los pigmentos siguió una ley cinética de primer orden con un tiempo medio de degradación (τ) de 28 ± 12 min. Los resultados obtenidos en fluorescencia se correlacionan con la disminución de absorbancia a 330 nm luego de la irradiación ($13 \pm 2\%$).

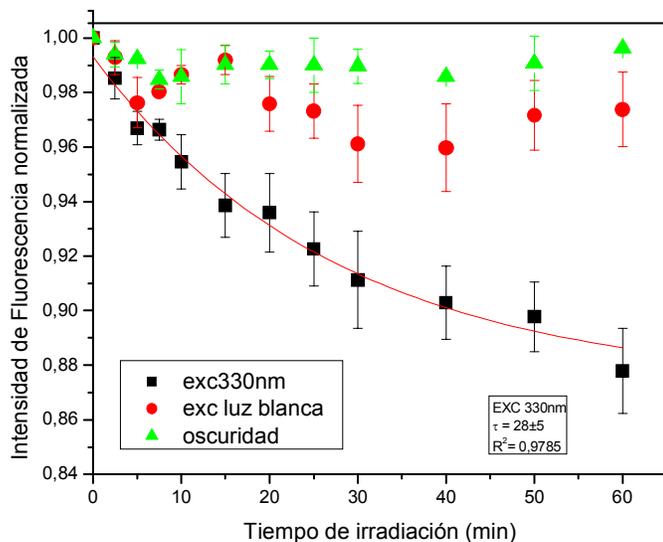


Figura 2.10. Disminución de la fluorescencia por irradiación directa con luz ultravioleta (330 nm) durante 60 min. de compuestos polifenólicos extraídos con agua a 100°C. Controles: luz visible (potencia de $4,5\pm 0,5$ mW/cm²) ó mantenidos en oscuridad.

IV.2.1.3. Sistemas modelo en soportes.

Para asemejar sistemas naturales en los que los reactivos se encuentran en una matriz soporte, se llevaron a cabo estudios de irradiación de compuestos de Maillard en sistemas con distintos soportes sólidos: absorbidos en papel de filtro, en una matriz de silicato o de proteína liofilizada. En esta forma de presentación del sistema a la irradiación se evita el efecto de difusión de los compuestos que ocurre en los sistemas líquidos y se puede lograr un efecto localizado de la radiación.

a) Absorbido en papel de filtro.

En la Figura 2.11 se muestran los distintos sistemas absorbidos (100 µl de cada uno) en papel de filtro:

- Sistema A, de color amarillento, (10 h de almacenamiento a 55°C)
- Sistema P, de color pardo, (90 h de almacenamiento a 55°C)
- Sistema B, incoloro (t = 0 h de almacenamiento).

Sistemas B (incoloro) Sistemas A (amarillo) Sistemas P (pardo)

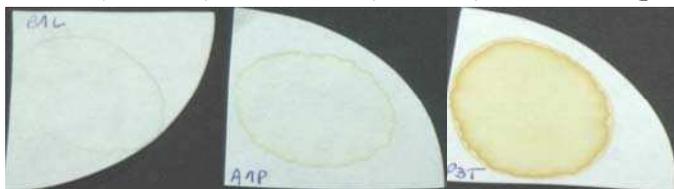


Figura 2.11. Sistema lisina-glucosa-*buffer* fosfato absorbido en papel de filtro (100 μ l). Sistema B ó blanco ($t=0$ h, incoloro). Sistema A (amarillo); Sistema P (pardo).

Los sistemas fueron colocados de manera aleatoria bajo las siguientes fuentes de luz de potencia constante durante los diferentes tiempos de irradiación;

- i) tubo de luz a 350 nm (tubo); potencia = $0,28 \pm 0,02$ mW/cm²
- ii) lámpara de luz a 365 nm (lámpara); potencia = $1,76 \pm 0,01$ mW/cm²
- iii) control mantenido en oscuridad.

En la Figura 2.12 se muestra los tres sistemas analizados bajo la fuente de luz, donde se observa mayor fluorescencia en los sistemas A (amarillo), ya que en los sistemas P (pardo), la fluorescencia es desactivada o “*quencheada*” por la mayor absorbancia de las muestras y en el sistema B (incoloro), no se generaron aún compuestos provenientes de la reacción.



Figura 2.12: Sistema lisina-glucosa-*buffer* fosfato absorbido en papel de filtro (100 μ l). Los tres sistemas analizados bajo la fuente de luz (350 nm).

Los resultados obtenidos con las dos fuentes de irradiación utilizada (365 nm ó 350 nm) se pueden observar en la Figura 2.13. En la Tabla 2.4 se resumen los resultados, indicando si el índice de pardeamiento aumentó (\uparrow S) o disminuyó (\downarrow S) significativamente con el tiempo de irradiación y el porcentaje del cambio total obtenido luego de 134 h de irradiación.

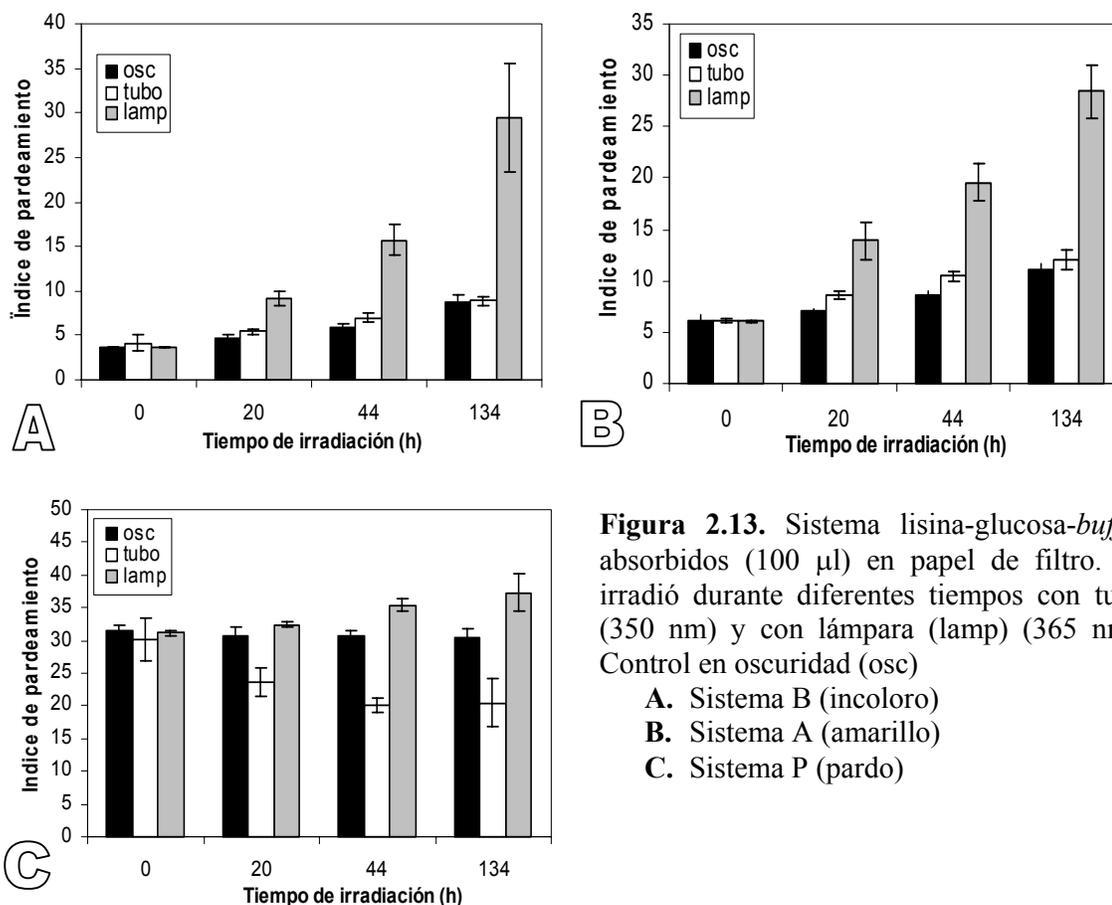


Figura 2.13. Sistema lisina-glucosa-*buffer* absorbidos (100 μl) en papel de filtro. Se irradió durante diferentes tiempos con tubo (350 nm) y con lámpara (lamp) (365 nm). Control en oscuridad (osc)
A. Sistema B (incoloro)
B. Sistema A (amarillo)
C. Sistema P (pardo)

Tabla 2.4. Comparación del índice de pardeamiento en función del tiempo de irradiación para los distintos sistemas absorbidos al papel de filtro.

Irradiación	Oscuridad	365 nm	350 nm
Sistema B (incoloro)	↑S ^a 130% ^c	↑S 716%	↑S 130%
Sistema A (amarillo)	↑S 80%	↑S 316%	↑S 97%
Sistema P (pardo)	NS ^d	↑S 20%	↓S ^b 32%

^a↑S: Aumento significativo del índice de pardeamiento.

^b↓S: Disminución significativa del índice de pardeamiento.

^c Porcentaje de aumento o disminución del índice de pardeamiento luego de 134 h de irradiación.

^dNS: Diferencias no significativas.

Se observó un aumento significativo del color, medido como índice de pardeamiento, en las muestras incoloras (t=0) (Sistema B) y amarillas (Sistema A), tanto las que se mantuvieron en oscuridad como las que fueron irradiadas con luz UV-A. Sin embargo, el aumento fue significativamente mayor en las muestras irradiadas con lámpara a 365 nm, por la mayor

potencia de esta fuente de luz. La irradiación con luz UV cercana, a longitudes de onda de máxima absorción de los compuestos fluorescentes (350 y 365 nm), aceleró la reacción de pardeamiento no enzimático o reacción de Maillard en lugar de producir el fotoblanqueamiento o *fotobleaching* esperado. Este aumento del color en los sistemas irradiados a 365 nm se puede observar cualitativamente en la Figura 2.14.A.

Por otro lado, en el sistema con mayor contenido de pigmentos pardos (Sistema P) el índice de pardeamiento disminuyó significativamente con respecto a los otros sistemas al irradiar durante 134 h con lámpara a 365 nm y a partir de las 20 h de irradiación con el tubo a 350 nm. La disminución del color en este sistema se puede observar cualitativamente en la Figura 2.14.B. La reacción se encuentra en este caso en etapas avanzadas, con alta concentración de pigmentos pardos, que pueden afectar la absorción de la luz ultravioleta de los compuestos fluorescentes mediante desactivación o *quenching*.

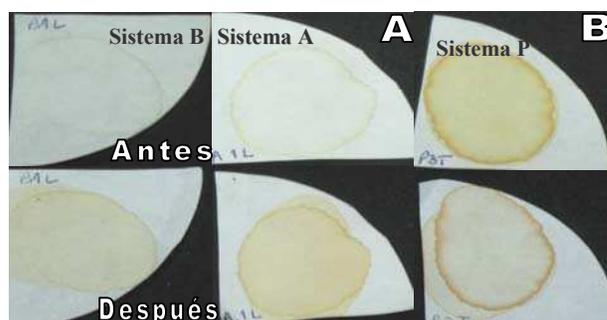


Figura 2.14. Observación cualitativa del color en los sistemas antes ($t=0$ h) (arriba) y después ($t=134$ h) de la irradiación. **(A)** Sistemas B (incoloro) y Sistema A (amarillo), irradiados con lámpara (365 nm). **(B)** Sistema P (pardo) irradiado con tubo (350 nm).

Cabe destacar que se obtuvieron condiciones en las cuales se produjo fotoblanqueo (hasta un 30%) de los pigmentos pardos. Sin embargo el tiempo de irradiación mínimo fue de 20 h y el sistema estaba en etapas avanzadas de la reacción, donde ya se perdieron propiedades importantes, como el valor nutritivo (Lowry y Baker, 1989). Por lo tanto este fotoblanqueo tiene escaso interés tecnológico desde el punto de vista del control de la reacción a través de la potencial destrucción de intermediarios, pero sí debe ser considerado como otro factor que influye en la cinética de deterioro.

b) Encapsulado en matrices sol-gel de tetraetoxisilano (TEOS).

La encapsulación de biomoléculas por procesos sol-gel se aplica en la industria farmacéutica o en el desarrollo de pruebas de diagnóstico para aumentar la estabilidad de componentes lábiles. El proceso de estabilización de proteínas se encuentra mediado por la limitación a la flexibilidad conformacional de las mismas y a la simultánea generación de un microambiente protector (Zheng y col., 1997). Una matriz de silicato muy estudiada como matriz vítrea amorfa inerte en la estabilización de biomoléculas es el tetraetoxisilano (TEOS) (Chaudhuri y col., 2003; Shchipunov y col., 2004; Desimone y col., 2008).

El proceso de sol-gel involucra la adición de una solución coloidal (sol) de un precursor que forma polímeros con una solución que contenga el material activo deseado. El resultado es la encapsulación de un determinado material en una matriz vítrea en estado amorfo (Brinker y Sheerer, 1990) y debe sus propiedades estabilizantes a su alta viscosidad y a la movilidad molecular restringida dentro de la matriz. Es importante que el precursor no reaccione con el material a encapsular. Por lo tanto, se eligió la matriz inerte de (TEOS) como soporte del sistema modelo aminoácido-glucosa para el estudio del efecto de la radiación UV-A.

Se encapsuló un sistema líquido de lisina (0,086 M)-glucosa (0,28 M) en *buffer* fosfato 0,1 M pH 6,84, almacenado a 70°C durante 0 h (incoloro), 2 h (color amarillento) ó 6 h (color pardo). Los sistemas encapsulados en forma de gotas casi esféricas (Figura III.2, Materiales y Métodos) se rompieron y se colocaron en los sistemas utilizados para la irradiación y la medición del color de los mismos utilizando el fotocolorímetro (Figura 2.15).

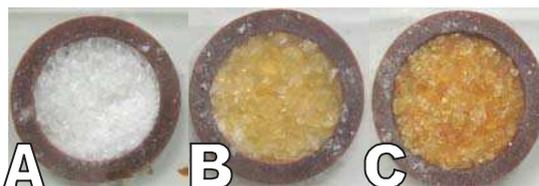


Figura 2.15. Sistema modelo lisina-glucosa-*buffer* almacenado a distintos tiempos de almacenamiento a 70°C encapsulado en una matriz de tetraetoxisilano (TEOS). (A) 0 h, sistema incoloro. (B) 2 h, pigmentos amarillos. (C) 6 h, pigmentos pardos.

La irradiación se realizó a 350 nm, 365 nm y con luz visible y produjo una disminución del índice de pardeamiento en ambos sistemas (Figura 2.16), pero sólo fue significativamente diferente del control conservado en oscuridad cuando se irradió a 365 nm el sistema de 6 h de almacenamiento a 55°C (de color amarillo). La irradiación del sistema de 40 h (pardo) a diferentes longitudes de onda y potencia en (Figura 2.16.B) no provocó diferencias.

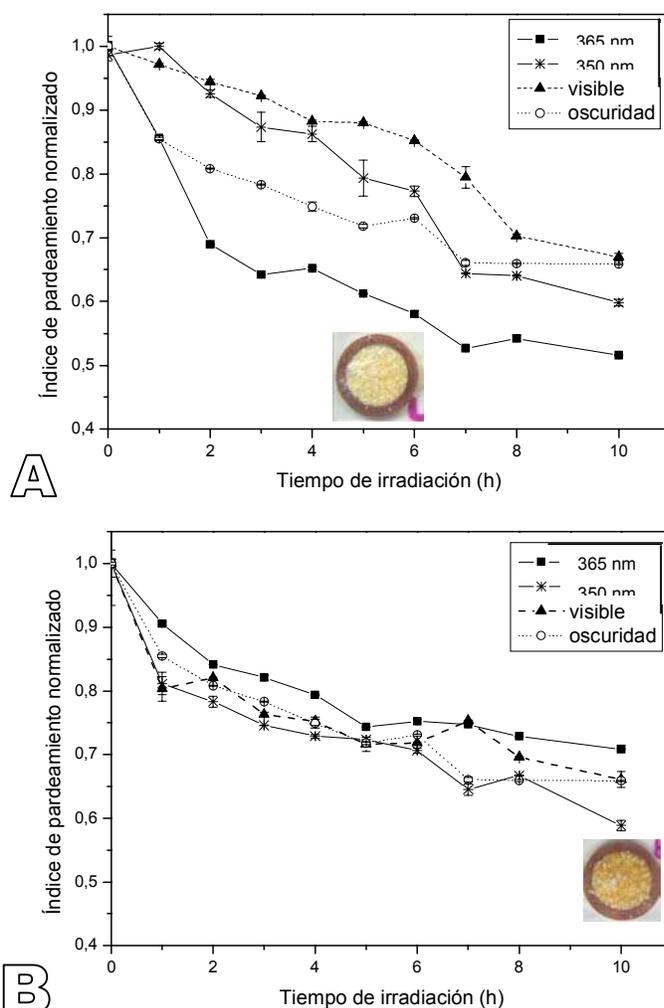


Figura 2.16. Variación del índice de pardeamiento en función del tiempo de irradiación (h) del sistema encapsulado **(A)** almacenado durante 6 h a 55°C (color amarillo) y **(B)** almacenado 40 h a 55°C (color pardo). En ambas figuras se insertó una fotografía digital de cada sistema luego de 10 h de irradiación a 365 nm.

En esta matriz se obtuvieron por lo tanto condiciones en las cuales se produjo un fotoblanqueo de los pigmentos amarillentos y el efecto matriz debe ser considerado como otro factor que influye en la cinética de deterioro a través de la formación de pigmentos. En el caso de la matriz de silano el fotoblanqueo se produce en productos de las etapas iniciales y podría tener interés tecnológico en el control de intermediarios.

c) Sistemas liofilizados proteína-glucosa.

Los sistemas liofilizados utilizados fueron tratados de la siguiente manera:

* E24 I24: Se colocó en estufa a 55°C durante 24 h. Se irradió durante 24 h. Se colocó nuevamente en la estufa durante 4 días.

* I24: Se irradió las muestras durante 24 h y luego se colocó en la estufa durante 5 días (24 h + 4 días).

Controles sin irradiar:

* E24: Se colocó en la estufa durante 24 h, se retiró y guardó en oscuridad a 25°C durante 24 h y luego se volvió a colocar en la estufa durante 4 días. (Control de E24 I24).

*WP: Sistema que se colocó en la estufa durante 5 días. (Control de I24).

Las muestras fueron expuestas a 350nm, con potencia constante (0,28 mW/cm²) durante todo el tiempo de irradiación y se realizaron controles en oscuridad.

c.1) Efecto sobre el color.

Se obtuvieron los valores CIE X, Y y Z y se calculó el índice de pardeamiento según la ecuación III.5. La variación de color obtenida no dependió significativamente del tratamiento de irradiación aplicado (Figuras 2.17 y 2.18).

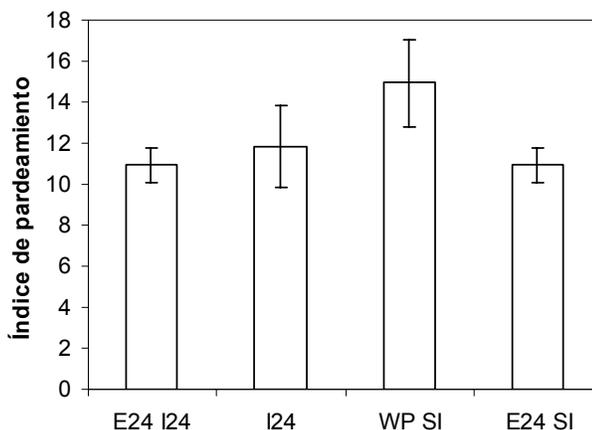


Figura 2.17. Índice de pardeamiento en el sistema sólido de proteínas de suero láctea-glucosa liofilizados irradiados durante 24 h con lámpara a 350 nm.

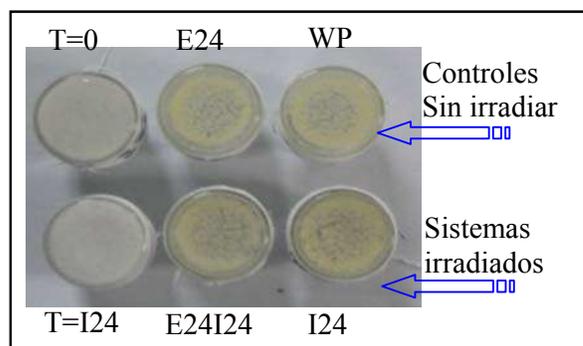


Figura 2.18. Fotografía digital de los sistemas modelo liofilizados e irradiados de proteína-glucosa y sus controles. Línea de arriba: Controles sin irradiar; tiempo cero de almacenamiento, sistemas E24 y WP luego del almacenamiento a 55°C. Línea de abajo: Sistemas irradiados; sistema I24 luego de la irradiación, antes de colocar en estufa, sistema E24I24 e I24 luego del almacenamiento a 55°C

Si bien la concentración de pigmentos no producía saturación del color, para lograr mayor sensibilidad en las lecturas, se resuspendieron los sistemas liofilizados y se midió la absorbancia a 4 longitudes de onda de manera tal de obtener las coordenadas cromáticas para utilizar la ecuación de índice de pardeamiento (*ec. III.5*). Los resultados obtenidos, tanto de la absorbancia a 445 nm como del índice de pardeamiento indicaron que no hubo efecto de la irradiación sobre ninguno de ellos.

c.2) Efecto sobre la fluorescencia

Para comprobar si se produce alguna modificación de los compuestos fluorescentes por la irradiación se realizó la irradiación de los sistemas a la longitud de onda de los fluoróforos generados durante la reacción en este sistema.

En la Figura 2.19 se muestra una imagen digital de la irradiación de los sistemas liofilizados, se observa claramente la emisión de fluorescencia en el sistema E24I24, comparado con el sistema I24, debido a que éste último fue irradiado antes de colocarlo en la estufa y entonces no tuvo el tiempo suficiente para generar compuestos fluorescentes detectables (tiempo cero).



Figura 2.19. Imagen digital durante la irradiación del sistema liofilizado. Sistema I24 a la izquierda, Sistema E24I24 a la derecha.

* I24: Se irradió las muestras durante 24 h antes de colocarlo en el almacenamiento térmico.

*E24 I24: Se colocó en estufa a 55°C durante 24 h. Se irradió durante 24 h.

La Figura 2.20 muestra que no hubo modificaciones de la intensidad de fluorescencia en las muestras irradiadas a 380 nm y tampoco se observaron diferencias en los espectros de emisión de fluorescencia debido al tratamiento de irradiación (datos no mostrados).

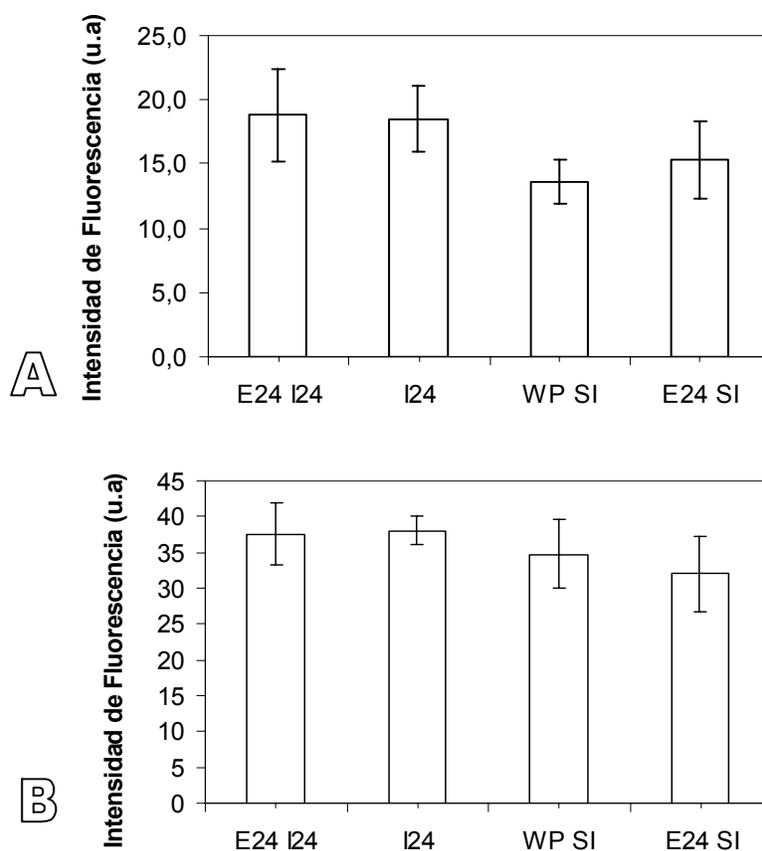


Figura 2.20. Intensidad de fluorescencia del sistema de proteína-glucosa resuspendidos. Excitación a 380 nm (absorbancia a 380 nm menor que 0,1). **A.** Emisión a 422 nm. **B.** Emisión a 528 nm.

IV.2.2. Irradiación en presencia de agentes sensibilizantes.

IV.2.2.1. Rosa de bengala.

IV.2.2.1.A. Irradiación del rosa de bengala (RB).

a) Características espectrofluorimétricas.

Con el objetivo de estudiar la interacción de los compuestos provenientes de la reacción de Maillard con agentes sensibilizantes a la radiación UV-visible, es necesario conocer las características espectrales del colorante utilizado, en este caso, el rosa de bengala. El espectro de absorción, y los espectros de excitación y emisión de fluorescencia se muestran en la Figura 2.21. Se observa que las características espectrales de fluorescencia del colorante no se superponen con la fluorescencia proveniente de los compuestos de Maillard (Cap 1, Figura 1.22), lo cual es útil para poder diferenciar los procesos que le ocurren al colorante y al pigmento.

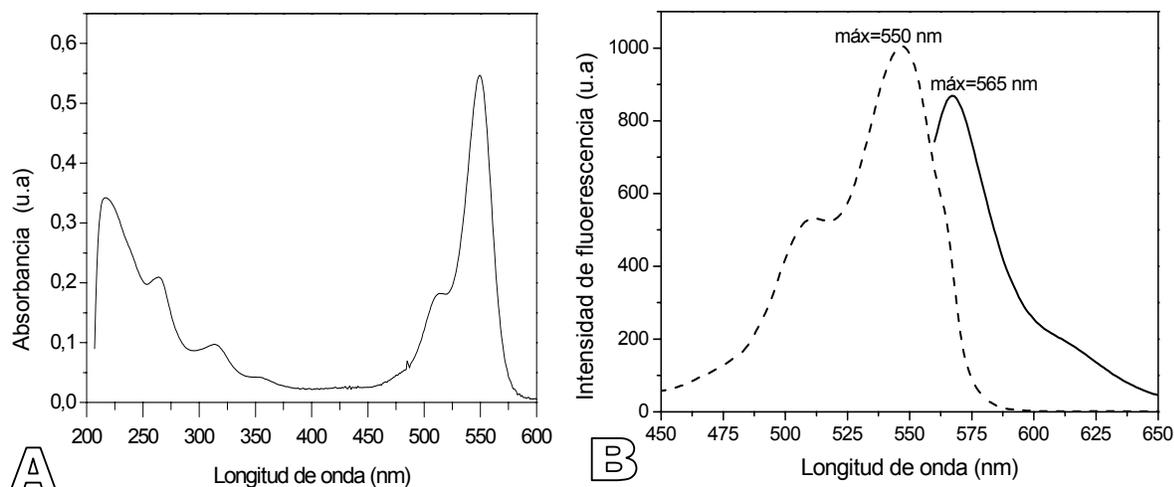


Figura 2.21. Colorante rosa de bengala en *buffer* fosfato de sodio pH 6,84. **A.** Espectro de absorción. **B.** Espectros de excitación (emisión a 565 nm) (-----) y de emisión (—)(excitación a 550 nm) del colorante (sistema diluido, absorbancia a 550 nm menor que 0,1).

b) Fotólisis del colorante

La cinética de cambio de absorbancia del colorante rosa de bengala fue registrada simultáneamente con la irradiación mediante un espectrofotómetro de arreglo de diodos Ocean Optics.

La excitación del colorante rosa de bengala involucra la formación del oxígeno singlete ($O_2(^1\Delta_g)$) por transferencia de energía simple a través del estado triplete, permitiendo esta

transferencia al rosa de bengala retornar a su estado basal (Lamberts y Neckers, 1983). Sin embargo, al irradiar al colorante en *buffer* fosfato a $\lambda > 515$ nm (luz amarilla, obtenida por utilización de un filtro) (Figura 2.22), el cromóforo del rosa de bengala fue significativamente fotodestruido, blanqueado o “bleachado”, produciendo una disminución de la absorbancia del pigmento, con un tiempo de degradación media del colorante de 84 min en presencia de oxígeno (atmósfera de aire). Si se compara con la irradiación en presencia de aire, la disminución de la absorbancia en presencia de azida de sodio (36,8%) (desactivador de oxígeno singulete) y en atmósfera de nitrógeno (36,3%) indicó que la fotodesactivación del rosa de bengala en las condiciones experimentales no ocurre a través de un mecanismo exclusivo de oxígeno singulete, sino que existen otras especies involucradas, posiblemente anión superóxido (Lambert y Kochevar, 1996) u otras especies reactivas.

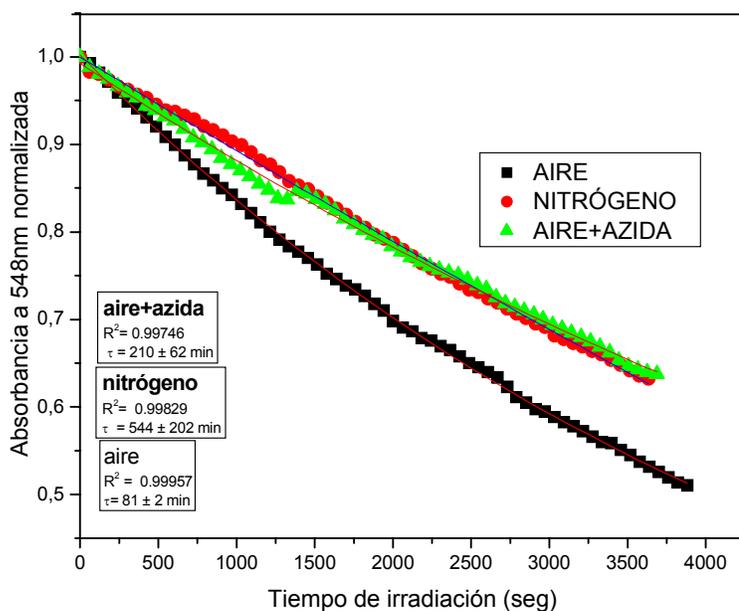


Figura 2.22. Cinética de absorbancia a 548 nm durante la irradiación a $\lambda > 515$ nm. En los insertos se muestra el tiempo de fotólisis o degradación medio (τ) y el parámetro R^2 que indica el buen ajuste a un modelo de decaimiento exponencial de primer orden.

c) Espectros de transientes

En la Figura 2.23 se observa el espectro de transientes determinado por *Laser Flash Photolysis* (LFP) de soluciones del colorante rosa de bengala en *buffer* fosfato 0,1 M pH 6,84, las cuales fueron desaireadas por 20 min por burbujeo constante de N_2 . Se puede observar la fuerte absorción de la muestra en la región entre 520-590 nm, típica de los pigmentos rojos.

La variación de la absorción en la región 600-650 nm con el tiempo de registro después de la excitación, es normalmente atribuida a la absorción debido al estado triplete ($^3\text{RB}^*$) del colorante (Wintgens y col., 1989).

En el inserto se observa la cinética de decaimiento del estado triplete (medido como variación de la absorbancia a 620 nm en función del tiempo, Lambert y Kochevar, 1996), obteniéndose como tiempo de vida media del $^3\text{RB}^* = 32,8 \pm 0,2 \mu\text{s}$ (ajustada por un decaimiento exponencial de primer orden utilizando el programa Origin 7.0)

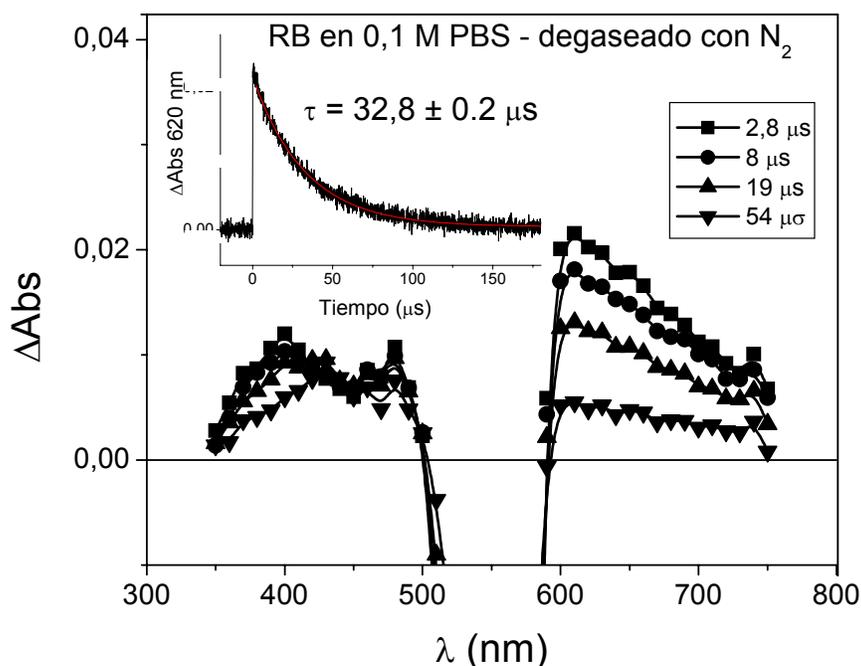


Figura 2.23. Espectro de transientes del rosa de bengala en *buffer* fosfato de sodio (PBS) por LFP. En el inserto se muestra la variación de absorbancia a 620 nm en función del tiempo (estado triplete del RB) y se destaca el tiempo de vida media (τ) obtenido del triplete.

IV.2.2.1.B. Irradiación de los pigmentos de Maillard en presencia de RB.

Se irradiaron soluciones conteniendo los pigmentos pardos de Maillard o los polifenólicos del té en presencia del colorante RB, a la longitud de onda de excitación del colorante (515 nm).

Se emplearon distintas condiciones: atmósfera de aire (donde se puede generar oxígeno singulete y otros radicales), en atmósfera de aire pero con concentración suficiente (50 mM) de azida de sodio (desactivador de oxígeno singulete) y en atmósfera de nitrógeno (se burbujeo el seno del líquido durante 20 minutos antes de la irradiación y se mantuvo la atmósfera de nitrógeno durante la irradiación). Utilizando el espectrofotómetro Ocean Optics, se siguió la cinética de absorción de los compuestos polifenólicos a la longitud de onda de

285 nm y a 548 nm para el colorante, simultáneamente con la irradiación (utilizando lámpara de tungsteno de 150W y filtro de corte amarillo ($\lambda > 515\text{nm}$)).

a) Fotólisis de pigmentos pardos

La Tabla 2.5 muestra los resultados obtenidos durante la fotólisis de los pigmentos pardos provenientes de la reacción de Maillard (PM) preparados a partir del sistema lisina-glucosa-*buffer* almacenado durante 40 h a 55°C. Las muestras se irradiaron durante 60 min en presencia y ausencia del colorante RB.

Tabla 2.5. Porcentaje de fotólisis de pigmentos de Maillard (PM) y del colorante rosa de bengala (RB), obtenidos por la disminución de absorbancia a 285 y 515 nm, respectivamente, durante 60min de irradiación a 340 nm (λ de absorción de PM) ó 520 nm (λ de absorción de RB)

<i>Sistema</i>	<i>Irradiación 340nm</i>			<i>Irradiación 520 nm</i>		
	λ_{obs} (nm)	Aire	Aire + NaN ₃	Aire	Aire + NaN ₃	N ₂
PM	285	--	--	--	--	--
RB		5	--	50	37	37
PM+RB		1	2	50	45	37
PM	515	2	--	1	5	5
RB		--	--	10	--	--
PM+RB		1,3	1,4	42	30	25

[NaN₃] = 50 mM

Los PM fueron estables al UV-A, ya que al irradiar a 340 nm (máximo de excitación de los fluoróforos) en atmósfera de aire no hubo disminución significativa de absorbancia ni de fluorescencia (al igual que lo observado en la sección 2.1.1). Sin embargo en presencia de RB, y en condiciones de fotólisis con luz visible (515 nm) se observó un fotoblanqueo tanto del RB como de los PM, en todas las condiciones estudiadas. La remoción de O₂ disuelto por purgado con N₂ disminuyó el porcentaje de fotoblanqueo, pero no lo anuló, indicando que existe una reacción entre el estado triplete del colorante ³RB* y los PM. En presencia de aire el consumo de ambos compuestos es mayor, pero en presencia de 50 mM de azida de sodio (NaN₃) que induce un 98% de desactivación de ¹O₂, se observó una leve reducción del fotoblanqueo, indicando además la participación de anión superóxido O₂^{•-} (Lambert y Kochevar, 1996) en la degradación fotosensibilizada de los PM.

b) Espectros de transientes

En la Figura 2.24 se muestra el espectro de transitorios obtenido por LFP. Con esta técnica se observa la variación de absorbancia entre el estado fundamental y el estado triplete con la longitud de onda, a distintos tiempos luego del pulso de luz. El espectro de transitorios del RB (Figura 2.24) obtenido por excitación láser a 532 nm en soluciones saturadas con N₂ y el análisis de los decaimientos a 420 y 620 nm, demuestran que los PM desactivan el estado triplete de ³RB* (λ_{\max} =620 nm), generando la forma semioxidada RB^{•+} (que absorbe a 420 nm, según Shafiqul, e Islam, 1999).

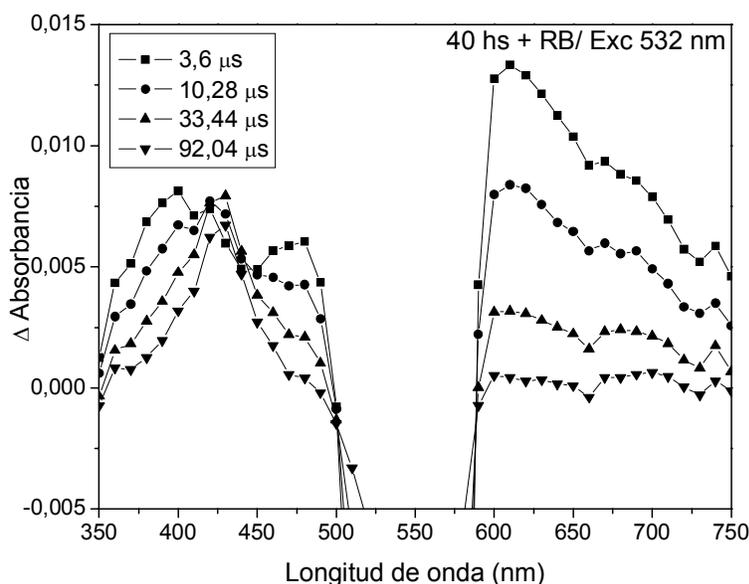


Figura 2.24. Espectroscopia de transitorios (LFP). Excitación del colorante rosa de bengala (RB) a 532 nm en presencia de pigmentos de Maillard (sistema modelo líquido lisina-glucosa-buffer almacenado durante 40 hs a 55°C) de soluciones purgadas con N₂.

IV.2.2.1.C. Irradiación de los pigmentos polifenólicos de té en presencia de RB.

a) Fotólisis de pigmentos

En la Figura 2.25 se muestra la variación de absorbancia en el tiempo debida a la irradiación del colorante, en las distintas condiciones estudiadas. En la Tabla 2.6 se resume el porcentaje de fotólisis de pigmentos polifenólicos (PF) y del colorante RB, obtenidos por la disminución de absorbancia a 285 y 515 nm, respectivamente, durante 60 min de irradiación con luz UV-A (340 nm) y Vis (520 nm) en distintas condiciones estudiadas.

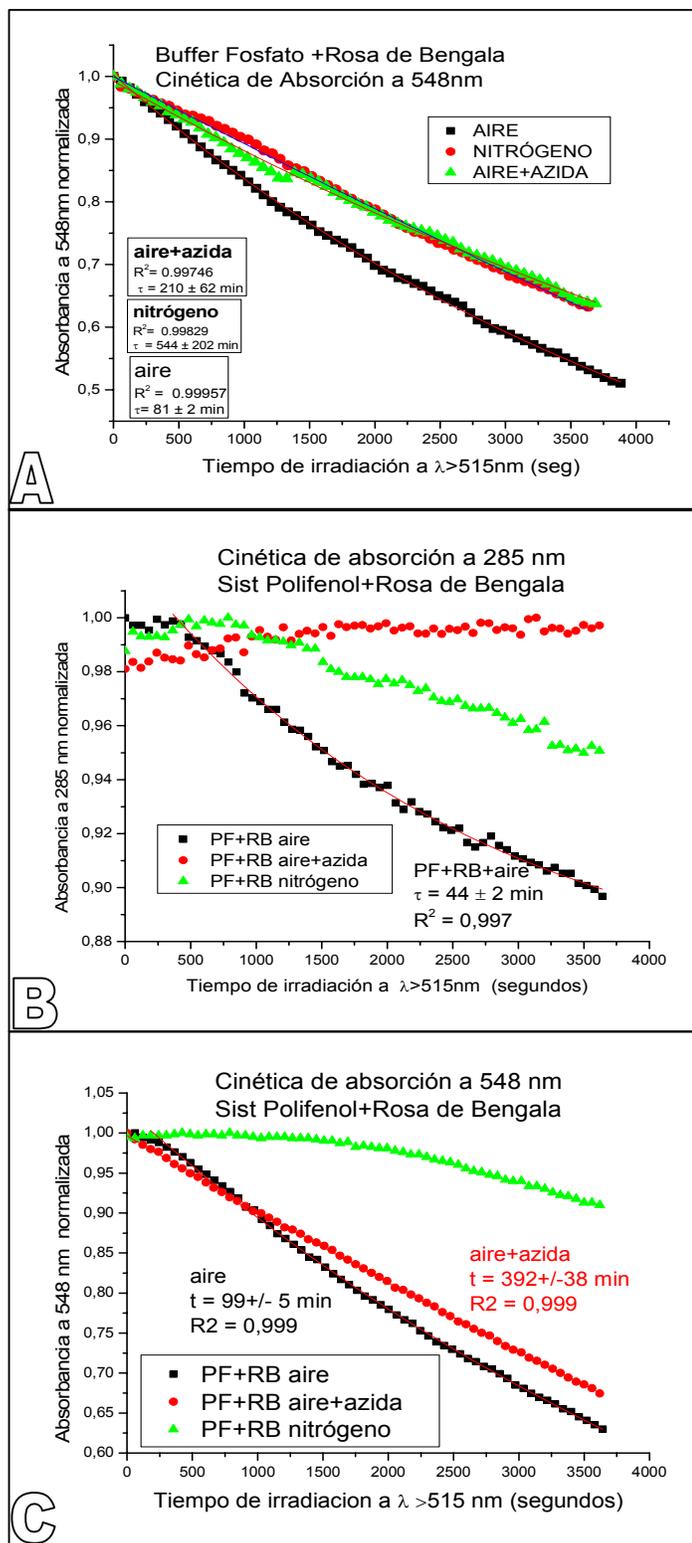


Figura 2.25. Variación de la absorbancia en función del tiempo de irradiación de un sistema de rosa de bengala (RB) (A) ó de sistema de compuestos pigmentados pardos polifenólicos obtenidos a partir de hojas de té (PF) (B y C) en distintas condiciones de irradiación (en atmósfera de aire, aire + el agregado de 50 mM de azida de sodio ó nitrógeno).

Tabla 2.6. Porcentaje de fotólisis de pigmentos polifenólicos (PF) y del colorante rosa de bengala (RB), obtenidos por la disminución de absorbancia a 285 y 515 nm, respectivamente, durante 60 min de fotólisis UV-A (340 nm) y Vis (520 nm) en distintas condiciones. $[\text{NaN}_3] = 50 \text{ mM}$ (desactivador de oxígeno singulete)

Sistema	Irradiación 340nm		Irradiación 515 nm		
	Abs. (nm)	aire	aire	Aire+ NaN_3	N_2
PF	585 nm	--	--	--	--
RB		5	50	38	38
PF +RB		1	40	35	10
PF	280nm	13	--	--	--
RB		--	10	--	--
PF +RB		5	10	5	--

En la Figura 2.25 B y C, como en la Tabla 2.6 se observa que la cinética de pérdida de absorbancia del colorante cambia en presencia de los polifenoles.

En la fotooxidación de los pigmentos mediado por el colorante estaría involucrado el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) producido durante la irradiación del colorante, ya que en presencia de azida de sodio (desactivador de $^1\text{O}_2$), se produjo menor fotólisis de los pigmentos polifenólicos (5%). Además en estas condiciones también se observó una disminución de la absorbancia del colorante (32%), lo cual indicaría que parte del oxígeno singulete formado no reacciona con el colorante sino que utiliza un camino alternativo reaccionando con los pigmentos polifenólicos.

b) Fotólisis de compuestos fluorescentes.

La Figura 2.26 muestra los cambios relativos de fluorescencia observados para el sensibilizante (RB) y los polifenoles (PF) durante la fotólisis a 330 nm. La absorbancia de los polifenoles fue aproximadamente 0,1 y para el colorante 0,4 para todas las condiciones estudiadas. Se realizó la irradiación a 330 nm y se siguió el cambio en la intensidad de fluorescencia de los polifenoles (exc 330/ em 440 nm) y del rosa de bengala (exc 550/ em 585 nm) utilizando la misma lámpara de tungsteno (150W). La disminución de la fluorescencia y de absorbancia de los controles (almacenados en oscuridad o irradiados con luz blanca artificial, con o sin colorante) no fue significativa (0,4-2,6%).

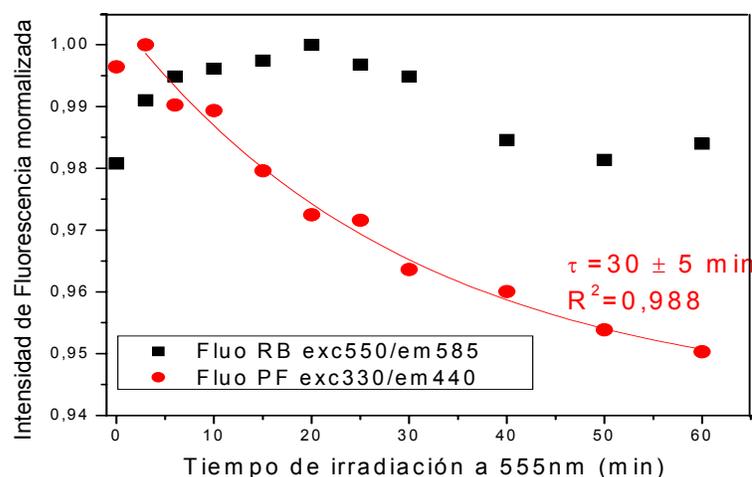


Figura 2.26. Disminución de la intensidad de fluorescencia por irradiación de compuestos polifenólicos en presencia de rosa de bengala (RB) a 555 nm durante 60 min. Fluorescencia del RB (excitación a 550 nm/emisión a 585 nm), fluorescencia de los compuestos polifenólicos (excitación a 330 nm/emisión a 440 nm). τ tiempo medio de degradación ajustado a un decaimiento de primer orden y su parámetro de ajuste (R^2).

A partir de la Figura 2.26 se observa que el tiempo medio de degradación (τ), también ajustado a un decaimiento exponencial de primer orden, fue de 30 ± 5 min (inserto de Figura 2.26), comparable al tiempo de degradación sin colorante (28 ± 2 min). Sin embargo, la disminución en la intensidad de fluorescencia en presencia del colorante fue del 5% para los polifenoles, en comparación con el 13% obtenido sin colorante (Tabla 2.6). Los resultados obtenidos en fluorescencia se correlacionan con la disminución de absorbancia a 330 nm luego de la irradiación ($5 \pm 1\%$).

La fluorescencia del colorante (medido como exc. 550 nm/ em. 585 nm) no tuvo una disminución significativa de la intensidad. Si bien el colorante absorbe a la longitud de onda de irradiación (330 nm, Figura 2.21), esa absorción no genera un cambio en la fotosensibilización del colorante (que sí ocurre en las condiciones de excitación a 550 nm). Estos resultados también indican que no hubo interacción apreciable entre los compuestos polifenólicos y el colorante RB, ni por transferencia de energía del estado excitado del polifenol al estado fundamental del colorante ni por el oxígeno singulete generado por la fotooxidación de los polifenoles. Sin embargo, el colorante produjo una mayor fotoestabilidad de los compuestos fluorescentes polifenólicos. Esto no se debe a la absorción del colorante a la longitud de onda de irradiación (Figura 2.21.A), que podría generar un efecto de filtro interno o *quenching* (los compuestos fluorescentes polifenólicos les llegaría menor energía de

irradiación, ya que parte de esa energía sería absorbida por el colorante), ya que por la concentración utilizada de colorante durante las experiencias de irradiación, la absorbancia fue despreciable a la longitud de onda de absorción de los pigmentos polifenólicos.

Se realizó un control de los polifenoles sin colorante en soluciones equilibradas al aire (atmósfera de aire), los cuales fueron irradiados durante 60 minutos a la longitud de onda de absorción del colorante ($\lambda > 515$ nm, Figura 2.27). La absorbancia de los pigmentos al irradiar con la luz amarilla aumentó un 2% a 260 nm y un 4% a 270 nm. Esto indica que las variaciones de absorbancia observadas en presencia del colorante se deben a interacción entre ellos y no a un efecto intrínseco de la luz sobre los pigmentos polifenólicos.

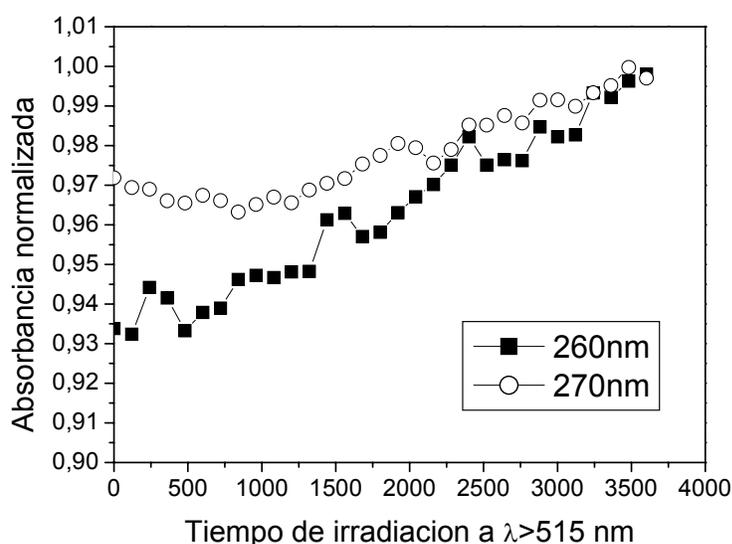


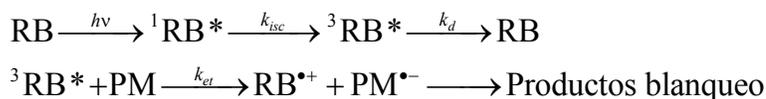
Figura 2.27. Variación de la absorbancia (normalizada) en función del tiempo de irradiación a $\lambda > 515$ nm en distintas condiciones atmosféricas de aire de una muestra de polifenoles en ausencia de rosa de bengala.

A partir del análisis realizado se puede observar que en ausencia o presencia de RB el tiempo medio de degradación (τ) fue similar, alrededor de 30 min. Sin embargo, el porcentaje final de fotodegradación de los polifenoles en presencia del colorante fue del 5% comparado con el 13% obtenido sin colorante.

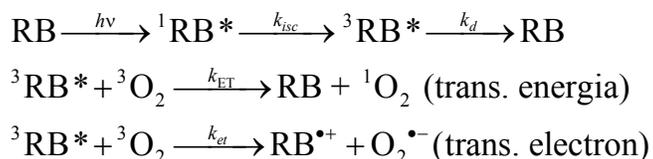
IV.2.2.1.D Mecanismos de interacción propuestos para la fotodestrucción de pigmentos en presencia del sensibilizante RB.

A partir de reacciones enzimáticas o no enzimáticas se forman compuestos pigmentados de características cromáticas similares. Sin embargo, las características de fotoestabilidad de ambos tipos de pigmentos son muy diferentes. Paralelamente, los compuestos fluorescentes que se generan en ambos tipos de reacciones tienen máximos de excitación y emisión en la misma región de longitudes de onda: exc 340/em 450 nm para los provenientes de la reacción de Maillard y exc 330 /em 440 nm para los polifenoles. El efecto de la luz sobre estos compuestos y la interacción de éstos con el sensibilizador RB dependen de las condiciones de excitación.

Un mecanismo propuesto para explicar la interacción entre los pigmentos provenientes de la reacción de Maillard (PM) y el colorante rosa de bengala (RB) es:



En presencia de O₂ (soluciones saturadas con aire), las reacciones de fotosensibilización relevantes son:

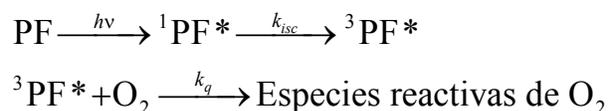


Tanto ¹O₂ como los iones radicales RB^{•+}, PM^{•-}, y O₂^{•-} son los fotoproductos primarios iniciadores de las reacciones de blanqueo de los pigmentos PM y RB.

Por otra parte, la fotólisis de los PM con luz UV-A no conduce a reacciones de fotoblanqueo, principalmente debido que los tiempos de vida de las especies transitorias de PM, tales como estados tripletes (los cuales absorben a 450 nm) poseen un tiempo de vida muy corto (<30 ns) indicando que la energía absorbida se degrada rápidamente como calor, reduciendo las vías de degradación fotoquímica desde los estados excitados.

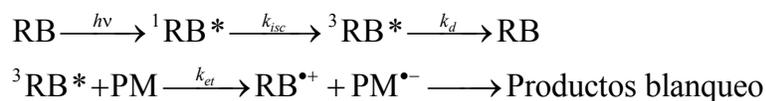
Este tipo de comportamiento selectivo entre fotólisis directa e indirecta (sensibilización) ofrece una posible alternativa para ejercer acciones de control en la estabilidad de pigmentos de Maillard.

En cambio, los resultados de la 2.2.1.C sugieren que la degradación de los polifenoles es promovida por la generación de especies oxidantes producidas por la excitación de ellos mismos.



Sin embargo, las especies reactivas generadas serían diferentes a la especie oxígeno singulete. Aguer y Richard (1996) mostraron que los compuestos polifenólicos no se degradan o no se fotolizan por reacción con oxígeno singulete, y que estos sustratos pueden desactivar el oxígeno singulete o estados tripletes responsables de la producción de oxígeno singulete.

Por otro lado, la fotólisis del rosa de bengala con luz visible (515 nm) induce la destrucción tanto de los polifenoles como del colorante. En la Tabla 2.6 se muestra el porcentaje de disminución de la absorbancia de los pigmentos luego de 60 minutos de fotólisis en las distintas condiciones. Se observó que el rosa de bengala y los polifenoles se degradan tanto en presencia de azida como en atmósfera de N₂, lo que indica que la fotosensibilización involucra procesos de transferencia de carga entre el sensibilizante y los polifenoles.



En resumen, los compuestos PM son mucho mas estables a la irradiación UV-A que los PF, debido principalmente a tiempos de vida muy cortos (<50 ns) de sus especies excitadas y por tanto incapaces de generar especies reactivas de oxígeno, ejem. ¹O₂ y O₂^{•-}.

La excitación con luz visible (λ > 515 nm) de RB produce degradación tanto del colorante como de los PM en similar proporción, y en menor medida, de los PF. Esto es indicativo de reacciones de fotosensibilización por transferencia de carga (Tipo I) involucrando iones radicales producidos en la interacción del estado triplete de RB con los pigmentos.

Debido a la complejidad molecular de estos extractos de pigmentos pardos, actualmente se están llevando a cabo estudios con pigmentos modelos para una mejor comprensión de los mecanismos de interacción y fotosensibilización.

Dada la amplia presencia de pigmentos pardos en alimentos y sus múltiples propiedades, beneficiosa o no, el conocimiento del efecto de la luz y de la interacción de estos pigmentos con agentes sensibilizantes es muy importante para ejercer acciones de control en la

estabilidad de materiales orgánicos, biomoléculas y/o alimentos que posean estos pigmentos y ofrecer alternativas para modular la cinética de su generación.

IV.2.2.2. Riboflavina

IV.2.2.2.A. Irradiación de riboflavina (RF)

a) Características espectrofluorimétricas

En primer lugar, se determinaron las características espectroscópicas (Figura 2.28.A) y espectrofluorimétricas (Figura 2.28.B) de la riboflavina (RF). Los resultados muestran cuatro picos principales de absorción, a 220, 275, 375 y 450 nm, coincidentemente con los datos de Heelis (1982).

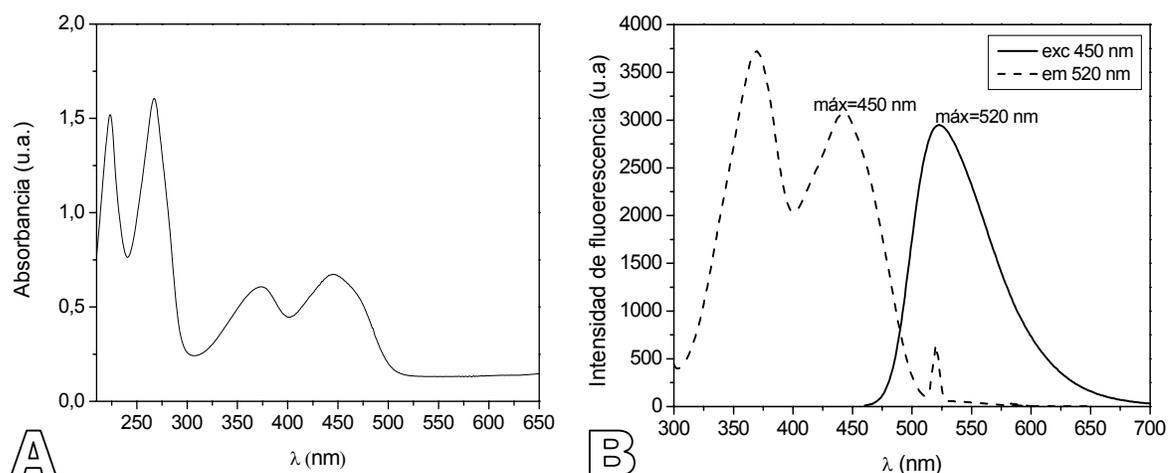


Figura 2.28. (A) Espectro de absorción del colorante natural riboflavina. (B) Espectros de excitación (emisión a 520 nm) y de emisión (excitación a 450 nm).

b) Fotólisis del colorante con luz UV-Visible

Se irradió una solución de riboflavina en *buffer* fosfato pH 6,84 (el mismo que fue utilizado para las soluciones de los pigmentos de Maillard) en una concentración tal que la absorbancia de la solución fuera aproximadamente 0,5 a 450 nm (Figura 2.29.A) a 340 nm (longitud de onda de excitación de los fluoróforos provenientes de Maillard, y donde la riboflavina también absorbe). La absorbancia de una solución de riboflavina se registró simultáneamente con la irradiación mediante un espectrofotómetro de arreglo de diodos Ocean Optics.

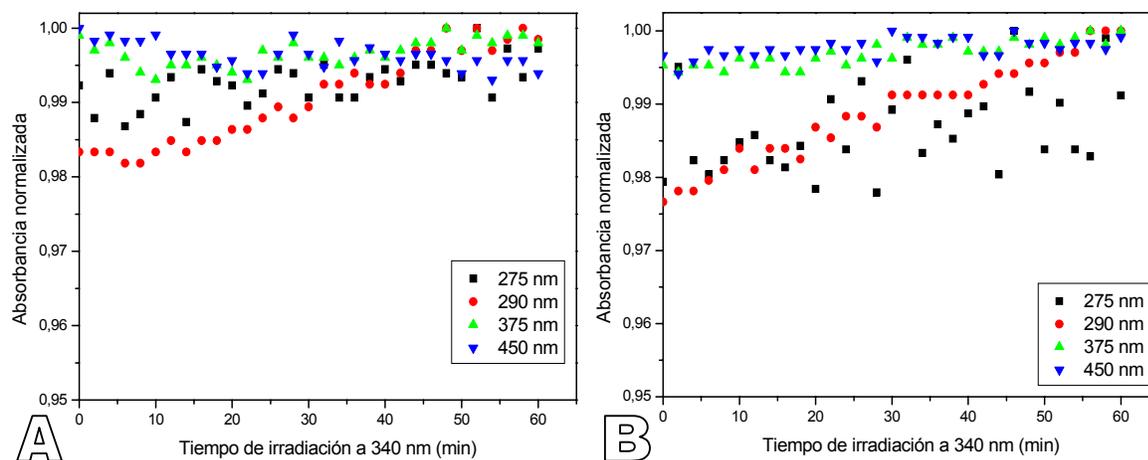


Figura 2.29. Variación de absorbancia de la riboflavina por irradiación a 340 nm en (A) atmósfera de aire ó (B) en atmósfera de air e con el agregado de 50 mM de azida de sodio (desactivador de oxígeno singulete).

A pesar que diferentes estudios reportados indicaron que la riboflavina es sensible a la luz ultravioleta (Kim y col., 1993; Ahmad y col., 2004), en la Figura 2.29 se muestra que no hubo variación significativa de la absorbancia tanto en atmósfera de aire (A) como con el agregado de azida de sodio (desactivador de oxígeno singulete) (B). Ahmad y col. (2004) indicaron que la fotólisis de riboflavina posee un carácter redox y que los potenciales redox dependen del pH del medio, siendo más estable a la luz UV-visible en el rango de pH entre 5 y 6.

Sin embargo, cuando se realizó la irradiación con luz visible (Figura 2.30), se observó una variación significativa de la absorbancia en las condiciones de atmósfera de aire.

Se produjo una disminución significativa de la absorbancia en los máximos de 275, 375 y 450 nm y un aumento de la absorbancia con características de formación de un excíplejo ó excímero con máximos a 287 nm y 397 nm, por disminución de las bandas de 275 y 375 nm, respectivamente.

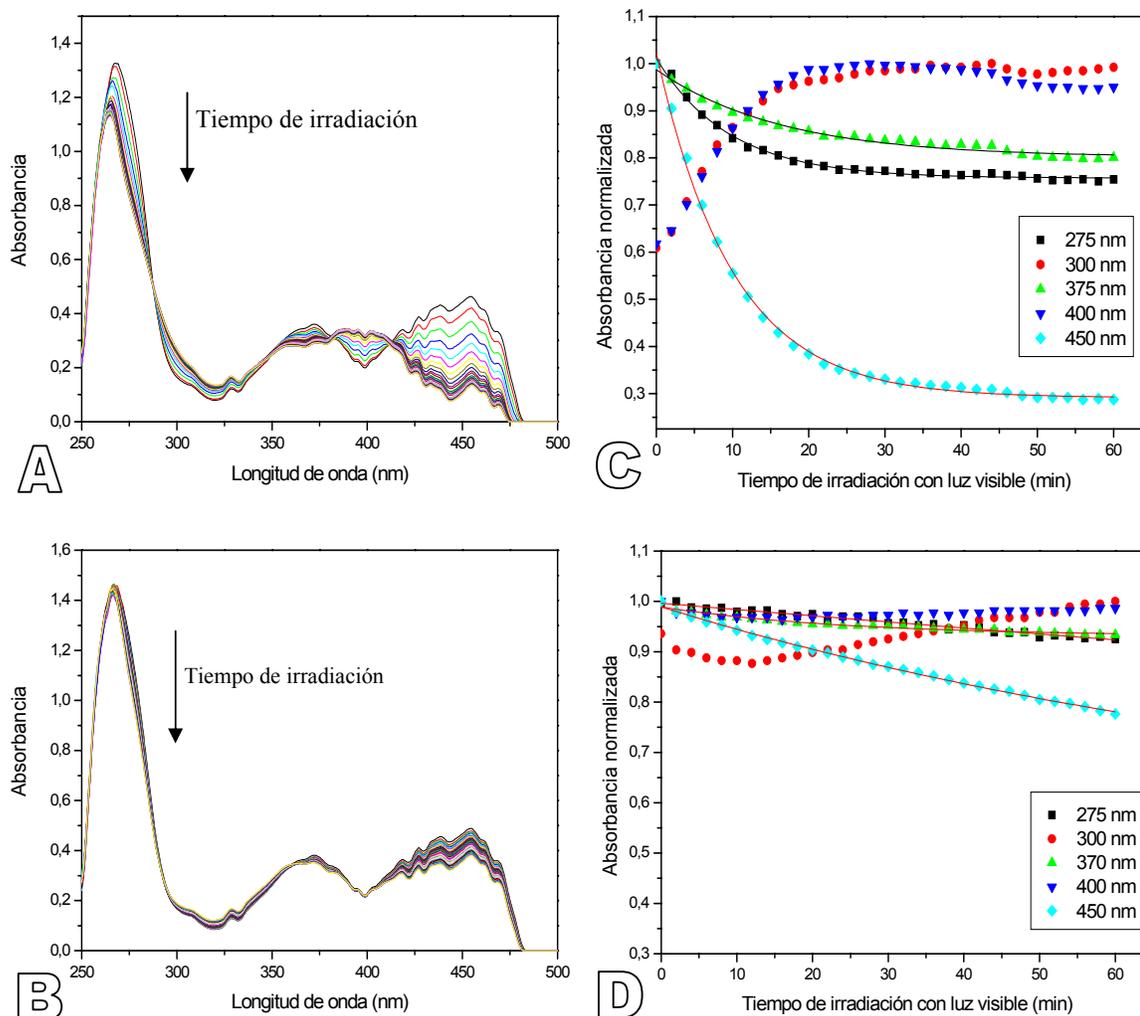


Figura 2.30. Variación de la absorbancia de la riboflavina por la irradiación con luz visible en condiciones de atmósfera de aire (A y C) ó con el agregado de 50 mM de azida de sodio (B y D).

Los excímeros son dímeros en el estado excitado formados por la colisión de dos moléculas idénticas, una excitada y la otra no. Los exciplejos, en cambio, son complejos en estado excitado formados por la colisión de una molécula excitada (donora de electrones, en este caso la riboflavina) con una molécula diferente no excitada (en este caso el oxígeno molecular, aceptor de electrones). La formación de ambos estados excitados se formaron únicamente en presencia de oxígeno, ya que cuando a la solución de riboflavina se le agregó azida de sodio se observó menor variación de la absorbancia en los máximos y no la formación de estos estados (Figura 2.30.B). Por lo tanto, los estados excitados generados más

probablemente son excíplejos formados durante la irradiación de la riboflavina. El análisis de los resultados obtenidos se resume en la Tabla 2.7.

Tabla 2.7. Análisis de los resultados obtenidos de la variación de la absorbancia de la riboflavina por la irradiación con luz visible en condiciones de atmósfera de aire ó con el agregado de azida de sodio.

Condición	Absorbancia	^b R ²	% variación
Atmósfera de aire	275 nm	0,994	↓24
	280 nm	0,98	↓27
	370 nm	0,981	↓20
	450 nm	0,998	↓71
	300 nm		↑40
	400 nm		↑40
Atmósfera de aire + azida de sodio (50 mM)	275 nm	0,96	↓6
	280 nm	0,998	↓15
	290 nm	0,948	↓9
	370 nm	0,98	↓7
	450 nm	0,998	↓33
	300 nm		ND
	400 nm		ND

^bR²: ajuste de los datos experimentales a un modelo de decaimiento exponencial de primer orden

IV.2.2.1.B. Irradiación de los pigmentos de Maillard en presencia de RF.

a) Fotólisis de pigmentos pardos con luz UV-A y visible.

Se realizó una mezcla de los pigmentos de Maillard con la misma concentración de riboflavina en *buffer* utilizada para la fotólisis del colorante. El espectro de absorbancia inicial de la mezcla para ambas condiciones se muestra en la Figura 2.31.

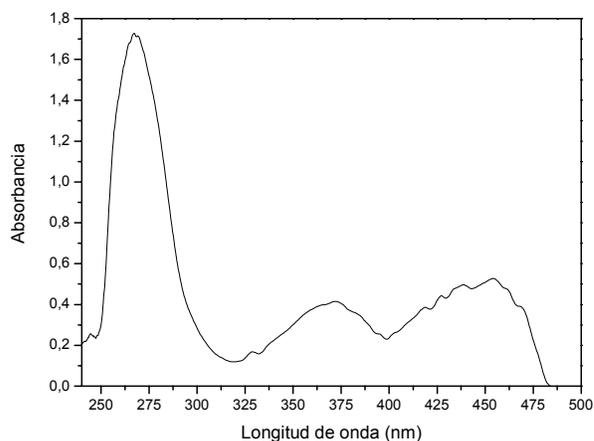


Figura 2.31. Espectro de absorbancia de la mezcla riboflavina y pigmentos de Maillard provenientes de una solución de lisina-glucosa almacenada durante 40 hs a 55°C.

La Figura 2.32 muestra los resultados obtenidos en la fotólisis de los pigmentos provenientes de la reacción de Maillard (PM) en presencia del colorante riboflavina (RF) en condiciones de presencia y ausencia de oxígeno (con el agregado de azida de sodio) irradiados durante 60 minutos. Como se discutió anteriormente, los PM fueron estables al UV-A. La riboflavina, por su parte, tampoco tuvo una variación significativa de su absorbancia al irradiar a 340 nm (Figura 2.32). Además, la irradiación de la solución mezcla no presentó formación de excíplejos durante la irradiación. Por lo tanto, los resultados de la irradiación a 340 nm no manifestaron interacciones entre los pigmentos de Maillard y la riboflavina.

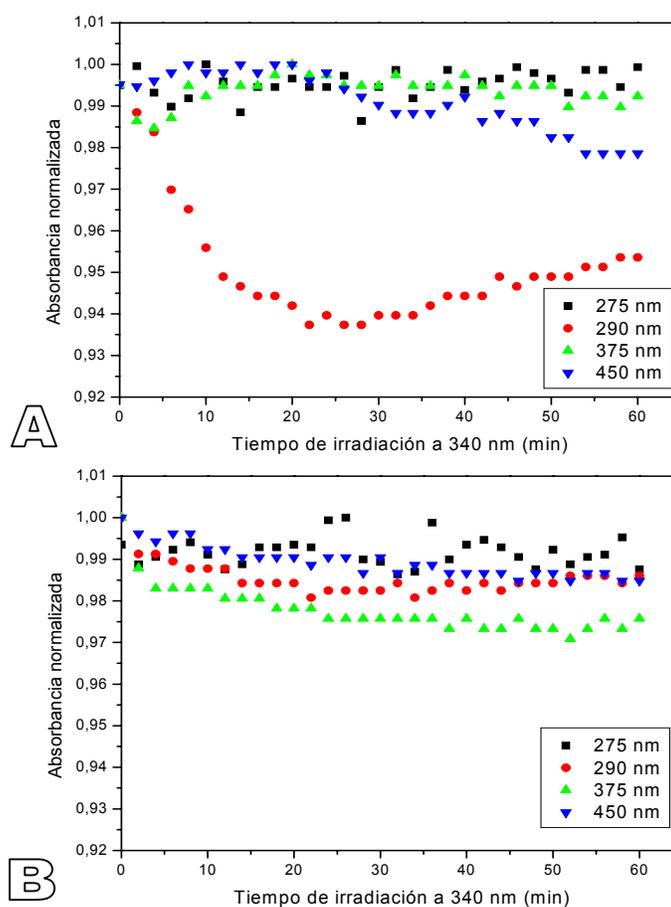


Figura 2.32. Cinética de la variación de absorbancia con el tiempo de irradiación a 340 nm en condiciones de atmósfera de aire en ausencia (**A**) o presencia (**B**) de 50 mM de azida de sodio (desactivador de oxígeno singulete).

En la Figura 2.33 se observan los resultados obtenidos por la irradiación de una mezcla de pigmentos de Maillard (40 h de almacenamiento a 55°C) con luz visible en presencia y en ausencia de riboflavina (Figs. 2.33. A y C, respectivamente) o en presencia de 50 mM de azida de sodio (2.33. B y D).

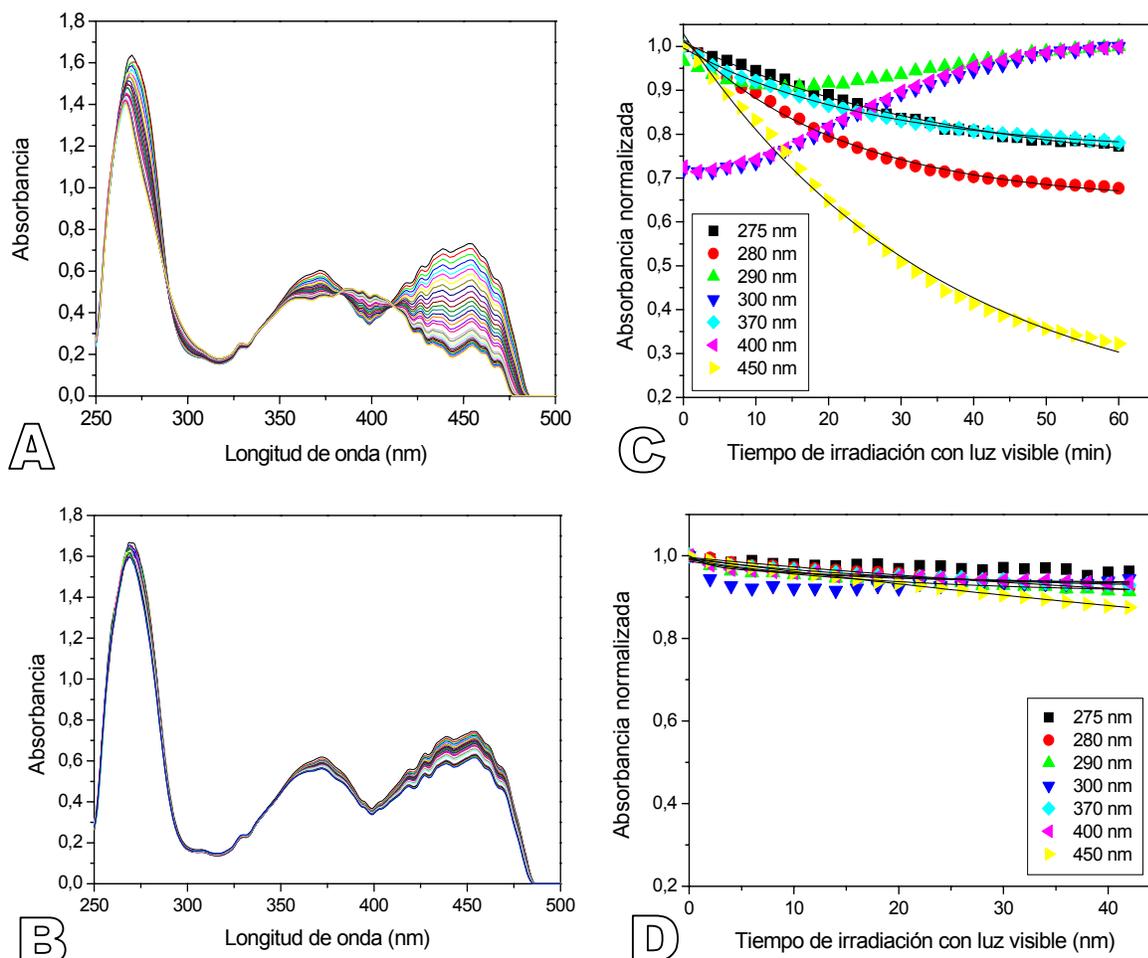


Figura 2.33. Variación de la absorbancia por la irradiación con luz visible de una mezcla de pigmentos de Maillard (40 hs de almacenamiento a 55°C) con riboflavina en ausencia (A y C) o presencia (B y D) de 50 mM de azida de sodio.

Los resultados confirman que no hubo interacción entre la riboflavina y los compuestos de Maillard por irradiación con luz UV (Figura 2.32) ni con luz visible (Figura 2.33 y Tabla 2.8).

Tabla 2.8. Análisis de los resultados obtenidos de la variación de la absorbancia de la riboflavina por la irradiación con luz visible en condiciones de atmósfera de aire ó con el agregado de azida de sodio.

Condición	Absorbancia	^b R ²	% variación de absorbancia RF	% variación de absorbancia RF + PM
Atmósfera de aire	275 nm	0,996	↓24	↓22
	280 nm	0,996	↓27	↓33
	370 nm	0,998	↓20	↓22
	450 nm	0,998	↓71	↓70
	300 nm		↑40	↑39
	400 nm		↑40	↑40
Atmósfera de aire + azida de sodio (50 mM)	275 nm	0,98	↓6	↓5
	280 nm	0,989	↓15	↓7
	290 nm	0,948	↓9	↓8
	370 nm	0,98	↓7	↓8
	450 nm	0,998	↓33	↓33
	300 nm		ND	ND
	400 nm		ND	ND

^bR²: Coeficiente de ajuste de los datos experimentales al modelo de decaimiento exponencial de primer orden

IV.2.2.2.D. Mecanismos propuestos para la fotodestrucción de riboflavina.

Como no se observó interacción entre los pigmentos de Maillard y la riboflavina, solamente se discute el efecto observado de la irradiación sobre la destrucción de riboflavina.

Ahmad y col., (2004) reportaron que la reacción de fotodegradación de riboflavina (RF) por luz UV y visible en presencia de *buffer* fosfato (0,05 M-2,0 M) pH 7 y de oxígeno involucra reacciones simultáneas de fotólisis (fotoreducción intramolecular) y fotoadición (fotoadición intramolecular), llevando a la formación de lumicromo (LC) y ciclodehidroriboflavina (CDRF), respectivamente, como productos mayoritarios. La contribución de cada reacción depende de la concentración de fosfato, siendo mayor la fotoadición al aumentar la concentración de fosfato. El espectro de CDRF exhibió un máximo de absorción a 400 nm, siendo el producto mayoritario de la reacción de fotoadición. El espectro de LC exhibió un máximo de absorción a 356 nm, indicando que es el mayor producto de la reacción de fotólisis. En concordancia con estos autores, en este trabajo se observó la generación del CDRF por fotoadición en presencia de oxígeno, tanto en la solución del colorante como en su mezcla con las melanoidinas provenientes de la reacción de Maillard. La conversión obtenida en la solución mezcla fue menor, quizás por la menor disponibilidad de los iones HPO₄²⁻ que catalizan la formación del CDRF. Sin embargo, los autores sólo realizan el estudio en

presencia de oxígeno. En el presente trabajo, no se observó el componente generado por fotoadición cuando se agregó azida de sodio, lo que indica que la fotoadición es dependiente de la formación de oxígeno singulete, inhibiendo la formación del exciplexo ó que hay una menor disponibilidad de los iones catalizadores de la reacción de fotoadición por la presencia de la azida. La formación de CDRF por fotoadición es mediada por el estado excitado singulete ($^1\text{RF}^*_{\text{ox}}$) mientras que la formación de LC por fotoreducción ocurre mediada tanto por el estado excitado triplete ($^3\text{RF}^*_{\text{ox}}$) como por el estado singulete ($^1\text{RF}^*_{\text{ox}}$) (Ahmad y col., 2005). Esto contribuye a la hipótesis que en la formación del CDRF se forma un exciplexo entre el estado excitado singulete y el oxígeno molecular triplete, y por transferencia de energía se forma oxígeno singulete.

Por otro lado, los autores observan la generación de CDRF al irradiar riboflavina con luz UV (313 y 365 nm) o visible (415 nm) con una potencia de 952 mW/cm^2 , mucho mayor que la utilizada en este trabajo (14 mW/cm^2 a 340 nm ó 16 mW/cm^2 en visible). Otro estudio de los mismos autores (Ahmad y col., 2006) mostró que en buffer fosfato la degradación de riboflavina aumenta con mayor potencia de luz, y que la fotoadición requirió mas energía que la fotoreducción. Por lo tanto, la potencia de radiación UV empleada en este estudio permitió observar la fotoreducción pero no la reacción de fotoadición.

En esta sección se analizaron las características de compuestos fluorescentes y pigmentos provenientes de diferentes semillas y la estabilidad de éstos a la irradiación UV-A.

El trabajo realizado es parte de un estudio más amplio que incluye la integración entre distintos grupos de trabajo que investigan aspectos diversos pero complementarios de estas semillas.

IV.2.4. Chenopodium quinoa.

IV.2.4.1. Cambios observados durante el almacenamiento.

Baker y Bradford (1994) no encontraron correlación entre la fluorescencia y el deterioro de semillas de cebolla, coliflor, tomate, zanahoria, brócoli y lechuga, probablemente debido a la interferencia con otros compuestos fluorescentes presentes en ellas. Sin embargo, Sun y Leopold (1995) observaron que ambos parámetros correlacionaron en semillas de soja. Se analizó entonces la existencia de dicha correlación en semillas de quinoa y la relación entre la estabilidad proteica y el deterioro durante el almacenamiento.

Con el objetivo de analizar el efecto del deterioro de las semillas en función del tiempo de almacenamiento, las semillas fueron almacenadas en condiciones contrastantes:

- (a) almacenamiento a 25°C y baja humedad (aproximadamente 70% HR) (condiciones ambientales);
- (b) almacenamiento en banco de germoplasma, con temperatura de -20°C y 14% de humedad relativa (condiciones de envejecimiento lento);
- (c) almacenamiento a alta temperatura (37°C) y alta humedad (75% HR) (condiciones de envejecimiento acelerado).

Se estudiaron los cultivares de quinoa Baer II y Ollagüe, que poseen diferentes adaptaciones según las zonas de Chile de las cuales provienen (árida o húmeda), tal como se describió en Materiales y Métodos.

Las condiciones de almacenamiento fueron elegidas teniendo en cuenta que según las indicaciones de la AGSI/FAO (Meyhuay, 2007) las semillas de quinoa se deben conservar en las condiciones apropiadas para garantizar su calidad sanitaria y organoléptica, ya que la degradación de los granos durante el almacenamiento se ve afectada por la combinación de tres factores ambientales:

- (i) Temperatura. Es uno de los factores que más afecta la calidad fisiológica de las semillas, sin embargo no se describen rangos de temperatura de almacenamiento en dicho informe.

(ii) Humedad. El grano es higroscópico, es decir que puede ganar o perder humedad del medio ambiente. Un alto contenido de agua, mayor que 14% no es deseable ni recomendable para el almacenamiento de semillas de quinoa.

(iii) Contenido de oxígeno. Los granos pueden ser afectados por microorganismos, por lo tanto las formas de almacenamiento son en sacos al aire libre o almacenes y a granel en silos de diversa capacidad.

Es de destacar que las presentes recomendaciones de FAO tienen principalmente en cuenta la estabilidad microbiológica de las semillas, pero no se hace referencia a las reacciones químicas que pueden afectar potencialmente a los granos.

a) Efecto sobre la preservación.

La preservación de las semillas de ambos cultivares se analizó a través mediciones de germinación y viabilidad antes y después de las distintas condiciones de almacenamiento estudiadas. Para determinar la viabilidad de las semillas se utilizó la prueba de tetrazolio, siendo una reacción positiva (color rosado en el embrión) cuando el embrión se encuentra viable. Un ejemplo para la visualización del ensayo de viabilidad se muestra en la Figura 2.34.



Figura 2.34. Análisis de viabilidad por la prueba de tetrazolio. Semilla de quinoa cv. Ollagüe en condiciones de almacenamiento durante 6 meses; fila de arriba **(A)**: intermedio (14% HR y 25°C) Reacción positiva: tejido embrionario color rojo ó fila de abajo **(B)**: acelerado (75%HR y 36°C) Reacción negativa: tejido embrionario sin coloración.

Los resultados de germinación y viabilidad obtenidos en las distintas condiciones de almacenamiento para ambos cultivares se muestran en la Tabla 2.9. Se observó que las semillas preservadas en el banco de germoplasma (envejecimiento lento) mantuvieron invariables los valores de germinación y viabilidad.

Tabla 2.9. Preservación de semillas de quinoa en condiciones diferentes de almacenamiento. La viabilidad se midió según el test de tetrazolio.

Cultivar	Baer II	Ollagüe	Baer II	Ollagüe	Baer II	Ollagüe
Almacenamiento	ambientales		lento		acelerado	
Humedad relativa (%)	14		14		75	
Temperatura (°C)	25±2		-20±1		36±1	
Contenido de agua (% bs) ^a	3,6±0,1	3,8±0,1			15,2±0,4	14,2±0,4
Viabilidad (%)	100	95 ± 5	96±4	92±4	100	95±5
Germinación (%)	100	63 ± 10	97±6	93±6	100	63±10
Viabilidad después de 6 meses (%)	100	85 ± 5	96±4	92±4	0	0
Germinación después de 6 meses (%)	95±3	33 ± 6	97±6	93±6	0	0

^a(% bs): porcentaje en base seca.

En condiciones de almacenamiento ambientales (envejecimiento intermedio), la germinación disminuyó significativamente por el almacenamiento en cv. Ollagüe, afectando apenas la viabilidad. Sin embargo, las semillas de cv. Baer II se preservaron mejor que las anteriores luego de 6 meses de almacenamiento en las mismas condiciones. Estas diferencias significativas entre los cultivares en cuanto a las tasas de germinación por el almacenamiento, no correlacionaron con la disminución de los valores de viabilidad. Debido a que las condiciones del medio ambiente natural son diferentes entre los cultivares (cv. Baer II se encuentra adaptada a condiciones húmedas mientras que cv. Ollagüe no) se esperarían encontrar diferencias en su comportamiento durante el almacenamiento en condiciones de alta humedad relativa. A pesar de esto, las semillas almacenadas a 14% HR mostraron diferencias significativas entre los cultivares en cuanto a su preservación, mientras que en condiciones de almacenamiento acelerado, el comportamiento de ambos cultivares fue similar con pérdida total del poder germinativo en esas condiciones.

b) Efecto sobre las propiedades térmicas.

Es sabido que la velocidad de reacciones químicas y enzimáticas, incluyendo las de pardeamiento, se relaciona con el estado físico de las matrices en las que desarrollan (Sun y Leopold, 1993; Labuza, 1994; Sun y col., 1998). Recientemente se realizaron numerosos estudios en semillas que ponen énfasis en el tipo de reacción causante de la pérdida de viabilidad y su relación con las transiciones de estado y de fase que tienen lugar en estos sistemas (Sun y Leopold, 1993; Baker y Bradford, 1994; Buitink y col., 2000)

Con el objetivo de estudiar el efecto del almacenamiento sobre las propiedades térmicas se estudiaron las transiciones térmicas de las distintas variedades de semillas de quinoa.

El contenido de agua requerido para detectar la presencia de agua congelable o agua libre es un punto crítico en sistemas de alimentos ya que muchas de las reacciones de deterioro y también el crecimiento microbiano son dependientes de la presencia de agua libre. En el caso de las semillas es aún más crítico ya que marca el límite de tolerancia a la desecación y el comienzo de la germinabilidad. La transición térmica correspondiente a la fusión de hielo comenzó a -30°C (Figura 2.35) y fue detectada en semillas enteras de cv. Ollagüe, cv. Sajama y cv. Baer II equilibradas a 98% de humedad relativa (correspondiente a un contenido de agua de 30-35 g agua/100g sólidos).

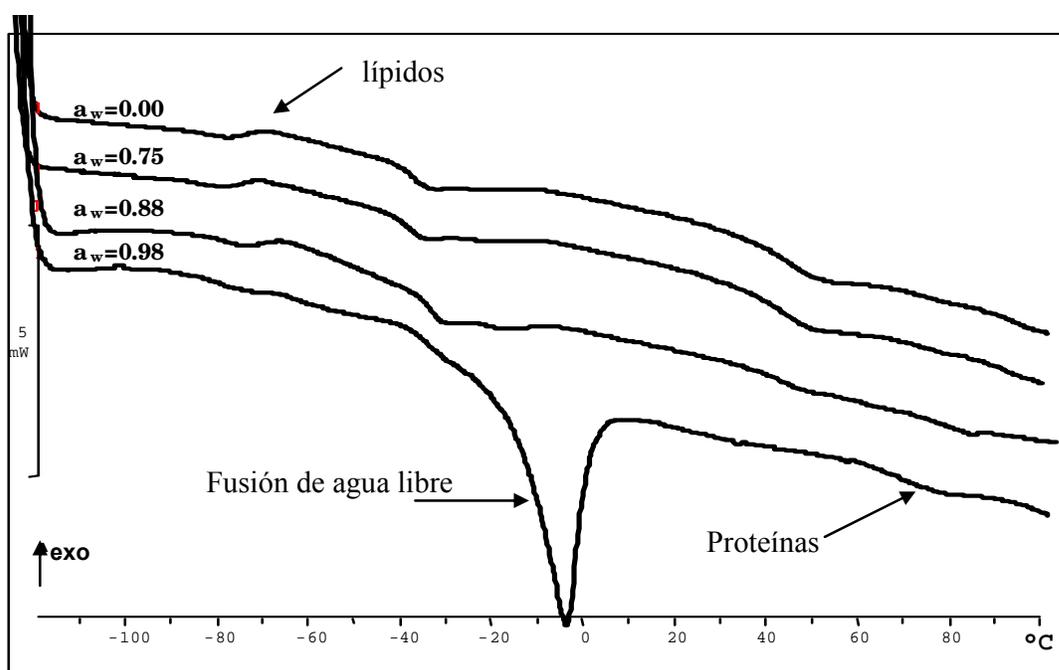


Figura 2.35. Termogramas obtenidos por calorimetría diferencial de barrido (DSC) de semillas enteras de cv. Baer II almacenadas durante 20 días sobre soluciones saturadas de diferentes actividades de agua (a_w), correspondientes a un contenido de agua entre 5 y 35 g agua/100 g sólidos. Rango de medición: -120° a 100°C ($10^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Las flechas señalan los eventos atribuidos a la presencia de agua libre congelable ó lípidos

La temperatura de transición vítrea disminuyó con el aumento del contenido de agua de las semillas (Figura 2.36), sin embargo la detección de esta transición fue difícil de realizar en muestras complejas como las semillas, requiriéndose realizar la medición en los embriones aislados y no sobre la semilla entera.

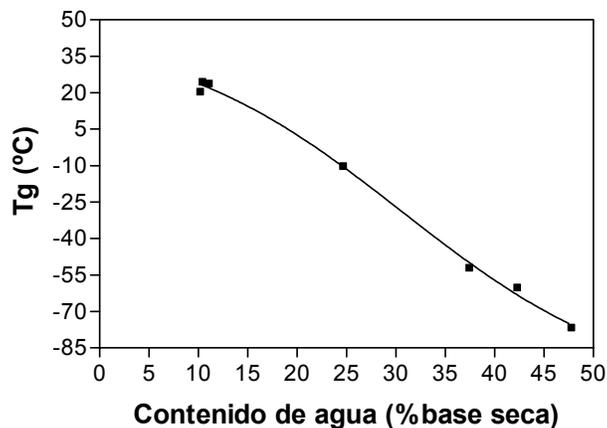


Figura 2.36. Variación de la temperatura de transición vítrea (Tg) en función del contenido de agua en embriones de quinoa cv. Baer II.

Un evento endotérmico fue observado con un inicio a $32\pm 2^{\circ}\text{C}$ y un pico $45\pm 2^{\circ}\text{C}$ (Figura 2.37) independientemente del contenido de agua tanto en semillas enteras como en embriones deslipidados equilibrados en el rango de 59-96% HR. Este evento endotérmico desapareció luego de un rescane de la muestra, sugiriendo que es un evento irreversible. Appelqvist y col. (1993) observaron eventos similares para varios polisacáridos asociándolo a interacciones agua-carbohidratos.

Se observaron transiciones térmicas que también fueron independientes del contenido de agua (Tabla 2.10) en el rango de -80 a -10°C y se atribuyeron a transiciones correspondientes a la presencia de lípidos presentes en el embrión, ya que al deslipidarlos estas transiciones desaparecieron o disminuyeron significativamente, y sí se observaron en el extracto lipídico obtenido (Figura 2.37). Estos eventos térmicos también fueron reportados en embriones de maíz (Williams y Leopold, 1989), semillas de *Cuphea* (Crane y col., 2003) y quinoa cv. (Matiacevich y col., 2006), especies con alto contenido lipídico. El inicio de estos eventos fue observado a $-79\pm 2^{\circ}\text{C}$ independientemente del contenido de agua tanto en embriones como en semillas enteras (Tabla 2.10), lo que indica que no es necesario la separación del embrión para la observación de las transiciones correspondientes a lípidos.

temperatura que cv Baer II, siendo estos dos parámetros obtenidos indicadores de las diferencias en el comportamiento al almacenamiento observadas.

De esta manera, la inhibición de la movilidad molecular a bajos contenidos de agua se vio bien reflejada por la menor cristalización de agua y la menor desnaturalización de proteínas. El aumento en el contenido de agua produjo un aumento de la entalpía de desnaturalización de proteínas y una disminución de la temperatura a la cual esta transición ocurre (Figura 2.38), tanto para semillas enteras como para embriones. Los mismos resultados obtenidos para embriones enteros fueron obtenidos en embriones deslipados (mediante extracción con solvente orgánico).

Sun y col. (1998) reportaron que la estabilidad de las proteínas exhibe una fuerte dependencia con la temperatura de transición vítrea (T_g), atribuyendo un rol importante al estado vítreo para la estabilización de las proteínas. Si bien los valores obtenidos de temperatura y entalpía fueron diferentes en semillas enteras y embriones, las transiciones correspondientes a la desnaturalización de proteínas tuvieron similares características en ambos (deslipados o no) (Figura 2.38). Por lo tanto, se podría analizar la desnaturalización sin el paso previo de separación de embriones y de remoción de lípidos de éstos. Además, entre cultivares de diferentes comportamientos al almacenamiento se observaron diferentes patrones de temperaturas de desnaturalización. Entonces se puede proponer el análisis de desnaturalización de proteínas como un índice adecuado de deterioro durante el almacenamiento en semillas de quinoa.

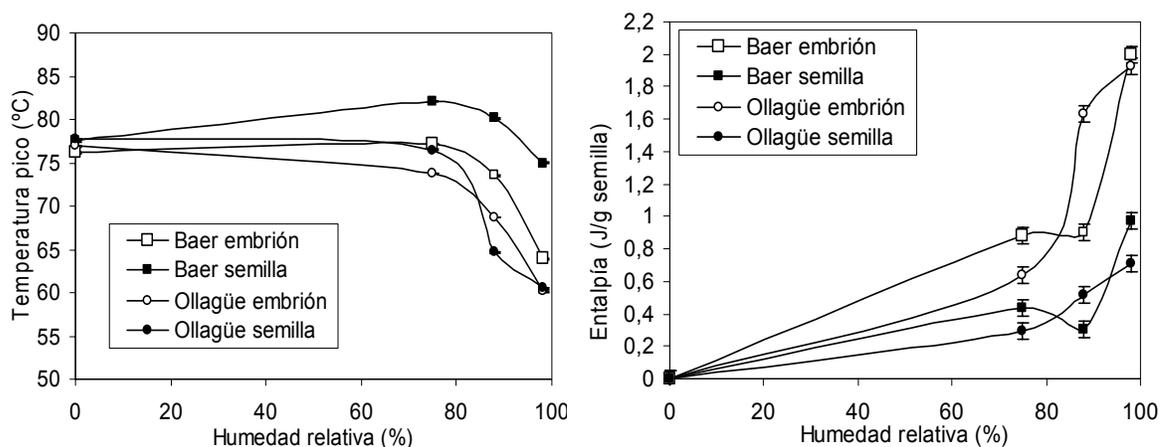


Figura 2.38. Variación de la temperatura del pico (A) y de la entalpía (ΔH) de desnaturalización de proteínas obtenida por DSC de semillas y embriones de quinoa cv. Baer II y cv. Ollagüe almacenadas a diferentes humedades relativas (HR).

Los termogramas obtenidos luego de 6 meses de almacenamiento en condiciones intermedias (14% HR y 25°C) ó aceleradas (14% HR y 25°C) de envejecimiento de las semillas se muestra en la Figura 2.39.

Luego de 6 meses de envejecimiento acelerado se observó una clara disminución de la intensidad de las transiciones térmicas: la transición correspondiente a lípidos fue apenas perceptible, probablemente debida a oxidaciones de los mismos y no se observó la transición correspondiente a desnaturalización de proteínas, debido a que se encontrarían desnaturalizadas antes del ensayo de DSC.

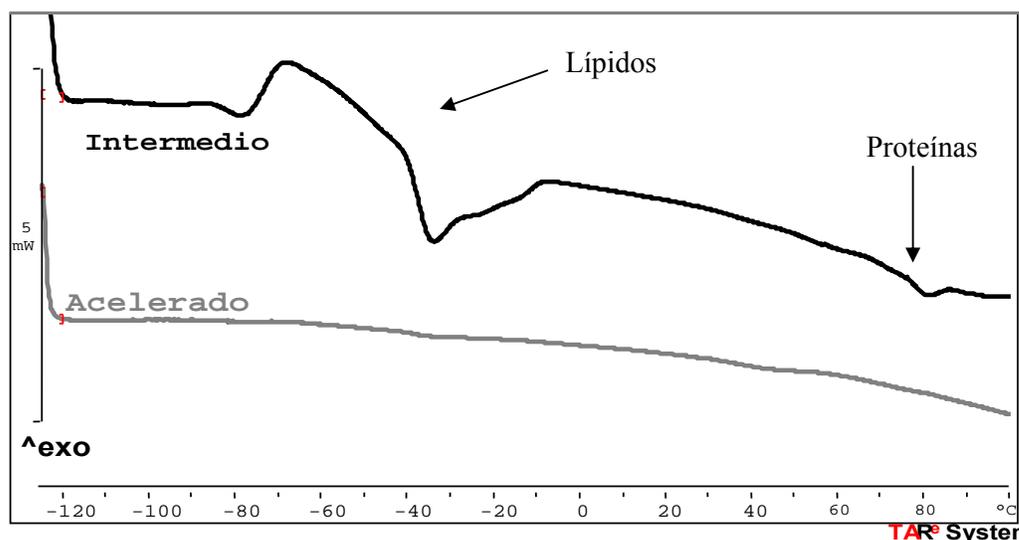


Figura 2.39. Termogramas obtenidos por DSC de semillas de cv. Baer II almacenados luego de 6 meses de almacenamiento en condiciones intermedias (14% HR y 25°C) ó aceleradas (14% HR y 25°C) de envejecimiento. Rango de medición: -120°C a 100°C (10°C/min).

c) Efecto sobre el color de las semillas.

En la Figura 2.40.A se muestra una fotografía digital de las semillas luego de 6 meses de almacenamiento en distintas condiciones. Se observó una variación significativa en la coloración de la semilla entera y del embrión en el almacenamiento acelerado.

Se observó una gran diferencia de color entre el embrión y el perisperma de reserva. Debido a la dificultad para separar los embriones y la gran cantidad necesaria de los mismos para poder obtener parámetros de color utilizando el fotocolorímetro, se obtuvo el índice de pardeamiento por análisis de imagen digital utilizando un programa computacional que permitió calcular el índice de pardeamiento, y los resultados se muestran en la Figura 2.40.B. Estudios previos de la variación del color por tratamientos térmicos en sistemas alimenticios (manzana) correlacionaron positivamente el color obtenido a través de análisis de imágenes con el obtenido a través del fotocolorímetro (Acevedo y col., 2008).

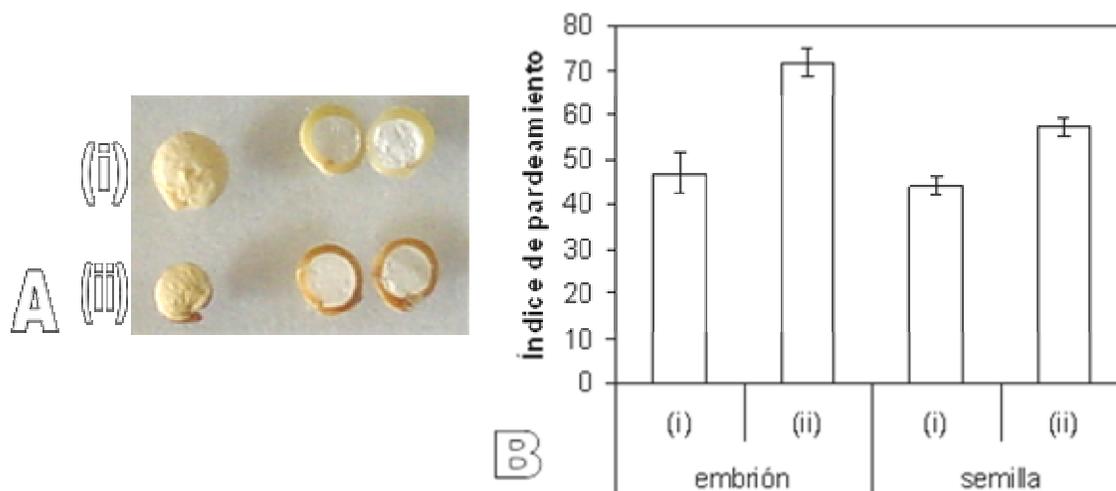


Figura 2.40. Semillas de quinoa cv. Ollagüe luego de 6 meses de almacenamiento; (i): intermedio (14% HR y 25°C) (ii): acelerado (75%HR y 36°C). (A) Fotografía digital (B) Índice de pardeamiento calculado por análisis de imagen.

El pardeamiento de la cubierta de las semillas y del embrión puede ser atribuido al menos a dos reacciones químicas diferentes en los sistemas biológicos. La reacción de Maillard y la polimerización de taninos solubles (leuco-antocianinas) presentes en la cubierta de las semillas de quinoa (Ruales y Nair, 1993), que forman polímeros polifenólicos de alto peso molecular de color pardo (Nozzolillo y De Bezada, 1984).

Los resultados obtenidos muestran un mayor pardeamiento en las semillas que fueron almacenadas durante 6 meses en condiciones de envejecimiento acelerado, tanto sobre la cubierta como sobre el embrión, comparando con las almacenadas el mismo período en condiciones de envejecimiento intermedio. Estos resultados se obtuvieron para ambos cultivares (Ollagüe y Baer II). En estas condiciones de almacenamiento acelerado, la generación de compuestos provenientes de la reacción de Maillard se encuentra más favorecida que en las condiciones de envejecimiento intermedio o lento. Al igual que lo observado por Sun y Leopold (1995) a 36°C y 75% HR para semillas de soja, el aumento de los productos de Maillard (pigmentos) en el embrión correlacionó con la pérdida de germinabilidad de las semillas. Sin embargo, fue menos obvia la correlación en condiciones de almacenamiento menos drásticas (Baker y Bradford, 1994).

La concentración de taninos en semillas de quinoa es de 0,5%, la concentración de proteínas es del 12-16% y el de azúcares reductores el 2% (Ahamed y col., 1998; Chauhan y col., 1992), por lo tanto ambos tipos de reacciones son posibles, principalmente en condiciones de envejecimiento acelerado.

d) Efecto sobre la solubilidad de proteínas.

La cuantificación de las proteínas solubles por el método de Bradford (Figura 2.41) mostró diferencias entre cultivares antes del almacenamiento, donde fue mayor la cantidad de proteínas solubles obtenidas en cv. Baer II que en cv. Ollagüe. Esta diferencia se puede atribuir a diferencias genéticas entre los cultivares. No se observaron diferencias entre los cultivares en las fracciones solubles durante el almacenamiento por ninguno de los dos métodos analizados (Bradford o micro-Kjeldahl, Figuras 2.41 y 2.42).

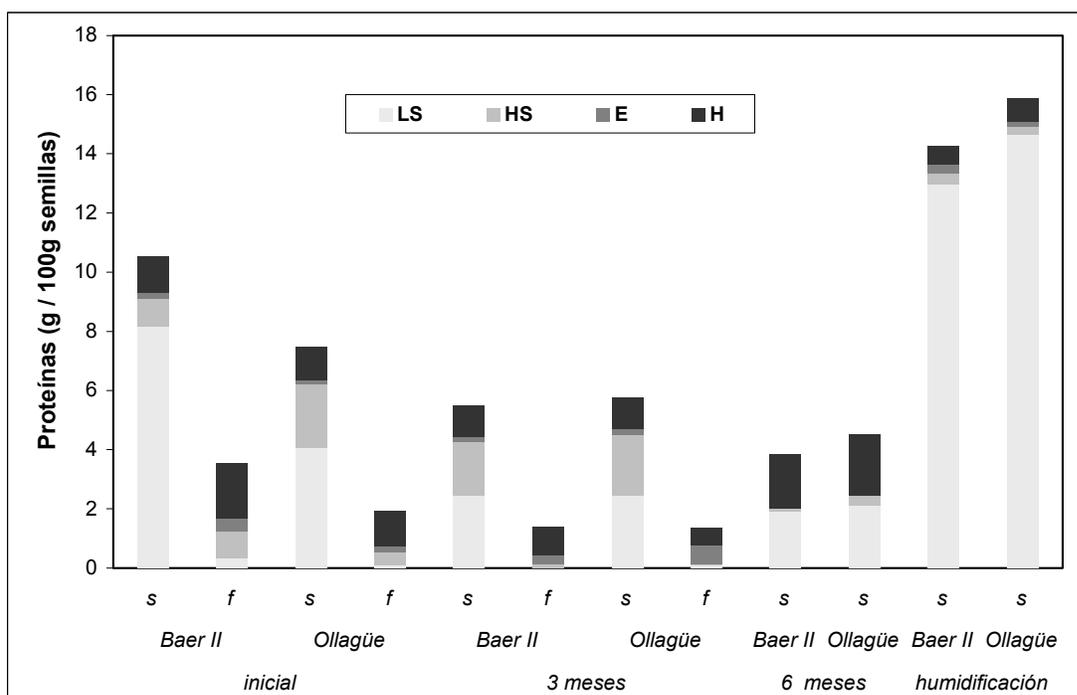


Figura 2.41. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford de semillas de quinoa cv. Baer II y cv. Ollagüe almacenadas en distintas condiciones ambientales: (s): ambientales a 25°C y 14% HR, (f): aceleradas a 37°C y 75% HR. Las semillas que tuvieron el tratamiento de humidificación fueron las semillas almacenadas 6 meses en condiciones ambientales que fueron humidificadas a 100% de humedad relativa y 4°C durante 20 h.

Extractos: LS (Low Salt): 50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl *buffer* pH 8,3; HS (High Salt): 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl *buffer* pH 8,3; E (Etanol): 70% alcohol etílico; H (Hidróxido): 0,1 M NaOH.

Particularmente, la fracción soluble salina (LS) se redujo y la fracción soluble alcalina (H) aumentó levemente (Fig. 2.41). Se observó también una disminución de los niveles de proteínas solubles totales luego del almacenamiento en todas las condiciones de envejecimiento estudiadas en ambos cultivares (Figuras 2.41 y 2.42).

Con el objetivo de confirmar el aumento de una fracción proteica insoluble debido al almacenamiento, el contenido de proteínas totales, solubles o insolubles fue determinado también por micro-Kjeldahl en semillas almacenadas durante 3 meses en condiciones de almacenamiento intermedio (s) y acelerado (f), y se muestra en la Figura 2.42.

Luego del tratamiento de humidificación o “*priming*” posterior al almacenamiento (tanto intermedio como lento), que induce eventos pregerminativos, la cantidad de proteínas solubles aumentó significativamente en ambos cultivares, lo que indica que proteínas insolubles se solubilizan y/o hay generación de proteínas *de novo* durante el proceso de germinación. Sin embargo, la mayor cantidad de proteínas solubles no correlaciona con la factibilidad de germinación de las semillas.

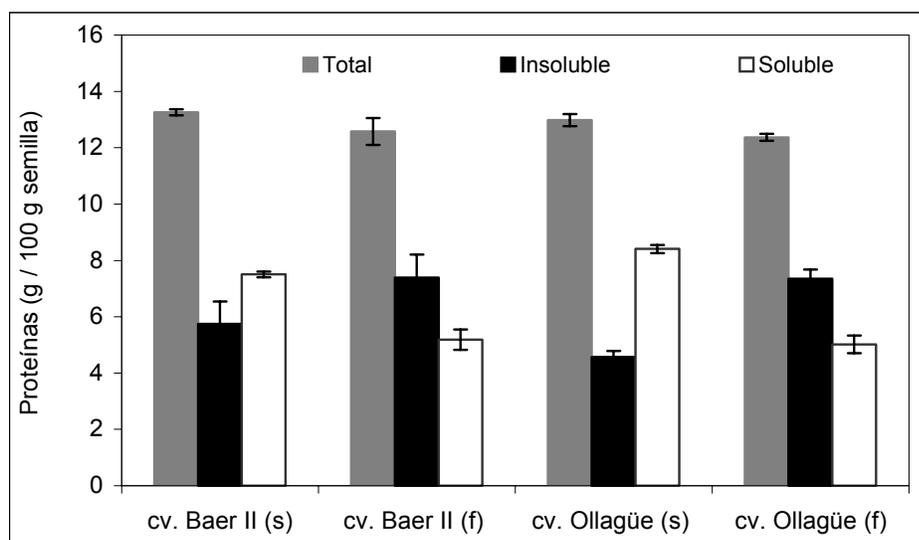


Figura 2.42. Cuantificación de proteínas según el método de micro-Kjeldahl para las fracciones soluble, insoluble y totales de cv. Baer II y cv. Ollagüe en las condiciones de almacenamiento de envejecimiento intermedio (s) (14% HR y 25°C) y envejecimiento acelerado (f) (75% HR y 36°C).

Estos resultados fueron consistentes con la agregación de proteínas durante el almacenamiento, las cuales fueron insolubilizándose en la solución salina. Estos agregados desaparecieron en los eventos pre-germinativos, probablemente debida a la activación de los mecanismos de reparación (Bray, 1995). El patrón electroforético obtenido por SDS-PAGE apoya la hipótesis del aumento de proteínas de almacenamiento (Figura 2.43) y no sintetizadas *de novo*.

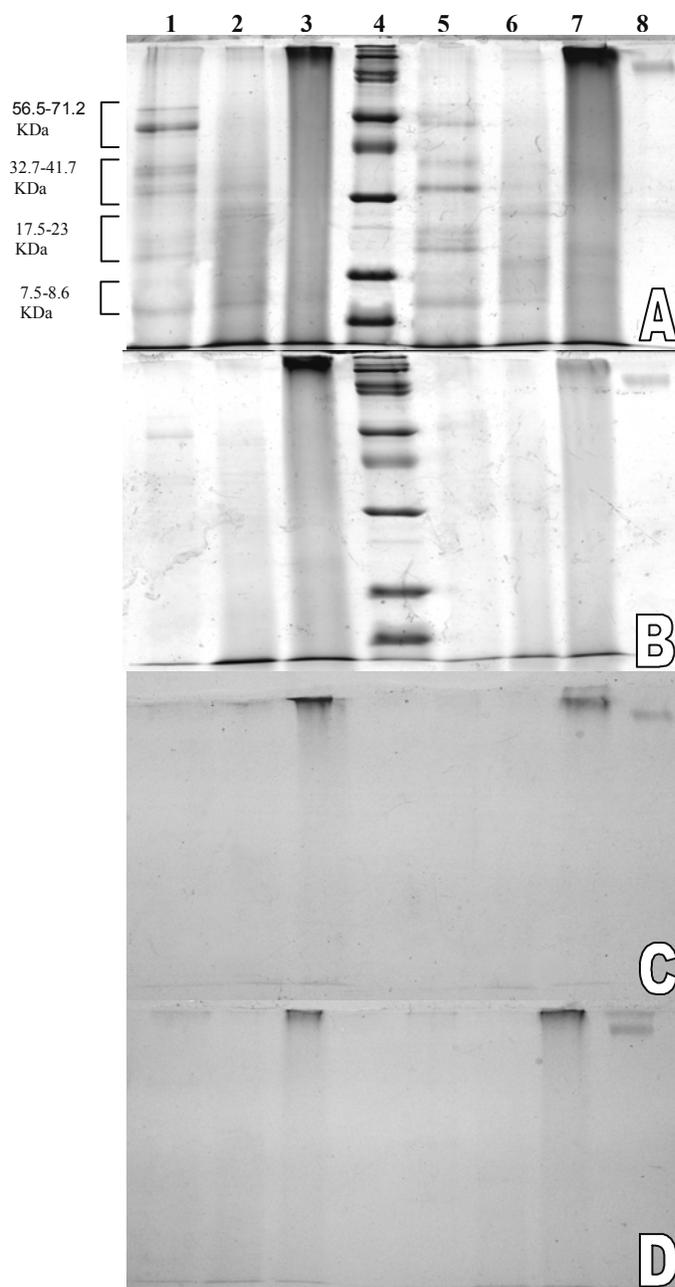


Figura 2.43. SDS-PAGE de diferentes fracciones proteicas de distintos cultivares de quinoa.

A, C. Semillas almacenadas durante 6 meses a 14%HR y 25°C fueron humidificadas a 100%HR y 4°C por 20 h.

B, D. Semillas almacenadas durante 6 meses a 14%HR y 25°C. Tinción de los geles: **A, B** Azul de Coomassie para proteínas; **C, D.** Ácido periódico-Schiff para glicoproteínas.

Calles: 1-3 :cv. BaerII, 1: LS+HS, 2: E, 3: H; 4: marcador de peso molecular; 5-7: cv. Ollagüe, 5: LS+HS, 6: E, 7: H; 8: invertasa.

El rango de pesos moleculares (kDa) se agregó a la izquierda del gel.

Cuando la fracción de proteínas almacenadas en condiciones de envejecimiento acelerado durante 6 meses fue analizada por SDS-PAGE, se observó un amplio rango de pesos moleculares (sin bandas específicas) al teñir con azul de Coomassie. Este patrón electroforético fue consistente con clivajes no específicos y entrecruzamiento, característico del deterioro no enzimático. El deterioro en las proteínas de almacenamiento podría ser indicativo de la ocurrencia de reacciones durante el almacenamiento en condiciones desfavorables (alta temperatura y alta humedad). Con el objetivo de determinar la presencia

de glicoproteínas (posible indicador de la formación de AGEs), la reacción de PAS fue utilizada para teñir el gel (Figura 2.43. C y D).

El patrón observado, igual al obtenido por azul de Coomassie, principalmente en la fracción soluble alcalina (H) fue consistente con la presencia de compuestos glicoproteicos en esta fracción. Además, el contenido de proteínas de esta fracción aumentó con el tiempo de almacenamiento (Figura 2.41). Ambos resultados sugieren que la presencia de proteínas glicosiladas se encuentra asociada a los efectos de envejecimiento causados por las condiciones extremas de almacenamiento.

Las semillas pre-germinadas (humidificadas) presentaron varias bandas proteicas. Los distintos cultivares de quinoa presentaron patrones electroforéticos de SDS-PAGE diferentes entre ellos cuando se revelaron con la tinción azul de Coomassie (Figura 2.43 A y B), lo cual coincide con estudios previos (Fairbanks, 1990; Brinegar y Goudan, 1993; Castellión y col., 2008).

Los valores de peso molecular para cada una de las bandas observadas se obtuvieron realizando el cálculo del Rf, tal como se indicó en Materiales y Métodos (Figura III.14). El extracto salino (LS y HS) de Cv. Baer II reveló 9 bandas diferentes (7,5, 17,5, 21,2, 32,7, 34,8, 38,1, 40,4, 56,5 y 68,7 kDa) mientras que Ollague reveló 8 bandas (8,6, 18,2, 20,5, 22,8, 33,7, 41,7, 58,3 y 71,2 kDa) (una banda menos que cv. Baer II en el rango de 40 kDa). En cambio, el extracto soluble etanólico (E) de cv. Baer II mostró 4 bandas de 8,2, 15,1, 26,9 y 32,7 kDa mientras que el extracto de cv. Ollagüe presentó 5 bandas de 8,2, 14,5, 26,0, 34,8 y 40,7 kDa (una banda más que cv. Baer II en el rango de 40 kDa).

Se observaron también bandas de alto peso molecular en otros cultivares (no fueron descritas). Brinegar y Goundan, (1993) estudiaron la composición proteica de semillas de quinoa, y reportaron la presencia de una globulina de tipo 11S llamada quenopodina. Las globulinas (extraídas en soluciones salinas) se caracterizan por dos grupos heterogéneos de polipéptidos de un tamaño en los rangos de 30-40 kDa y 20-25 kDa, los cuales se encuentran unidos por puentes disulfuro en la proteína nativa. La fracción salina LS utilizada en este estudio se asimiló a los componentes de la quenopodina, de acuerdo con las bandas electroforéticas de la Figura 2.43 A y B, corroborada por sus pesos moleculares.

La banda obtenida a 7,5 kDa y 8,6 kDa en estos cultivares correlaciona con la proteína 2S globulina rica en cisteína (7,5-9 kDa), una proteína de almacenamiento importante observada en varios cultivares de semillas de quinoa (Brinegar y col., 1996; Castellión y col., 2008).

Estos resultados obtenidos por electroforesis apoyan la hipótesis de la reparación de las proteínas de las semillas más que la síntesis de proteínas relacionadas a la germinación, ya

que fueron detectadas varias bandas características de proteínas de almacenamiento. Entre los cultivares se observaron diferencias en la composición proteica (Figura 2.43 A y B). Como las condiciones de crecimiento del conjunto de plantas de las cuales provienen las semillas fueron idénticas entre ambos cultivares, la heterogeneidad encontrada en la composición de proteínas estaría relacionada a diferencias genéticas entre los cultivares mismos. Por lo tanto, estos resultados fueron consistentes con los resultados obtenidos por Fairbanks y col. (1990), quienes propusieron la posibilidad de utilizar la heterogeneidad de los polipéptidos y su patrón electroforético como marcadores moleculares para la identificación y clasificación del germoplasma de quinoa. Además, estos resultados apoyan la hipótesis de la ocurrencia de insolubilización de las proteínas durante el almacenamiento.

e) Efecto sobre la fluorescencia.

En primer lugar se realizó una caracterización de la fluorescencia obtenida en cada fracción soluble de proteínas. A cada fracción se realizó un espectro de absorción, espectros fluorimétricos de excitación y emisión. Los espectros de fluorescencia, tanto los de emisión como los de excitación se corrigieron por la absorbancia a la longitud de onda de excitación correspondiente y por la cantidad de proteínas de cada fracción.

En la Figura 2.44 A y B se observa los espectros de excitación de cada una de las fracciones proteicas obtenidas de cv. Baer II y cv. Ollagüe, respectivamente.

Luego del envejecimiento acelerado (36°C y 75% HR), los extractos presentan el mismo espectro, sin variación de los picos máximos observados en ambos cultivares (datos no mostrados). En cada fracción se obtuvieron diferentes máximos de excitación, lo que indica la presencia de varios compuestos en cada fracción y diferentes entre sí, que generan fluorescencia emitiendo a 450 nm. Los picos máximos de excitación (nm) principales para cada fracción proteica obtenidos se muestran en la Tabla 2.11.

Tabla 2.11. Picos máximos de excitación (nm) principales (± 5 nm). Emisión a 450 nm.

Fración soluble	Cv. Baer II	Cv. Ollagüe
LS	280, 305, 333, 360	288, 308, 336, 362
HS	280, 346, 360	285, 346, 362
E	270, 290, 330, 360	265, 270, 280, 340, 360
H	290, 333, 360	290, 333, 362, 385

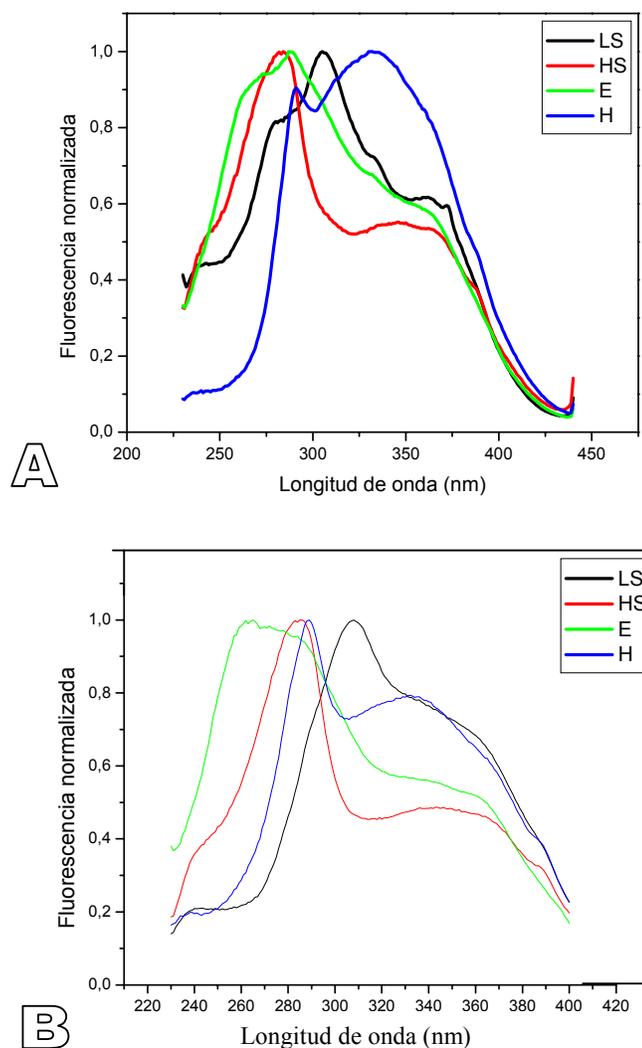


Figura 2.44. Espectros de excitación (normalizados) de las diferentes fracciones proteicas obtenidas de cv. Baer II (A) y cv. Ollagüe (B), siendo la emisión a 450 nm. Extractos: LS (Low Salt); HS (High Salt); E (Etanol); H (Hidróxido).

La presencia de un pico máximo de excitación a 265 y 270 nm en la fracción etanólica indicaría la presencia de proteínas conteniendo fenilalanina y tirosina, respectivamente o una mayor exposición de éstas al medio.

Como se puede observar para ambos cultivares en las Figuras 2.44 y 2.45, a medida que aumentó la longitud de onda de excitación, aumentó la longitud de onda del pico máximo de emisión, indicando que a cada longitud de onda de excitación, están emitiendo fluorescencia diferentes tipos de compuestos, de modo similar a lo observado en sistemas modelo de Maillard o de pigmentos polifenólicos (Sección IV.1.2).

Al comparar las condiciones de almacenamiento se observó mayor fluorescencia cuando se realizó el envejecimiento acelerado (Tabla 2.11).

Tabla 2.11. Cuantificación de compuestos fluorescentes de cada fracción proteica soluble. El valor de intensidad de fluorescencia (ec. III.6) se encuentra expresada en UF/g semilla. Condiciones de almacenamiento: ambiental: 14% HR y 25°C, acelerado: 75% HR y 36°C.

almacenamiento		cv. Baer II		cv. Ollagüe	
		ambiental	acelerado	ambiental	acelerado
3 meses	LS	30,1 ± 0,4	52,6 ± 0,2	12,2 ± 0,4	57,6 ± 0,2
	HS	12,6 ± 0,4	9,9 ± 0,2	7,7 ± 0,4	37,5 ± 0,2
	E	10,1 ± 0,4	13,9 ± 0,2	7,2 ± 0,4	19,1 ± 0,2
	H	13,1 ± 0,4	20,6 ± 0,2	8,2 ± 0,4	14 ± 0,2
	Total	65,9	97	35,3	128,2
6 meses	LS	16,0 ± 3	-	16,6 ± 0,2	-
	HS	3,4 ± 0,2	-	3,2 ± 0,2	-
	E	8,3 ± 1,2	-	4,7 ± 0,5	-
	H	4,8 ± 1	-	3,8 ± 0,4	-
Total	32,5		28,3		
6 meses+ humidificación	LS	24,8 ± 7,6	-	26,9 ± 6	-
	HS	6,4 ± 1	-	4,3 ± 0,2	-
	E	6,1 ± 0,7	-	4,1 ± 0,4	-
	H	2,1 ± 0,4	-	1,9 ± 0,2	-
	Total	39,4		37,2	

Tanto para cv. Baer II como para cv. Ollagüe, los espectros de emisión de fluorescencia y la longitud de onda del pico máximo de emisión obtenido en cada fracción no variaron significativamente con el envejecimiento. Al comparar los cultivares se observó que excepto para el extracto LS, en todos los extractos se observó mayor fluorescencia en la variedad Ollagüe que en la variedad Baer II.

Al realizar la excitación a 380 nm se observa (Figura 2.45) que no hubo diferencias en el pico máximo de emisión entre las fracciones, indicando que la fluorescencia emitida a 450 nm se debe a la presencia de un único tipo de compuesto presente en todas las fracciones.

Este análisis permite distinguir la fluorescencia intrínseca de las proteínas de la de los pigmentos pardos, pero no discriminar entre pigmentos de Maillard y polifenólicos, debido a sus características de fluorescencia similares.

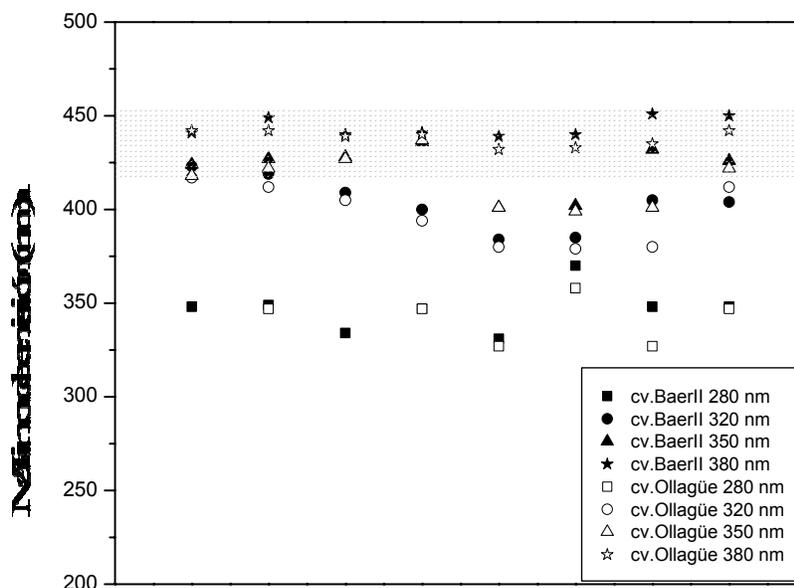


Figura 2.45. Longitud de onda del pico máximo de emisión a diferentes longitudes de onda de excitación para los cultivares Baer II y Ollagüe con y sin almacenamiento en condiciones de envejecimiento acelerado.

IV.2.4.2. Cambios provocados por la irradiación de las semillas

Se realizó la irradiación de las semillas durante diferentes tiempos con tubo a λ de 380 nm (potencia de $0,28 \pm 0,02$ mW/cm²) ó con luz visible (potencia de $5,76 \pm 0,02$ mW/cm²), a temperatura constante de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ durante todo el experimento. Los resultados se compararon con un control almacenado en oscuridad.

Los experimentos se realizaron por sextuplicado y el análisis estadístico se realizó por T-test de variables dependientes al tiempo cero con una significancia de $p < 0,05$ utilizando el programa STATISTICA ó comparando el promedio con sus desvíos estándares de 98% de confianza.

a) Efectos sobre el color en semillas enteras y molidas.

Las semillas de quinoa (enteras o molidas) no presentaron diferencias significativas de color luego de la irradiación a diferentes tiempos y potencias, para ninguna de los cultivares analizados. Las Figuras 2.46 y 2.47 muestran el resultado del índice de pardeamiento (ec. III.5) y las fotografías digitales en cv. Baer II (A y C) y cv. 2-Want (B y D) antes y después del último tiempo de irradiación realizado sobre semillas enteras o molidas, respectivamente.

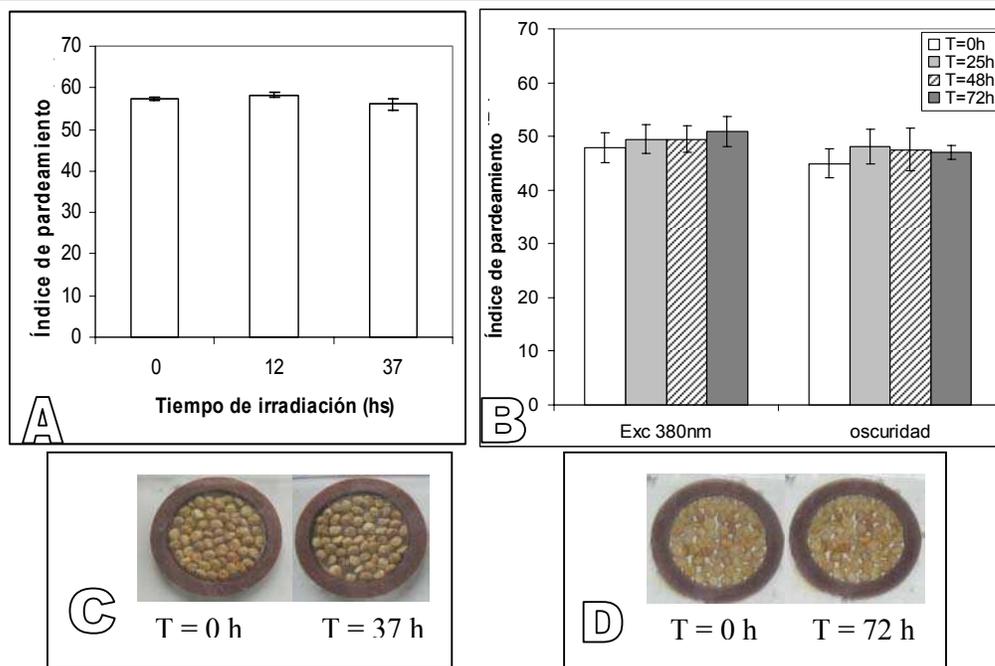


Figura 2.46. A y B. Índice de pardeamiento de cv. Baer II y cv. 2-Want, respectivamente y el control en oscuridad (irradiación a 380nm) C y D. Fotografías digitales de los sistemas analizados antes y después de la irradiación de cv. Baer II y cv. 2-Want, respectivamente.

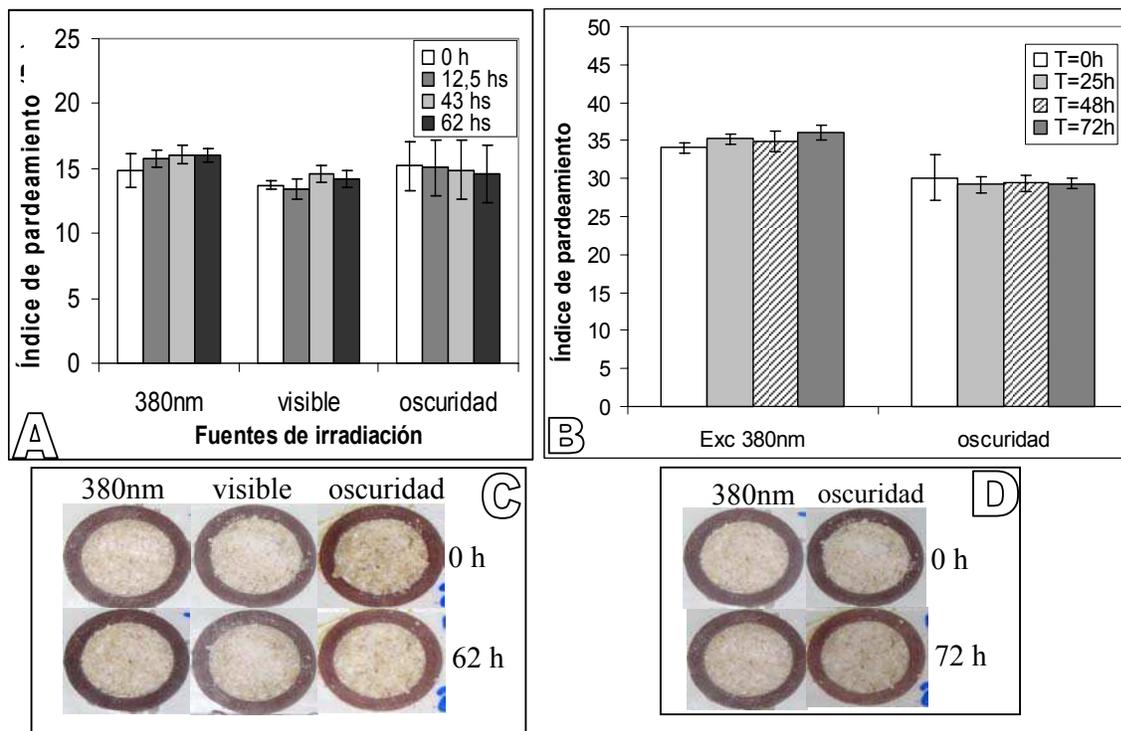


Figura 2.47. A y B. Índice de pardeamiento de semillas molidas cvs. Baer II y 2-Want, respectivamente, a distintos tiempos de irradiación. C y E. Fotografías digitales de las muestras antes de la irradiación (0h, fila de arriba) o al tiempo final de irradiación (fila de abajo) de cv. Baer II y cv. 2-Want, respectivamente.

b) Efectos sobre los extractos proteicos

Se realizó una comparación entre los extractos proteicos obtenidos a partir de las semillas irradiadas enteras ó molidas. No se observaron diferencias significativas en los extractos proteicos por efecto de la irradiación en la concentración de proteínas (Figura 2.48), ni en el índice de pardeamiento (Figura 2.49), ni en el patrón electroforético (2.50), tanto para los extractos provenientes de las semillas irradiadas enteras o molidas.

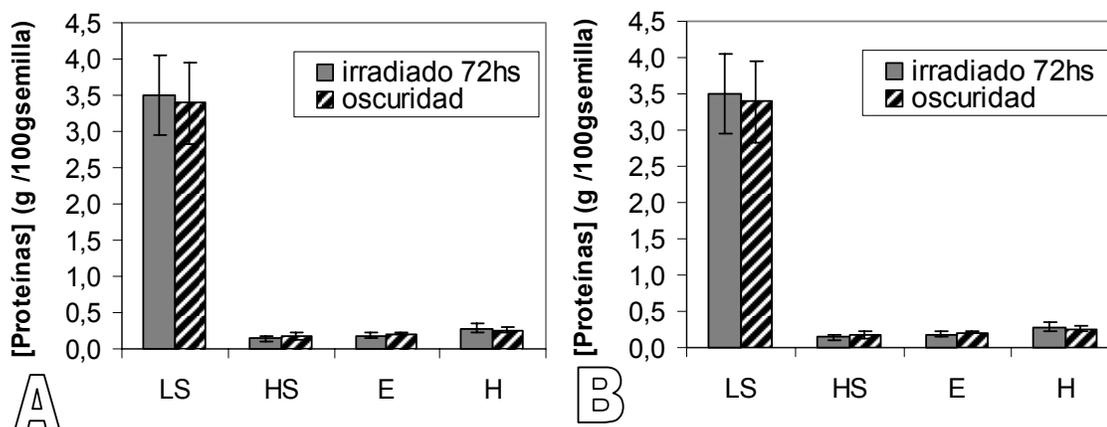


Figura 2.48. Cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford, de cada fracción proteica extraída según método de Osborne. **A.** Extractos obtenidos a partir de semillas enteras (molienda posterior a la irradiación) **B.** Extractos obtenidos a partir de semillas molidas (molienda anterior a la irradiación).

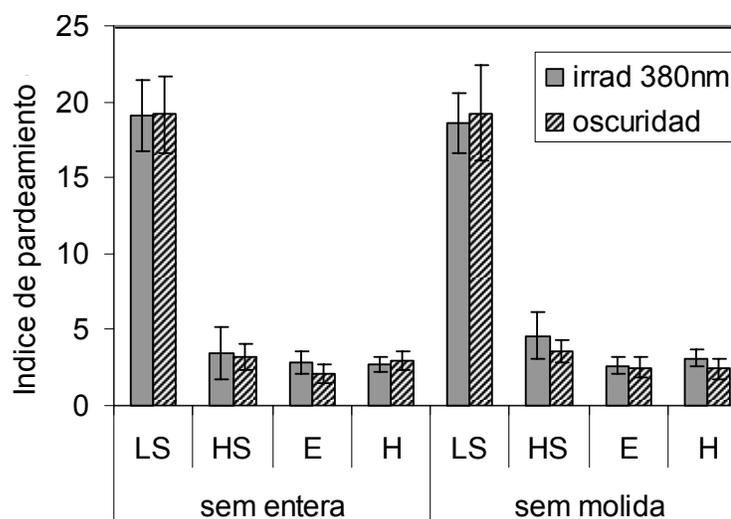


Figura 2.49. Índice de pardeamiento de cada fracción proteica extraída de semillas cv. 2-Want según método de Osborne (1924) irradiadas enteras (sem entera) ó molidas (sem molida).

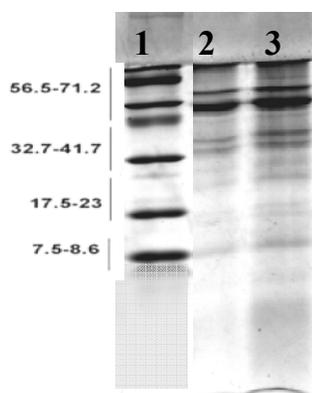


Figura 2.50. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (15% *resolving*/4% *stacking*), teñido con azul de Coomassie de extractos LS proveniente de semilla irradiada entera (calle 2) o molida (calle 3). Calle 1: Marcador de peso molecular, al costado del gel se muestran los rangos de peso molecular (kDa).

IV.2.4.3. Envejecimiento acelerado combinado con irradiación.

Con el objetivo de evaluar si la irradiación produjo cambios en el comportamiento germinativo de las semillas, se realizó un envejecimiento acelerado en las semillas, mediante un almacenamiento en estufa a 37°C. Esta temperatura es lo suficientemente alta para acelerar el envejecimiento sin generar la muerte de las semillas por temperatura. Por otro lado este envejecimiento se realizó en la atmósfera generada por una solución sobresaturada de NaCl que tiene una humedad relativa ambiental del 75%, a la cual no se observó presencia de agua libre congelable en la semilla (Figura 2.39), por lo que no estarían favorecidas las reacciones de deterioro dependientes de la presencia de agua libre (Labuza, 1994) ni el ataque microbiano.

a) Efecto sobre la germinación y color de las semillas.

Los resultados obtenidos de germinación evaluada a las 72 h a 25°C de los distintos tiempos de envejecimiento acelerado se observan en la Tabla 2.11. Se observa una disminución significativa del porcentaje de germinación con el tiempo de almacenamiento, similar en las semillas mantenidas en oscuridad como en las irradiadas. Sin embargo, a largos tiempos de almacenamiento (1000 h), la irradiación provocó un impacto mucho mayor en las semillas.

Tabla 2.11. Porcentaje (%) de germinación de semillas cv. 2-Want irradiadas durante 72 h a 380 nm o mantenidas en oscuridad. El envejecimiento acelerado se realizó en estufa a 37°C.

Tratamiento	% de Germinación	
	Irradiadas 72 h a 380 nm	Control en oscuridad
Tiempo inicial sin envejecer	98±2	99±1
Envejecidas 240 h	91±2	86±1
Envejecidas 1000 h	77±1	86±2

En la Figura 2.51 se muestra el resultado del índice de pardeamiento (ec. III.5) de las semillas enteras. Hubo un leve aumento del color al aumentar el tiempo de almacenamiento en todas las muestras, pero no se encontraron diferencias significativas entre el índice de pardeamiento ($p > 0,01$) en las muestras irradiadas o no irradiadas (durante 72 h) después del envejecimiento acelerado durante 1000 h.

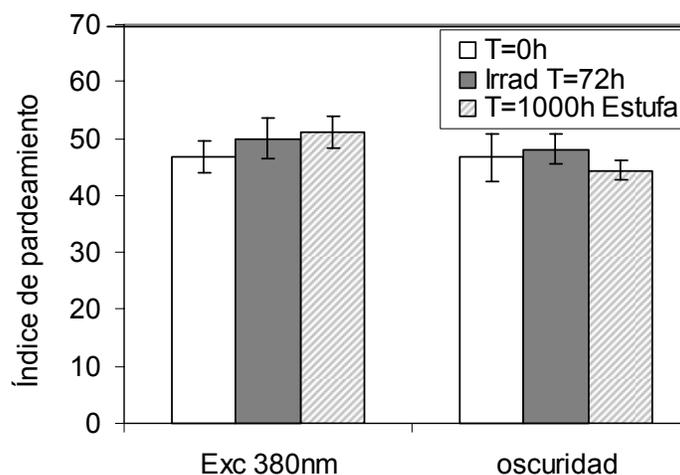


Figura 2.51. Índice de pardeamiento de semillas enteras cv. 2-Want antes (T=0 h), después de 72 h de irradiación a 380 nm (Irrad T=72 h) y luego del envejecimiento acelerado por 1000 h en estufa a 37°C y 75% HR (T=1000d Estufa).

b) Efecto sobre los extractos proteicos

Se realizó la extracción de las proteínas solubles (por sextuplicado) utilizando el método modificado de fraccionamiento secuencial de proteínas de Osborne a partir de las semillas enteras irradiadas durante 72 h a 380 nm y mantenidas en oscuridad (Sistemas de la sección IV.2.4.3.a) antes (tiempo inicial sin envejecer) y después del envejecimiento acelerado. Además, con el objetivo de determinar si las diferencias observadas en la germinación se debieron a efectos de la irradiación, semillas irradiadas envejecidas durante 1000 h se humidificaron durante 20 h a 4°C y 100% de humedad para simular el estado de las semillas antes de la germinación y luego se realizó la extracción de las proteínas mayoritarias (utilizando *buffer* LS).

No se observaron diferencias significativas en los extractos proteicos de semillas envejecidas por efecto de la irradiación, ni en la concentración de proteínas de cada fracción (Figura 2.52), ni en el patrón electroforético (Figura 2.53), ni en el color, ni en la fluorescencia (Figura 2.54),

La mayor concentración de proteínas obtenidas luego del envejecimiento (Figura 2.52.B), al igual que lo obtenido en la Figura 2.41, se debió a que en la humidificación existe un aumento de la cantidad de proteínas solubles antes de la germinación por reparación de las proteínas de almacenamiento.

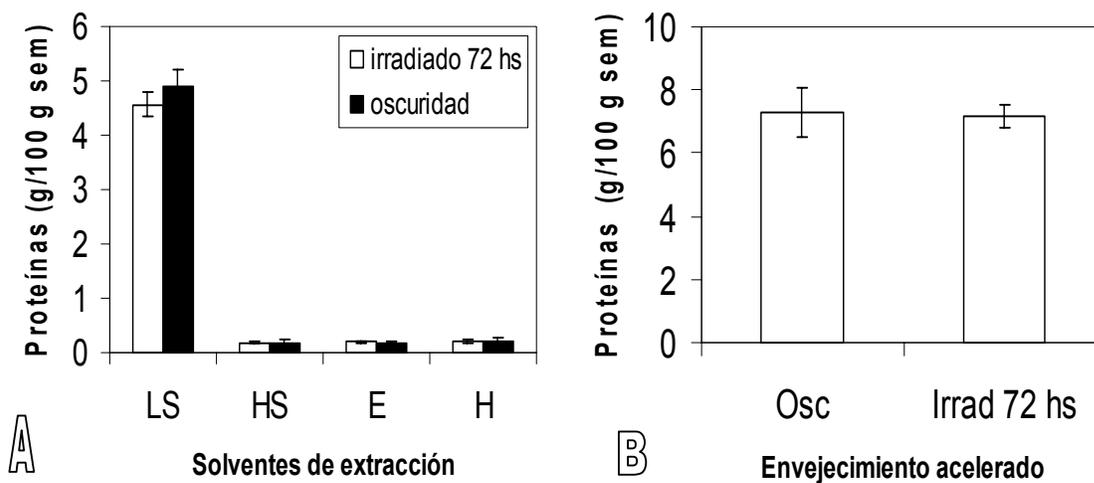


Figura 2.52. Cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford de fracciones proteicas extraídas de semillas enteras cv. 2-Want (A). Al final de la irradiación (B) Fracción LS luego de un envejecimiento acelerado generado por almacenamiento a 37°C y 75% HR durante 1000 h. Irradiación a 380 nm; control sin irradiación en oscuridad.

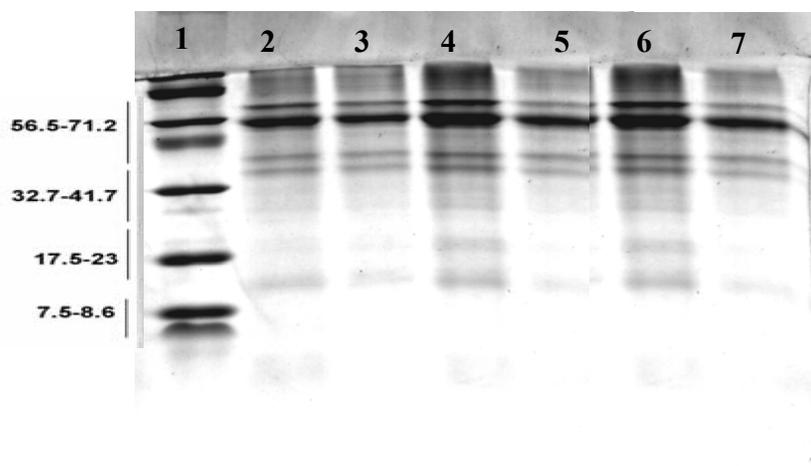


Figura 2.53. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), teñido con azul de Coomassie de extractos LS proveniente de semillas cv. 2-Want.

Calles: 1: Marcador de peso molecular; 2, 4 y 6: semillas irradiadas durante 72 h; 3, 5 y 7: semillas mantenidas en oscuridad. (2 y 3 antes de estufa; 4 y 5 después de 240 h en estufa a 37°C; 6 y 7 después de 1000 h estufa a 37°C).

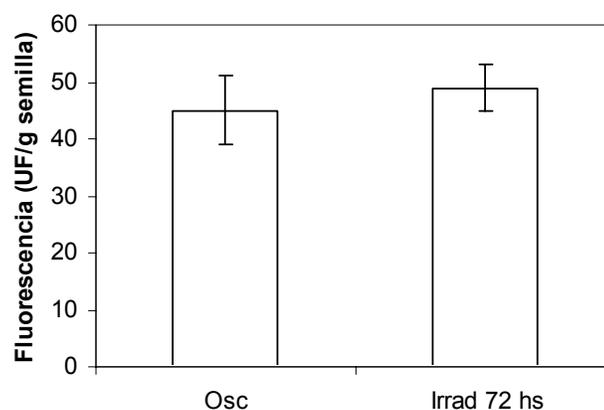


Figura 2.54. Cuantificación de fluorescencia (ec. III.7) de extractos LS de semillas cv. 2-Want irradiadas durante 72 h y mantenidas en oscuridad que fueron almacenadas durante 1000 h a 37°C y 75% HR.

IV.2.4.4. Irradiación del extracto proteico.

Se estudió el efecto de la irradiación UV-A y visible sobre el extracto proteico de semillas de quinoa cv. 2-Want. Se utilizó el extracto LS por ser el extracto con mayor contenido proteico (Figura 2.48) y de mayor índice de pardeamiento (Figura 2.49), el cual posee un color amarillento. Se realizó la irradiación del extracto sin realizar ninguna dilución del mismo con luz UV-A a 340 nm (Figura 2.55.A) o con luz visible (Figura 2.55.B), ambos durante 1 hora a $28\pm 2^\circ\text{C}$ y potencia constante de $14\pm 2 \text{ mW/cm}^2$ ó $16,02\pm 0,02 \text{ mW/cm}^2$, respectivamente. El análisis de la variación de absorbancia con el tiempo de irradiación observado en la Figura 2.55 se muestra en la Tabla 2.12.

Tabla 2.12. Análisis de variación de la absorbancia por efecto de la irradiación con luz UV-A a 340 nm ó visible de extractos LS provenientes de semillas de quinoa cv. 2-Want. El parámetro R^2 que indica el buen ajuste a un modelo de decaimiento exponencial de primer orden. (↓) indica disminución de la absorbancia con respecto a la inicial.

Irradiación	Absorbancia (nm)	% de variación de absorbancia	R^2
340 nm	340	↓2%	0,966
	440	↓1%	0,960
	445	↓10%	0,962
visible	340	↓2%	0,974
	440	↓10%	0,968
	445	↓13%	0,976

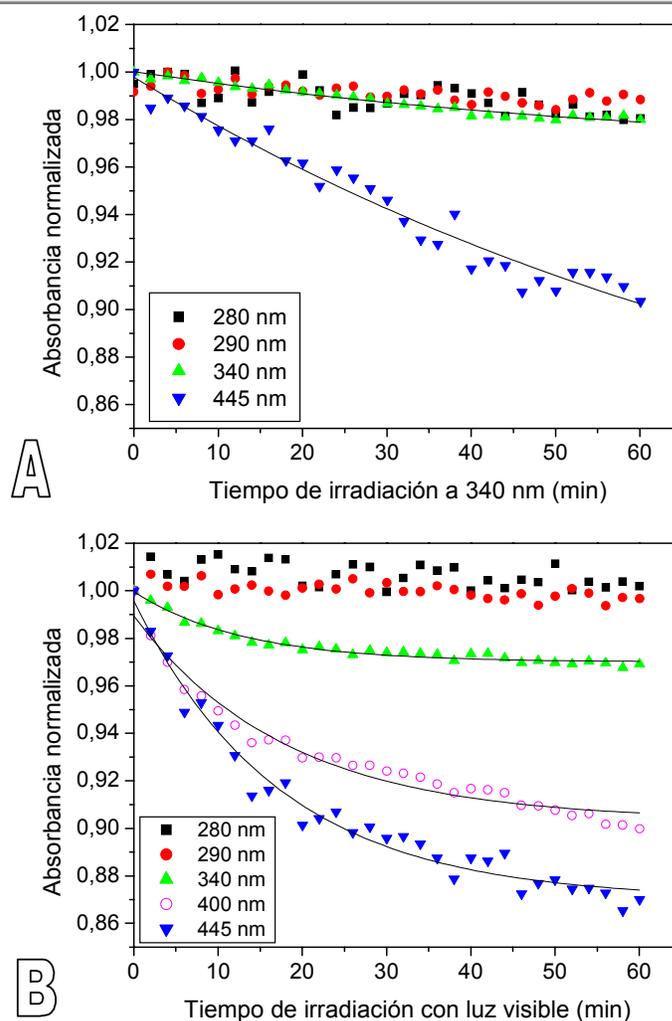


Figura 2.55. Variación de la absorbancia por efecto de la irradiación con luz UV-A a 340 nm (A) ó visible (B) de extractos LS provenientes de semillas de quinoa cv. 2-Want.

Los resultados obtenidos muestran una disminución de la absorbancia al irradiar el extracto con luz visible acorde a los resultados obtenidos previamente para los pigmentos provenientes de la reacción de Maillard en sistemas modelo de aminoácido o proteína con glucosa.

IV.2.5. Araucaria angustifolia.

IV.2.5.1. Cambios provocados por la irradiación del prótalo.

Se utilizó prótalo de *Araucaria* liofilizado y almacenado durante diferentes años (hasta 7 años) en freezer (-18°C).

Al sistema liofilizado (sistema sólido opaco) de 1 cm de espesor se irradió durante 1 hora con lámpara de $\lambda=365$ nm, a temperatura constante de $28\pm 2^\circ\text{C}$ durante todo el experimento.

a) Efecto sobre el color.

En la Figura 2.56 se muestra el resultado del índice de pardeamiento y las fotografías digitales de los sistemas analizados antes y después de 1 hora de irradiación a 350 nm. Se observa cuantitativa y cualitativamente que el mayor índice de pardeamiento corresponde al sistema almacenado por 7 años, siendo este índice no significativamente diferente ($p < 0,01$) entre los años 1997 a 1999, pero éstos significativamente diferentes ($p < 0,01$) a los almacenados entre los años 2001 y 2002. Sin embargo, el índice de pardeamiento no varió significativamente con la irradiación de los sistemas.

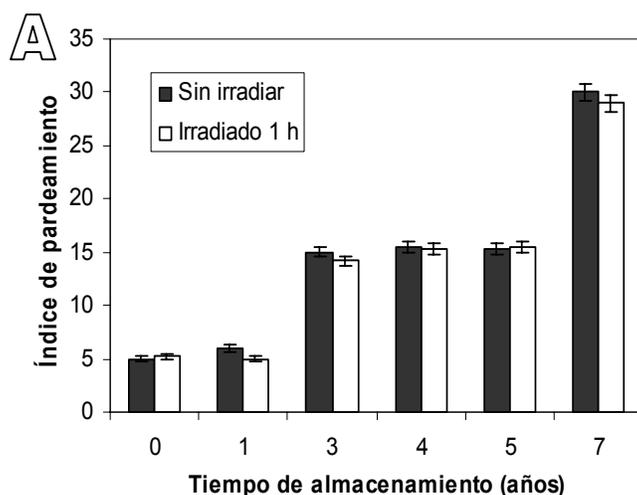
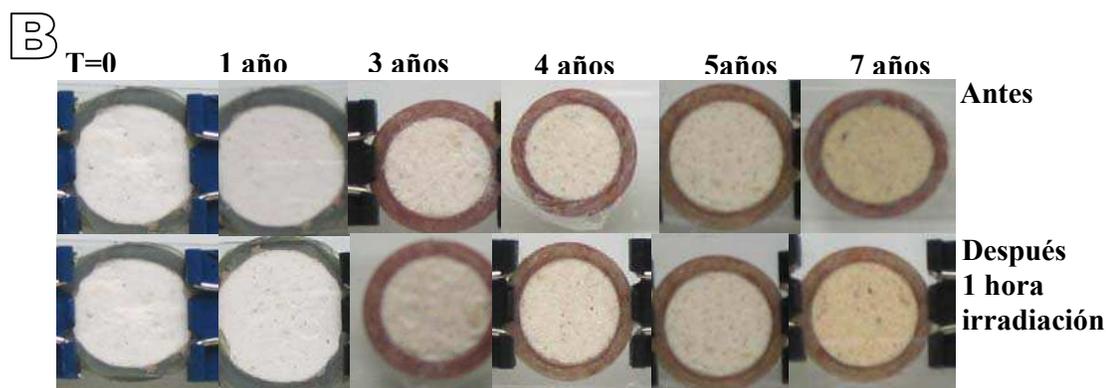


Figura 2.56. (A) Índice de pardeamiento del prótalo antes y después de 1 h de irradiación a 365 nm. (B) Fotografías digitales de los distintos sistemas (el año de almacenamiento se muestra en la parte superior de las fotografías) antes (fila de arriba) y después (fila de abajo) de 1 h de irradiación.



b) Efecto sobre los extractos proteicos.

Como se describió en la sección de Materiales y Métodos (III.2.7.2.B) se realizó la extracción de proteínas utilizando el solvente LS en prótalo irradiado ó mantenido en oscuridad (SI). En la Figura 2.57 A y B se observan los resultados obtenidos para el índice de pardeamiento (ec. III.5) y la cuantificación de fluorescencia (ec. III.7), respectivamente, ambos normalizados por la cantidad de muestra utilizada para realizar la extracción. Los datos presentados son los

valores promedio obtenidos y el intervalo de confianza fue calculado por derivadas parciales utilizando los desvíos estándares obtenidos en cada determinación (peso y medición).

Se puede observar que la mayor cantidad de pigmentos se obtuvo con el mayor tiempo de almacenaje (7 años), siendo los extractos de 4 y 5 años de almacenamiento no significativamente diferentes entre ellos pero diferentes a los 0-3 años, entre los cuales tampoco se obtuvieron diferencias significativas, de la misma manera que lo observado para el índice de pardeamiento.

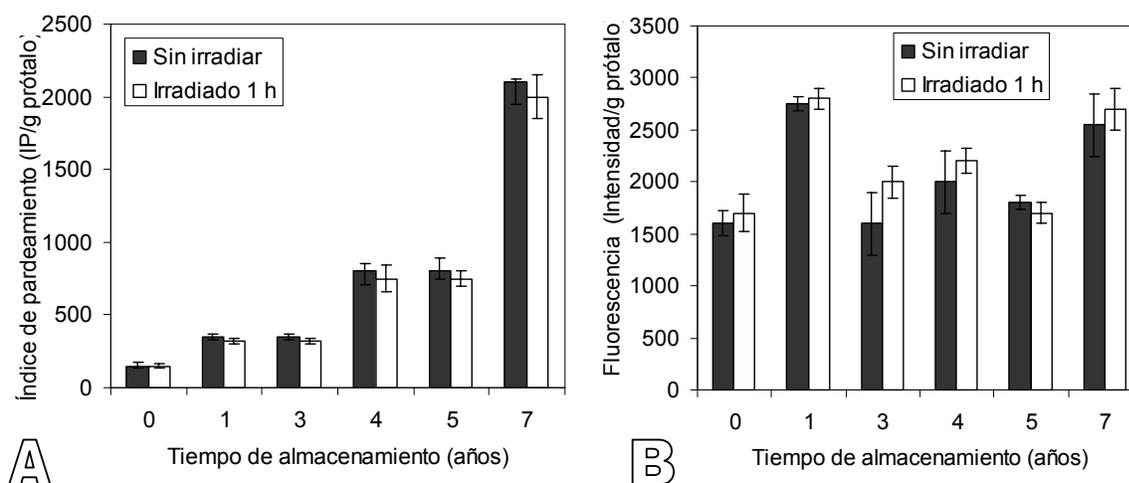


Figura 2.57. Índice de pardeamiento (A) y fluorescencia (B) de extracto proteico de proutalo de *araucaria*, normalizado por gramo de proutalo utilizado para la extracción. La concentración de fluorescencia fue calculada según la ec. III.7 (Excitación a 380 nm, emisión a 422 nm). Solvente de extracción: LS (Low Salt).

Sin embargo no hay diferencias significativas cuando se compara la intensidad de fluorescencia de los extractos (ec. III.7). Esto significa que independientemente del tiempo de almacenaje, la cantidad de compuestos fluorescentes en el proutalo de *Araucaria* es la misma, lo que significaría que si bien la presencia de pigmentos es un índice de envejecimiento, en este caso, la medición de compuestos fluorescentes no resultó ser un buen índice de envejecimiento. La fluorescencia obtenida con estas características espectrales, podría deberse a la presencia de compuestos fluorescentes intrínsecos no relacionados con el envejecimiento.

En el caso de la fluorescencia de los extractos, tampoco hubo diferencias significativas provocadas por la irradiación.

Se realizó además una electroforesis en condiciones desnaturizantes, SDS-PAGE, teñido con azul de Coomassie y con el reactivo de ácido periódico-Schiff (PAS), para ver si se encontraban diferencias en las bandas de proteínas durante los años de almacenaje y por

el tratamiento de irradiación. Los extractos se concentraron por liofilización durante 24 h y resuspendidos en *buffer* de corrida. El gel se muestra en la Figura 2.58. Se observaron diferencias en el patrón electroforético de las proteínas, muy evidentes a partir de los 3 años de almacenamiento. La mayor intensidad de color y grosor de las bandas de los extractos de prátalos de hasta 3 años de envejecimiento se correlacionó con la concentración de proteínas obtenida por el método de Bradford (10 ± 2 mg proteína soluble/100g prátalo para ambos años, en relación con los 6 ± 1 mg proteína soluble/100g prátalo de los años anteriores). Estos cambios en las proteínas no correlacionan ni con el color ni con la fluorescencia y no cambia por el tratamiento de irradiación. La tinción de PAS, que detecta glicoproteínas sólo dio positivo con la proteína invertasa (calle1), utilizada como control positivo de PAS por ser una glicoproteína conocida.

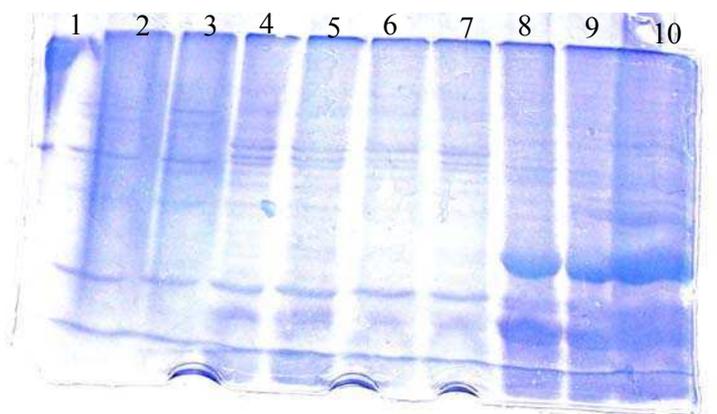


Figura 2.58. Fotografía digital de gel SDS-PAGE (15% *resolving*/4% *stacking*). Tinción: azul de Coomassie. Muestras corridas: Extractos de proteínas de distintos años de almacenamiento utilizando solvente LS. La irradiación se realizó durante 1 hora a 365 nm a 28°C. Calles: **1:** Invertasa, control positivo tinción PAS; **2:** 7 años Sin irradiar (SI); **3:** 7 años Irradiado (I); **4:** 5 años SI; **5:** 5 años I; **6:** 4 años SI; **7:** 4 años I; **8:** 3 años SI; **9:** 3 años I; **10:** 1 año I.

IV.2.5.2. Envejecimiento acelerado combinado con irradiación.

Debido a que no hubo diferencias significativas durante la irradiación por 1 h se realizó la misma prueba con tiempos de irradiación por 2 h con la misma lámpara (longitud de onda de 365 nm y potencia $1,78 \pm 0,01$ mW/cm²) y por 24 h con tubo de luz negra (longitud de onda de 380 nm y potencia $0,28 \pm 0,02$ mW/cm²). Se eligió un tiempo considerablemente mayor para la irradiación con tubo de luz debido a su menor potencia.

Se utilizó el prátalo almacenado por 1 año y se realizó su irradiación antes y después de 42 días de almacenamiento a 55°C.

a) Efecto sobre el color del prótalo liofilizado.

La Tabla 2.13 muestra los resultados obtenidos del color medido como índice de pardeamiento a través de las coordenadas CIE obtenidas por colorímetro (ecuación III.5).

Tabla 2.13. Índice de pardeamiento de prótalos de Araucaria almacenado por 1 año, irradiados (I) antes ó después del envejecimiento acelerado por temperatura durante 42 días a 55°C. Controles sin irradiar (SI). Se representa el promedio de triplicados con su respectivo desvío estándar.

		inicial	Luego de 42 días a 55°C
Antes del almacenamiento	Control SI	5±2	20±2
	I 2 h a 365 nm	5±2	30±1
	I 24 h a 350 nm	6±1	15±1
Después del almacenamiento	I 2 h a 365 nm		18±3
	I 24 h a 350 nm		17±3

El índice de pardeamiento de todos los sistemas aumentó significativamente con el tiempo de almacenamiento. La comparación con los controles mostró que la irradiación *per se* no provoca cambios de color.

Cuando la irradiación fue posterior al almacenamiento, no hubo fotoblanqueo de los pigmentos producidos. Sin embargo, los sistemas irradiados durante 24 h antes del almacenamiento mostraron disminución del color, mientras que en los irradiados por 2 h a mayor potencia mostraron aumento de pardeo luego del almacenamiento.

Como se vio en los sistemas de Maillard soportados sobre papel o silano (Sección IV.2.1.3) según las condiciones de irradiación el pardeamiento se puede favorecer o no, pero nunca de una manera drástica.

b) Efecto sobre el extracto proteico

Se realizó la extracción de proteínas del prótalo irradiado o mantenido en oscuridad con el solvente elegido anteriormente, LS.

No se observaron diferencias significativas en el índice de pardeamiento, ni en la fluorescencia, ni en la concentración de proteínas (Tabla 2.14) ni en el patrón electroforético del extracto proteico (Figura 2.59).

Tabla 2.14. Concentración de proteínas solubles (método de Bradford) obtenidos de prótalo irradiados antes (IA) y después (ID) del envejecimiento acelerado por temperatura durante 42 días a 55°C. Solvente de extracción: LS. Controles sin irradiar (SI); 2 h: irradiación por 2 h a 365 nm. 24 h: irradiación por 24 h a 380 nm. Se representa el promedio de triplicados con su respectivo desvío estándar. Curva de calibración realizada con una solución de BSA.

Sistema	Concentración de proteínas solubles ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
Control SI	$1,2 \pm 0,1$
IA 2 h	$1,1 \pm 0,2$
IA 24 h	$1,5 \pm 0,3$
ID 2 h	$1,4 \pm 0,2$
ID 24 h	$1,3 \pm 0,2$

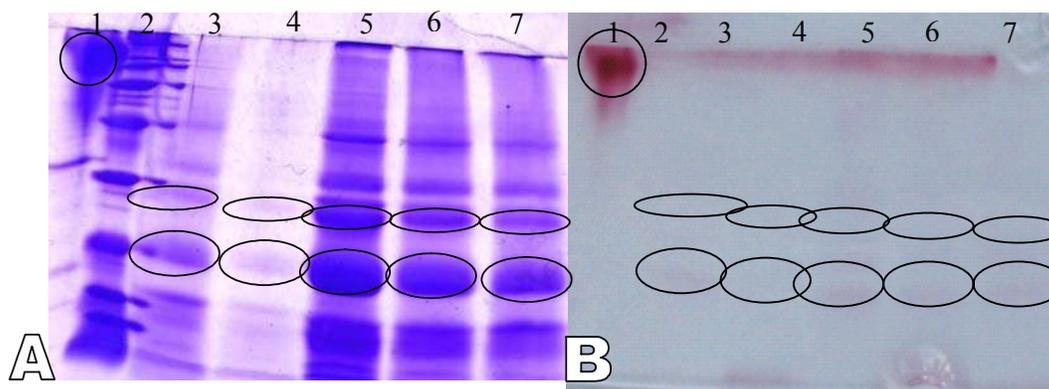


Figura 2.59. Fotografías digitales de geles SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie (A) ó con PAS (B). Solvente de extracción: LS. La irradiación se realizó a 28°C durante 2 h a 365 nm ó a 24 h a 380 nm antes (IA) ó después (ID) del almacenamiento durante 42 días a 55°C. Calles: 1: Invertasa, control positivo de tinción PAS; 2: Marcador de peso molecular; 3: Control Sin irradiar (SI); 4: IA2; 5: IA24; 6: AI2; 7: AI24. Se señala con elipses las bandas que dieron positivas con la tinción de PAS en el gel teñido con Coomassie.

Si se compara la cantidad y posición de las bandas obtenidas por el envejecimiento acelerado con las obtenidas por el envejecimiento natural a -18°C por varios años (Figura 2.36) se observa que la cantidad de bandas es significativamente menor y su intensidad mayor.

Además en el caso del envejecimiento acelerado la tinción con PAS (Figura 2.58.B), no sólo dio positiva para el control de invertasa, sino que otras 2 bandas también fueron detectadas como glicoproteínas. Ambas bandas, aproximadamente de 31 kDa y 40 kDa fueron observadas tanto en el sistema control sin irradiar como en los sistemas irradiados antes y después del envejecimiento acelerado. Por lo tanto, comparando las Figuras 2.53 y 2.59, en el

envejecimiento acelerado se produjeron glicoproteínas no observadas en los sistemas envejecidos naturalmente.

Los resultados de esta sección indican que durante el envejecimiento acelerado de semillas se forman compuestos de características cromáticas y fluorescentes similares a los observados en los sistemas modelo donde se desarrolló la reacción de Maillard. Sin embargo, por medio de estas características no pueden diferenciarse de los compuestos polifenólicos pigmentados que también están presentes en las semillas. Hay evidencias de que la reacción de Maillard se desarrolla durante el envejecimiento acelerado de semillas (37-42°C), como lo indican el aumento del grado de glicosilación de proteínas, la pérdida de solubilidad de las mismas y la alta estabilidad a la irradiación. Una forma de confirmar la ocurrencia la reacción de Maillard podría ser a través de la utilización de aminoguanidina. Este compuesto ha encontrado aplicaciones en el campo de la medicina como inhibidor de la reacción (Ulrich y Cerami, 1992), y podría ser aplicado a las semillas por imbibición ya que es un compuesto soluble en agua. La reducción del pardeamiento por aminoguanidina proporcionaría evidencias del aporte relativo de la reacción de Maillard al pardeamiento total.

IV. Resumen de resultados

Las reacciones de pardeamiento estudiadas (reacción de Maillard y polifenoles oxidados) generan productos fluorescentes y pigmentos pardos, que afectan la calidad de materiales orgánicos, especialmente alimentos, material biológico, fármacos, contribuyendo a las características físico-químicas.

A continuación se resaltan en forma resumida los principales resultados.

- ✦ A partir de reacciones enzimáticas o no enzimáticas se forman compuestos pigmentados de características cromáticas y fluorescentes similares.
- ✦ En los sistemas modelo de aminoácidos, el aumento de fluorescencia observado durante el desarrollo de la reacción de Maillard en función del tiempo se debe a un aumento de la cantidad de compuestos fluorescentes del mismo tipo, ya que el rendimiento cuántico se mantuvo constante. Sin embargo, en el sistema modelo de proteínas, el rendimiento cuántico aumentó en el tiempo hasta mantenerse constante, lo que implica que el aumento de fluorescencia se debió no sólo a un aumento en la cantidad sino también a la formación de distintos tipos de compuestos.
- ✦ El rendimiento cuántico de los compuestos fluorescentes de Maillard fue cinco veces menor que el de la solución de quinina y el de los pigmentos polifenólicos fue aún un orden menor que los de Maillard.
- ✦ Tanto en los sistemas donde se desarrolló la reacción de Maillard (ya sea con aminoácidos o proteínas) como en los polifenólicos, la fluorescencia se genera por la presencia de varios compuestos fluorescentes y la misma proviene de compuestos no rígidos como lo indica su amplio corrimiento de Stokes.
- ✦ Los compuestos fluorescentes y pigmentos provenientes de la reacción de Maillard (aminoácido-glucosa, proteína-glucosa, semillas enteras y sus extractos) en diferentes presentaciones (líquido, sólido, semillas enteras y sus extractos) fueron fotoestables bajo las diferentes condiciones de irradiación utilizadas.
- ✦ De los casos analizados, sólo en algunos sistemas aislados, se observó disminución de la intensidad de absorbancia y/o fluorescencia luego de exponer los sistemas a irradiación UV-visible. Esto ocurrió sobre el soporte sólido de silano y únicamente si los pigmentos eran inicialmente amarillentos, ya que no se verificó la fotodestrucción en los más oscuros. En el caso del soporte papel de filtro se produjo aumento de la velocidad de reacción cuando se irradió un sistema con pigmentos amarillentos, y fotodestrucción de los más oscuros. De esta forma, la matriz en la que se encuentran los pigmentos constituye una variable más a tener en cuenta en aquellos casos en los que la estabilidad de pigmentos sea relevante.

- La sal $MgCl_2$ afectó la cinética de desarrollo de pardeamiento y fluorescencia desde varios aspectos, debido a las interacciones del catión con el agua y los azúcares. Las mismas modifican la movilidad molecular del agua, afectan la cinética de cristalización en sistemas deshidratados y resultan a veces en complejación catión-azúcar. A este complejo escenario se suma el efecto inhibitorio del agua en la reacción de Maillard. Sin embargo, esta sal no tuvo efecto sobre las características cromáticas o fluorescentes ni sobre la fotoestabilidad de los compuestos fluorescentes y pigmentos generados.
- Durante el almacenamiento de semillas de distintas variedades de quinoa se observó desarrollo de pardeamiento sobre la cubierta de la semilla y en los embriones, que correlacionó con el tiempo y dependió de las condiciones de envejecimiento. Las diferencias en el poder germinativo no correlacionaron con la cantidad o tipo de proteínas de las distintas variedades, o con la fluorescencia de sus extractos. De las variables analizadas, las que correlacionaron mejor con el poder germinativo fueron el color, la solubilidad y grado de desnaturalización de proteínas.
- La mayor parte de los trabajos que estudiaron la reacción de Maillard analizaron la cinética de la reacción en condiciones favorables para que se produzca (alto pH, alta temperatura) y por lo tanto, los productos fluorescentes fueron propuestos como marcadores tempranos para seguir la cinética la reacción, cuando no hay cambios visibles. Es importante notar que la disminución de la fluorescencia no se observó en este trabajo, para ninguno de los sistemas o condiciones experimentales estudiadas, lo cual hubiera ocurrido si fueran realmente intermediarios de la reacción. De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo y en otros recientes, en los que se considera a los productos fluorescentes como productos finales de la reacción de Maillard, en condiciones favorables, la constante cinética del desarrollo de productos fluorescentes sería mayor que la de productos pigmentados. Sin embargo, en condiciones desventajosas (bajo pH, baja temperatura, presencia de sales inhibitorias), la reacción global es más lenta y el desarrollo de pigmentos se encuentra favorecido. Para cada sistema en particular se debe definir el índice más conveniente que refleje el grado de reacción. Por lo tanto, no se puede utilizar a los compuestos fluorescentes como indicadores tempranos universales de la reacción de Maillard.
- Corroborando las observaciones anteriores, en el caso del almacenamiento de sistemas biológicos (semillas recalcitrantes, como las de *Araucaria angustifolia*, u ortodoxas, como las de quinoa) el desarrollo de fluorescencia no fue paralelo al de color, siendo este último mejor indicador de los daños en las proteínas.

- ✦ Se comparó la fotoestabilidad de los compuestos fluorescentes y pigmentos pardos polifenólicos (provenientes de té) y aquellos generados en la reacción de Maillard. Los resultados indicaron que los compuestos provenientes de la reacción de Maillard son mucho más estables a la irradiación UV-A que los polifenoles, debido principalmente a tiempos de vida muy cortos (<50 ns) de sus especies excitadas y por tanto incapaces de generar especies reactivas de oxígeno. En cambio en la degradación de los compuestos polifenólicos durante la irradiación estarían involucradas especies reactivas de oxígeno formadas a través de la excitación de los mismos polifenoles.
- ✦ La irradiación de semillas enteras o molidas de araucaria no produjo cambios en los parámetros analizados, lo que hace suponer la predominancia de pigmentos de Maillard sobre los pigmentos polifenólicos en la coloración observada. Sin embargo, la irradiación previa al almacenamiento acelerado produjo en algunos casos aumento, y en otros disminución, de la concentración de pigmentos al final del almacenamiento, dependiendo del tiempo y de la potencia de radiación.
- ✦ La excitación con luz visible en presencia del sensibilizante rosa de bengala produjo degradación tanto del colorante como de los pigmentos de Maillard, y en menor medida, de los polifenólicos. En este trabajo se propusieron posibles mecanismos de interacción. Los resultados con el agente sensibilizante mencionado indicaron que el efecto de la fotosensibilización de los pigmentos ocurre principalmente por transferencia de carga (Tipo I), directamente entre el estado triplete del sensibilizante con los pigmentos o indirectamente entre el estado triplete del RB con oxígeno molecular generando especies reactivas de oxígeno que intervienen en la destrucción de los pigmentos. En cambio, la fotodegradación de un sensibilizante natural, como la riboflavina, no produjo degradación de los pigmentos de Maillard.

VI. Conclusiones

- ☑ Dada la amplia presencia de pigmentos pardos en alimentos y sus múltiples propiedades, beneficiosas o no, el conocimiento del efecto de la luz y de la interacción de estos pigmentos con agentes sensibilizantes o con sales es muy importante para ejercer acciones de control dirigidas a aumentar la estabilidad de materiales orgánicos, biomoléculas y/o alimentos que posean estos pigmentos y ofrecer alternativas para modular la cinética de su generación.
- ☑ A pesar de que la reacción de Maillard y otras que generan pigmentos pardos, como la oxidación de polifenoles, han sido estudiadas en profundidad desde mediados del siglo XX, las características de fotoestabilidad de los mismos no se habían analizado previamente. La aplicación de métodos físicos para el control de reacciones de deterioro en alimentos o sistemas biológicos abre la posibilidad de reducir o eliminar el uso de agentes químicos aditivos conservantes, y es relevante para el desarrollo de productos naturales.
- ☑ Una de las conclusiones más notables de este trabajo está basada en la observación de la elevada fotoestabilidad de los compuestos fluorescentes y pigmentos pardos generados en la reacción de Maillard. Esto excluye, por un lado, realizar una fotomodulación de la reacción. Es de hacer notar que de haber sido los intermediarios fotosensibles, hubiera sido posible elaborar alguna estrategia para inhibirla aplicando irradiación UV-visible para destruir los mismos y retardar el desarrollo de la reacción. La metodología reciente de aplicación de pulsos de luz de alta intensidad desarrollada para ayudar en el control del crecimiento microbiano, requiere también del conocimiento de los efectos de la luz sobre los componentes de alimentos. Según los resultados presentados, para cada caso particular se deben estudiar los efectos de la matriz donde la reacción tiene lugar, ya que es una variable involucrada y puede contribuir a que se manifiesten los efectos de la exposición a luz UV-visible tanto para acelerar como para inhibir el desarrollo de la reacción. Por otro lado, desde el punto de vista industrial, el conocimiento de que la reacción de Maillard genera pigmentos fotoestables puede ser relevante para la estimación de vida útil, la predicción de cambios durante el almacenamiento.
- ☑ En el caso de los pigmentos polifenólicos, por medio de irradiación UV-visible se logró fotoblanquear (hasta un 15% con respecto a los no expuestos a la luz) en las condiciones estudiadas, lo que permitiría controlar el color en los sistemas en los que estos compuestos constituyan la principal fuente de coloración, como es el caso de aquellos que contienen antocianinas.

- ☑ Así como el colorante rosa de bengala produjo sensibilización y aceleró la fotodestrucción de los pigmentos pardos (tanto los generados por Maillard como los polifenólicos) mediado principalmente por la generación de oxígeno singulete, podrían existir agentes naturales que permitan manejar la cinética de reacción. La riboflavina, analizada en el presente trabajo por ser un agente sensibilizante potencial, no se comportó como tal durante la reacción de Maillard. Los resultados de los experimentos de irradiación bajo distintas condiciones (atmósferas de aire, aire+azida ó nitrógeno) permitieron proponer mecanismos de fotodegradación de pigmentos. Tanto los mecanismos involucrados como los potenciales agentes sensibilizantes naturales son temas relevantes necesarios para lograr la destrucción programada de pigmentos y/o compuestos fluorescentes.
- ☑ Dada la estabilidad de los pigmentos de Maillard a la irradiación UV-visible, el empleo de sustancias agregadas para el control de la reacción es un recurso válido. Sin embargo, el agente más extensamente empleado para el control del pardeo no enzimático, es el bisulfito de sodio cuyas características alergénicas han hecho decrecer el valor económico de los productos que lo contienen. De manera que la alternativa es hallar alguna sustancia inocua o al menos de características menos perjudiciales para la salud humana. Luego de analizar el efecto de varias sales sobre la cinética de desarrollo de fluorescencia y pardeo, y en base a datos previos, se analizó el $MgCl_2$ como agente de control de la reacción. Si bien esta sal no afectó las características espectrales y cromáticas de los pigmentos de Maillard, ni su fotoestabilidad, el aditivo $MgCl_2$ modificó la cinética de la reacción, de modo indirecto, a través de sus interacciones con el agua y con los azúcares, y en un grado dependiente de los reactivos involucrados y del contenido de agua de los sistemas. De esta manera se postula como agente potencial para el desarrollo de la reacción. Esto requiere sin embargo el estudio de su efecto en cada sistema, dado que su acción depende de las condiciones de reacción y la composición del sistema, lo que impide establecer la generalización del efecto inhibitor.
- ☑ En el caso de sistemas biológicos, como las semillas ortodoxas o recalcitrantes (quinoa y araucaria, respectivamente) las evidencias indicaron que la reacción de Maillard es responsable en un grado importante de la pigmentación durante el almacenamiento. Especialmente en condiciones de envejecimiento acelerado los cambios en las proteínas (entalpía de desnaturalización, solubilidad, perfil electroforético) se sugieren como marcadores adecuados del daño, y a su vez el color desarrollado es también mejor índice que la fluorescencia como indicativos de envejecimiento.

Como puntos destacados para continuar analizando se encuentran:

- el efecto de la matriz sobre la fotoestabilidad de los pigmentos,
- la interacción de reactivos, intermediarios y productos con sales, en particular $MgCl_2$,
- el efecto de agentes sensibilizantes naturales sobre la fotoestabilidad y los mecanismos de reacción,
- el aporte relativo de la reacción de Maillard y oxidación de polifenoles en el desarrollo de color en semillas y otros materiales biológicos a través de la inhibición de la reacción de Maillard con aminoguanidina.

VI. Referencias bibliográficas

- Acevedo, N. C., Briones, V., Buera, M. P. y Aguilera, J. M. (2008) *Microstructure affects the rate of chemical, physical and color changes during storage of dried apple discs*. J. Food Eng. 85: 222-231.
- Adhikari, H. R. (1973) *Fluorescent products in a glucose-glycine browning reaction*. J. Food Sci. 38: 486-488.
- Ahamed, N. T., Singhal, R. S., Kulkarni, P. R. y Pal, M. (1998) *A lesser-known grain, Chenopodium quinoa: Review of the chemical composition of its edible parts*. Food Nutr. Bull. 19: 17-35.
- Ahmad, I., Fasihullah, Q. y Vaid, F. H. M. (2004) *A study of simultaneous photolysis and photoaddition reactions of riboflavin in aqueous solution*. J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 75: 13-20.
- Ahmad, I., Fasihullah, Q. y Vaid, F. H. M. (2005) *Effect of phosphate buffer on photodegradation reactions of riboflavin in aqueous solution*. J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 78: 229-234.
- Ahmad, I., Fasihullah, Q. y Vaid, F. H. M. (2006) *Effect of light intensity and wavelengths on photodegradation reactions of riboflavin in aqueous solution*. J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 82: 21-27.
- Ajandouz, E. H. y Puigserver, A. (1999) *Nonenzymatic browning reaction of essential amino acids: effect of pH on caramelization and Maillard reaction kinetics*. J. Agric. Food Chem. 47: 1786-1793.
- Aluko, R. E. (2004) *Proteins in food processing*. R. Y. Yada, (Ed). Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC. Cap. 14.
- Appelqvist, I. A. M., Cooke, D., Gidley, M. J. y Lane, S. J. (1993) *Thermal properties of polysaccharides at low moisture: An endothermic melting process and water-carbohydrate interactions*. Carbohydr. Polym. 20: 291-299.
- Argirova, M. D. (2005) *Photosensitizer activity of model melanoidins*. J. Agric. Food Chem. 53: 1210-1214.
- Ashoor, S. y Zent, J. (1984) *Maillard browning of common aminoacids and sugars*. J. Food Sci. 49: 1206-1207.
- Azzam, N., Levanon, D. y Dovrat, A. (2004) *Effects of UV-A irradiation on lens morphology and optics*. Exp. Geront. 39: 139-146.
- Baeza, R. I. y Pilosof A. M. R. (2002) *Calorimetric studies of thermal denaturation of β -lactoglobulin in the presence of polysaccharides*. Lebensm.-Wiss. u.-Technol. 35: 393-399.

- Baeza, R. I., Gugliotta, L. M. y Pilosof A. M. R. (2003) *Gelation of β -lactoglobulin in the presence of propylene glycol alginate: kinetics and gel properties*. Colloids Surfaces B: Biointerfaces. 31: 81-93.
- Baisier, W. M. y Labuza, T. P. (1992) *Maillard browning kinetics in a liquid model system*. J. Agric. Food Chem. 40: 707-713.
- Baker, E. H. y Bradford, K. J. (1994) *The fluorescence assay for Maillard product accumulation does not correlate with seed viability*. Seed Sci. Res. 4: 103-106.
- Batey, D. W. y Eckhert, C. D. (1991) *Analysis of flavins in ocular tissues of the rabbit*. Investig. Ophthal. Vis. Sci. 32: 1981-1985.
- Baynes, J. W. (2001) *The role of the AGEs in aging: causation or correlation*. Exp. Gerontol. 36: 1527-1537.
- Baynes, J. W. y Thorpe, S. R. (1999) *The role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm*. Diabetes. 48: 1-9.
- Belitz, H. D. y Grosh, W. (1987) *Food Chemistry*. New York. Springer Verlag.
- Bell, L. N. y Wetzel, C. R. (1995) *Aspartame degradation in solution as impacted by buffer type and concentration*. J. Agric. Food Chem. 43: 2608-2612.
- Bell, L. N. (1997) *Maillard reaction as influenced by buffer type and concentration*. Food Chem. 1: 143-147.
- Birch, G. G., Grigor, J. y Derbyshire, W. (1989) *Identification of proton type in concentrated sweet solutions by pulsed NMR analysis*. J. Sol. Chem. 18: 795-801.
- Birlouez-Aragón, I., Sabat, P. y Gouti, N. (2002) *A new method for discriminating milk heat treatment*. Int. Dairy J. 12: 59-67.
- Blanka, I., Davidekb, T., Devauda, S. y Cletyb, N. (2002) *Analysis of Amadori compounds by high performance anion exchange chromatography-pulse amperometric detection*. International Congress Series. 1245: 263-267.
- Blanshard, J. M. y Franks, F. (1987) *Ice crystallization and its control in frozen-food systems*. En: "Food Structure and Behaviour", J. M. Blanshard y P. Lillford (Eds.), Academic Press Inc., Orlando, FL. Cap. 4. pp. 51-65.
- Bobbio, F. O., Bobbio, P. A., y Revisan, L. M. V. (1973) *Maillard reaction II: Catalytic Effect of anions*. Lebensm.-Wiss. u. Technol. 6: 215-218.
- Bradford, M. M. (1976) *A rapid and sensitive method for quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-die binding*. Annal Biochem. 72: 284-254.

- Bray, C. M. (1995) *Biochemical processes during the osmopriming of seeds*. En: "Seed development and germination". J. Kigel y G. Galili (Eds.). Marcel Dekker, NY. pp. 767-789.
- Brinegar, C. y Goundan, S. (1993) *Isolation and characterization of chenopodin, the 11S seed storage protein of Quinoa (Chenopodium quinoa)*. J. Agric. Food Chem. 41: 182-185.
- Brinegar, C., Sine, B. y Nwokocha, L. (1996) *High-Cysteine 2S seed storage proteins from Quinoa (Chenopodium quinoa)*. J. Agric. Food Chem. 44: 1621-1623.
- Brinker, C. J. y Sheerer, G. W. (1990) *Sol-Gel Science*. En: "The physics and chemistry of sol-gel processing". Academic Press, Inc. California.
- Broersen, K., Voragen A. G. J., Hamer, R. J. y de Jongh H. H. J. (2004) *Glycoforms of β -lactoglobulin with improved thermostability and preserved structural packing*. Biotech. Bioeng. 86: 78-87.
- Brownlee, M., Cerami, A. y Vlassara, H. (1988) *Advanced products of nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic vascular disease*. Diabetes Metab. Rev. 4: 437-451.
- Buera, M. P., Petriella, C. y Lozano, R. D. (1986) *Definition of color in the non-enzymatic process*. Die Farbe 33: 223-228.
- Buera, M. P., Chirife, J., Resnik, S. L., y Lozano, R. (1987a) *Nonenzymatic browning in liquid model systems of high water activity: kinetics of color changes due to caramelization of various single sugars*. J. Food Sci. 52: 1059-1062.
- Buera, M. P., Chirife, J., Resnik, S. L., y Wetzler, G. (1987b) *Nonenzymatic browning in liquid model systems of high water activity: kinetics of color changes due to Maillard's reaction between different single sugars and glycine and comparison with caramelization browning*. J. Food Sci. 52: 1063-1067.
- Buera, M. P. y Resnik, S. (1990) *Colorimetric measurements in a turbid medium: hydrolyzed concentrated cheese whey*. Die Farbe 35: 268-272.
- Buitink, J., van den Dries, I. J., Hoekstra, F. A., Alberda, M. y Hemminga, M. A. (2000) *High critical temperatura above Tg may contribuye to the stability of biological systems*. Biophys. J. 79: 1119-1128.
- Burton, H. S., Mc Weeny, D. J., Pandhi, P. N. y Biltcliffe, D. O. (1962) *Fluorescent compounds and non-enzymatic browning*. Nature. 98: 4858, 948-950.
- Burton, H. S., Mc Weeny D. J. y Biltcliffe D. O. (1963) *Non-enzymic browning reaction: consideration of sugar stability*. Nature. 197: 266-268.

- Cardona, S., Schebor, C., Buera, M., Karel, M. y Chirife, J. (1997) *Thermal stability of Invertase in reduced-moisture amorphous matrices in relation to glassy state and trehalose crystallization*. J. Food Sci. 62: 105-112.
- Carpenter, J. F., Crowe, L. M. y Crowe, J. H. (1987) *Stabilization of phosphofructokinase with sugars during freeze-drying: characterization of enhanced protection in the presence of divalent cations*. Biochim. Biophys. Acta. 923: 109-115.
- Carpenter, J. F., Izutsu, K. y Randolph, T. W. (1999) *Freezing- and drying-induced perturbation of protein structure and mechanisms of protein protection by stabilizing additives*. En: "Freeze-drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products". L. Rey y J. C. May (Eds.). Marcel Dekker, Inc. USA.
- Carr, H. Y. y Purcell, E. M. (1954) *Effects of diffusion on free precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments*. Phys. Rev. 94: 630-638.
- Carson, J. (1955) *The reaction of fructose with isopropyl-amine and cyclohexylamine*. J. Am. Chem. Soc. 77: 1881-1889.
- Castelli3n, M. L., Matiacevich, S. B., Buera, M. P. y Maldonado, S. B. (2008) Storage effects in quinoa seeds. Differential protein stability and viability of two cultivars. Seed Sci. Res. Enviado.
- Cayot, P. y Lorient, D. (1996) *Structure-function relationships of whey proteins*. En: "Food proteins and their applications". Damodar3n y Paraf (Eds.). Marcel Dekker, NY. pp: 225-256.
- Cerami, A., Vlassara, H. y Brownlee, M. (1987) *Glucose and Aging*. Sci. Am. 256: 90-96.
- Cerami, A. (1994) *The role of the Maillard reaction in vivo*. En: "Proceedings of the Fifth International Symposium on the Maillard reaction". The Royal Society of Chemistry. Cambridge.
- Cerruti, P., Resnik, S. L., Seldes, A. y Ferro Font3n, C. (1985) *Kinetics of deteriorative reactions in food systems of high water activity: glucose loss, 5-HMF accumulation and fluorescence development due to non-enzymatic browning*. J. Food Sci. 50: 627-636.
- Chan, R. K., Pathmanathan, K. y Johari, G. P. (1986) *Dielectric relaxations in the liquid and glassy states of glucose and its water mixtures*. J. Phys. Chem. 90: 6358-6362.
- Chaudhury, N. K., Bhardwaj R. y Murari, B. M. (2003) *Fluorescence spectroscopic study to characterize and monitor TEOS based sol-gel process for development of optical biosensors*. Current Applied Physics. 3: 177-184.
- Chauhan, G. S., Eskin, N. A. M. y Tkachuk, R. (1992) *Nutrients and antinutrients in quinoa seed*. Cereal Chem. 69: 85-88.

- Cheng, R., Lin, B., Lee, K-W. y Ortwerth, B. J. (2001) *Similarity of the yellow chromophores isolated from human cataracts with those from ascorbic acid-modified calf lens proteins: evidence for ascorbic acid glycosylation during cataract formation*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1537: 14-26.
- Cheyrier, V. (2005) *Polyphenols in foods are more complex than often thought*. *Am. J. Clin. Nutr.* 81 (suppl): 223S-239S.
- Chio, K. S. y Tappel, A. L. (1969) *Synthesis and characterization of the fluorescent products derived from malonaldehyde and aminoacids*. *Biochem.* 8: 2821-2827.
- CIE (1979) *Colorimetry*. CIE Publication 15 (E-1.3.1), Bureau Central de la CIE, París.
- Crane, J., Miller, A. L., Van Roekel, J. W. y Walters, C. (2003) *Triacylglycerols determine the unusual storage physiology of Cuphea seed*. *Planta.* 217: 699-708.
- Davies, C. G. A., Netto, F. M., Glassenap, N., Gallaher, C. M., Labuza, T. P. y Gallaher, D. D. (1998) *Indication of the Maillard reaction during storage of protein isolates*. *J. Agric. Food Chem.* 46: 2485-2489.
- Desimone, M. F., Matiacevich, S. B., Buera, M. P. y Díaz, L. E. (2008) *Effects of relative humidity on enzyme activity immobilized in sol-gel-derived silica nanocomposites*. EMT. Aceptado.
- Douglas, P., Waechter, G. y Mills, A. (1990) *Ionic strength effects on the ground state complexation and triplet state electron transfer reaction between rose bengal and methyl viologen*. *Photochem. Photobiol.* 52: 473-479.
- Dworschak, E. (1980) *Nonenzyme browning and its effect on protein nutrition*. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.* 13: 1-40.
- Dworschak, E. y Orsi, F. (1977) *Study into the Maillard reaction occurring between methionine and tryptophan on the one hand and glucose on the other. I. Studies in aqueous solutions*. *Acta Aliment.* 6: 59.
- Eichner, K. y Karel, M. (1972) *The influence of water content and water activity on the sugar-amino browning reaction in model systems under various conditions*. *J. Agric. Food Chem.* 20: 218-223.
- Eichner, K. (1975) *The influence of water content on non-enzymatic browning reactions in dehydrated foods and model systems and the inhibition of fat oxidation by browning intermediate*. En: "Water relations of foods". R.B. Duckworth (Ed). Academic Press. New York pp 417.
- Ellis, G. (1959) *The Maillard Reaction*. En: "Advances in carbohydrate chemistry". M.L. Wolfrom (Ed). Academic Press, New York, pp. 63-134.

- Ellis, R. H., Hong, T. D. y Roberts, E. H. (1988) *A low moisture content limit to logarithmic relations between seed moisture content and longevity*. *Annals Bot.* 61: 405-408.
- Fairbanks, B. K. W., Robinson, L. R., Andersen, W. R. y Balln, E. (1990) *Electrophoretic characterization of quinoa seed proteins*. *Plant Breed.* 104: 190-195.
- Flink, J. (1983) *Nonenzymatic browning of freeze-dried sucrose*. *J. Food Sci.* 48: 539-542.
- Fox, T. y Flory, P. (1950) *Second-order transition temperatures and related properties of polystyrene. I. Influence of molecular weight*. *J. Appl. Phys.* 21: 5581-591.
- Franke, S., Dawczynski, J., Strobel, J., Niwa, T. y Stahl, P. (2003) *Increased levels of advanced glycation end products in human cataractous lenses*. *J. Cataract Refract Surg.* 29: 998-1004.
- Franks, F. (1994) *Long term stabilization of biologicals*. *Biotech.* 12: 253-256.
- Fu, M.-X., Wells-Knecht, K. J., Blackledge, J. A., Lyons, T. J., Thorpe, S. R. y Baynes, J. W. (1994) *Glycation, glycooxidation, and cross-linking of collagen by glucose: Kinetics, mechanisms, and inhibition of late stages of the Maillard reaction*. *Diabetes* 43: 676-683.
- Ge, S.-J. y Lee, T.-C. (1996) *Effective HPLC method for the determination of aromatic Amadori compounds*. *J. Agric. Food Chem.* 44: 1053 -1057.
- Goff, H. D. (1995) *The use of thermal analysis in the development of a better understanding of frozen food stability*. *Pure Appl. Chem.* 67: 1801-1808.
- Graham, L. (1996) *A comprehensive survey of the acid-stable fluorescent cross-links formed by ribose with basic amino acids, and partial characterization of a novel Maillard cross-link*. *Biochim Biophys Acta.* 1297 (1): 9-16.
- Greenspan, L. (1977) *Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions*. *J. Res.* 81 (A): 89-96.
- Gregory, R. B. (1998) *Protein hydration and glass transition*. En: "The properties of water in foods". D.S. Reid (Ed). University of California, Davis, USA.
- Gunnison, A. F. y Jacobsen, D. W. (1987) *Sulfite hypersensitivity: A critical review*. *Crit. Rev. Toxicol.* 17: 185-214.
- Haard, N. F. y Chism, G. W. (1996) *Characteristics of edible plant tissues* En: "Food chemistry". O. R. Fennema (Ed). Marcel Dekker Inc, New York. pp. 943-1011.
- Hahn, E. L. (1950) *Spin echoes*. *Phys. Rev.* 80: 580-594.
- Hayase, F., Hinuma, H., Asano, M., Kato, H. y Arai, S. (1994) *Identification of novel fluorescent pyrrolopyridinium compound formed from Maillard reaction of 3-doxyglucosone and butylamine*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58: 1936-1937.

- Heelis, P. F. (1982) *The photophysical and photochemical properties of flavins (isoalloxazines)*. Chem. Soc. Rev. 11: 15-51.
- Hodge, J. E. (1953) *Chemistry of browning reactions in model systems*. J. Agric. Food Chem. 1: 928-936.
- Hodge, J. E. y Osman, E. M. (1976) *Carbohydrates*. En: "Principles of food science. Part I. Food chemistry". O. R. Fennema (Ed.). Marcel Dekker Inc., New York. pp. 138-145.
- Hodge, J. E. y Osman, E. M. (1982) *Hidratos de carbono. Introducción a la Ciencia de los Alimentos*. O. R. Fennema (Ed.). Reverté S.A. Vol 1. Cap. 3.
- Hoffman, A. M., Van Miltenburg, J. C. y Van Mil, P. J. (1997) *The suitability of scanning calorimetry to investigate slow irreversible protein denaturation*. Thermochim. Acta 306: 45-49.
- Hoffman, A. M. y Van Mil, P. J. (1999) *Heat-induced aggregation of β -lactoglobulin as a function of pH*. J. Agric. Food Chem. 47: 1898-1905.
- Huidrobo y Simal (1985) *Determination of colour and turbidity of honey*. An. Bromatol. (Spain) 36: 225-245.
- Ibarz, A., Pagán, J., Panadés, R. y Garza, S. (2005) *Photochemical destruction of color compounds in fruit juices*. J. Food Eng. 69: 155-160.
- Iida, T., Yoshiki, Y., Akiyama, Y. y Okubo, K. (2002) *Photon emission properties of roasted soybean as related to reactive oxygen scavenging activities*. Food Chem. 77: 471-477.
- Isbell y Frush (1958) *Mutarotation, hydrolysis and rearrangement reactions of glycosylamines*. J. Org. Chem., 23: 1309-1314.
- ISTA (2004) *International rules for seed testing*. Capítulo 5 y anexo: Análisis de germinación y análisis bioquímico de viabilidad. ISTA, Switzerland.
- Jouppila, K. y Roos, Y. H. (1997) *The physical state of amorphous corn starch and its impact on crystallization*. Carbohydr. Polym. 32: 95-104.
- Kalichevsky, M. T., Jaroskiewicz, E. M., Ablett, S., Blanshard, J. M. y Lillford, P. J. (1992) *The glass transition of amylopectin measured by DSC and NMR*. Carbohydr. Polymers, 18: 77-88.
- Karel, M., Anglea, S., Buera, M. P., Karmas, R., Levi, G. y Roos, Y. (1994) *Stability-related transitions of amorphous foods*. Thermochimica Acta, 246: 249-269.
- Karmas, R., Buera, M. P. y Karel, M. (1992) *Effect of glass transition on rates of non-enzymatic browning in food systems*. J. Agric. Food Chem. 40: 873-879.

- Kato, Y., Matsuda, T., Kato, N. y Nakamura, R. (1989) *Maillard reaction of disaccharides with protein: suppressive effect of non-reducing and pyranoside groups on browning and protein polymerization*. J. Agric. Food Chem. 37: 1077-1081.
- Katz, E. E. y Labuza, T. P. (1981) *Effect of water activity on the sensory crispness and mechanical deformation of snack food products*. J. Food Sci. 46: 403-409.
- Kim, H., Kirschenbaum, L. J., Rosenthal, I. y Riesz, P. (1993) *Photosensitized formation of ascorbato radicals by riboflavin: an ESR study*. Photochem. Photobiol. 57: 777-784.
- Kjeldahl, J. A (1883) *A new method for determination of nitrogen in organic matter*. Anal Chem. 22: 366-382.
- Klim, M. y Nagy, S. (1988) *An improved method to determine nonenzymic browning in citrus juices*. J Agric. Food Chem. 36: 1271-1274.
- Knetch, K. J., Dunn, J. A., Mc Fraland, K. F., Mc Cance, D. R., Lyons, T. J., Thorpe, S. R. y Baynes, J. W. (1991) *Effect of diabetes and aging on carboxymethyllysine levels in human urine*. Diabetes. 40: 90-96.
- La Rochette, A., Silva, E., Birlouez-Aragon, I., Mancini, M., Edwards, A. M. y Morlière, P. (2000) *Riboflavin photodegradation y photosensitizing effects are highly dependent on oxigen and ascorbate concentrations*. Photochem. Photobiol. 72: 815-820.
- La Rochette, A., Birlouez-Aragon, I., Silva, E. y Morlière, P. (2003) *Advanced glycation endproducts as UVA photosensitizers of tryptophan and ascorbic acid: consequences for the lens*. Biochim. Biophys. Acta 1621: 235– 241.
- Laborie, S., La Voie, J.-C. y Chessex, P. (1998) *Paradoxical role of ascorbic acid and riboflavin in solutions of total parenteral nutrition: implication in photoinduced peroxide generation*. Ped. Res. 43: 601-606.
- Labuza, T., Warren, R. y Warmbier, J. (1977) *The physical aspects with respect to water and non-enzymatic browning*. Adv. Exp. Med. Biol. 86B. 379-418.
- Labuza, T. (1980) *The effect of water activity on reaction kinetics of food deterioration*. Food Technol. 34: 36-41.
- Labuza, T. y Saltmarch, M. (1980) *The nonenzymatic browning reaction as affected by water in foods*. En: "Water activity: Influences on food quality". Academic Press, San Francisco, pp. 605-649.
- Labuza, T. y Baiser W. (1993) *The kinetics of nonenzymatic browning*. En: "Physical chemistry of foods". Academic Press. USA. Cap. 14.

- Labuza, T. P. (1994) *Interpreting the complexity of the kinetics of the Maillard reaction*. En: "Maillard reactions in chemistry, food and health". The Royal Society of Chemistry, Cambridge. pp. 176-181.
- Laemmli, U. K. (1970) *Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4*. Nature 227: 680-685.
- Lakowicz, J. (1999) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Second Edition. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York.
- Lambert, C. R. y Kochevar, I. E. (1996) *Does Rose Bengal Generate Superoxide Anion?*. J. Am. Chem. Soc. 118: 3297-3298.
- Lamberts, J. J. M. y Neckers, D. C. (1983) *Rose bengal and nonpolar derivatives*. J. Am. Chem. Soc. 105: 7465-7467.
- Lapornik, B., Prosek, M. y Wondra, A.G. (2005) *Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time*. J. Food Eng. 71: 214-222.
- Le Grusse, J. y Watier, B. (1993) *Les vitamines*. Données biochimiques et nutritionnelles, Centre d'Etude et d'Information sur les Vitamines.
- Leclère, J. y Birlouez-Aragon, I. (2001) *The fluorescence of advanced Maillard products is a good indicator of lysine damage during the Maillard reaction*. J. Agric. Food Chem. 49: 4682-4687.
- Lee, C. M., Sherr, B. y Koh, Y. (1984) *Evaluation of kinetic parameters for a glucose-lysine Maillard reaction*. J. Agric. Food Chem. 32: 379-382.
- Lee, K. H., Jung, M. Y. y Kim, S. Y. (1998) *Effects of ascorbic acid on the light-induced riboflavin degradation and color changes in milks*. J. Agric. Food Chem. 46 : 407-410.
- Lee, K-W., Bell, J., Kilpatrick, E., Hayes, M., Lindop, G. B. y Dominiczak, M. H. (1993) *Collagen-linked fluorescence in human atherosclerotic plaques*. Atherosclerosis. 98: 219-227.
- Lee, K-W., Simpson, G. y Ortwerth, B. (1999) *A systematic approach to evaluate the modification of lens proteins by glycation-induced crosslinking*. Biochim. Biophys. Acta. 1453: 141-151.
- Leprince, O. y Walters-Vertucci, C. (1995) *A Calorimetric study of the glass transition behaviors in axes of bean seeds with relevance to storage stability*. Plant Physiol. 109: 1471-1481.
- Lester, M. R. (1995) *Sulfite sensitivity: Significance in human health*. J. Am. Coll. Nutr. 14: 229-232.

- Levine, H. y Slade, L. (1986) *Polymer physico-chemical approach to the study of commercial starch hydrolysis products*. Carbohyd. Polym. 6: 213-244.
- Levine, H. y Slade, L. (1988) “Collapse” phenomena – a unifying concept for interpreting the behaviour of low moisture foods. En: “Food structure: Its creation and evaluation”. J. M. Blanshard y J. R. Mitchell (Eds.), Butterworths, Londres. Cap 9. pp. 149-180.
- Levine, H. y Slade, L. (1990) *Influences of the glassy and rubbery states on the thermal, mechanical, and structural properties of dough and baked products*. En: “Dough rheology and baked products texture”. H. Faridi y J. M. Faubion, (Eds.). AVI. New York. Cap. 5. pp. 157-330.
- Levine, H. y Slade, L. (1992) *Another view of trehalose for drying and stabilizing biological materials*. Biopharm. 5: 36-40.
- Linetsky, M., Chemoganskiy, V. G., Hu, F. y Ortwerth, B. J. (2003) *Effect of UV-A light on the activity of several aged human lens enzymes*. Invest. Ophthalmol. Visual Sci. 44: 264-274.
- Loncin, M. y Merson, R. L. (1979) *Water activity*. En: “Food engineering principles and selected applications”. Academic Press. USA. pp. 200-215.
- Lowry, R. y Baker, H. (1989) *Effect of storage, carbohydrate composition and heat processing on protein quality an amino acid bioavailability of a commercial enteral products*. J. Food Sci. 54: 1024-1030.
- Maillard, L. C. (1912) *Action des acides amin. Formation des melanoidines par voie methodologique*. C.R. Acad. Sci. 154: 66-68.
- Makita, Z., Bucala, R., Rayfield, E. J., Frieman, E. A., Kauman, A. M., Korbet, S. M., Barth, R. H., Winston, J. A., Fuh, H., Manoque, K. R., Cerami, A. y Vlassara, H. (1994) *Reactive glycosylation end products in diabetic uremia and treatment of renal failure*. Lancet. 343: 565-706.
- Mancini, M., Edwards, A. M., Becker, M. I., De Ioannes A. E. y Silva, E. (2000) *Reactivity of monoclonal antibodies against a riboflavin-tryptophan adduct toward irradiated and nonirradiated bovine eye lens protein fractions: an indicator of in vivo visible light mediated photo transformations*. J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 55: 9-15.
- Masaki, H., Okano, Y. y Sakurai, H. (1999) *Generation of active oxygen species from advanced glycation end-products AGEs during ultraviolet light UVA irradiation and a possible mechanism for cell damaging*. Biochim. Biophys. Acta. 1428: 45-56.

- Matiacevich, S. B., Santagapita, P. R. y Buera, M. P. (2005) *Fluorescence from the Maillard reaction and its potential application in food science*. Crit. Rev. Food Sci. Nut. 45: 483-495.
- Matiacevich, S. B. y Buera, M. P. (2006) *A critical evaluation of fluorescence as a potential marker for the Maillard reaction*. Food Chem. 95: 423-430.
- Matiacevich, S. B., Castellión, M. L., Maldonado, S. B. y Buera, M. P. (2006) *Thermal transitions of quinoa embryos and seeds as affected by water content*. En: "Water properties of food, pharmaceutical and biological materials". P. Buera, J. Welti-Chanes, H. Corti, P. Lillford (Eds.). CRC Press, Argentina. Vol. 9. pp. 565-570.
- Mauron, J. (1981) *The Maillard reaction in food: a critical review from the nutritional standpoint*. Prog. Food Nutr. Sci. 5: 5-18.
- Mazzobre, M. F. y Buera, M. P. (1999) *Combined effects of trehalose and cations on the thermal resistance of β -galactosidase in freeze-dried systems*. Biochim. Biophys. Acta 1473: 337-344.
- Meiboom S. y Gill, D. (1958) *Modified spin-echo method for measuring nuclear magnetic relaxation times*. Rev. Scient. Instr. 29: 688-691.
- Meyhuay, M. (2007) *Quinoa. Tareas de post cosecha*. Informe de AGSI/FAO. Mejía, Lewis y Bothe (Eds.). <http://www.fao.org/inpho/>.
- Miller, D. P. y de Pablo, J. J. (2000) *Calorimetric solution properties of simple saccharides and their significance for the stabilization of biological structure and function*. J. Phys. Chem. B. 104 (37): 8876 -8883.
- Monnier, V. y Cerami, A. (1982) *Non-enzymatic glycosylation and browning of proteins in diabetes*. Clin. Endocrin. Metabol. 11: 431-452.
- Monnier, V. y Cerami, A. (1983) *Detection of nonenzymatic browning products in the human lens*. Biochem. Biophys. Acta 760: 97-103.
- Monnier, V., Kohn, R. y Cerami, A. (1984) *Accelerated age-related browning of human collagen in diabetes mellitus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81: 583-587.
- Morales, F. J., Romero, C. y Jiménez-Pérez, S. (1996) *Fluorescence associated with Maillard reaction in milk and milk-resembling systems*. Food Chem. 57: 423-428.
- Morales, F. J., y van Boekel, M. A. J. S. (1997) *A study on advanced Maillard reaction in heated casein/sugar solutions: Fluorescence accumulation*. Int. Dairy J. 7: 675-683.
- Morales, F. y Jiménez-Pérez, S. (2001) *Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence*. Food Chem. 72: 119-125.

- Morr, C. y Ha, Y. W. (1993) *Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties*. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 33: 431-476.
- Murkovic, M., Wber, H-J., Geiszler, S., Fröhlich, K. y Pfannhauser, W. (1999) *Formation of the food associated carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in model systems*. Food Chem. 65: 233-237.
- Murthy, U. M. y Sun, W. Q. (2000) *Protein modification by Amadori and Maillard reactions during seed storage: roles of sugar hydrolysis and lipid peroxidation*. J. Exp. Bot. 51 (348): 1221-1128.
- Murthy, U. M., Liang, Y., Kumar, P. P. y Sun, W. Q. (2002) *Non-enzymatic protein modification by the Maillard reaction reduces the activities of scavenging enzymes in *Vigna radiata**. Physiol. Plant. 115: 213-220.
- Najaraj, R. H. y Monnier, V. M. (1995) *Protein modification by the degradation products of ascorbat: formation of a novel pyrrole from the Maillard reaction of L-treose with proteins*. Biochim. Biophys. Acta. 1253: 75-84.
- Namiki, M., Oka, M., Otsuka, M., Miyazawa, T., Fujimoto, K. y Namiki, K. (1993) *Weak chemiluminescence at an early stage of the Maillard reaction*. J. Agric. Food Chem. 41: 1704-1709.
- Ngammongkolrat, A., Moutounet, M. y Pech, J. C. (1985) *Pulp browning of french prunes: Methods of measurement and types of reactions involved*. Sci. des Alimentes, 5: 393-405.
- Noel, T. R., Ring, S. G. y Whittam, M. A. (1992) *Dielectric relaxations of small carbohydrate molecules in the liquid and glassy states*. J. Phys. Chem. 96: 5662-5667.
- Nozzolillo, C. y De Bezada, M. (1984) *Browning of lentil seeds, concomitant loss of viability, and the possible role of soluble tannins in both phenomena*. Canadian J. Plant Sci. 64: 815-824.
- Nursten, H. (1980) *Recent developments in studies of the Maillard reaction*. Food Chem. 6: 263-279.
- O'Brian, J. y Morrissey, P. A. (1997) *Metal ion complexation by products of the Maillard reaction*. Food Chem. 58: 17-27.
- Obayashi, H., Nakano K., Shigeta H., Yamagushi M., Yoshimori K., Fukui M., Fujii, M., Kitagawa, Y., Nakamura, N., Nakamura, K., Nakazawa, Y., Ienaga, K., Ohta, M., Nishimura, M., Fukui, I. y Kondo, M. (1996) *Formation of crossline as a fluorescent advanced glycation end product in vitro and in vivo*. Biochim. Biophys. Res. Comm. 226: 37-41.

- Oberby, L. R. y Frost, D. V. (1952) *The effects of heat on the nutritive value of protein hydrolysates with dextrose*. J. Nut. 46: 539-559.
- Okano, Y., Masaki, H. y Sakurai, H. (2001) *Pentosidine in advanced glycation end-products (AGEs) during UVA irradiation generates active oxygen species and impairs human dermal fibroblasts*. J. Derm. Sci. 27: S11-S18.
- Olcott, H. S. y Dutton, H. J. (1945) *Chances in stored dried eggs: source of fluorescence*. Ind. Eng. Chem. 37: 119-1122.
- Ornstein, L. (1964) *Disc Electrophoresis-I background and theory*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 121: 321-349.
- Ortwerth, B. J. y Olesen, P. R. (1994) *UVA photolysis using protein-bound sensitizers present in human lens*. Photochem. Photobiol. 60:53-60.
- Ortwerth, B. J., Chemoganskiy, V. y Olesen, P. R. (2002) *Studies on singlet oxygen formation and UVA light-mediated photobleaching of the yellow chromophores in human lenses*. Exp. Eye Res. 74: 217-229.
- Osborne, T. B. (1924) *Solubility of vegetable proteins*. En: "The vegetable proteins". Longmans Green. N.Y. 2nd Edition. pp. 51.
- Overby, L. y Frost, D. (1951) *The effects of heat on the nutritive value of protein hydrolysates with dextrose*. J. Nut. 56: 539-547.
- Panza, V., Schebor, C., Láinez, V., Buera, M. P. y Maldonado, S. (2002) *Variación del contenido de almidón durante el almacenaje de semillas maduras de Araucaria angustifolia*. VIII Congreso Latinoamericano de Botánica y II Congreso Colombiano de Botánica. Cartagena de Indias. Colombia.
- Park, C. K. y Kim, D. H. (1983) *Relationship between fluorescence and antioxidant activity of ethanol extracts of a Maillard browning mixture*. JAOCS. 60: 22-26.
- Pauls, K. P. y Thompson, J. E. (1984) *Evidence for the accumulation of peroxidized lipids in membranes of senescing cotyledons*. Plant Physiol. 75: 1152-1157.
- Pearce J. A. y Thistle, M. A. (1942) *Fluorescence as a measurement of quality in dried whole egg powder*. Can. J. Res. D20: 276-282.
- Pearce, J. A. (1943) *Behavior and nature of the fluorescing substances in dried egg powders*. Can. J. Research. D21: 98-107.
- Pearce, J. A. (1950) *Fluorescence changes in solutions of glucose and glycine and of acetaldehyde and ammonia*. Food Tech. 4: 416-419.
- Pereyra Gonzales, A., Burin, L. y Buera, M. P. (1999) *Color changes during storage of honeys in relation to their composition and initial color*. Food Res. Int. 32: 185-191.

- Perez, O. E. y Pilosof A. M. R. (2004) *Pulsed electric fields effects on the molecular structure and gelation of β -lactoglobulin concentrate and egg white*. Food Res. Int. 37: 102-110.
- Perez, O. E., Wargon, V. y Pilosof A. M. R. (2006) *Gelation and structural characteristics of incompatible whey proteins/ hydroxypropylmethylcellulose mixtures*. Food Hydrocol. 20: 966-974.
- Petriella, C., Resnik, S., Lozano, R. y Chirife, J. (1985) *Kinetics of deteriorative reactions in model food systems of high water activity: color changes due to non-enzymatic browning*. J. Food Sci. 50: 622-626.
- Petriella, C., Chirife, J., Resnik, S. y Lozano, R. (1988) *A Research Note: Solute Effects at High Water Activity on Nonenzymatic browning of Glucose-Lysine Solutions*. J. Food Sci. 53: 987-988.
- Pongor, S., Ulrich, P. C., Bencsath, F. A. y Cerami, A. (1984) *Aging of proteins: isolation and identification of fluorescent chromophores from the reaction of polypeptides with glucose*. Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 2684-2688.
- Pordal Poulsen, K. (1981). *Acceleration of chemical reactions due to freezing*. En: "Water activity: Influences on food quality" . Academic Press Inc. pp.651-677.
- Potman, R. P. y Van Wijk, T. A. (1989) *Mechanistic studies of the Maillard reaction with emphasis on phosphate-mediated catalysis*. En: "Thermal generation of aromas". T. H. Parliament, R. J. McGorin, y C.-T. Ho (Eds.). American Chemical Society, Washington D.C., pp 182-195.
- Pourcel, L., Routaboul, J-M., Cheynier, V., Lepiniec, L. y Debeaujon, I. (2007) *Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions*. Trends Plant Sci. 12 (1): 29-36.
- Reddy, G. K., Stehno-Bittel, L. y Emwemeka, C. S. (2002) *Glycation-induced matrix stability in the rabbit Achilles tendon*. Arch. Biochem. Biophys. 399: 174-180.
- Relkin, P. (1996) *Thermal unfolding of β -lactoglobulin, α -lactalbumin, and bovine serum albumin. A thermodynamic approach*. Crit. Rev. Food Scie Nutr. 36: 565-601.
- Reyes, F. G. R., Poocharoen, B. y Wrolstad, R. (1982). *Maillard browning reaction of sugar-glycine model systems: Changes in sugar concentration, color and appearance*. J. Food Sci. 47: 31376–31377.
- Reynolds, T. (1963) *Chemistry of nonenzymic browning. I. The reaction between aldoses and amines*. Adv. Food Res. 12: 168-283.
- Reynolds, T. (1970) *Flavors from nonenzymic browning reactions*. Food Technol. Australia, pp. 610-648.

- Roberts, J. E., Kinley, J., Young, A., Jenkins, G., Atherton, S. y Dillon, J. (1991) *In vivo and photophysical studies on photooxidative damage to lens proteins and their protection by radioprotectors*. Photochem. Photobiol. 53: 33-38.
- Roos, Y. (1987) *Effect of moisture on the thermal behavior of strawberries studied using differential scanning calorimetry*. J. Food Sci. 52: 146-149.
- Roos, Y. (1992) *Reaction kinetics and thermodynamics in food systems; Part II, Phase transitions and transformations*. En: "Handbook of food engineering". D. Lund y D. Heldman (Eds.). Marcel Dekker, New York.
- Roos, Y. (1993) *Melting and glass transitions of low-molecular weight carbohydrates*. Carbohydrate Res. 238: 39-48.
- Roos, Y. (1995) *Phase Transitions in Foods*. S. Taylor (Ed.), Academic Press Inc., New York. Cap. 2, 5 y 7.
- Roos, Y. y Karel, M. (1990) *Differential scanning calorimetry study of phase transitions affecting the quality of dehydrated materials*. Biotech. Progress. 6: 59-163.
- Roos, Y., Karel, M. y Kokini, S. (1996) *Glass transitions in low moisture and frozen foods: effects on shelf life and quality*. Food Technol. 50: 95-108.
- Roos, Y., Roininen, K., Jouppila, K. y Tuorila, H. (1998) *Glass transition and water plasticization effects on crispness of a snack food extrudate*. Int. J. Food Prop. 1: 163-180.
- Royer, C. A. (1995) *Approaches to teaching fluorescence spectroscopy*. Biophys. J. 68: 1191-1196.
- Ruales, J. y Nair, B. M. (1993) *Saponins, phytic acid, tannins and protease inhibitors in quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willd) seeds*. Food Chem. 48: 137-143.
- Rufian-Henares, J. A., Guerra-Hernandez, E. y García-Villanova, B. (2002) *Maillard reaction in enteral formula processing: furososin, loss of o-phthaldialdehyde reactivity, and fluorescence*. Food Res. Int. 35: 527-533.
- Sajithlal, G. B., Chithra, P. y Chandrakasan, G. (1998) *Advanced glycation en products induce crosslinking of collagen in vitro*. Biochim. Biophys. Acta. 1407: 215-224.
- Salinas Sanjinés, C. (2004) *Study on the social, environmental and economic impacts of quinoa promotion in Bolivia*. W. Rojas, J. L. Soto y E. Carrasco (Eds.). PROINPA Foundation. La Paz, Bolivia.
- Sanchez del Angel, S., Moreno Martínez, E. y Valdivia López M. A. (2003) *Study of denaturation of corn proteins during storage using differential scanning calorimetry*. Food Chem. 83: 531-540.

- Sander, B. y Larsen, M. (1995) *Photochemical bleaching of fluorescent glycosylation products*. Int. Opht. 18: 195-198.
- Santagapita, P. R. y Buera, M. P. (2006) *Chemical and physical stability of disaccharides as affected by the presence of MgCl₂*. En: "Water properties of food, pharmaceutical, and biological materials". M. P. Buera, J. Welti-Chanes, P. Lillford y H. Corti (Eds). CRC. Taylor and Francis. Buenos Aires, Argentina. Cap 54: pp. 663-669.
- Sasaki, N., Fukatsu, R., Tsuzuki, K., Hayashi, Y., Yoshida, T., Fujii, N., Koike, T., Wakayama, I., Yanagihara, R., Garruto, R., Amano, N. y Makita, Z. (1998) *Advanced glycation end products in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases*. Am. J. Pathol. 153: 1149-1155.
- Saunders, J. y Jervis, F. (1966) *The role of buffer salts in non-enzymatic browning*. J. Sci. Food Agric. 17: 245-249.
- Sava, V. M., Yang, S. M., Hong, M. Y., Yang, P. C. y Huang G. S. (2001) *Isolation and characterization of melanic pigments derived from tea and tea polyphenols*. Food Chem. 73: 177-184.
- Schebor, C., Burin, L., Buera, M. P. y Chirife, J. (1999). *Stability of hydrolysis and browning of trehalose, sucrose and raffinose in low-moisture systems in relation to their use as protectants of dried biomaterials*. Lebensm. -Wiss. u.-Technol. 32: 481-485.
- Schwimmer, S. y Olcott, H. (1953) *Reaction between glycine and the hexose phosphates*. J. Am. Chem. Soc. 75: 4835-4842.
- Sell, D. R. y Monnier V. M. (1989) *Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. Implication of pentoses in the aging process*. J. Biol. Chem. 264: 21597-21602.
- Segrest, J. P. y Jackson, R. L. (1972) *Molecular weight determination of glycoproteins by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulphate*. Methods Enzymol. 28: 54-63.
- Shafiqul, D-M. e Islam, O. I. (1999) *Solvent effects on rates of photochemical reactions of rose bengal triplet state studied by nanosecond laser photolysis*. J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 123: 53-59.
- Shallenberger, R. y Birch, G. (1975) *Non-enzymatic browning reactions*, En: "Sugar Chemistry". AVI Publishing Company Westport, Connecticut. Cap. 7.
- Shchipunov, Y. A., Karpenko, T. Y., Bakunina, I. Y., Burtseva, Y. V. y Zvyagintseva, T. N. (2004) *A new precursor for the immobilization of enzymes inside sol-gel-derived hybrid*

- silica nanocomposites containing polysaccharides*. J. Biochem. Biophys. Methods 58: 25-38.
- Shipanova, I. N., Glomb, M. A. y Nagaraj, R. H. (1997) *Protein modification by methylglyoxal: chemical nature and synthetic mechanism of a mayor fluorescent adduct*. Arch. Biochem. Biophys. 344: 29-36.
- Sionkowska, A. (1999) *Photochemical transformations in collagen in the presence of melanin*. J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry. 124: 91-94.
- Sionkowska, A. y Kaminska, A. (1999) *Changes induced by ultraviolet light in fluorescence of collagen in the presence of β -carotene*. J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 120: 207-210.
- Skoog, D. A., Holler, F. G. y Nieman, T. A. (2001) *Principios de Análisis Instrumental*. McGraw Hill/Interamericana. España. 5° edición. Cap. 15.
- Slade, L. y Levine, H. (1987) *Structural stability of intermediate moisture foods - a new understanding*. En: "Food structure – Its creation and evaluation" J. R. Mitchell y J. M. V. Blanshard (Eds.). Butterworths, Londres. pp. 115-147.
- Slade, L. y Levine, H. (1991) *Beyond water activity: recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety*. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 30: 115-360.
- Slinkard, K. y Singleton, V. L. (1977). *Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods*. Am. J. Enol. Vitic. 28: 49–55.
- Smith, M. A., Taneda, S., Richey, P. L., Miyata, S., Yan S-D., Stern, D., Sayre, L., Monnier, V. M. y Perry, G. (1994) *Advanced Maillard reaction end products are associated with Alzheimer disease pathology*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 5710-5714.
- Song, D. U., Jung, Y. D., Chay, D. O., Lee, K. H., Yang, S. Y., Shin, B. A. y Ahn, B. W. (2002) *Effect of drinking green tea on age-associated accumulation of Maillard-type fluorescence and carbonyl groups in rat aortic and skin collagen*. Arch. Biochem. Biophys. 397: 424-429.
- Sperling, L. H. (1986) *Introduction to physical polymer science*. John Wiley & Sons, New York. pp. 224-295.
- Suggett, A., Ablett, S. y Lillford, P. J. (1976) *Molecular motion and interactions in aqueous carbohydrate solutions. II. Nuclear-magnetic-relaxation studies*. J. Sol. Chem. 5: 17-31.
- Sun, W. Q. y Leopold, C. (1993) *The glassy state and accelerated aging of soybean*. Physiol. Plant. 89: 767-774.

- Sun, W. Q. y Leopold, C. (1995) *The Maillard reaction and oxidative stress during aging of soybean seeds*. *Physiol. Plant.* 94: 94-104.
- Sun, W. Q., Davidson, P. y Chan, H.S. (1998) *Protein stability in the amorphous carbohydrate matrix: relevance to anhydrobiosis*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1425: 245-254.
- Szabo, A. G. (2000) *Spectrophotometry and spectrofluorimetry*. M. G. Gore (Ed). New York, Oxford University Press. pp. 33-67.
- Tanielian, C., Mechin, R., Seghrouchni, R. y Schweitzer, C. (2000) *Mechanistic and kinetic aspects of photosensitization in the presence of oxygen*. *Photochem. Photobiol.* 71: 12-19.
- Tessier, F., Monnier, V. M. y Kornfield, J. A. (2002) *Characterization of novel chromophores, fluorophores and cross-links from glyceraldehydes, lysine and arginine*. *Int. Congress Series.* 1245: 303-311.
- Traverso, N., Menini, S., Cottalasso, D., Odetti, P., Marinari, U. M. y Pronzato, M. A. (1997) *Mutual interaction between glycation and oxidation during non-enzymatic protein modification*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1336: 409-418.
- Ugarte, R., Edwards, A. M., Diez, M. S., Valenzuela, A. y Silva, E. (1992) *Anaerobic riboflavin photosensitized modification of rat lens proteins. A correlation with aged-related changes*. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 13: 161-168.
- Ulrich, P. C. y Cerami, A. (1992) *Inhibitors of nonenzymatic cross-linking*. United States Patent # 5140048.
- van Boekel, M. A. J. S. (2001) *Kinetic aspects of the Maillard reaction: a critical review*. *Nahrung/Food.* 45: 150-159.
- Van Teeffelen, A. M. M., Broersen, K. y De Jongh, H. H. J. (2005) *Glucosylation of β -lactoglobulin lowers the heat capacity change of unfolding; a unique way to affect protein thermodynamics*. *Protein Sci.* 14: 2187-2194.
- Verzija, N., De Groot, J., Oldehinkel, E., Bank, R. A., Thorpe, S. R., Bayliss, M. T., Bijlsma, J. W., Lafeber, F. P. y Tekoppele, J. M. (2000) *Age-related accumulation of Maillard reaction products in human articular cartilage collagen*. *Biochem. J.* 350: 381-387.
- Vlassara, H., Brownlee, M. y Cerami, A. (1986) *Nonenzymatic glycosylation: role in the pathogenesis of diabetic complications*. *Clin. Chem.* 32/10 (B): B37-B41.
- Vrhovsek, U., Rigo, A., Tonon, D., Mattivi, F. (2004) *Quantitation of polyphenols in different apple varieties*. *J. Agric. Food Chem.* 52: 6532-6538.
- Wang, H., Provan, G. J. y Helliwell, K. (2000) *Tea flavonoids: their functions, utilization and analysis*. *Trends Food Sci. Technol.* 11: 152-160.

- Warmbier, H., Schnickles, R. y Labuza, T. (1976) *Effect of glycerol on nonenzymatic browning in a solid intermediate moisture model food system*. J. Food Sci. 41: 528-531.
- Wettlaufer S. y Leopold, A. C. (1991) *Relevance of Amadori and Maillard products to seed deterioration*. Plant Physiol. 97: 165-169.
- Whitaker, J. R. (1996) *Role of endogenous enzymes in food quality*. En: "Food Chemistry". O. Fennema (Ed.). Marcel Dekker, New York. pp 493-494.
- White, G. y Cakebread, S. (1966) *The glassy state in certain sugar-containing food products*. J. Food Technol. 1: 73.
- Wilkinson, F., Helman, W. P. y Ross, A. B. (1993) *Quantum yields for the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet-state of molecular-oxygen in solution*. J. Phys. Chem. Ref. Data. 22: 113-262.
- Williams, R. J. y Leopold, A. C. (1989) *The glassy state in corn embryos*. Plant Physiol. 89: 977-981.
- Wintgens, V., Scaiano, J. C., Linden, S. M. y Neckers, D. C. (1989) *Transient phenomena in the laser flash photolysis of rose Bengal C-2'ethyl ester C-6 sodium salt*. J. Org. Chem. 54: 5242-5246.
- Wolfrom, M., Kolb, D. y Langer, A., (1953) *Chemical interactions of amino compounds and sugars. VII. PH dependency*. J. Am. Chem. Soc. 75: 3471-3476.
- Wunderlich, B. (1981) *The basis of thermal analysis*. En: "Thermal characterization of polymeric materials". E. A. Turi (Ed.). Academic Press Inc., NY. Cap. 2. pp. 91-234.
- Yaylayan, V. A. y Huyghues-Despointes, A. (1994) *Chemistry of Amadori rearrangement products: analysis, synthesis, kinetics, reactions, and spectroscopic properties*. CRC Rev. Food Sci. Nutr. 34: 321-369.
- Yaylayan, V. A. (1997) *Classification of the Maillard reaction: A conceptual approach*. Trends Food Sci. Tech. 8: 13-18.
- Zeleznak, K. J. y Hosenev, R. C. (1987) *The glass transition in starch*. Cereal Chem. 64:121-124.
- Zheng L., Reid W. R., Brennan J. D. (1997) *Measurement of fluorescence from tryptophan to probe the environment and reaction kinetics within protein doped sol-gel derived glass monoliths*. Anal Chem. 69: 3940-3949.
- Zigman, S., Groff, J. y Yulo, T. (1977) *Enhancement of the non-tryptophan fluorescence of human lens proteins after near-UV light exposure*. Photochem. Photobiol. 26: 505-509.