

Tesis Doctoral

Influencia de las radiaciones gamma y de microondas en las características químicas, bioquímicas y mecánicas de tejidos vegetales con especial referencia a Beta vulgaris L.var.conditiva

Latorre, María Emilia

2011

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:

Latorre, María Emilia. (2011). Influencia de las radiaciones gamma y de microondas en las características químicas, bioquímicas y mecánicas de tejidos vegetales con especial referencia a Beta vulgaris L.var.conditiva. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Latorre, María Emilia. "Influencia de las radiaciones gamma y de microondas en las características químicas, bioquímicas y mecánicas de tejidos vegetales con especial referencia a Beta vulgaris L.var.conditiva". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

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

Influencia de las radiaciones gamma y de microondas en las características químicas, bioquímicas y mecánicas de tejidos vegetales con especial referencia a *Beta vulgaris* L.var.conditiva.

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

María Emilia Latorre

Director de tesis: Dra. Lía Noemí Gerschenson

Director Asistente: Dra. Ana María L. Rojas

Consejero de estudio: Dra. Lía Noemí Gerschenson

Buenos Aires, 2011

Influencia de las radiaciones gamma y de microondas en las características químicas, bioquímicas y mecánicas de tejidos vegetales con especial referencia a *Beta vulgaris* L.var.conditiva.

RESUMEN

Es reconocida la importancia del estudio de nuevas tecnologías de procesamiento con el objetivo de colaborar en la mejora de la calidad de los alimentos y en la eficiencia de los procedimientos, abordando las necesidades e intereses de los consumidores, la mejora de sus dietas y el aumento del consumo de productos saludables. Es sabido que durante los distintos procesos de pre-tratamiento y preservación, el tejido vegetal sufre cambios a nivel estructural y de composición, que podrían afectar las características deseadas y esperadas de los productos basados en frutihortícolas, siendo importantes las investigaciones que tengan la finalidad de contribuir a minimizarlos.

En esta investigación se realizaron estudios sobre la aplicación de radiaciones ionizantes (radiación gamma) y no ionizantes (radiación de microondas) sobre el tejido de raíz de remolacha roja (*Beta vulgaris* L. var. conditiva) y se analizaron los cambios químicos, bioquímicos y mecánicos a fin

de conocer la influencia de dichas tecnologías en la calidad de los productos basados en dicho tejido. Todo ello con el objetivo de contribuir al desarrollo de alimentos sanos y aceptados por el consumidor.

Palabras Claves: Tejido Vegetal; Remolacha Roja; Radiación Gamma; Microondas.

**Influence of gamma radiation and microwaves on the
chemical, biochemical and mechanical characteristics of
vegetable tissues with special reference to *Beta vulgaris*
L.var.conditiva.**

ABSTRACT

It is recognized the importance of studying new processing techniques with the objective of deepening knowledge concerning the improvement of food quality and the increase of processes efficiency. In this way, the needs and interests of the consumers will be addressed tending to the improvement of their diets and the increase of healthy food consumption. It is known that during the pretreatment and the preservation processes, the vegetal tissue suffers changes at the structural and chemical composition level; these changes might affect desired and expected characteristics of products based on fruits and vegetables being, as a consequence, important to perform research that help to minimize these effects.

In this research, there were performed studies about the use of ionizing radiations (gamma radiation) and non-ionizing radiation (microwaves) for treating redbeet root tissue (*Beta vulgaris* L. var. conditiva) and it were analyzed the chemical, biochemical and mechanical changes with the goal of understanding the influence of these technologies on the quality of the products developed with this

tissue. All this with the objective of contributing to the development of healthy food that will be accepted by consumers.

Key words: Vegetal Tissue; Redbeet; Gamma Radiation; Microwaves.

AGRADECIMIENTOS

-A mi Directora y Consejera de estudio, Lía Gerschenson y a mi Directora Asistente, Ana María Rojas, por permitirme ser parte de este grupo, de este proyecto, por formarme, enseñarme y guiarme con paciencia y constancia en esta labor, tanto en el aspecto científico como humano.

-Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Promoción Científico y Tecnológica (ANPCyT) por las becas que me permitieron concretar mi trabajo de Tesis.

-A la Universidad de Buenos Aires, Universidad Pública, por permitirme al igual que a muchos, realizar mi formación de grado y post-grado.

-A mis compañeras del laboratorio Carmen, Marina, Silvia, Fernanda, Eliana, Carolina, Dolores, Laura, Paula, por estar y compartir cada día esta hermosa labor.

-A la Lic. Patricia Narvaiz y miembros de la CNEA Ezeiza, por compartir mis tareas allí realizadas. En especial a la Lic Narvaiz le agradezco su guía en los estudios con radiaciones ionizantes.

-A todos los chicos que también pasaron y compartieron su tiempo y trabajo en el laboratorio.

-A Emilia, Gisel, Pablo y miembros del PINMATE, por compartir su amistad y tiempo de trabajo.

-A los miembros del Departamento de Industrias, becarios, docentes, investigadores, personal de taller y no docente, por compartir el día a día en este lugar, por el apoyo y el cariño brindado a lo largo de estos años.

-Y a todos los que me acompañaron y me acompañan cada día y hacen hermosa esta vida:

Mis papas Inés y Mario; mis hermanos Martín, José Luis, Miriam, Alejandra y Joaquín, porque los amo.

A Santiago por su paciencia, amor, aguante desmedido y por la fuerza que me da cada día.

A mi familia, primos, tíos, cuñados, a mis padrinos.

A los amigos que estuvieron, están y que forman parte de este camino.

A cada uno de los *Colgados*, por estar y ser alegría en mi vida.

A mis papas por darme la vida,
a la vida por esta oportunidad, a mis hermanos
y a mi compañero de camino.

ÍNDICE

Resumen	ii
Abstract	iv
Agradecimientos	vi
1. Introducción General	5
1.1 Preservación de alimentos: Tecnologías emergentes y Nuevas tecnologías	6
1.1.2 Principios generales de los tratamientos no térmicos, térmicos y combinados	10
1.1.2.1 Tratamientos no térmicos	10
1.1.2.2 Tratamientos térmicos	14
1.1.2.3 Tratamientos combinados	15
1.2 Pared celular de los tejidos vegetales	17
1.2.1 Estructura y composición química de pared celular	18
1.2.2 Propiedades físicas y mecánicas	26
1.2.2.1 Presión de turgor	26
1.2.2.2 Comportamiento mecánico	27
1.2.3 Aspectos nutricionales y funcionales de los componentes de pared celular	29
1.3 Tejido de remolacha roja (<i>Beta vulgaris</i> L. var conditiva)	31
2. Objetivos	37
3. Materiales y Métodos Generales	39
3.1 Preparación de las muestras	40
3.2 Análisis químicos, bioquímicos y funcionales	42
3.2.1 Actividad Enzimática	43
3.2.1.1 Peroxidasa (POX)	44

3.2.1.2 Polifenol oxidasa (PPO)	44
3.2.2 Medición del color	45
3.2.3 Contenido de pigmentos	47
3.2.4 Ensayos Mecánicos	48
3.2.4.1 Relajación	48
3.2.5 Características estructurales	50
3.2.5.1 Microscopia óptica	50
3.2.5.2 Microscopia electrónica de transmisión	50
3.2.6 Residuo Insoluble en Alcohol (RIA)	51
3.2.6.1 Obtención del RIA	51
3.2.6.2 Determinación de lignina, celulosa y carbohidratos no celulósicos	52
3.2.6.2.1 Lignina	52
3.2.6.2.2 Celulosa	53
3.2.6.2.3 Carbohidratos no celulósicos	53
3.2.6.3 Otras determinaciones químicas	54
3.2.6.3.1 Determinación de carbohidratos totales	54
3.2.6.3.2 Determinación de ácidos urónicos	55
3.2.6.3.3 Determinación de proteínas	57
3.2.6.3.4 Determinación de humedad	58
3.2.6.3.5 Determinación del grado de metilación	59
3.2.6.3.6 Determinación del grado de acetilación	61
3.2.6.3.7 Determinación de fenoles de pared celular	62
3.2.6.3.8 Caracterización por extracción secuencial de polímeros de pared celular	65
3.2.6.3.9 Análisis por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)	67
3.3 Análisis estadístico	67
4. Tratamiento del tejido de raíz de remolacha roja (<i>Beta vulgaris</i> L. <i>var. conditiva</i>) con dosis bajas de radiación gamma	68
4.1 Introducción	69

4.2	Materiales y métodos específicos	79
4.2.1	Tratamiento con radiación gamma	79
4.2.2	Análisis físicos, químicos, bioquímicos y funcionales	81
4.2.2.1	Determinación de fenilalanina amonio-liasa (PAL)	82
4.2.2.2	Determinación del perfil de aminoácidos	83
4.2.2.3	Turgor	83
4.2.2.3.1	Medición del volumen del tejido	84
4.2.2.3.2	Cálculo de la presión de turgor	84
4.2.2.4	Ensayos mecánicos	87
4.2.2.4.1	Punción	87
4.2.2.4.2	Compresión	88
4.3	Resultados y discusiones	89
4.3.1	Pigmentos, color y enzima PPO	89
4.3.2	Actividad de POX y PAL y composición química de pared celular	93
4.3.3	Análisis por FTIR	103
4.3.4	Caracterización por extracciones secuenciales	105
4.3.5	Evaluación textural	108
4.3.5.1	Ensayo mecánico de compresión	109
4.3.5.2	Ensayo mecánico de relajación	109
4.3.5.3	Influencia del turgor en el comportamiento mecánico de compresión	112
4.3.5.4	Ensayo mecánico de punción	114
4.3.6	Caracterización microscópica del tejido	115
4.4	Conclusiones	119
5.	Tratamientos de escaldo del tejido de raíz de remolacha roja (<i>Beta vulgaris</i> L.var.conditiva) por microondas y en agua a 90 °C	122
5.1	Introducción	123
5.2	Materiales y métodos específicos	131
5.2.1	Tratamientos	131
5.2.1.1	Tratamiento por microondas	131

5.2.1.1.1 Tratamientos por microondas en ausencia de agua	133
5.2.1.1.2 Tratamientos por microondas en presencia de agua	134
5.2.1.2 Tratamiento térmico convencional por inmersión en agua a 90 °C	135
5.2.2 Caracterización del tejido sin tratar y tratado	136
5.2.2.1 Ensayos mecánicos de compresión	136
5.2.2.2 Modelado de la inactivación enzimática	137
5.2.2.3 Eficiencia energética del proceso	140
5.2.3 Profundización de la caracterización de los sistemas de interés	143
5.3 Resultados y discusiones	145
5.3.1 Ensayos preliminares. Tratamiento por microondas en ausencia de agua	145
5.3.2 Tratamientos por microondas en presencia de agua	148
5.3.2.1 Modelado de la inactivación	158
5.3.2.2 Ensayos mecánicos	161
5.3.2.2.1 Compresión	161
5.3.2.2.2 Relajación	162
5.3.2.3 Color	166
5.3.2.4 Eficiencia energética del proceso	167
5.3.3 Ensayos adicionales de los tratamientos de interés	170
5.3.3.1 Pigmentos de remolacha roja	170
5.3.3.2 Composición química de pared celular	172
5.3.3.3 Extracciones secuenciales de polímeros de pared celular	177
5.3.3.4 Análisis por FTIR	185
5.3.3.5 Caracterización microscópica del tejido	189
5.4 Conclusiones	191
6. Conclusiones Generales	194
7. Bibliografía	197

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Preservación de alimentos: Tecnologías emergentes y Nuevas tecnologías

La ciencia y tecnología orientada al desarrollo y preservación de los alimentos, tiene por objetivo principal, brindar seguridad y calidad de los productos que llegan al consumidor. El uso de calor a través de los procesos térmicos tales como el escaldado, la pasteurización, la esterilización, el secado y la evaporación, han sido y son las prácticas más ampliamente empleadas en la industria alimentaria a fin de garantizar la seguridad microbiológica y estabilidad de los productos.

El crecimiento de la población y la demanda de los consumidores por alimentos seguros, nutritivos y listos para consumir, ha crecido y crece exponencialmente. Por ello, la industria se ve en la necesidad de una mayor velocidad de producción, una mejora de la calidad y extensión de la vida útil de sus productos. Para poder cumplir con estas demandas y alcanzar los objetivos, la ciencia y la tecnología aplicada a los alimentos conduce sus fuerzas a mejorar las técnicas ya existentes y poder desarrollar nuevas metodologías que permitan la óptima preservación de alimentos.

Actualmente la preocupación por el medio ambiente, el interés por disminuir el impacto ambiental de los procesos, suma nuevos objetivos en el desarrollo de tecnologías de preservación, en términos de eficiencia energética,

reducción de la cantidad de agua necesaria, disminución de las emisiones de gases al ambiente, disminución del empleo de sustancias químicas o solventes orgánicos, entre otros.

En los últimos tiempos, muchos desarrollos tecnológicos han sido dirigidos a mejorar las operaciones unitarias tradicionales aplicadas a la preservación así como a la búsqueda de nuevos procesos tecnológicos. Estos nuevos desarrollos podrán servir para complementar y/o sustituir procesos tradicionales.

Entre estas *nuevas tecnologías* se encuentran aquéllas que dan lugar a los *alimentos mínimamente procesados*. Mucho se discute sobre este concepto ya que el mismo apunta “al mínimo tratamiento posible, pero tanto como sea necesario” (Butz y Tauscher, 2002) lo que involucra un concepto abierto a la comprensión y aplicación.

De acuerdo con Vicente y Castro (2007), la aplicación de nuevos tratamientos ha adquirido mayor interés a escala industrial y ellos presentan un importante potencial para sustituir al menos parcialmente, los procesos tradicionales ya establecidos, siempre con el objetivo de la obtención de productos con una mejor calidad (inocuidad y valor nutricional) así como la mejora de los procesos en términos de eficiencia (tiempo, consumo de energía, impacto ambiental).

Las nuevas tecnologías pueden agruparse en:

a) tratamientos **no térmicos** desarrollados como respuesta al interés en productos alimenticios frescos y naturales. Dentro de estos se destacan el ultrasonido (US); el procesamiento con alta presión (AP); pulsos de campos eléctricos (PCE), campos magnéticos oscilantes (CMO), tratamiento con luz UV y radiaciones ionizantes (electrones acelerados; rayos-gamma (γ) y rayos-X). La particularidad de estos tratamientos es la capacidad de trabajar sin producir un aumento de la temperatura en el producto, evitando así la degradación de los componentes termolábiles y permitiendo preservar características de calidad de los productos *naturales* o *frescos* (Pereira y Vicente, 2010).

b) tratamientos **térmicos** no convencionales: calentamiento óhmico (CO) y calentamiento dieléctrico que incluye la radiofrecuencia (RF) y el calentamiento con microondas (MO). En estas tecnologías, también llamadas *térmicas novedales*, la energía de calentamiento y el aumento de la temperatura se generan directamente en el interior del alimento, fenómeno denominado *calentamiento volumétrico* (Venkatesh y Raghavan, 2004). Este patrón común de generación de calor, permite la disminución de los tiempos de cocción y, en consecuencia, presenta ventajas directas sobre los términos de eficiencia energética y de calefacción.

c) tratamientos **combinados** o también llamados *de barrera* que involucran la aplicación de diversos tratamientos tradicionales y no tradicionales a fin de obtener productos con características similares al alimento original (Lee, 2004). La combinación de factores, actualmente denominados *hurdles*, obstáculos o barreras, ha sido aplicada para la conservación de los alimentos durante siglos. Hoy se estudia la combinación de factores para optimizar la calidad del producto.

La aplicación de algunas de estas tecnologías emergentes a escala industrial presenta aún algunas limitaciones tales como costo de inversión, control total de variables de proceso, regulación a nivel estatal, escalado. Sin embargo los aspectos de interés, que impulsan su estudio son la reducción del impacto sobre el medio ambiente, la mejorar de la eficiencia energética y el minimizar el uso de recursos no-renovables junto, desde ya, con la optimización de la calidad de los alimentos.

1.1.2 Principios generales de los tratamientos no térmicos, térmicos y combinados

1.1.2.1 Tratamientos no térmicos

El término *no térmico* se utiliza a menudo para designar a las tecnologías que son eficaces a temperatura ambiente o sub-letales para inactivar microorganismos (Butz y Tauscher, 2002).

✧ *Ultrasonido (US)*: Utiliza ondas ultrasónicas, semejantes a las ondas sonoras con frecuencias de 20 kHz o mayores. Para el procesamiento de alimentos se aplican frecuencias mayores a 2,5 MHz, capaces de producir disrupción del tejido, crear emulsiones o promover a reacciones químicas (Fellows, 2000). En el interior de la matriz la generación de una burbuja de gas en medio líquido produce cambios rápidos de presión y temperatura que causan disrupción y adelgazamiento de las membranas, calentamiento puntual y generación de radicales libres.

✧ *Altas Presiones (AP)*: Se someten los materiales a presiones que pueden ir desde 100 a 1.000 MPa. La presión se aplica de manera uniforme e instantánea a través del alimento (con o sin empaque), independientemente de su masa, forma y composición. Bajo altas presiones, las biomoléculas cumplen el principio de Le

Châtelier-Braun y las reacciones ocurren debido a la reducción del volumen (Hendrickx y col., 1998).

✧ *Pulsos de Campos Eléctricos* (PCE): Aplicación de pulsos de alta tensión (de 20 a 80 kV) entregados al producto que se halla ubicado entre un par de electrodos. El pulso, causado por la descarga de energía eléctrica, fluye a través del alimento por un período muy corto de tiempo (1-100 μ s). El pulso de alto voltaje eléctrico genera un potencial a través de la membrana celular; la polarización de la membrana celular conduce finalmente a la ruptura de la misma (Butz y Tauscher, 2002).

✧ *Campos Magnéticos Oscilantes* (CMO): utilizan una fuerza de campo que va desde 5 a 50 Tesla, capaces de inactivar las células en estado vegetativo, pero sin efectos sobre esporas y enzimas. El pulso puede ir de 10 μ s a varios ms. La frecuencia máxima utilizada es de 500 MHz y más allá de ésta se produce un calentamiento no deseado (Butz y Tauscher, 2002).

✧ *Luz Ultravioleta* (UV): La porción ultravioleta del espectro electromagnético varía aproximadamente entre 100 y 400 nm, sin embargo los efectos inducidos por las radiaciones UV se producen en la zona del **UV-C** o “UV lejano”. Las longitudes de onda específicas y responsables de este tratamiento se sitúan entre 200-280 nm con una longitud de onda máxima de 254 nm. La **Figura 1.1** muestra y amplía las zonas de A, B, C y Vacío del rango UV.

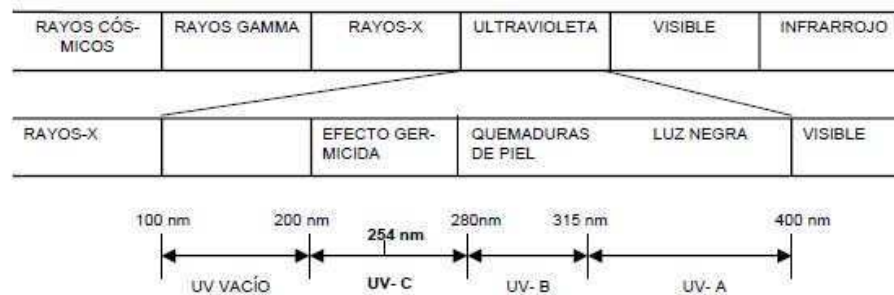


Figura 1.1 Espectro electromagnético, ampliación de las región UV, discriminación de las zonas UV-Vacío, UV-C, UV-B y UV-A. (Adaptación, Rivera-Pastrana y col., 2007).

Durante los tratamientos con UV-C los productos frutihortícolas son expuestos por un cierto período de tiempo a las radiaciones UV (a la longitud de onda de máxima 254 nm). La luz UV a bajas dosis genera diversos efectos benéficos, tales como inducción de resistencia a enfermedades, retraso de la maduración y mejora de atributos que aportan una mayor calidad a los productos (Charles y col., 2005; Charles y col., 2008). Luckey (1980) propuso un mecanismo denominado de *hormesis*, donde bajas dosis de rayos UV pueden causar daños sobre el ADN y leves heridas en los tejidos activando en consecuencia mecanismos de reparación. La activación del sistema de defensas del tejido se pone en marcha y algunos compuestos tales como las enzimas antifúngicas, tienen un efecto directo y/o sinérgico en la inactivación de los microorganismos.

✧ *Radiaciones Ionizantes (RI)*: Existen diferentes fuentes productoras de radiaciones ionizantes; los rayos gamma (γ) emitidas por isótopos radiactivos tales como ^{60}Co , ^{137}Cs ; los electrones acelerados o partículas beta (β) y los rayos X (electrones de alta velocidad originados en el interior de un tubo de vacío mediante bombardeo de rayos catódicos). Los rayos X y rayos gamma son radiaciones electromagnéticas de muy baja longitud de onda (10^{-12} - 10^{-15} m) y alta frecuencia (10^{18} a 10^{22} Hz). Las radiaciones ionizantes poseen elevada energía (0,1 a 10 MeV). La irradiación consiste en exponer el producto a la acción de las radiaciones ionizantes durante un cierto período de tiempo que es proporcional a la cantidad de energía que se desea que el alimento absorba. Se define como *dosis* a la cantidad de energía absorbida por unidad de masa de producto y la unidad de dosis es el Gray que corresponde a un Joule de energía absorbida por kilo de masa irradiada (Farkas, 2006). Para el procesamiento de alimentos, se utilizan electrones acelerados o rayos gamma debido al costo demasiado alto de la aplicación de rayos X. Excepto por las diferencias en el poder de penetración, los efectos logrados en los alimentos son equivalentes. La penetrabilidad de la radiación varía de forma inversamente proporcional a la energía. Los electrones acelerados usados poseen alta energía (10 MeV) y baja penetrabilidad (3,9 cm) a diferencia de los rayos gamma que poseen menor energía (^{60}Co : 1,17-1,33 MeV; ^{137}Cs : 0,66 MeV) y mayor alcance, siendo eficaces en alimentos hasta profundidades de 20 cm (Farkas, 2006).

Las radiaciones ionizantes absorbidas producen daños en los ácidos nucleicos (ARN-ADN) de las células vivas en forma directa o indirecta (a través de los radicales oxidativos originados mayoritariamente por la radiólisis del H₂O). El daño producido por la dosis absorbida, en las células de los distintos microorganismos e insectos puede conducir a su eliminación o prevenir su reproducción. En tejidos vegetales, bajas dosis pueden causar daños sobre el ADN y leves heridas en los tejidos activando, en consecuencia, los mecanismos de reparación de estos (Thayer, 1990).

1.1.2.2 Tratamientos térmicos

✧ *Calentamiento Dieléctrico*: La interacción entre un campo electromagnético alterno aplicado con los dipolos y cargas iónicas presentes en la matriz alimentaria, produce la conversión de energía electromagnética en energía térmica debido a la interacción directa de la radiación incidente con las moléculas del material permitiendo así el calentamiento en el producto, denominado *calentamiento volumétrico* (Venkatesh y Raghavan, 2004). Los sistemas de *Radiofrecuencia (RF)* y *Microondas (MO)* operan bajo este principio obligando a las moléculas polares, tales como el agua y a las especies iónicas, a alinearse constantemente con el campo eléctrico que se encuentra rodeando el producto. El movimiento de las moléculas es muy rápido y tanto las RF como las MO operan en la región del espectro electromagnético que resulta en el calentamiento dieléctrico. Las RF se ubican en la zona de frecuencias de 3 kHz a 300 MHz y las

MO se ubican entre 300 MHz-300 GHz, siendo las frecuencias más empleadas 915 MHz y 2,45 GHz (Ramaswamy y Tang, 2008).

Las MO son consideradas radiaciones no ionizantes ya que la energía emitida no es suficiente para romper uniones químicas (Heddleson y Doores, 1994; Wathey y col., 2002; Piyasena y col., 2003; Orsat y col, 2005). En las MO el fenómeno de radiación tiene lugar en una cavidad cerrada o muy próxima a un aplicador de onda como el caso de los túneles industriales (Piyasena y col, 2003).

✧ *Calentamiento Óhmico (CO)*: Es llevado a cabo mediante el uso de resistencia eléctrica o calefacción por electro-conducción. El calentamiento se produce cuando una corriente eléctrica alterna pasa a través de un alimento resultando así en la generación interna de calor, debido a la resistencia eléctrica de los mismos (de Alwis y Fryer, 1990).

1.1.2.3 Tratamientos combinados

Los métodos combinados actúan afectando diversos factores que influyen sobre la supervivencia y/o el crecimiento de los microorganismos indeseados. El concepto de tecnologías de obstáculos o barreras, ha sido introducido por Leistner y Gorris (1995) para definir la aplicación combinada de factores a fin de conservar un alimento. Existen numerosos factores de barreras que se han utilizado durante siglos para la conservación de alimentos, entre las más importantes se pueden

citar las altas y bajas temperaturas, reducción de actividad de agua (a_w), incremento de acidez (pH), cambio del potencial redox (Eh), inclusión de microorganismos competitivos y agregado de conservantes químicos. Una elevada intensidad o concentración de cualquiera de las barreras podría afectar de manera indeseada la calidad de los alimentos (ej.: pérdida de nutrientes, textura, color). Actualmente se suman a estas barreras las nuevas tecnologías (altas presiones, luz UV, radiaciones ionizantes, campo eléctrico pulsado, otros).

El tratamiento combinado o de barrera se basa en las respuestas homeostáticas de los microorganismos frente a factores de estrés. Todas estas respuestas homeostáticas requieren que las células gasten energía. Es de interés comprender las interacciones entre los diferentes obstáculos o barreras en las diversas matrices, hallar el orden e intensidad adecuado de cada uno para poder alcanzar la seguridad microbiológica y la estabilidad del producto, optimizando la calidad del alimento.

1.2 Pared celular de los tejidos vegetales

La pared celular en su conjunto, laminilla media, paredes primaria y secundaria y membrana celular o plasmalema, son los componentes principales de los tejidos vegetales, constituyen la *base* de estos y juegan un papel fundamental en la determinación de las características sensoriales de los alimentos de origen vegetal. Las propiedades químicas, físicas, bioquímicas y mecánicas de estos componentes, juegan un rol importante sobre los aspectos de *calidad* de los productos frutihortícolas. Muchos de ellos son creados a través de la experiencia del consumo y se ponen en juego al evaluar el color, la textura y el flavor. De acuerdo a Rodriguez y col. (2006) las propiedades funcionales están influenciadas por la *fibra dietaria* que contribuye además, en la prevención de enfermedades, en el control del tránsito intestinal, en la disminución del nivel de glucosa en sangre.

Hoy, nuevas tecnologías de preservación y elaboración son aplicadas a los tejidos vegetales a fin optimizar su calidad. La ciencia de los alimentos a su vez, investiga para comprender los cambios y modificaciones que se producen en los principales componentes de la pared celular de los tejidos al aplicar estas nuevas técnicas ya que podrían afectar los aspectos de calidad del producto final.

1.2.1 Estructura y composición química de pared celular

Desde el punto de vista fisiológico, la pared celular está íntimamente ligada con la mayoría de las actividades de desarrollo, regulación del crecimiento, división celular, señalización y transporte de nutrientes, almacenamiento de reservas y protección contra organismos externos y factores de medio ambiente o de estrés. Además proporciona la función de sostén y forma de las células. La composición química de la pared celular difiere entre los órganos vegetales; la complejidad aparente del tipo de células en cada tejido vegetal se puede observar a partir de las diferencias de las células meristemáticas. La división del núcleo de las células meristemáticas es seguido por la formación de una tabique o pared celular, donde las pectinas y sus sales de calcio se depositan en la pared de cada una de las células hijas para formar una capa cementante intercelular conocida como la laminilla media. Seguido por la deposición de celulosa, hemicelulosa, polisacáridos pécticos adicionales, glicoproteínas, proteoglicanos y compuestos fenólicos para formar la pared principal o primaria. La deposición de todos los polímeros en la pared se lleva a cabo de manera organizada y controlada (Brett y Waldron, 1996). Las células de tejidos jóvenes y de la mayoría de los tejidos frutihortícolas poseen solamente pared primaria. Otras células al finalizar su crecimiento, alcanzando su madurez, desarrollan la pared secundaria (interna a la pared primaria) que no permite el crecimiento celular.

Las características de composición de la pared celular reflejan la diversidad de las propiedades funcionales en los diferentes niveles jerárquicos (**Figura 1.2**). A nivel celular, la composición química y bioquímica difiere a lo largo de la pared y sus componentes refieren a los rasgos estructurales. La jerarquía de los niveles de organización en las paredes celulares se encuentra por encima de los polímeros aislados. La jerarquía estructural está fuertemente ligada a la composición de la pared, sus componentes afectan directamente sobre las propiedades físicas y mecánicas del tejido y presentan una gran importancia en el estudio de productos frutihortícolas derivados.

Las jerarquías estructurales de los tejidos vegetales (**Figura 1.2**) estudiadas por Waldron y col. (1997b), permiten identificar cinco niveles, comenzando por los polímeros que conforman la pared celular; la consistencia de estos se refleja en la fuerza, forma y tamaño de la pared celular. El tejido constituido por dichas células se encuentra formando parte de uno de los órganos del vegetal. Este modelo jerárquico propuesto permite comprender que las características de calidad de los productos frutihortícolas y la estructura de los tejidos están fuertemente ligados. Los órganos comestibles de las plantas (frutos, hojas, semillas, raíces, tronco) se encuentran en lo más alto de las jerarquías descritas en la **Figura 1.2**. Las propiedades globales de cada uno dependerán de las características integradas de los niveles más bajos de la estructura los cuales pueden verse modificados por eventos fisiológicos o de procesamientos durante

toda la cadena alimentaria (Waldron y col., 2003). Dichas alteraciones pueden ser estudiadas en cualquiera de las jerarquías mencionadas.

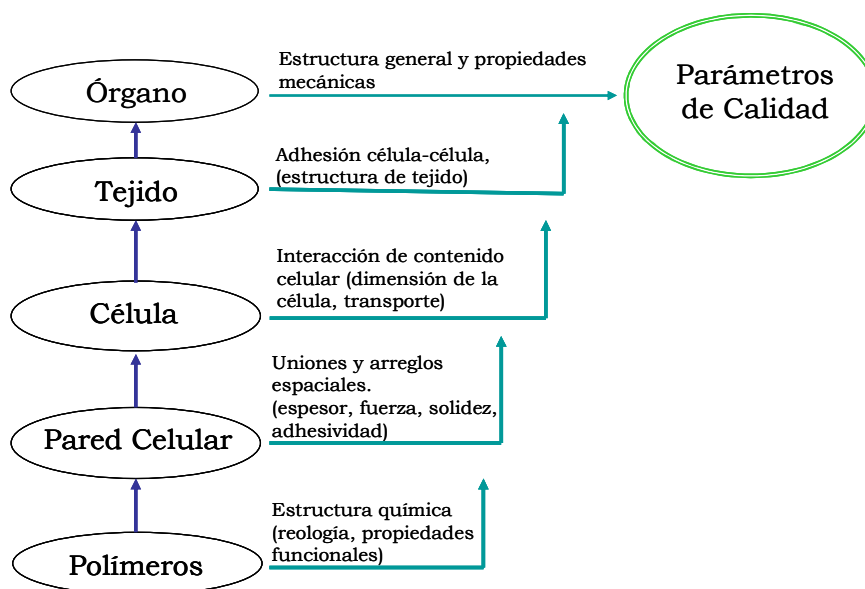


Figura 1.2 Jerarquías estructurales. Adaptación de Waldron y col. (1997b) y Waldron y col. (2003).

La pared celular es una capa rígida que se localiza en el exterior de la membrana celular o plasmalema (**Figura 1.3**). En las células viables, la pared celular protege el contenido celular, da rigidez a la estructura, funciona como mediadora en todas las relaciones de la célula con el entorno y actúa como compartimento celular. Los componentes principales de la pared celular son el agua, las pectinas, las hemicelulosas y la celulosa; además las proteínas, la lignina y otros compuestos fenólicos que también pueden estar presentes (Brett y Waldron, 1996; Waldron y col., 2003).

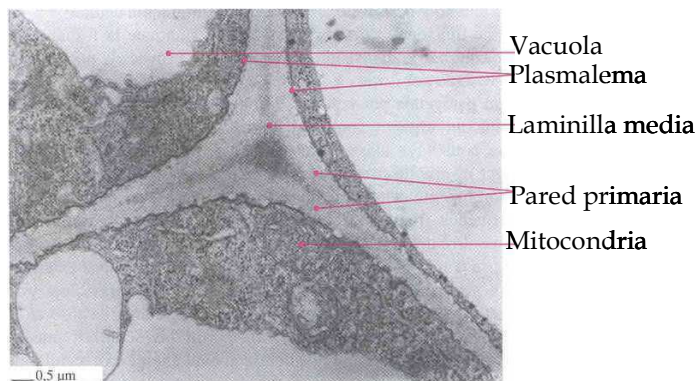


Figura 1.3- Microscopía de pared primaria de células parenquimáticas del tallo de chayota o chayotera (*Sechium edule*). Adaptación Kovács y Keresztes (2002).

En las células de los tejidos vegetales la pared primaria, relativamente rígida, se desarrolla en todo el protoplasma exterior al plasmalema. Esta pared primaria está constituida por una estructura base de microfibrillas de celulosa y una matriz de polisacáridos. Las células contiguas están separadas por la laminilla media (de 0,1 a 0,2 micrones de espesor), constituida por pectinas amorfas y iones de calcio asociados y su función principal es mantener a las células unidas. La degradación de las sustancias pécticas y la eliminación de los iones de calcio conducen, por lo general, a la separación de células.

Los tejidos comestibles suelen contener pequeñas cantidades de pared celular secundaria lignificadas. Esta pared se establece dentro de la pared primaria una vez que la expansión celular se ha completado (Andersson y col., 2006). La formación de esta pared secundaria, desarrollada durante el envejecimiento celular, va acompañada de cambios como la lignificación en la laminilla media y pared primaria (Brett y Waldron, 1996). En las paredes celulares lignificadas, la

concentración de lignina se ve aumentada en la laminilla media y pared celular primaria, pero en menor proporción respecto a la cantidad total de lignina presente en las paredes secundarias cuyo grosor es mucho mayor (1 a 3 micrones).

Los nuevos modelos consideran a la pared celular como un sistema integrado, organizado, dinámico (Talbot y Ray, 1992; Carpita y Gibeaut, 1993) y se podría concebir a la pared celular como tres estructuras independientes, pero con dominios relacionados entre sí. Según Carpita y Gibeaut (1993) el primer dominio constituido por la red celulosa-hemicelulosa, está integrado en un segundo dominio formado por una matriz de sustancias pécticas. (**Figura 1.4**). El tercer dominio (no observable en la figura) se compone de proteínas estructurales, orientadas de forma radial dentro de la matriz de la pared celular.

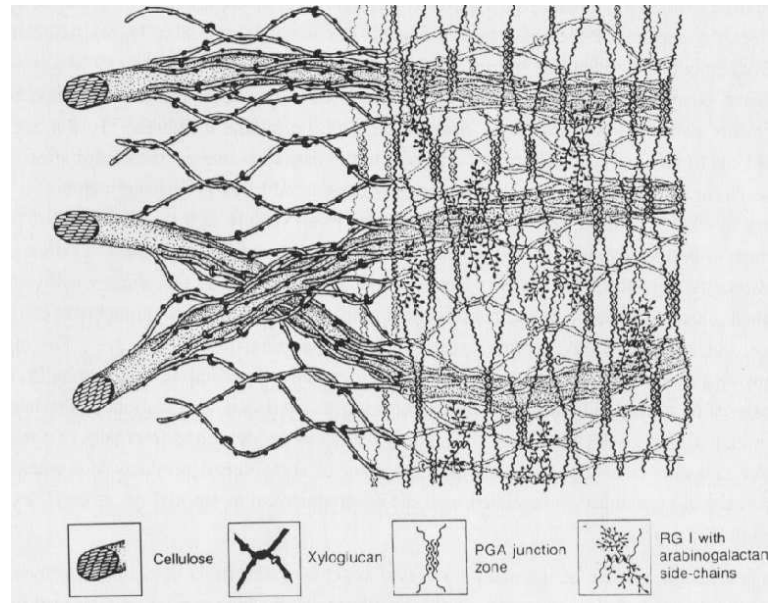


Figura 1.4-Esquema representativo del sistema integrado celulosa-hemicelulosa junto a la matriz de sustancias pécticas, de la pared primaria de tejidos vegetales. Adaptación Carpita y Gibeaut (1993).

Los polisacáridos de la pared celular están compuestos por diversos azúcares, que pueden vincularse a través de una enorme variedad de formas. A continuación veremos los más importantes:

Celulosa: polímero lineal simple formado por unidades de D-glucosa (Glu) unidas por enlaces glucosídicos $\beta(1\rightarrow4)$, presente en las paredes primarias con un grado de polimerización entre 2.000-6.000 unidades y en las paredes secundarias con un grado de polimerización entre 10.000-12.000 unidades (MacDougall y Selvendran, 2001). La unidad básica repetitiva es la celobiosa; su función es mantener la rigidez de la pared celular. En la disposición espacial, los polímeros de glucosa están empaquetados formando un material fibrilar cristalino, y se forman fuertes enlaces puente de hidrógeno inter e intramoleculares que

hacen a la celulosa insoluble. Una proporción significativa de la celulosa de la pared celular está presente en una forma cristalina y otra, en estado amorfo.

Hemicelulosa: polisacáridos no celulósicos muy heterogéneos. Son polisacáridos neutros constituidos principalmente por unidades de glucosa, xilosa manosa y galactosa. En general se clasifican según el principal residuo de la cadena: xilanos, mananos, glucanos, galactanos y también pueden encontrarse tales como: glucuronoxilanos, arabinoxilanos, glucomananos, galactomananos, galactoglucomananos y xiloglucanos (Waldron y col., 2003). El polisacárido predominante es capaz de formar uniones puente de hidrógeno con las microfibrillas de celulosa (Carpita y Gibeaut, 1993; Waldron y col., 2003).

Sustancias Pécicas: El principal residuo de azúcar encontrado en las pectinas es el ácido D-galacturónico (GalA), una fracción de éste se encuentra generalmente esterificada con metanol. Otros azúcares comúnmente presentes incluyen L-ramnosa (Rha), L-arabinosa (Ara), D-galactosa (Gal), en menor cantidad D-xilosa (Xil) y otros monosacáridos. En general, tres tipos de componentes pécticos han sido descritos y estudiados; los homogalacturonanos (HG) y ramnogalacturonano tipo I (RGI) y ramnogalacturonano tipo II (RGII). Las pectinas conforman *bloques* de polímeros y se han descritos los bloques lineales de HG (regiones lisas) y regiones ramificadas constituidas por bloques de ramnogalacturonanos con cadenas laterales neutras (Jarvis, 1984).

También están presentes **proteínas** que pueden clasificarse en dos grupos, las proteínas *funcionales* (enzimas) y las proteínas de *estructura*. Las enzimas presentan un amplio rango de funciones asociadas al desarrollo, crecimiento, proceso madurativo, senescencia y post-cosecha del tejido. Las proteínas estructurales de la pared, son en su mayoría glicoproteínas que contienen cadenas laterales de carbohidratos sobre ciertos aminoácidos. Un grupo común de proteínas celulares se caracterizan por la abundancia del aminoácido hidroxiprolina. La extensina proteína estructural de pared celular puede formar enlaces covalentes con otras moléculas de extensina a través del aminoácido tirosina (Tyr), envolviendo otros constituyentes de la pared celular lo que contribuye a la cohesión de la misma. (Showalter, 1993; Sommer-Knudsen y col., 1998).

Los compuestos **fenólicos**, se encuentran presentes frecuentemente en la pared celular y pueden dividirse en dos clases; la mayoritaria forma la **lignina** (cadena fenólica, producto de uniones oxidativas entre fenoles). La segunda clase corresponde a esteres fenólicos unidos a polisacáridos de la pared celular, que pueden ser utilizados para generar uniones covalentes mediadas por la acción de la enzima peroxidasa (Brett y Waldron, 1996).

1.2.2 Propiedades físicas y mecánicas

Además de los componentes de pared celular, la presión de turgor y las propiedades mecánicas de los tejidos también tienen un efecto directo sobre los parámetros de la calidad de los tejidos vegetales (Van Buren, 1979; Waldron y col., 1997 b; Ng y col., 1998 b) siendo la textura uno de los atributos de calidad de mayor interés.

1.2.2.1 Presión de turgor

Es la presión hidrostática ejercida por el líquido intracelular sobre la membrana de las células, que poseen la propiedad de ser *semipermeable*, permitiendo el proceso de ósmosis. La rigidez y la jugosidad de los vegetales han sido atribuidas al turgor de las células (Bourne, 1978). Las membranas celulares presentan una escasa resistencia mecánica, mientras que la pared celular debido a su elasticidad es capaz de presentar resistencia y soportar la presión ejercida por el líquido intracelular. Ilker y Szczesniak (1990), han sugerido que la relación entre las resistencias mecánicas de la pared celular y la laminilla media, influye directamente sobre la percepción sensorial durante la masticación del tejido vegetal. La presión de turgor tiene un efecto directo sobre las características reológicas y texturales de los tejidos vegetales (Falk y col., 1958; Nilsson y col., 1958; Philip, 1958; Lin y Pitt, 1986).

1.2.2.2 Comportamiento mecánico

El comportamiento mecánico de los tejidos vegetales presenta una fuerte dependencia con la geometría celular y la presión de turgor. Las características particulares (composición y estructura de la pared celular) de las células que conforman el tejido también influyen en el comportamiento mecánico de estos (Lin y Pitt, 1986). En el estudio del comportamiento mecánico de los tejidos vivos, es importante conocer el módulo de elasticidad de las paredes celulares y la magnitud de la presión internas de las células.

El conocimiento del módulo elástico, obtenido de la curva de tensión-deformación de un tejido vegetal, no es suficiente para caracterizar las propiedades del material. Si bien la deformación ocurre en los sólidos y el flujo en el material líquido, los alimentos con comportamiento viscoelástico son aquellos que presentan simultáneamente características viscosas y elásticas. Los tejidos vegetales responden a este comportamiento, mostrando en general, una disipación gradual del esfuerzo cuando son sometidos a un ensayo de compresión-relajación, acercándose a un valor asintótico de equilibrio en el tiempo (Steffe, 1996).

El uso de modelos mecánicos permite obtener información acerca del comportamiento viscoelástico de los alimentos. Estos modelos se construyen a partir de la combinación, más o menos compleja, de elementos sólidos de Hooke representados por un resorte y elementos viscosos representados por un sistema

émbolo-pistón. Los modelos más conocidos son el modelo de Maxwell (**Figura 1.5A**) y el modelo de Kelvin (**Figura 1.5B**). Las analogías de Maxwell y Kelvin describen el comportamiento viscoelástico como un elemento viscoso y otro elástico dispuestos en serie o en paralelo, respectivamente.

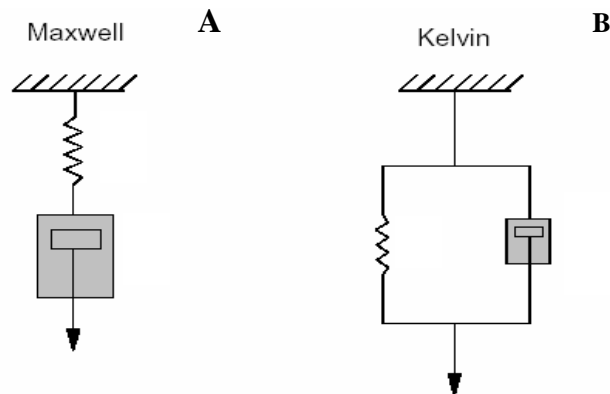


Figura 1.5 Modelos de comportamientos viscoelásticos (**A**) modelo de Maxwell (elementos en serie) y (**B**) modelo de Kelvin (elementos en paralelo). Adaptado de Steffe (1996).

La mayoría de los materiales viscoelásticos incluidos los materiales biológicos, no relajan el esfuerzo con una velocidad uniforme sino que lo hacen en distintas etapas con tiempos característicos de relajación diferentes. El modelo de Maxwell generalizado se puede observar en la **ecuación 1.1**

$$F_{(t)} = F_{\infty} + \sum_{i=1}^n F_i \cdot \exp(-t / \tau_i) \quad \mathbf{1.1}$$

Este modelo, ha permitido describir de manera adecuada, la respuesta del tejido vegetal frente al ensayo de relajación del esfuerzo (Lin y Pitt, 1986; Llano y col., 2003; Sajnin y col.2003).

1.2.3 Aspectos nutricionales y funcionales de los componentes de pared celular

En 1953, Hipsley utilizó por primera vez el concepto de *fibra dietaria* para designar a los componentes no digeribles de la pared celular de los tejidos vegetales. Entre 1972 y 1976, el estudio de la *fibra dietaria* se amplió y se desarrollaron una serie de hipótesis sobre sus efectos en la salud. Actualmente existe una gran discusión asociada al concepto de *fibra dietaria*, pero el concepto más utilizado y aceptado es el definido por Trowell y col. (1976) el cual considera *fibra dietaria* al remanente de las células vegetales (pared celular) que no es hidrolizado durante la digestión por las enzimas presentes en el organismo del hombre y cuyos componentes son celulosa, hemicelulosa, pectinas, lignina, gomas y ceras. Sin embargo Mongeau y col. (1999) han informado que un material vegetal se puede definir como *fibra dietaria*, si se trata de las paredes celulares de dichos tejidos, que mantienen intacta su estructura y se pueden determinar mediante el uso de métodos oficiales de análisis. La American Association of Cereal Chemists (AACC) en el 2001 adoptó como definición de *fibra dietaria* a las partes comestibles de las plantas o carbohidratos análogos, que son resistentes a la digestión y absorción en el intestino delgado del ser humano con fermentación total o parcial en el intestino grueso.

El Código Alimentario Argentino (CAA) indica en el artículo 1385 modificado en el 2008 que; “Se entiende por Fibra Alimentaria a cualquier

material comestible que no sea hidrolizado por las enzimas endógenas del tracto digestivo humano. Incluye polisacáridos no almidón, pectinas, almidón resistente, inulina, oligofructosa, polidextrosa, maltodextrinas resistentes, fructo-oligosacáridos (FOS), galacto-oligosacáridos (GOS), trans-galactooligosacáridos (TOS) y todos los que en el futuro incorpore la Autoridad Sanitaria Nacional”.

1.3 Tejido de remolacha roja (*Beta vulgaris* L. var conditiva)

La remolacha (*Beta vulgaris* L.) es una planta perteneciente al orden Cariofilales (*Caryophyllales*), familia de las Amarantáceas (*Amaranthaceae*), subfamilia Quenopodioideas (*Chenopodioideae*), género *Beta* especie *B.vulgaris*. Su nombre nominal es *Beta vulgaris* L. Existen numerosas variedades de la especie, una es la conditiva que corresponde a la remolacha roja comestible. Otra variedad se caracteriza por tener raíces poco engrosadas y es la *B.vulgaris* L. var. cicla, la cual tiene muy desarrollada el nervio medio y es conocida como acelga. *B.vulgaris* L. var conditiva (**Figura 1.6**) posee raíces muy engrosadas (≥ 3 cm de diámetro) y se conoce como remolacha comestibles siendo característico el color rojo de sus raíces.



Figura 1.6. *Beta vulgaris* L. var conditiva

Las remolachas rojas en el mercado, se pueden encontrar frescas (hojas y raíces) ó en conserva (al natural, cocida, agridulce o en vinagre). La remolacha de mesa que se adquiere en fresco permanece en el mercado local durante todo el año. No obstante, la mejor época para su consumo son los meses no invernales, período donde la productividad es mayor (ver **Tabla 1.1**).

En nuestro país la producción anual comercializada a través del mercado central es de 5.200 Tn (**Tabla 1.1**) de raíz de remolacha roja frescas (hojas y raíces).

Tabla 1.1 DMA-Área Mercados de Hortalizas s/datos Mercado Central Buenos Aires).

INGRESOS MENSUALES (En Tn.)												
AÑO	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Set	Oct	Nov	Dic
1999	579,6	453,3	491,1	413,1	415,9	432,9	445,0	503,3	573,1	547,3	591,8	659,3
2000	593,5	482,5	587,6	470,6	419,7	333,4	319,0	427,6	574,5	710,9	572,9	542,2
2001	503,6	347,1	292,3	333,9	375,9	385,2	351,3	501,8	472,9	533,8	494,1	401,1
2002	424,5	375,2	353,3	314,2	276,2	245,7	294,2	307,7	449,6	511,2	515,8	536,8
2003	444,5	287,2	279,3	303,1	335,6	311	284,8	281,7	350	575,8	559,9	454,4
2004	441,1	416,5	493,8	413,9	361,9	374,3	372,5	466,8	434,1	610,8	529,3	491,3
2005	437,6	384,4	458,7	437,3	370,5	360	358	381,3	424,5	449,7	556,1	530,9
2006	510,1	405,9	403,7	406,8	445,8	397,9	443,4	354,7	405,5	s/d	s/d	s/d
2007	497,2	395,2	443,5	407,1	334,4	337,5	347,3	210,1	373,5	583,5	556	493,4
2008	526,5	451,8	345	419,3	374,6	342,4	447,6	493,9	519,8	507,2	443	481,2
2009	500,5	526,1	479,1	482,3	398,6	356,8	337,1	387,8	461,3	541,3	500,6	451,9
2010	379,40	343,60	353,02	369,13	415,70	358,52	353,45	397,99	496,40	449,78	440,78	386,00
PROM.	486,51	405,73	415,04	397,56	377,07	352,97	362,80	392,89	461,27	547,39	523,66	493,50

Fuente: DMA-Area Mcdos de Hortalizas s/datos MCBA

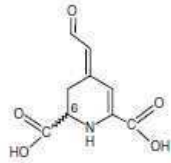
Las raíces de remolacha roja presentan un contenido significativo de vitamina C. Además, son fuente de folatos, fibra dietaria (soluble e insoluble) y antioxidantes. Está entre los vegetales más dulces debido a su contenido de azúcar.

Todos los pigmentos biológicos absorben selectivamente ciertas longitudes de onda de la luz y reflejan otros. La luz absorbida puede ser usada por la planta para proveer energía para la ocurrencia de reacciones químicas mientras que las longitudes de onda reflejadas determinan el color con el cual el pigmento se va a expresar para los ojos del consumidor. Las betalainas de *Beta vulgaris* L. var. conditiva son pigmentos que contienen nitrógeno, solubles en agua y que derivan de la tirosina, encontrándose sólo en un número limitado de linajes vegetales, especialmente en plantas que pertenecen al orden de las *Caryophyllales* (por ejemplo, en la Familia *Amaranthaceae*) y en el género fungal de las *Amanita* e *Hygrocybe* (Gandia-Herrero y col., 2005). Todos los pigmentos betalaínicos contienen ácido betalámico como el cromóforo y actúan como señales visibles para atraer insectos, pájaros y animales para la polinación y dispersión de semillas. Ellos también protegen a las plantas de los daños causados por la radiación UV y la luz visible (Yoshikazu y col., 2008). Dependiendo de la naturaleza del residuo agregado al ácido betalámico, las betalaínas pueden ser clasificadas en betacianinas o betaxantinas. Las betacianinas exhiben una coloración rojo/violeta mientras que las betaxantinas exhiben una coloración amarillo/naranja. Las betalaínas están localizadas en diferentes partes de las

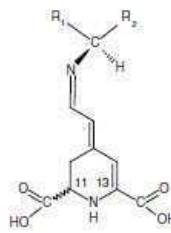
plantas, en raíces, frutas y flores (Kujala y col., 2000; Gandía-Herrero y col., 2005). De acuerdo con Herbach y col. (2004), cerca de 1% (en base seca) de las raíces frescas están constituidas por betalaínas y 80 a 90% del pigmento total en remolacha roja, puede ser atribuido a las betacianinas, fundamentalmente betanina y su isómero isobetanina, siendo el resto betanidina, prebetanina y sus isómeros de C-15 (Knuthsen, 1981). También se encuentran presentes pero en una cantidad menor, las betaxantinas, siendo la vulgaraxantina I la más representativa (Kujala y col., 2000). Como muchos otros pigmentos naturales, las betalaínas son muy sensibles al calor, luz y oxidación, especialmente, la causada por la actividad de la peroxidasa (POX), la cual es una de las más importantes causas de decoloración de pigmentos. En la **Figura 1.7** se muestran las estructuras químicas de la betacianina y betaxantina.

Por otro lado el jugo concentrado de remolacha es también utilizado como aditivo alimentario, con función de colorante para alimentos (E162). En la Argentina, su uso es permitido por el Código Alimentario Argentino (CAA) en el artículo 1324.

(A) Acido Betalámico

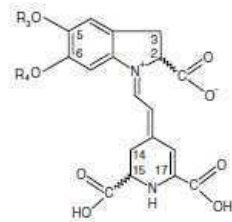


(B) Betaxantina



R ₁	R ₂	
H	Glutamic acid	Vulgaxanthin I
	Proline	Indicaxanthin

(C) Betacianina



R ₃	R ₄	
β -glucose	H	Betain
6'-O-(malonyl)- β -glucose	H	Phyllocactin
2'-O-(β -glucuronic acid)- β -glucose	H	Amaranthin

Figura 1.7 Estructuras químicas del ácido betalámico (A), betaxantina (B) y betacianina (C). Adaptación de Herbach y col. (2006).

Estos pigmentos, presentes en la remolacha roja (*Beta vulgaris* L. var conditiva) presentan actividad antioxidante. Vinson y col (1998) han ranqueado al extracto de la remolacha como uno de los diez vegetales de mayor potencialidad respecto a su poder antioxidante. Los autores han indicado que tanto el jugo de remolacha roja como otros productos de éstas, si son incorporados con regularidad en la dieta, pueden proporcionar la protección contra ciertos desórdenes oxidativos causados por el estrés, aumentando el interés por este tejido.

Distintas enzimas se encuentran presentes en los tejidos vegetales tales como los de raíz de remolacha. En el caso de la peroxidasa y polifenol oxidasa, su actividad puede producir deterioro de la calidad (pérdida de color, textura, nutrientes), lo cual se controla con distintas estrategias tales como el escaldado. En el caso de la pectinmetilesterasa, un tratamiento a bajas temperaturas puede exaltar su actividad favoreciendo la demetilación y la formación de puentes calcio entre moléculas de pectina lo cual puede contribuir a una mejora de la textura de tejidos (Llano y col., 2003). La enzima fenilalanina amonio-liasa, por otra parte, contribuye a la biosíntesis de compuestos fenólicos y, de este modo, ayuda a la defensa de los tejidos frente a daños externos (Harakava, 2005).

2. OBJETIVOS

» Contribuir al desarrollo de alimentos sanos y nutritivos, que sean aceptados por el consumidor por su adecuada funcionalidad y aptitud organoléptica.

» Contribuir en la búsqueda y optimización de procesos involucrados en la industria de preservación de alimentos de origen vegetal.

» Contribuir al desarrollo y empleo de nuevos tratamientos de preservación de productos frutihortícolas.

» Determinar el efecto de bajas dosis de radiación gamma (1 y 2 kGy) en las características del tejido de raíz de remolacha roja para evaluar la posibilidad de utilizar la radiación ionizante como uno de los factores combinados para prolongar la vida útil de dichos tejidos.

» Evaluar la inactivación de peroxidasa y polifenol oxidasa en tejido de raíz de remolacha roja por métodos tradicionales y por escaldado por microondas.

» Estudiar el efecto de la aplicación de radiaciones ionizantes y no-ionizantes, sobre las características del tejido vegetal (*Beta vulgaris* L.var conditiva), analizando los cambios químicos, bioquímicos, estructurales y mecánicos ocurridos. Y vincular los cambios en la estructura y composición química con la textura y el color del tejido de remolacha roja tratado.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

GENERALES

3.1 Preparación de las muestras

Las raíces de remolacha roja (*Beta vulgaris* L. var. *conditiva*), cosechadas en Argentina (**Figura 3.1**) obtenidas en el mercado local, fueron lavadas cuidadosamente con agua corriente, peladas y cortadas en cilindros de 10 mm de espesor y 15 mm de diámetro. Los especímenes se tomaron a 5-7 mm de la periferia siendo descartados, además, los extremos superiores e inferiores de la raíz. Para adquirir dicha geometría se utilizó un sacabocado de acero inoxidable.



Figura 3.1 Tejido fresco de raíz de remolacha roja, lavado para la posterior obtención de las muestras.

Dichos cilindros obtenidos a partir del tejido fresco de raíz de remolacha roja (*Beta vulgaris* L. var conditiva) fueron las muestras empleadas para la evaluación del efecto de las radiaciones gamma, el tratamiento de escaldado por radiación de microondas o el tratamiento de escaldado por inmersión en agua a 90 °C. Un grupo de cilindros se dejó sin tratar en cada caso, constituyendo estos el sistema control correspondiente.

En la **Figura 3.2** se muestra el diagrama de flujo correspondiente al esquema de preparación y tratamiento de las muestras.

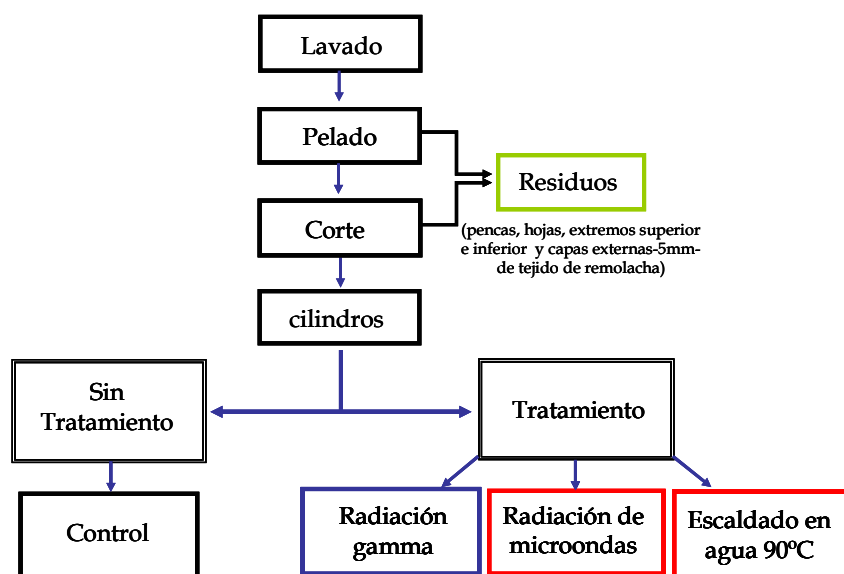


Figura 3.2 Diagrama de flujo para la preparación de muestras y su tratamiento.

3.2 Análisis químicos, bioquímicos y funcionales

Los especímenes de remolacha, control y tratados, fueron: **(1)** utilizados para determinar cambios bioquímicos (actividades enzimáticas), color y contenido de pigmentos, comportamiento mecánico (ensayos de punción, compresión y compresión-relajación) y estructurales del tejido (microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión) y **(2)** utilizados para la obtención del material de pared celular, residuo insoluble en alcohol (RIA). Dicho residuo fue luego utilizado **(i)** para determinar el contenido de lignina, celulosa, hidratos de carbono totales no celulósicos, ácidos urónicos, grado de metilación y grado de acetilación de pectinas, contenido de proteínas y humedad; **(ii)** extraer y cuantificar el contenido de fenoles; **(iii)** caracterizar por extracciones secuenciales a los polímeros de pared celular y **(iv)** análisis por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).

Todos los reactivos utilizados en los análisis fueron de calidad pro-análisis (p.a), a menos que se aclare lo contrario. Para la preparación de todos los reactivos utilizados en los análisis bioquímicos y químicos, se utilizó agua deionizada (Milli-QTM).

Todas las determinaciones químicas se realizaron por triplicado ($n=3$), a menos que se aclare lo contrario.

3.2.1 Actividad Enzimática

Extracción acetónica

Se siguió la metodología de Walton y Sondheimer (1968). Los tejidos frescos y tratados fueron triturados y homogeneizados con acetona pre-enfriada (4 °C) en una relación tejido:solvente de 1:4 (p:v) durante 2 minutos a velocidad de 16.000 rpm utilizando un Sorvall Omni Mixer (Modelo 17105, USA). Cada homogenato fue posteriormente filtrado, utilizando un embudo Büchner y filtro de fibra de vidrio (Whatman GF/C, UK). Los residuos fueron lavados dos veces, sucesivamente, con acetona (4 °C). La acetona remanente fue eliminada por evaporación a temperatura ambiente, manteniendo el residuo bajo campana durante toda la noche. Los residuos secos fueron almacenados hasta el momento de la determinación de las actividades enzimáticas a -18 °C. Todas las actividades fueron evaluadas dentro de los cinco días de la obtención del residuo. Cada extracto enzimático fue obtenido por duplicado ($n=2$).

Concentración de proteínas de los extractos acetónicos

El contenido de proteínas fue determinado en cada uno los extractos, según el método de Lowry y col. (1951) utilizando como estándar albúmina de suero bovino (Sigma, St Louis, MO, USA).

3.2.1.1 Peroxidasa (POX)

Los polvos acetónicos ($\approx 0,5000$ g) fueron resuspendidos en 40 ml de buffer fosfato 0,05 M (pH=7,0). En cada suspensión se agregó cloruro de sodio hasta alcanzar una concentración final 1 M. Los sistemas se mantuvieron, con agitación constante, durante 60 minutos a temperatura de 5-7 °C y luego fueron centrifugados (10.000 rpm, 15 min, 7 °C) empleando una centrífuga Eppendorf Modelo 5804R (Eppendorf AG, Hamburg, Alemania). En los sobrenadantes obtenidos se evaluó la actividad de POX total a 25 °C según Marangoni y col. (1995), utilizando como sustrato guayacol (o-metoxi-fenol) 1 % (p/v de etanol 50 % v/v); peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 0,3 % (v/v) y buffer fosfato de sodio (0,1 M, pH=6,0) en una relación (1:1:10). La variación de la absorbancia a 470 nm, fue evaluada cada 10 segundos durante 6 minutos, utilizando un espectrofotómetro UV-Visible (Spectro SC, LaboMed Inc., Culver City, CA, USA). La actividad se expresa como el cambio de absorbancia a 470 nm (Unidad de Absorbancia, AbU) por minuto y miligramo de proteína ($AbU\ min^{-1}\ mg^{-1}$ proteína)

3.2.1.2 Polifenol oxidasa (PPO)

Una masa de $\approx 0,5000$ g de polvo acetónico fue utilizada para evaluar la actividad de la PPO de acuerdo al método propuesto por Coseteng y Lee (1987) y Xuan y col. (2008). Los polvos acetónicos fueron resuspendidos en buffer fosfato de sodio 0,1 M (pH=6,0) manteniendo una relación 1:5 (p:v) y a cada muestra se

agregó NaCl hasta alcanzar una concentración final 1 M. Los sistemas se mantuvieron con agitación constante, durante 45 minutos a 5-7 °C; posteriormente los sobrenadantes fueron separados por centrifugación (10.000 rpm, 10 min y 7 °C) utilizando una centrífuga Eppendorf Modelo 5804R (Eppendorf AG, Hamburg, Alemania). En los sobrenadantes se midió la actividad de PPO total, a 25 °C utilizando pirocatecol 0,04 M en solución de buffer fosfato 0,01 M (pH=7,0). La variación de absorbancia a 420 nm fue evaluada cada 10 segundos durante 6 minutos utilizando un espectro UV-Visible (SpectroSC modelo, LaboMed Inc., Culver City, CA, USA). La actividad se expresa como el cambio de absorbancia a 420 nm por minuto y mg de proteína ($\text{AbU min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína).

3.2.2 Medición del color

El color de los tejidos de raíz de remolacha (control y tratados) fue evaluado, utilizando un fotocolorímetro (Minolta Co. Ltd., Osaka, Japan) con iluminante D65 y ángulo de observador α de 10°. Cada espécimen fue colocado sobre un azulejo blanco, registrándose el color a través de las coordenadas cromáticas L^* a^* b^* del espacio CIELab, en diez especímenes de cada sistema ($n=10$).

Los valores adquiridos de L^* , a^* y b^* fueron utilizados para evaluar los cambios en la luminosidad (ΔL^*); en el grado del color rojo/verde (Δa^*) y en el grado de color amarillo/azul (Δb^*). A su vez, los valores de a^* y b^* fueron

utilizados para evaluar el Cromo (C^*), índice de pureza o saturación del color y el ángulo de hue (h°) o tono, mediante las siguientes expresiones:

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad 3.1$$

$$h^\circ = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad 3.2$$

La diferencia de color total (DCT) (Cruz y col., 2007) fue evaluada para las muestras tratadas con respecto a sus respectivos controles según la siguiente ecuación:

$$DCT = \left[(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2 \right]^{1/2} \quad 3.3$$

Siendo:

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

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

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

donde L_0^* , a_0^* y b_0^* corresponde a los valores adquiridos en el tejido control, y L^* , a^* y b^* a los valores en los tejidos tratados.

3.2.3 Contenido de pigmentos

Una masa de (≈ 10 g) de tejido de cada sistema (tratado y control), fue utilizada para extraer su jugo usando una extractora de jugo doméstica (Moulinex, Buenos Aires, Argentina). El jugo obtenido fue utilizado para la cuantificación espectrofotométrica del contenido de pigmentos betalaínicos, según Mobhammer y col. (2006). Las lecturas de las absorbancias se llevaron a cabo en un espectrofotómetro UV-mini-1240UV-VIS (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón).

El contenido de las betacianinas totales fue calculado como Betanina equivalente y el contenido de betaxantinas; como Vulgaraxantina I equivalente. Para la lectura espectrofotométrica, el jugo extraído fue diluido en buffer McIlvaine (pH=6,3) hasta que las absorbancias evaluadas a 600, 536 y 476 nm no sobrepasaran un valor 1,00 ($\pm 0,05$).

El contenido de *betacianinas* (B_c) se calculó como:

$$B_c \left[\text{mg L}^{-1} \right] = \frac{A.F.M_w.100}{\varepsilon.l} \quad \mathbf{3.4}$$

donde A corresponde al valor de absorbancia de la betanina λ_{max} (536 nm), corregida por la lectura a 600 nm (línea de base), F es el factor de dilución, M_w es el peso molecular de la betanina (550 g mol^{-1}), ε es el coeficiente de extinción

molar de la betanina ($60.000 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y l es el paso óptico de la cubeta (1,0 cm).

El contenido de *betaxantinas* (B_x) es calculado como:

$$B_x \left[\text{mg L}^{-1} \right] = \frac{A.F.M_w.100}{\varepsilon.l} \quad 3.5$$

donde A corresponde al valor de absorbancia de la vulgaraxantina I λ_{max} (476 nm), corregida por la lectura a 600 nm (línea de base), F es el factor de dilución, M_w es el peso molecular de la vulgaraxantina I (339 g mol^{-1}), ε es el coeficiente de extinción molar de la vulgaraxantina I ($48.000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y l es el paso óptico de la cubeta (1,0 cm).

El jugo para cada muestra fue extraído por duplicado y las absorbancias fueron medidas, al menos, por triplicado ($n=3$).

3.2.4 Ensayos mecánicos.

3.2.4.1 Relajación

Los ensayos fueron llevados a cabo utilizando una prensa Instron modelo 3345 (Instron Corp, Norwood, Ma, USA) provista de una celda de carga de 100 N. Se utilizó una punta plana de 30 mm de diámetro. Para cada ensayo se utilizaron diez especímenes de 15 mm de diámetro y 10 mm de altura (H_0).

Los cilindros de tejido fueron sometidos a una compresión hasta el 10 % de deformación a velocidad de cabezal constante (10 mm/min) para todos los tratamientos y sus controles, respectivamente. Se eligió la menor deformación posible que permitiese al equipo registrar respuesta sin ocasionar fractura macroscópica de los tejidos, tanto para el control como para los tejidos tratados. Al cabo de la compresión, el cabezal fue detenido y se registró la fuerza de relajación $[F(t)]$ durante un período de 10 minutos. La fuerza de relajación obtenida es normalizada dividiendo $F(t)$ por la fuerza inicial de relajación (F_0) del espécimen. Los valores de la curva normalizada ($F(t)/F_0$) se ajustaron según el modelo de Maxwell generalizado (Peleg y Calzada, 1976; Nussinovitch y col., 1989):

$$\frac{F_{(t)}}{F_0} = \frac{F_{\infty}}{F_0} + \sum_{i=1}^n \frac{F_i}{F_0} \exp\left(-t/\tau_i\right) \quad 3.6$$

donde $(F_{(t)}/F_0)$ fuerza relativa del especimen en el tiempo (t) de relajación; (F_{∞}/F_0) la fuerza relativa a tiempo infinito, representando el *resorte libre* correspondiente al del modelo mecánico de Maxwell generalizado; (F_i/F_0) fuerza relativa correspondiente al i -ésimo cuerpo de Maxwell; (τ_i) tiempo de relajación correspondiente al i -ésimo cuerpo de Maxwell.

3.2.5 Características estructurales

3.2.5.1 Microscopía óptica

De cada tejido (tratado y control) se extrajo una muestra de $\approx 4 \text{ mm}^3$. El corte tisular fue sumergido en glutaraldehído (2,5 % p/p) en solución de buffer fosfato (0,2 mM; pH=7,2); luego fueron enjuagados tres veces con agua destilada y fijados posteriormente con tetróxido de osmio (OsO_4) 1,5 % (p/p). Para poder alcanzar el contraste deseado se utilizó una solución acuosa de acetato de uranilo 5 % (p/p). Previo a la incorporación en la resina, Durcupan epoxi, una deshidratación fue llevada a cabo utilizando una serie gradual de buffer acetona. Para la microscopía óptica (MO), secciones de 0,5 μm de espesor del tejido embebido fueron teñidos con azul de metileno. Las observaciones se realizaron con un microscopio óptico (Axioplan, Japon).

3.2.5.2 Microscopía electrónica de transmisión

Sobre las muestras de interés, se continuó el corte y la tinción para su observación al microscopio electrónico de transmisión (MET). Se tomó una sección ultradelgada de 70-90 nm, que fue teñida con acetato de uranilo (5 % p/p) y posteriormente examinada en un microscopio electrónico de transmisión EM 10C Zeiss (Karl Zeiss, Berlin, Alemania).

3.2.6 Residuo Insoluble en Alcohol (RIA)

3.2.6.1 Obtención del RIA

Se partió de una masa de ≈ 350 g de tejido de cada sistema (especímenes control y tratados), las mismas fueron trituradas utilizando un equipo Sorvall Omni Mixer (USA) durante 2 minutos a 16.000 rpm. El RIA de cada muestra, se obtuvo luego de tratar el tejido triturado con una solución de etanol 95 % (v/v), relación 1:4 (p:v), el homogenato fue llevado a ebullición y se mantuvo en estado de ebullición y agitación constante durante 10 minutos. El residuo obtenido fue filtrado y sometido a una segunda extracción con etanol 65 % (v/v) relación 1:4 (p:v), el homogenato fue llevado a ebullición y se mantuvo en estado de ebullición y agitación constante durante 10 minutos. El residuo sólido finalmente obtenido, fue filtrado utilizando un filtro de fibra de vidrio y lavado con alcohol 65 % (v/v). El residuo sólido se dejó 24 horas bajo campana a temperatura ambiente, para permitir la evaporación del etanol remanente, luego fue congelado con N₂ líquido y liofilizado (Equipo de liofilización; StokesCompany, Philadelphia, MA, USA). La masa de RIA seca obtenida, fue pesada, molida y envasadas en envases plásticos con cierre hermético y almacenados a -18 °C hasta el momento de su uso.

Los residuos insolubles en alcohol, obtenidos a partir de cada sistema (tejido control y tratados) fueron utilizados para llevar a cabo determinaciones gravimétricas y análisis químicos de interés.

3.2.6.2 Determinación de lignina, celulosa y carbohidratos no celulósicos

Los RIA obtenidos a partir del tejido de cada sistema, fueron utilizados para la cuantificación gravimétrica del contenido de lignina, celulosa e hidratos de carbono no celulósicos mediante la hidrólisis de polisacáridos de acuerdo a Ng y col. (1998 b). Todas las hidrólisis fueron realizadas al menos por duplicado.

3.2.6.2.1 Lignina

Una cantidad de $\approx 0,3000$ g de RIA, de cada sistema, fue dispersada en 2080 μ l de ácido sulfúrico (72 % p/p) y se mantuvo a temperatura ambiente durante 3 horas. Luego las muestras fueron llevadas a volumen (25 ml) con agua deionizada (Milli-QTM) para alcanzar una concentración final de ácido sulfúrico 1 M. Las suspensiones se hidrolizaron mediante calentamiento en un baño de agua a 100 °C durante 2,5 horas, homogeneizando periódicamente y agregando agua (a 100 °C) para mantener el volumen total constante. Finalmente, las dispersiones fueron enfriadas, centrifugadas y los sobrenadante fueron separados y neutralizados con NaOH para la posterior cuantificación del contenido de hidratos de carbono totales mediante el método de fenol-sulfúrico (Dubois y col., 1956) utilizando una curva de calibración con estándar D-glucosa. Los residuos sólidos fueron lavados al menos tres veces con agua deionizada (Milli-QTM) congelado y liofilizado. El residuo sólido liofilizado obtenido, fue pesado e informado como lignina de Klason.

3.2.6.2.2 Celulosa

Una masa de $\approx 0,3000$ g de RIA de cada sistema fue dispersada en 2080 μ l de ácido sulfúrico (72 % p/p) e inmediatamente todas las muestras fueron llevadas a volumen (25 ml) mediante el agregado de agua deionizada (Milli-QTM), para alcanzar una concentración final 1 M. La hidrólisis se llevó a cabo mediante calentamiento en un baño de agua a 100 °C durante 2,5 horas, homogeneizando periódicamente y agregando agua (a 100 °C) para mantener el volumen total constante. Las dispersiones fueron finalmente enfriadas y centrifugadas. Los sobrenadantes separados, fueron neutralizados con NaOH para la posterior cuantificación del contenido de hidratos de carbonos mediante el método de fenol-sulfúrico (Dubois y col, 1956), utilizando una curva de calibración con estándar D-glucosa. Los residuos fueron lavados al menos tres veces con agua deionizada, congelados y liofilizados. Los residuos finalmente obtenidos fueron pesados.

3.2.6.2.3 Carbohidratos no celulósicos

Una masa de $\approx 0,3000$ g de RIA de cada sistema fue dispersada en 2080 μ l de ácido sulfúrico (72 % p/p) e inmediatamente todas las muestras fueron llevadas a volumen (25 ml) mediante el agregado de agua deionizada (Milli-QTM), para alcanzar una concentración final 1 M. La hidrólisis se llevo a cabo mediante calentamiento en un baño de agua a 100 °C, durante 1 hora homogeneizando periódicamente y agregando agua (a 100 °C) para mantener el volumen total

constante. Las dispersiones fueron finalmente enfriadas y centrifugadas. Los sobrenadantes separados, fueron neutralizados con NaOH para la posterior cuantificación del contenido de hidratos de carbono mediante el método de fenol-sulfúrico (Dubois y col., 1956), el contenido de ácido urónico según el método de Filisetti-Cozzi y Carpita (1991) y el contenido de proteínas de acuerdo a Lowry y col. (1951).

3.2.6.3 Otras determinaciones químicas

3.2.6.3.1 Determinación de carbohidratos totales

Los sobrenadantes neutralizados, obtenidos de las distintas hidrólisis ácidas, fueron utilizados para cuantificar el contenido de hidratos de carbonos según Dubois y col. (1956), utilizando una curva de calibración con D-glucosa como estándar.

Para la reacción colorimétrica y posterior medición espectrofotométrica se tomó un volumen de muestra adecuado y se llevó a volumen final (2000 μl) con H_2O deionizada (Milli-QTM). Se agregaron 50 μl de la solución de fenol (Merck, Buenos Aires, Argentina) (80 % p/p), se homogeneizó y luego se agregaron 5000 μl de H_2SO_4 (c); la solución se dejó enfriar y se homogeizó nuevamente. Finalmente se leyó la absorbancia a 490 nm. La cantidad de color desarrollada es proporcional al contenido de azúcares presentes. Para la cuantificación se realizó una curva de calibración con D-Glucosa como estándar.

Se utilizó para la curva una solución estándar de D-glucosa (0,05 g de glucosa /L). La curva de calibración se observa a continuación:

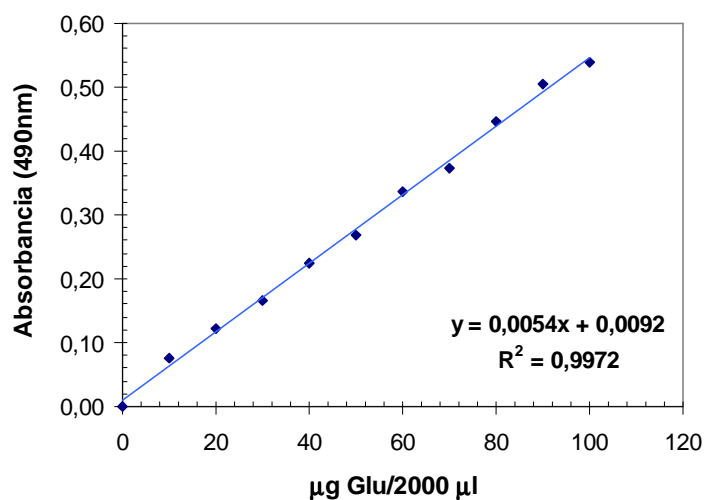


Figura 3.3 Curva de calibración para carbohidratos totales

3.2.6.3.2 Determinación de ácidos urónicos

En el sobrenadante neutralizado, correspondiente a la hidrólisis ácida para hidratos de carbono no celulósicos (3.2.6.2.3), el contenido de ácido urónicos (AU) fue determinado según el método de Filisetti-Cozzi y Carpita (1991) utilizando una curva de calibración de ácido D-galacturónico como estándar.

Para la reacción colorimétrica y posterior medición espectrofotométrica se tomó una alícuota adecuada de la muestra y se llevó a volumen final (400 µl) con agua deionizada (Milli-QTM); se agregaron 40 µl de ácido sulfámico (4 M;

pH=1,6). Luego se añadieron 2400 μ l de la solución de tetraborato de sodio (0,075 M en solución en ácido sulfúrico concentrado) y se colocaron las muestras tapadas en un baño de agua a 100 °C durante 20 minutos. La reacción se cortó rápidamente colocando las muestras en un baño de agua con hielo. Se añadieron 80 μ l de m-hidroxidifenilo 0,15 % (p/v) (solución en NaOH 0,5 % (p/v)). A partir de los 10 minutos el color se desarrolló completamente. La absorbancia fue leída a 525 nm.

La curva de calibración se llevó a cabo con una solución estándar de ácido D-galacturónico (AGU) al 0,1 % (p/v).

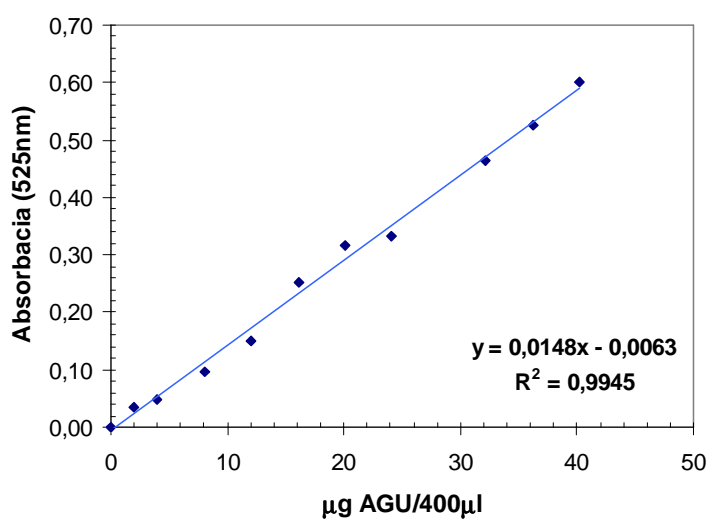


Figura 3.4 Curva de calibración para la determinación del contenido de ácidos urónicos

3.2.6.3.3 Determinación de proteínas

El contenido de proteínas fue determinado en los sobrenadantes neutralizados correspondientes a las hidrólisis ácidas (3.2.2.1.3) de cada sistema, según Lowry y col. (1951) utilizando como estándar albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma, St Louis, MO, USA).

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

Reactivos **A**: Carbonato de sodio 2% (p/v) en solución de NaOH 0,1N; sulfato de cobre pentahidratado 1% (p/v) y tartrato de sodio y potasio 1% (p/v). Relación de mezcla de 100:1:1. Reactivo **B**: Solución Folin Ciocalteau: agua deionizada Milli-Q™. Relación de mezcla (1:1). Los reactivos utilizados fueron provistos por Merck (Argentina) salvo la solución de Folin Ciocalteau que fue provista por Anedra (Argentina).

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

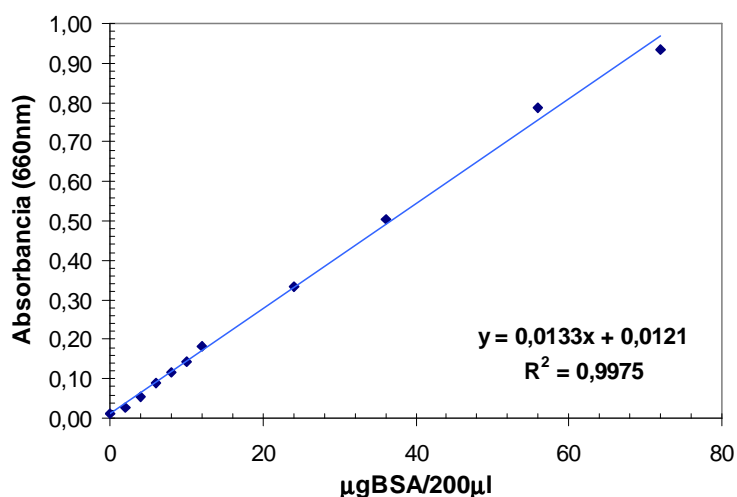


Figura 3.5 Curva de calibración para la determinación del contenido de proteínas

3.2.6.3.4 Determinación de humedad

El contenido de humedad de los residuos (RIA) fue determinado sobre una masa ≈1,000 g de RIA y el contenido de agua se fue evaluado utilizando una estufa con calentamiento infrarrojo (OHAUS, Pine Brook, NJ, USA), trabajando a temperatura de secado constante de 90 °C. Las muestras fueron tratadas hasta alcanzar un peso constante. El contenido de humedad se calculó como:

$$(m_i - m_f) = m_{H_2O} \quad \mathbf{3.7}$$

$$\mathbf{m.o.} = (m_{H_2O} / m_i) * 100 \quad \mathbf{3.8}$$

donde m_i corresponde a la masa de RIA inicial, m_f masa de RIA al cabo del secado, m_{H_2O} masa de agua eliminada y **m.o.** contenido de humedad porcentual en RIA.

Las determinaciones de humedad fueron realizadas al menos por triplicado ($n=3$).

3.2.6.3.5 Determinación del grado de metilación

El grado de metilación se evaluó a partir del método espectrofotométrico de metanol de acuerdo a Wood y Siddiqui (1971), previa saponificación de los ésteres correspondientes según Fissore y col. (2007). El grado de metilación (GM) se calculó como la relación porcentual entre el número de moles de metanol y el número de moles de ácido urónico (AU) por gramo del RIA. Una saponificación inicial de cada muestra fue llevada a cabo previa reacción colorimétrica y posterior medición espectrofotométrica.

Para la etapa inicial, saponificación de las muestras, se colocó una masa ($\approx 0,075$ g) de RIA en contacto con 50 ml de NaOH (0,5 N), en tubo falcon tapado y se homogeneizó cada 10 minutos durante el período de 1 hora a temperatura ambiente. Simultáneamente se preparó un blanco de muestra ($\approx 0,075$ g) con 50 ml de agua deionizada MilliQ™. Luego los sobrenadantes fueron separados por centrifugación. Se tomó una alícuota de 750 μ l del tubo testigo y se agregaron 250 μ l de H₂SO₄ (5,5 N); del blanco de muestra se tomó una alícuota de 500 μ l y se le

agregaron 250 μl de H_2SO_4 (5,5 N) y 250 μl de NaOH (1,5 N). Las muestras saponificadas y los blancos de muestra (muestras sin saponificar) pasaron luego a la etapa de la reacción colorimétrica.

Para la reacción colorimétrica y medición espectrofotométrica se agregó a cada muestra, 200 μl de KMnO_4 2% (p/v) y se dejó enfriar las muestras durante 15 minutos en un baño de agua con hielo. Luego, se agregaron 200 μl de $\text{AsO}_3\text{H}_2\text{Na}$ 0,5 M (solución en H_2SO_4 0,12 N) y 600 μl de agua deionizada (MilliQTM); se agitó vigorosamente y se dejó reaccionar durante el período de una hora a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de reacción se agregaron 2000 μl de una solución de 2,4-pentadiona 0,02 M (disuelta en solución buffer acetato de amonio 2 M/ácido acético 0,05 M). Finalmente se colocaron las muestras en un baño de agua a 60 °C durante 15 minutos; finalizado el tiempo de reacción, se retiraron las muestras y se colocaron en baño de agua fría con hielo para cortar la reacción. Una vez alcanzada la temperatura ambiente en las muestras, se lee la absorbancia a 412 nm.

Para la determinación de concentración de metanol, se utilizó una curva de calibración de una solución estándar de metanol (86,9 μg CH_3OH / ml H_2SO_4 1N).

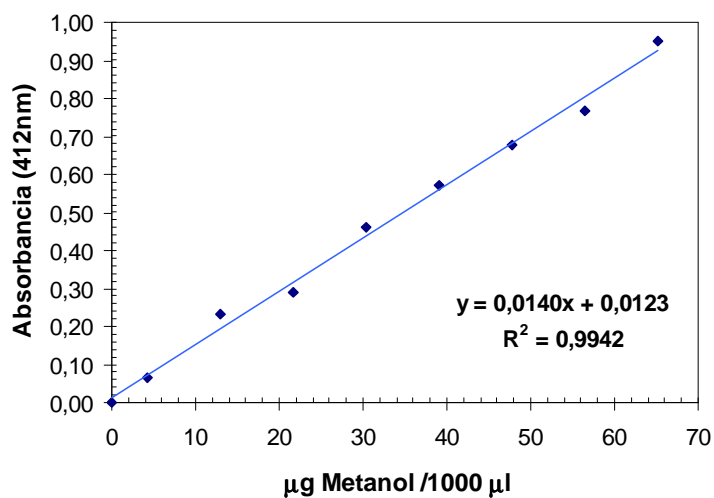


Figura 3.6 Curva de calibración para la determinación del contenido de metanol

3.2.6.3.6 Determinación del grado de acetilación

Los grupos acetilos fueron determinados en los RIA de los diferentes sistemas según el método de Naumenko y Phillipov (1992). El grado de acetilación (GA) se calculó como la relación porcentual del número de moles de acetato y número de moles de ácido urónico (AU) por gramo de RIA. Para la curva de calibración se usó como estándar pentaacetato de glucosa.

Para la reacción colorimétrica y posterior medición espectrofotométrica, se tomó una masa de RIA ($\approx 0,060-0,070$ g) y se agregaron 5000 µl de una mezcla de clorhidrato de hidroxilamina (0,125 M) y NaOH (0,25 M) en relación (1:1). La suspensión se agitó durante 1 hora. De la solución obtenida se tomaron 1000 µl, se agregaron 1000 µl de HNO₃ 0,125M y 3000 µl de una solución de Fe(NO₃)₃ 0,01 M; se agitó y se dejó en reposo 10 minutos a temperatura ambiente para asegurar

el desarrollo completo de la reacción. Se leyó la absorbancia de la solución coloreada obtenida a 495 nm. Se utilizó como blanco de reacción un volumen de 1000 µl de una mezcla de clorhidrato de hidroxilamina (0,125 M) y NaOH (0,25 M) (relación 1:1), 1000 µl de HNO₃ (0,125 M) y 3000 µl de Fe(NO₃) (0,01 M).

Para la curva de calibración se usó como estándar pentaacetato de glucosa (0,9 mg/ml) (SIGMA, USA).

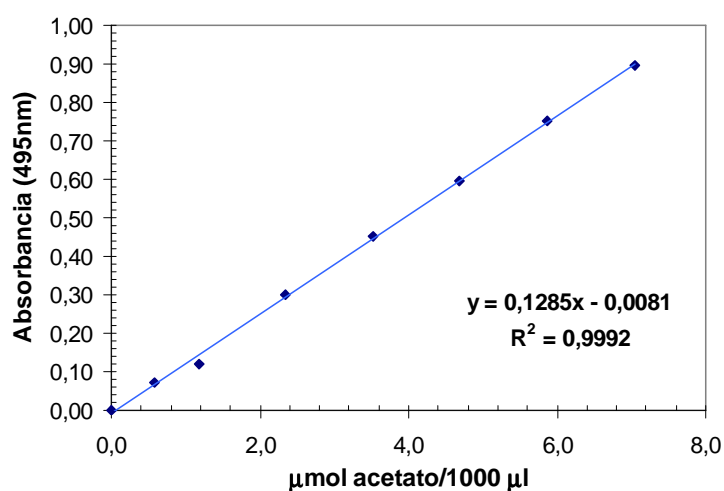


Figura 3.7 Curva de calibración para la determinación del contenido de acetilos

3.2.6.3.7 Determinación de fenoles de pared celular

El contenido de fenoles totales (ferúlicos y no ferúlicos) fue determinado en los residuos RIA de los diferentes sistemas según Bunzel y col. (2000). Una cantidad de ≈0,9000 g de RIA se mezcló con 50 ml de NaOH 1 M y la solución se mantuvo durante 18-20 horas a temperatura ambiente, bajo vacío y al abrigo de la

luz. Finalizada la hidrólisis alcalina, se agregó a cada muestra 9,5 ml de HCl (pH < 2). Los sobrenadantes fueron separados por centrifugación.

El contenido de fenoles no ferúlicos fue determinado en los residuos RIA de los diferentes sistemas de acuerdo con Budini y col. (1980) y Parr y col. (1997). Una cantidad de $\approx 0,9000$ g de RIA se mezcló con 50 ml de HCl (2 N) y colocó en baño de agua caliente (90 °C) durante 30 minutos (las muestras permanecen tapadas, durante la hidrólisis ácida). Finalizada la hidrólisis ácida y una vez enfriadas las muestras, los sobrenadante fueron separados por centrifugación.

Todas las hidrólisis fueron realizadas al menos por duplicado ($n=2$).

El contenido de fenoles ferúlicos, fue calculado a partir de la diferencia matemática del contenido de fenoles en las fracciones correspondientes a la hidrólisis alcalina (fenoles totales) e hidrólisis ácida (no ferúlicos).

Los sobrenadantes obtenidos de las hidrólisis alcalina y ácida (previamente descriptas) fueron utilizados para evaluar el contenido de fenoles totales y no-ferúlicos, respectivamente según Shui y Leong (2006) utilizando la técnica de Folin-Ciocalteu. El contenido de fenoles fue informado como ácido gálico equivalente (AGE).

Para la reacción colorimétrica y posterior medición espectrofotométrica, se tomaron 40 µl de las muestras hidrolizadas y se agregaron 1800 µl de una mezcla de reactivo Folin Ciocalteu y agua deionizada Milli-Q™ (relación 1:10). Se agitó y se dejó reaccionar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregaron 1200 µl de una solución de NaHCO₃ 7,5 % (p/v) y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. Finalizada la reacción y completado el desarrollo del color, se evaluó la absorbancia a 765 nm.

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

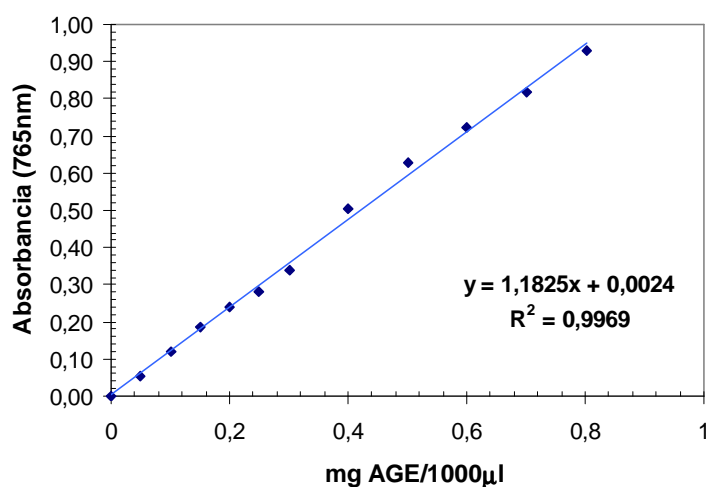


Figura 3.8 Curva de calibración para la determinación del contenido de fenoles como ácido gálico equivalente (AGE)

3.2.6.3.8 Caracterización por extracción secuencial de polímeros de pared celular

Las extracciones secuenciales de polímeros de pared celular se realizaron de acuerdo a Brett y Waldron (1996) y Ng y Waldron (1997). Una masa $\approx 0,5000$ g de RIA fue utilizada para la primera extracción con 50 ml de agua deionizada (MilliQTM) agitando la suspensión durante 2 horas a 18 °C. El residuo insoluble en agua fue posteriormente utilizado para una extracción con NaCl (0,136 M, pH=6,5) durante 2 horas con agitación constante a 18-20 °C. El residuo remanente, insoluble en NaCl, fue resuspendido en una solución de CDTA (0,050 M, pH=6,8-6,5) y la suspensión se mantuvo con agitación constante durante 6 horas a 18 °C. El residuo sólido obtenido fue sometido a una primera extracción con Na₂CO₃ (0,050 M) durante 16 horas a 4 °C y una segunda extracción con Na₂CO₃ (0,050 M) durante 2 horas a 20 °C según Marry y col. (2006). El remanente sólido se sometió posteriormente a tres extracciones en soluciones alcalinas. La primera extracción alcalina fue realizada con NaOH (0,1 N) durante 2 horas a 18 °C (Fry, 1986), el remanente sólido fue luego extraído con KOH (1 M) durante 2 horas a 18 °C y, finalmente, el residuo insoluble fue sometido a una última extracción con KOH (4 M) durante 2 horas a 18 °C de acuerdo a Coimbra y col. (1996). Todas las extracciones básicas se realizaron bajo vacío y al abrigo de la luz.

Al cabo de cada extracción, los residuos fueron filtrados utilizando filtro de fibra de vidrio, lavados con agua deionizada (MilliQ™), liofilizados y finalmente, los residuos secos fueron pesados. En cada extracción se mantuvo la relación residuo:solvente 1:100 (p:v). Los resultados fueron expresados como la relación porcentual de la masa de RIA solubilizada en el *i*-ésimo solvente de extracción respecto a la masa de RIA inicial.

$$\% \text{ soluble}_{(fracción_{n_i})} = \frac{m_{\text{residuo}(n_i-1)} - m_{\text{residuo}(n_i)}}{m_{\text{RIA}(0)}} \times 100 \quad \mathbf{3.9}$$

donde $m_{\text{RIA}(0)}$ corresponde a la masa de RIA inicialmente pesada; $m_{\text{residuo}(n_i)}$ corresponde al residuo insoluble en el *i*-ésimo solvente de extracción; $m_{\text{residuo}(n_i-1)}$ es la masa del residuo insoluble en el solvente de extracción anterior (*i*-1).

Todas las extracciones fueron realizadas por duplicado ($n=2$).

Los sobrenadantes obtenidos de la extracción con agua y con NaCl fueron utilizados para cuantificar hidratos de carbono totales según Dubois y col. (1956), contenido de ácido urónico según Filisetti-Cozzi y Carpita (1991) y contenido de proteínas según Lowry y col. (1951).

3.2.6.3.9 Análisis por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros de transmisión fueron determinados sobre cada uno de los residuos de RIA correspondientes a los diferentes sistemas. Las muestras se prepararon formando una pastilla de KBr (1% p/p), el rango espectral de barrido correspondió a las longitudes de onda 4000-500 cm^{-1} . Los espectros fueron obtenidos utilizando un espectrofotómetro PerkinElmer FT-IR System (SpectrumBx; USA). El utilitario de análisis utilizado por el equipo fue el IR-Spectroscopy (version 5.3.1, USA). Se realizaron las lecturas de transmitancia (%) de 32 escaneos de cada una de las muestras y con una resolución de 4 cm^{-1} .

3.3 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos y la comparación de resultados se realizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) con nivel de significancia (α) de 0,05. Para la comparación de muestras se utilizó como test *a posteriori* el test de Tukey y se utilizó el utilitario Statgraphic (Statgraphic Plus for Windows, versión 5.0, 2001, Manugistic Inc., Rockville, MD, USA). Los ajustes lineales y no lineales se realizaron utilizando el programa Prism5 (Statistical Software para Windows; GraphPad, USA).

**4. TRATAMIENTO DEL TEJIDO
DE RAÍZ DE REMOLACHA ROJA
(*Beta vulgaris* L. var. *conditiva*) CON
DOSIS BAJAS DE RADIACIÓN
GAMMA**

4.1. Introducción

El aumento de la demanda de los consumidores por productos frutihortícolas con mínimo procesamiento ha dado lugar a la venta de vegetales pre-cortados en bandejas que se comercializan a nivel minorista o se proveen a granel a instituciones. Aquino-Bolaños y Mercado-Silva (2004) han reportado que los productos frutihortícolas son susceptibles a cambios y modificaciones no deseadas debido a daños mecánicos producidos durante la cosecha, el transporte, el almacenamiento o durante el procesamiento. Además, los vegetales con mínimo procesamiento pueden tener altos niveles de desarrollo microbiano y/o presencia de sustancias indeseadas. Los procesamientos comerciales para su preparación, usualmente utilizan cloro en el agua de lavado para controlar el recuento microbiológico. Sin embargo, el cloro no puede ser la única estrategia si se necesita eliminar microorganismos patógenos tales como *Listeria monocytogenes*. (Nguyen-The y Carlin, 1994). En nuestro país el CAA establece que para las operaciones de lavado e hidrogenfriado de productos vegetales se permite utilizar concentraciones de entre 100-200 ppm de hipoclorito de sodio.

La aplicación y uso de tratamientos no térmicos (luz UV, alta presiones, radiaciones ionizantes) con mínimos efectos en la calidad del producto es una de las alternativas viables para la desinfección de vegetales de hoja de acuerdo a Gomes y col. (2008). Según el nivel o dosis aplicada de estos tratamientos se

puede alcanzar una disminución de la carga microbiana inicial y/o la letalidad de microorganismos patógenos sin dañar al tejido (Thayer y Rajkowski, 1999).

Las radiaciones ionizantes empleadas en alimentos han sido y son de gran interés debido a que su aplicación, no produce aumento de temperatura en el alimento. Es un tratamiento *no térmico* y *no químico*, cuya seguridad y eficacia ha sido bien establecida (ICGFI, 1999). Actualmente 56 países autorizan la irradiación de diversos alimentos. Su eficacia se basa en que la actividad no está limitada a la superficie ni a las características de ésta. Las radiaciones ionizantes pueden penetrar en el producto y eliminar microorganismos que están presentes en el interior, en grietas, pliegues, hendiduras, espacios intercelulares de las semillas y otras partes de los vegetales donde se podrían localizar microorganismos patógenos. (Prakash y col., 2000; Waje y col., 2009). La reducción de la carga microbiana presente en los alimentos y causante de deterioros, permite aumentar la vida útil de estos.

Por otro lado, efectos adversos o indeseados pueden producirse debido a la aplicación de radiaciones ionizantes en los alimentos. La irradiación que determina la absorción de dosis elevadas pueden producir en el alimento modificaciones del sabor, color y textura que pueden tornar al alimento inaceptable para el consumo (Narvaiz, 2000). Todos ellos corresponden a deterioros de las características sensoriales. El uso de una dosis adecuada permitirá en gran medida, conservar las propiedades deseadas de los productos.

En general puede decirse que el efecto de la radiación ionizante en el alimento en sí tolera hasta dosis absorbidas de 7,5 kGy.

El uso de bajas dosis de radiaciones ionizantes, se encuentra ampliamente reportado y ha sido exitosamente aplicado para prolongar la vida útil de los alimentos de origen vegetal (Noomhorm y col., 1998; Niemera y col., 2002; Wang y Chau, 2003; Wang y col., 2006). La irradiación puede producir en el tejido alteraciones a nivel de las rutas metabólicas, permitiendo inhibir la brotación, retardar la maduración y disminuir la velocidad de respiración. Un estudio llevado a cabo con champiñones comestibles maduros, determinó que la absorción de bajas dosis de radiación gamma es una herramienta útil para prolongar la vida útil de este producto. La irradiación produjo una reducción en la respiración de los champiñones, lo que llevó a una disminución del pardeamiento, característico asociado a la maduración excesiva de este alimento (Benoît y col., 2000).

Por otro lado la aplicación de radiaciones ionizantes como un agente de barrera, en métodos combinados, también ha sido estudiado y reportado para productos vegetales (Moussaid y col., 2000; Fan y col., 2005). En 1978, Langerak y Damen demostraron la posibilidad de extender la vida útil de sopas de vegetales previamente empaquetadas, mediante un tratamiento con una dosis baja de irradiación (< 1 kGy) y un almacenamiento a 10 °C. Por otro lado Prakash y col. (2000) observaron que la lechuga romana cortada, envasada en atmósferas modificadas y tratada con radiación gamma, con dosis absorbidas de 0,15 y 0,35

kGy, mostraba que la dosis superior permitía reducir la carga de bacterias aerobias, hongos y levaduras, manteniendo los atributos del color pero con cierto ablandamiento del tejido. Dosis bajas de radiación gamma utilizadas como tratamiento post-cosecha, o pre-proceso y en combinación con otros tratamientos han demostrado ser una técnica prometedora para la extender la vida útil de frutas. Los valores de D (cantidad de energía radiante requerida para inactivar el 90% de patógenos específicos) para *Escherichia coli* O157:H7 en vegetales recién cortados toman valores, en general, entre 0,12 y 0,20 kGy (Niemira y col., 2002; Foley y col., 2004; Niemira y Fan, 2006). Entonces, la absorción de una dosis de 1 kGy puede alcanzar por lo menos, 5 reducciones decimales de *Escherichia coli* O157:H7 en la superficie de productos frescos inoculados, aunque los agentes patógenos en el interior del producto, podrían ser capaces de sobrevivir mejor a la irradiación que aquellos que se encuentran sobre la superficie (Niemira, 2007). El costo de la irradiación de alimentos depende del alimento, dosis, efectos deseados, densidad de empaquetamiento, volumen de producción, empaquetamiento, requerimientos logísticos y condiciones del país (Kunstadt, 2001). De acuerdo al IGCFI (1999), los costos de la irradiación van de 10 U\$ a los 15 U\$ por tonelada para bajas dosis.

En el 2007 la Food and Drug Administration (FDA) presentó una propuesta de cambio en el rotulado de alimentos. Allí expresó interés en disponer de información acerca de si el control de los patógenos presentes en alimentos usando irradiación, cambia las características del alimento de una manera que

exceda la normal variabilidad del mismo; en dicho caso se requeriría un etiquetado adicional para informar al consumidor de dicho cambio (Fan y Sokorai, 2008). Esto resalta la importancia del estudio del efecto de las radiaciones ionizantes en los alimentos. Los cambios en la apariencia y la textura son aspectos fundamentales que determinan la aceptabilidad del consumidor de los tejidos vegetales (Ilker y Szcsesniak, 1990; Toivonen y Brummell, 2008). Prakash y col. (2000) destacan que cambios en la textura inducidos por la irradiación están asociados con cambios en las sustancias pécticas y otros componentes de la pared celular. Más aún, los daños en la membrana y pared celular conducen a la pérdida de turgor (Faust y col., 1967) afectando la firmeza de los tejidos vegetales. Según Lacroix y Ouattara (2000) la mayoría de los tejidos vegetales toleran tratamientos de irradiación a dosis bajas de 0,25 kGy-2,25 kGy sin sufrir cambios en su calidad. Debido a ellos es común la aplicación de técnicas combinadas para alcanzar un alimento seguro y mantener un nivel óptimo de las cualidades organolépticas (Thakur y Sing, 1995). De acuerdo con Farkas (2006) el tratamiento con radiaciones ionizantes resulta en una reducción de las pérdidas por almacenamiento, extensión de la vida útil e incremento de seguridad microbiológica y parasitológica. Thayer (1990) afirmó que los cambios químicos en los alimentos inducidos por la irradiación son mínimos.

La aplicación de radiaciones ionizantes en los alimentos, ha sido estudiada también para alcanzar otros fines u objetivos más allá de su uso como método de preservación. Por ejemplo Lee y col. (2001) encontraron la posibilidad de

disminuir el contenido de proteínas generadoras de alergias (proteínas alergénicas) en leche mediante la aplicación de radiación ionizante, mientras que Ahn y col. (2003) observaron mejoras en la actividad antioxidante del ácido fítico en solución acuosa sometida a irradiación. Jo y col. (2003) informaron cambios en el color de extractos alcohólicos de té verde con un viraje del marrón oscuro brillante al amarillo brillante luego de la irradiación, permitiendo utilizar dichos extractos en alimentos y en formulaciones cosméticas sin alterar el color del material y manteniendo la capacidad antioxidante del extracto de té. Por otro lado, Mukandama y col. (2003) observaron que la aplicación de rayos gamma con ^{60}Co en semillas de tomate, generó variabilidad genética en la actividad biológica expresada en el contenido de proteínas totales, actividades enzimáticas específicas y generales de las enzimas, β -glucanasa, quitinasa, peroxidasa y fenilalanina amonio-liasa. Siendo la peroxidada la enzima más radiosensible al efecto de los rayos gamma.

Los tejidos vegetales presentan distintas actividades enzimáticas vinculadas a su desarrollo y metabolismo. La tirosinasa o polifenol oxidasa (PPO, **EC 1.14.18.1**) es la enzima clave en la biosíntesis de la melanina y el pardeo enzimático de frutas y vegetales. El papel de la PPO en el metabolismo secundario de las plantas aún no está claro, pero ha sido sugerido que está involucrada en la biosíntesis de betalaínas, pigmentos característicos de las remolachas. PPO es una enzima dependiente de cobre que cataliza dos reacciones diferentes utilizando una molécula de oxígeno: la hidroxilación de monofenol a o-difenol (actividad de

monofenoloxidasas) y la oxidación de o-difenol a o-quinona (actividad difenolasa) (Sanchez-Ferrer y col., 1995). Dicha enzima tirosinasa se encuentra distribuida en plantas, microorganismos y animales y es la responsable de la melanización.

La enzima peroxidasa (POX; EC 1.11.1.7) involucra un grupo de enzimas que catalizan reacciones de carácter redox, utilizando peróxido como oxidante y un segundo sustrato de características reductoras que es oxidado por el peróxido. Esta enzima utiliza como cofactor el grupo hemo. Su actividad se ha visto involucrada en la captación de radicales libres dentro de los sistemas vegetales vivos (Regalado y col., 2004) y también es partícipe en diversos procesos metabólicos. El incremento del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), tal como ocurre luego de la irradiación gamma puede ser controlado en las plantas por la acción de la enzima POX a través de sus ciclos hidroxílicos y peroxidativos. Los tejidos vegetales contienen dos clases de POX: Clase I, intracelular y Clase III, secretada en la pared celular y/o en el medio circundante, estando presente sólo en los tejidos vegetales terrestres debido al fenómeno de adaptación a la vida terrestre en presencia de elevadas concentraciones de oxígeno. El intercambio de electrones y protones se produce a través del grupo Fe (III)-protoporfirina IX (*hemo*) de la enzima POX Clase III. En el ciclo peroxidativo, la enzima cataliza la reducción del H_2O_2 tomando electrones de moléculas donantes tales como los compuestos fenólicos, precursores de lignina, auxina o metabolitos secundarios. Se considera que la enzima POX juega un papel importante en procesos tales como la lignificación (Egley y col., 1983.) así como en la insolubilización de los

complejos pectina-extensina (HRGPs) (Jackson y col., 1999; Passardi y col., 2004 b). La diversidad de sustratos utilizados por la POX explica por qué esta enzima está involucrada en un amplio rango de procesos fisiológicos entre los que podemos citar el catabolismo de auxina, la formación de lignina y suberina (Oudgenoeg y col., 2002), el entrecruzamiento (*cross linking*) de los componentes de la pared celular, la defensa contra el ataque de patógenos y la elongación celular. Por la generación de radicales hidroxilos ($\bullet\text{OH}$), la enzima POX podría también jugar un rol crucial de protección de la semilla durante los primeros días de germinación por reducción del ataque de patógenos en el momento que emerge la radícula (germinación), evento que produce una *herida* en la semilla. La producción de $\bullet\text{OH}$ podría además contribuir a la rotura de la cubierta de la semilla y al posterior proceso de alargamiento celular mediante la hidrólisis de polisacáridos en sitios específicos de la red que conforma la pared celular (Fry, 1998; Passardi y col., 2004 a,b).

La enzima fenilalanina amonio-liasa (PAL; **EC 4.3.1.24**) presenta su actividad involucrada en la biosíntesis de los compuestos fenólicos. Por otra parte, los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios implicados, como sustratos de POX, en el mecanismo de defensa de los tejidos vegetales frente a daños externos producidos en estos. La producción total de fenoles mediada por fenilalanina amonio-liasa es altamente sensible a condiciones ambientales; las más importantes son aquellas que se pueden considerar estresantes como temperatura, luz ultravioleta y daños físicos de la planta. Su actividad también

varía con el grado de maduración en el caso de frutos. Por ello, la concentración de compuestos será función de la actividad de dicha enzima (Gómez-Navarro, 2009). Harakava (2005) informó que la desaminación de la fenilalanina por la enzima fenilalanina amonio-liasa inicia el metabolismo de los fenilpropanoides dando lugar a la formación de ácido trans-cinámico y que dicho mecanismo conduce a la formación de monolignoles que constituyen los bloques de lignina.

Las actividades de estas enzimas pueden afectarse por los tratamientos a que se someten los tejidos con el objetivo de aumentar su vida útil. En este sentido, Cantos y col. (2001) evaluaron las actividades de las enzimas POX, PPO y PAL para determinar los daños ocasionados por frío, en seis cultivares de lechuga (*Lactuca sativa* L.) almacenados durante 7 días a 5 °C.

En el caso de la radiación gamma, se sabe que algunas enzimas presentes en los alimentos se inactivan frente a ciertas dosis absorbida, mientras que otras permanecen activas (IAEA, 1998). Tal como observaron Wang y col. (2006), las enzimas POX y PPO presentaron actividad en jugo de melón, incluso frente a una dosis absorbida de radiación gamma de 5 kGy.

El objetivo de esta etapa de la investigación fue determinar el efecto de dosis bajas de radiación gamma (1 y 2 kGy) en las características del tejido de raíces de *Beta vulgaris* L. var. conditiva para evaluar la posibilidad de considerar la irradiación como un factor de estrés (barrera) para la prolongación de la vida

segura de este tejido. Para ello, se evaluó la composición química, actividad enzimática, turgor, color, comportamiento mecánico del tejido, con el propósito de obtener información sobre las condiciones que conducen a la optimización del procesamiento de los vegetales tendiendo a contribuir al desarrollo de alimentos más saludables.

4.2 Materiales y métodos específicos

4.2.1 Tratamiento con radiación gamma

Los cilindros de raíz de remolacha roja, fueron separados en tres lotes de ≈ 500 g cada uno. Los cilindros correspondientes a cada lote se fraccionaron en bandejas de polipropileno y se colocaron en cajas de telgopor. Las cajas de telgopor de los tres lotes se almacenaron en una cámara de refrigeración a $7,0 \pm 0,5$ °C (90-95 % HR) durante 24 horas previo al tratamiento. Dos lotes fueron expuestos a radiaciones ionizantes gamma utilizando una fuente de ^{60}Co en la planta semi-industrial de la Comisión Nacional de Energía Atómica, (CNEA), Centro Atómico Ezeiza, Argentina (actividad 600.000 Curios) a 25 °C. Las dosis absorbidas fueron ≈ 1 y 2 kGy utilizando una velocidad de irradiación de 9,23 kGy/h y una uniformidad de dosis de 1,04 (**Tabla 4.1**). Un tercer lote de cilindros no irradiados fue llevado hasta la planta con el objetivo de que las muestras control tuvieran análogas condiciones de transporte y ambientales que las muestras tratadas.

En la **Figura 4.1** se muestra el lateral de las cajas de telgopor utilizadas, donde se encuentra indicando el frente de las mismas, dado que las cajas son rotadas, durante la irradiación para garantizar la homogeneidad de dosis. Así mismo se observan las bandejas de polipropileno a ser ubicadas en dichas cajas.



Figura 4.1 Características de los envases utilizados para la contención de las muestras del tejido de remolacha roja (*Beta vulgaris* L.var conditiva) para irradiación (A 1 kGy; B 2 kGy) y control (C 0 kGy).

Tabla 4.1 Ejemplo de informe de dosimetría provisto por el laboratorio de Dosimetría de Altas Dosis –Centro Atómico Ezeiza– CNEA.

PRODUCTO : Remolacha (2 cajas)	Vol= (51*27*31) cm ³	
TIPO DE DOSÍMETROS	Dicromato de Plata	
POSICIÓN DE IRRADIACIÓN	Mesa A ES	
TEMPERATURA DE IRRADIACIÓN	Ambiente (25°C)	
TIEMPO DE IRRADIACIÓN (horas)	0,11	0,22
DISTANCIA A LA FUENTE (cm)	63,5	63,5
VELOCIDAD DE DOSIS MÍNIMA (kGy/h)	9,23	9,23
DOSIS SOLICITADAS (kGy)	1,0	2,0
DOSIS RECIBIDA MINIMA (kGy)	1,04	2,15
DOSIS RECIBIDA MAXIMA (kGy)	1,08	2,23
UNIFORMIDAD DE DOSIS	1,04	1,04
OBSERVACIONES:	Con rotación	

Dado que existen diferencias entre las dosis absorbida mínima y máxima frente a la requerida en cada caso, de ahora en adelante las muestras se nombrarán como muestras con dosis absorbidas de 1 y 2 kGy.

4.2.2 Análisis físicos, químicos, bioquímicos y funcionales

El tejido de raíz de remolacha roja, correspondiente a las muestras control e irradiadas, fue utilizado para evaluar la actividad de las enzimas PPO, POX y PAL, el color, el contenido de pigmentos, la presión de turgor, la estructura del tejido y el comportamiento mecánico. Por otro lado una porción de tejido fue utilizada para la obtención del residuo insoluble en alcohol (RIA). En los residuos (RIA) de pared celular: **(i)** se determinó el contenido de lignina, celulosa, hidratos de carbono totales no celulósicos, ácidos urónicos, grado de metilación y grado de acetilación de pectinas, contenido de proteínas y humedad; **(ii)** se extrajo y cuantificó el contenido de fenoles; **(iii)** se evaluó el perfil de aminoácidos; **(iv)** se caracterizaron los polímeros de pared por extracciones secuenciales y **(v)** análisis por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) de los RIA. La mayor parte de los métodos utilizados para ello han sido descritos en la sección de métodos generales. A continuación se describirán aquellos que son específicos para el estudio planteado en este capítulo.

4.2.2.1 Determinación de fenilalanina amonio-liasa (PAL)

El procedimiento de obtención del extracto acetónico y dosaje de proteínas y actividad de POX y PPO, se han descripto en los métodos generales.

Una masa de $\approx 2,000$ g de cada polvo acetónico fue resuspendida en buffer borato 0,1 M (pH=8,8) utilizando una relación extracto:buffer de 1:20 (p:v). Los sistemas se mantuvieron con agitación constante durante 30 minutos a una temperatura de 5-7 °C; las suspensiones fueron luego centrifugadas (10.000 rpm, 10 min, 7 °C) en una centrífuga Eppendorf (Modelo 5804R, Eppendorf AG, Hamburg, Alemania). En cada sobrenadante se evaluó la actividad de PAL según Duan y col. (2007). El sobrenadante de cada muestra fue dividido en dos fracciones, en una se agregó el sustrato L-fenilalanina (0,02 M) y se colocó en un baño a 37 °C y la fracción restante fue colocada en el mismo baño sin sustrato (blanco de muestra). Alícuotas (1000 μ l) de cada muestra (mezcla de reacción y blanco de muestra) fueron extraídas al cabo de 60, 90, 120 y 180 minutos de reacción. Un volumen de sustrato sin muestra fue utilizado como blanco de reactivos. La actividad se evaluó como el cambio de absorbancia a 290 nm en un espectrofotómetro UV (UV-Mini 1240, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón) y la actividad es definida como el cambio de absorbancia (0,001) por hora y miligramo de proteína ($\text{AbU h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína).

4.2.2.2 Determinación del perfil de aminoácidos

El perfil de aminoácidos fue obtenido mediante una extracción con HCl 6 N (según el Método 994.12, AOAC, 2000). Para el análisis de hidroxiprolina, las muestras fueron derivatizadas utilizando 9-fluorenilmetil cloroformato y ácido 3-mercaptopropiónico (Henderson y col, 2000; Herbert y col, 2000). La separación y análisis fue realizada por cromatografía de alta presión en fase líquida, HPLC (Cromatógrafo Serie 1100. Agilent, California, USA) usando una columna de C18 (Hypersil BDS Gold. Agilent, California, USA) de 15x4,6 cm y partículas de 5 mm. El cromatógrafo estaba equipado con detector de fluorescencia. Como fase móvil se utilizó una mezcla 40 mM- Na_2HPO_4 , pH=7,8 (A) y metanol (B) utilizando un gradiente lineal y comenzando con 50:50 (v:v) y finalizando, al cabo de 10 minutos, con una mezcla 10:90 (v:v) de A y B.

4.2.2.3 Turgor

Seis cilindros fueron equilibrados en distintas soluciones de polietilenglicol 400 (PEG) tamponeadas con buffer fosfato (0,02 M KH_2PO_4 y 0,02 M K_2HPO_4). Las concentraciones de las soluciones de PEG barrieron el rango de 0,000 a 1,200 M. Un batch sin inmersión fue dejado como sistema testigo de cada tratamiento. Todas las experiencias fueron realizadas por duplicado. La relación de peso de cada solución de PEG y del peso del tejido

inmerso fue suficientemente alta (10:1 o más) como para mantener constante el valor inicial de actividad acuosa durante el experimento (Sajnin y col., 1999).

4.2.2.3.1 Medición del volumen del tejido

Los volúmenes (V_i) y pesos (m_i) iniciales se determinaron a partir de los cilindros de remolacha fresca (sin inmersión). El volumen del tejido (V_f) y el peso (m_f) de los cilindros fueron determinados al cabo de 36 horas de inmersión, una vez logrado el equilibrio en las soluciones de PEG, a 12 °C. Los volúmenes se midieron por desplazamiento de la parafina líquida en una probeta de vidrio calibrada (precisión de 0,1 ml) y el peso se evaluó en una balanza analítica. Con dichos datos se calculó el cambio relativo de volumen $[(V_f - V_i)/V_i]$ y la variación relativa de peso $[(m_f - m_i)/m_i]$.

4.2.2.3.2 Cálculo de la presión de turgor

La presión de turgor se calculó, para cada muestra, a partir de los cambios de volumen ocurridos al equilibrarse en las diferentes soluciones de PEG, según la descripción de Sajnin y col. (1999), buscando la mínima concentración de soluto donde ocurría la plasmólisis incipiente. El polímero utilizado (PEG) no es absorbido a través de la membrana celular debido a su tamaño, por lo tanto el

cambio de la presión de turgor se debe exclusivamente al flujo de agua. Debido a que el agua sí atraviesa la pared celular, se observa el fenómeno de plasmólisis en el caso de pérdidas de agua extremas (Carpita y col., 1979). En el equilibrio, el potencial de agua celular (ψ) se puede estimar a partir del potencial de agua de las soluciones de inmersión de PEG, a través de la ecuación de Van't Hoff:

$$\psi = M i R T \quad 4.1$$

donde M es la molaridad de la solución de inmersión, i corresponde al número de partículas que resultan de la disociación de una molécula de soluto involucrada ($i = 1$ para PEG en solución acuosa), T es la temperatura absoluta (K) y R es la constante universal de los gases (0,008315 MPa dm³ / mol K).

El potencial osmótico del contenido celular (ψ_s) se relaciona al potencial de agua de la respectiva solución mediante la siguiente ecuación:

$$\psi = \psi_s + W \quad 4.2$$

donde W es la presión de la pared celular

$$W = -T$$

siendo T, la presión de turgor celular (Stadelmann, 1966). La primera concentración de PEG donde ocurrió la plasmólisis incipiente ($T=0$), permitió calcular ψ_s° (el correspondiente potencial osmótico) a partir de las ecuaciones 4.1

y **4.2** Finalmente el potencial osmótico de las muestras de tejido en cada solución (ψ_s) de inmersión se pudo a partir de la relación:

$$\psi_s = \psi_s^\circ (V_0 / V) \quad \mathbf{4.3}$$

donde V_0 y V son el volumen de muestra en la plasmólisis incipiente y en una dada solución de inmersión luego de alcanzado el equilibrio, respectivamente. En las soluciones de PEG, las células tratan de igualar el potencial de agua en ambos lados de la membrana sólo por el movimiento de agua desde las células hacia la solución externa o en la dirección contraria, dependiendo del caso. Este movimiento de agua produce un cambio en el volumen del tejido. La condición isotónica corresponde a la concentración de soluto (PEG) en la cual el cambio relativo de volumen ($(V_f - V_i) / V_i$) es igual a cero. Luego, la presión de turgor del tejido en cada caso, se estimó de las ecuaciones **4.2** y **4.3** como:

$$\mathbf{T} = [\psi_s^\circ (V_0/V)] - (\mathbf{M} \mathbf{i} \mathbf{R} \mathbf{T})$$

La elongación de la pared celular, λ , fue evaluada como:

$$\lambda = (V/V_0)^{1/3} \quad \mathbf{4.4}$$

Y el esfuerzo de la pared celular, \mathbf{X} , como:

$$\mathbf{X} \cdot t_p/r = \mathbf{T} \cdot \lambda/2 \quad \mathbf{4.5}$$

donde X es el esfuerzo de la pared celular (MPa), t_h es el espesor de pared celular (m), r es el radio de la célula no presurizada (m) y T es la presión de turgor (MPa) de acuerdo con Lin y Pitt (1986).

La relación de la presión de turgor (T), el potencial osmótico del contenido celular (ψ_s) y la elongación (λ) y esfuerzo (X) de la pared celular, fueron evaluados según Lin y Pitt (1986) y Rojas y col. (2001) para cada muestra.

4.2.2.4 Ensayos mecánicos

4.2.2.4.1 Punción

Los ensayos fueron llevados a cabo utilizando una prensa Instron modelo 3345 (Instron Corp, Norwood, Ma, USA) provista de una celda de carga de 100 N. Se utilizó una punta plana de 2,5 mm de diámetro. Para cada ensayo se utilizaron diez especímenes de 15 mm de diámetro y 10 mm de altura (H_0).

Se utilizó una velocidad de cabezal constante de 10 mm/min. Las curvas de fuerza-deformación fueron recolectadas y utilizadas para evaluar la firmeza al punto de fractura ($F_{fractura}$), mediante la relación entre la fuerza de carga, F (N) y la deformación, d (m) correspondiente a dicho punto.

$$F_{fractura} = \frac{F}{d} \quad \mathbf{4.6}$$

El ensayo de punción, fue evaluado en los especímenes tratados con radiación gamma y en su sistema control.

4.2.2.4.2 Compresión

Los ensayos fueron llevados a cabo utilizando una prensa Instron modelo 3345 (Instron Corp, Norwood, Ma, USA) provista de una celda de carga de 100 N y se utilizó una punta plana de 30 mm de diámetro. Para cada ensayo se utilizaron diez especímenes de 15 mm de diámetro ($A = \text{área} = \pi \cdot \text{diámetro}^2/4$) y 10 mm de altura (H_0).

Se registraron las curvas de fuerza-deformación para deformaciones del espécimen de 60 %, utilizando una velocidad del cabezal constante de 10 mm/min. Se evaluó la fuerza (F_f) y la deformación ($\Delta H = H_0 - H_f$) al primer punto de fractura (f) y se calculó el esfuerzo normal ($\sigma = F_f / \text{Area}$) y la deformación de Hencky (ε_H), calculada a través de la siguiente ecuación:

$$\varepsilon_H = \ln\left(\frac{H_0}{H_0 - \Delta H}\right) \quad \mathbf{4.7}$$

4.3 Resultados y discusiones

4.3.1 Pigmentos, color y enzima PPO

Las radiaciones ionizantes y no ionizantes constituyen una importante fuente exógena de especies reactivas a oxígeno (ROS) para los organismos vivos expuestos a ellas. En particular las radiaciones gamma producen una amplia variedad de especies radicalarias y no radicalarias a partir de la ionización del agua (radiólisis del agua) intracelular, generando, por ejemplo, electrones acuosos, radicales $\bullet\text{OH}$ y H_2O_2 . La remolacha roja acumula betacianinas, principalmente betanina en el órgano de reserva, la raíz (Sepúlveda-Jiménez y col., 2004). Las betalainas (betacianinas y betaxantinas) son los pigmentos característicos de la raíz de remolacha roja. Los pigmentos presentes protegen al tejido vegetal contra los daños causados por los rayos UV y la luz visible, además de la función de pigmento (color) propiamente dicha (Yoshikazu y col., 2008). Las betalainas se encuentran ubicadas en las vacuolas de las células de las plantas que pertenecen al orden de las *Caryophyllales*. Escribano y col. (1998) determinaron la actividad antirradicalaria de betacianinas y betaxantinas y observaron que la actividad fue mayor para las betacianinas que para betaxantinas y, además, observaron cambios de la actividad con el pH del medio de reacción.

El contenido de betacianinas y betaxantinas fue cuantificado en los tejidos de remolacha roja control (0 kGy) e irradiados (muestras con dosis absorbidas de 1 y 2 kGy) y se observó una fuerte disminución para la dosis de 2 kGy (**Figura**

4.2A). En particular, la concentración de betacianinas disminuyó con la dosis y de manera significativa, en un 35 %, para las muestras 2 kGy mientras que la concentración de betaxantinas se incrementó para la dosis de 1 kGy, pero disminuyó para la dosis de 2 kGy, en ambos casos de manera significativa en un 11 y un 19 %, respectivamente en relación al contenido en el tejido control. Esto muestra que el contenido de pigmentos puede soportar una dosis absorbida de 1 kGy como se ve al considerar el contenido de pigmentos totales (101 %). Por otra parte, las barreras celulares antioxidantes dieron un saldo positivo en la síntesis de betaxantinas en este caso, mientras que los ROS (H_2O_2 , $\bullet OH$) producidos en respuesta a una mayor dosis absorbida (2 kGy) consumieron una cantidad significativa tanto de betacianinas como de betaxantinas, disminuyendo significativamente su relación de 1,4 (en el sistema control) a 1,1 para las muestras con dosis absorbidas de 2 kGy. Frente a lo observado, pareciera ser la betacianina, más sensible que la betaxantina frente a la irradiación gamma; esto puede estar asociado a su mayor capacidad para retirar un electrón así como también a la mayor estabilidad y tiempo de vida del radical generado, según lo indicado por Escribano y col. (1998). Por otra parte, la formación de betanidina (violeta) a partir de dopaxantina-quinona (amarilla) podría ser llevada a cabo por la acción de PPO (tirosinasa), enzima responsable del cambio de color de amarillo a violeta. La enzima PPO también cataliza reacciones en la conversión de tirosina-betaxantina a betanidina (Gandía-Herrero y col., 2005). Por lo tanto, la caída del contenido de betaxantina para la dosis de 2 kGy, podría ser explicada por el incremento de la actividad de PPO. La ausencia de incremento de la actividad de

esta enzima para las dosis 1 kGy, determinaría la mayor concentración de betaxantina para esta dosis. (**Figura 4.2B**).

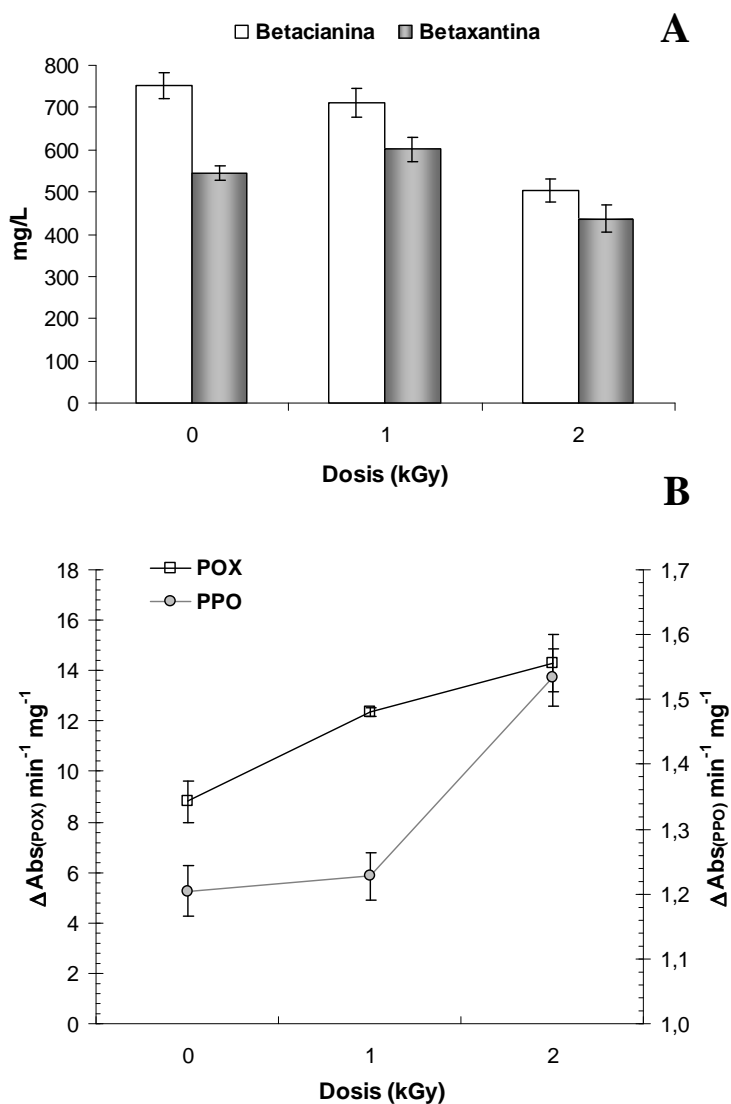


Figura 4.2 (A) Concentración de betacianinas y betaxantinas, expresadas como mg por litro de jugo de raíz de remolacha roja, según la dosis absorbida. **(B)** Actividad de peroxidasa (POX) y polifenol oxidasa (PPO) para las distintas dosis de radiación gamma absorbida.

La disminución del contenido de betacianinas, frente a la mayor dosis absorbida (2 kGy) fue coincidente con el incremento significativo de la actividad de PPO para dicha dosis y la más alta actividad de POX (**Figura 4.2B**). Se sugiere que el aumento de los niveles de actividad de PPO puede ser en parte atribuido a la necesidad de aumentar la actividad de tirosinasa, para compensar con mayor síntesis el incremento del consumo de betacianinas y betaxantinas debido a los radicales $\bullet\text{OH}$ y otros compuestos ROS generados en el tejido frente a la irradiación.

No se observaron cambios significativos con respecto al color en los tejidos (**Tabla 4.2**) al comparar los distintos parámetros evaluados. Los valores siempre se mantuvieron en la zona del rojo del espectro. Estos cambios no significativos en las coordenadas cromáticas permite confirmar que el incremento en la actividad de PPO para 2 kGy (**Figura 4.2B**), no se vió dirigida principalmente a la biosíntesis de melaninas y pardeamiento enzimático (*browning*) en este tejido, sino a la síntesis de los pigmentos constitutivos.

Tabla 4.2. Funciones de color (espacio CIELab) croma (C^*) y ángulo de tono (h°), evaluados en las muestras de tejido de remolacha roja control (0 kGy) y tratadas con radiación gamma (1 y 2 kGy).

Dosis (kGy)	L^{*1}	a^{*1}	b^{*1}	C^{*1}	$h^{\circ 1}$
0	10 ± 3^a	40 ± 4^a	17 ± 5^a	43 ± 5^a	22 ± 7^a
1	8 ± 3^a	38 ± 4^a	15 ± 4^a	41 ± 5^a	21 ± 5^a
2	$9,9 \pm 0,9^a$	40 ± 1^a	17 ± 2^a	43 ± 2^a	23 ± 5^a

¹Valor promedio y desviación estándar ($n=10$). Diferentes letras para la misma columna indican, diferencias significativas entre tratamientos ($p<0,05$).

4.3.2 Actividad de POX y PAL y composición química de pared celular

El incremento de H_2O_2 , tal como ocurre luego del tratamiento con radiación gamma (LaVerne, 2000), puede ser controlado en los tejidos vegetales por la enzima peroxidasa (POX), a través de los ciclos hidroxílicos y peroxidativos. La POX puede considerarse como una enzima bifuncional ya que es capaz de oxidar diversos sustratos en presencia de H_2O_2 y también compuestos ROS, que están implicados en el corte de polisacáridos tales como las pectinas y los xiloglucanos de las paredes celulares para llevar a cabo el proceso natural de elongación celular (Fry, 1998). En este estudio, la actividad de POX aumentó significativamente con la dosis de radiación gamma absorbida (**Figura 4.2B**). Por otro lado, el contenido total de compuestos fenólicos de pared celular, así como los componentes no ferúlicos de los mismos, aumentaron en concentración para la menor dosis (1 kGy), mientras que la concentración disminuyó para la dosis de 2

kGy respecto a la muestra control. Siendo este último cambio significativo sólo en el caso de los fenólicos totales de pared. La concentración de ácidos ferúlicos, calculada como la diferencia matemática entre las fracciones previamente mencionadas, mostró una tendencia similar, pero las diferencias no fueron significativa (**Figura 4.3A**).

El contenido de lignina determinado en el residuo insoluble en alcohol (RIA) extraído de los tejidos de remolacha roja, mostró una tendencia similar a la observada para el contenido de fenoles totales de la pared celular, aunque las diferencias no fueron significativas (**Figura 4.4A**); el contenido de celulosa mostró también una tendencia al aumento luego de la irradiación (**Figura 4.4B**). De Lara y col. (2006) determinaron que los cambios morfológicos/estructurales, tal como el entrecruzamiento (*cross-linking*) entre las cadenas de polímeros, parecieran justificar el efecto de la radiación gamma sobre la permeabilidad de membrana de celulosa a electrolitos tales como NaCl. En el presente trabajo, los compuestos fenólicos totales de la pared celular podrían haber aumentado después de una dosis de 1 kGy (**Figura 4.3A**) como respuesta del tejido frente al aumento del consumo de estos, como donadores de electrones en el ciclo peroxidativo, debido a una mayor actividad de POX y a fin de disminuir el H₂O₂ acumulado luego de la exposición a la radiación gamma. Esta mayor actividad de POX también podría promover la polimerización de los precursores de la lignina (compuestos fenólicos) en la pared celular de los tejidos de remolachas irradiados con dosis de 1 kGy. La POX Clase III es capaz de oxidar una gran variedad de

sustratos fisiológicos (por ejemplo, ácido ferúlico) demostrando poca especificidad de sustrato (Price y col., 2003).

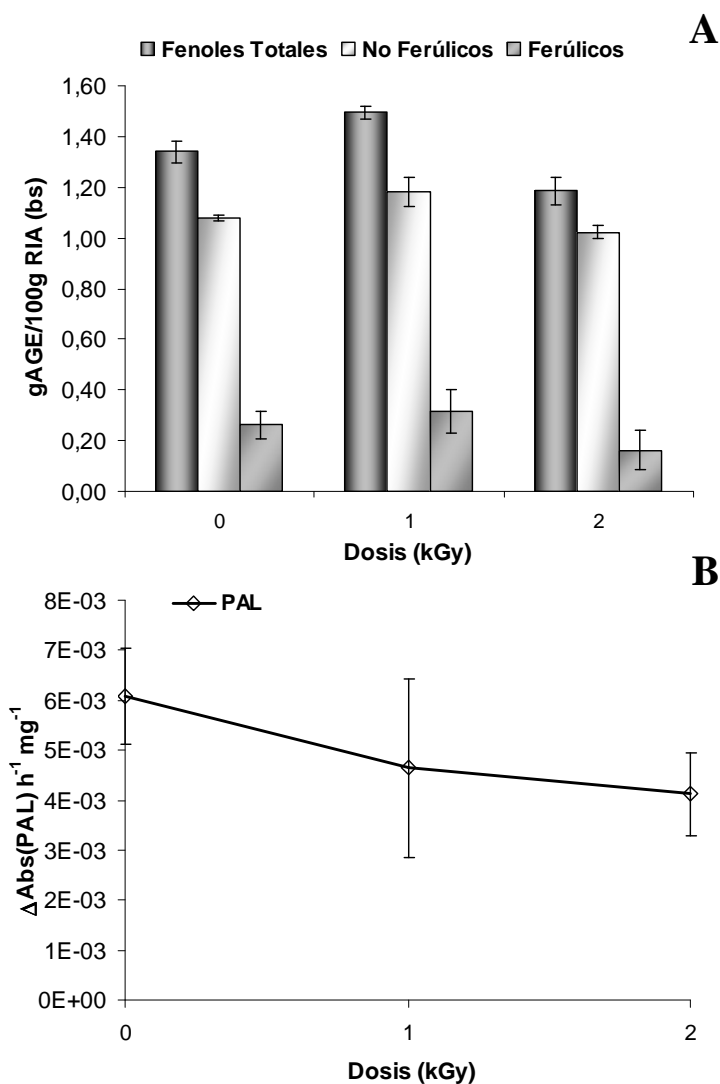


Figura 4.3 (A) Contenido de fenoles totales, no ferúlicos y ferúlicos, expresados como gramos de ácido gálico equivalente (AGE) cada 100 gramos en base seca (bs) de residuo insoluble en alcohol (RIA) y **(B)** actividad de la enzima fenilalanina amonio-liasa (PAL) determinada en los tejidos de raíz de remolacha roja control (0 kGy) o tratado con radiación gamma (dosis 1 y 2 kGy).

El ácido ferúlico a menudo se encuentra esterificado a los polímeros de la pared celular en los tejidos vegetales y es un buen sustrato para la enzima POX de vegetales. Las enzimas peroxidasa son por lo tanto, principales actores en la formación de uniones diferulato, que se producen luego de la oxidación protagonizada por los radicales ferúlicos libres. Dehidrodímeros de ácido ferúlico derivados de la combinación de radicales, han sido identificados en las paredes celulares de tejidos vegetales (Oudgenoeg y col., 2002), particularmente, en las raíces de remolacha azucarera (Levigne y col., 2004) y remolacha roja (Strasser y Amado, 2001). Dos dímeros de unidades de arabinosa vinculadas por uniones (1→5) esterificados por un dímero ferúlico central 8-O-4' fueron identificados por Levigne y col. (2004) en estudios de las paredes de las células de remolacha azucarera; ello indica que los arabinanos pécticos pueden entrecruzarse covalentemente a través de dehidroferulatos. Baydoun y col. (2004) reportaron que el tratamiento de pectina de remolacha azucarera *in vitro* con POX y H₂O₂ causó una disminución del 90-95 % en el contenido de monómeros ferulatos. Estos autores observaron además, una pérdida neta de alrededor del 50 % de los grupo fenólicos (monómeros y dímeros), durante la dimerización *in vitro*, aunque esta proporción puede variar *in vivo* debido a las macromoléculas presentes en la red de pared celular. En el tejido, *in vivo*, la síntesis de fenoles puede ser incrementada como consecuencia de la estimulación de la ruta enzimática en respuesta al aumento de los requerimientos de entrecruzamiento de biopolímeros de la pared celular. Sin embargo, en este trabajo la baja actividad de PAL detectada no permitió observar cambios significativos con la dosis absorbidas

(Figura 4.3B). Baydoun y col. (2004) también determinaron que la cantidad total de dehidrodímeros formados es fuertemente dependiente de la concentración de H_2O_2 , pero no de POX. Las variaciones en la concentración de H_2O_2 tuvieron un gran efecto especialmente a bajas concentraciones. Además, observaron que la cantidad total de dehidrodímeros formados alcanzó un máximo para concentraciones próximas a 0,3 mM de H_2O_2 y luego, a concentraciones más altas, cayó a un nivel próximo a dos tercios del máximo. El incremento de la concentración de H_2O_2 hasta 35 mM no produjo ulteriores cambios significativos en la dimerización. Estos eventos podrían justificar la variación en el contenido de ferúlicos con las dosis absorbidas en los tejidos de remolacha roja evaluados en este trabajo, ya que cada dosis produce un nivel distinto de H_2O_2 , controlado por el aumento de la actividad de POX. Por otro lado, la dimerización de ferulatos puede ser también un punto de partida para la dimerización de compuestos fenólicos y formación de lignina. Por lo tanto el grado y la naturaleza de lignificación también pueden ser grandemente influenciados por la concentración de H_2O_2 derivada de la irradiación (Figura 4.4A). En cultivos celulares en suspensión de *Pinus taeda*, la síntesis de lignina fue correlacionada con la generación del co-sustrato oxidante H_2O_2 , según lo reportado por Oudgenoeg y col. (2002). Se sugiere, en la presente investigación que los radicales monolignol y lignina pueden acoplarse bajo uniones β -O-4 para formar intermediarios metide quinona, que son estabilizados por la adición de nucleófilos (agua, ácido urónico, azúcares neutros) formando estructuras sustituidas con grupos α -hidroxil o entrecruzars con polisacáridos de la pared celular y proteínas mediante uniones

bencil- α -ester, de acuerdo a lo indicado por Grabber (2005). La adición de agua es coherente con las etapas iniciales de la lignificación, dado que un medio hidrofílico existe en la red de polisacáridos de la pared celular, como ocurre en este trabajo con el tejido de remolacha roja irradiado. La eficiencia de captación de radicales por la lignina también ha sido reconocido y algunas relaciones de estructura-actividad también han sido propuestas (Pouteau y col., 2003; Dizhbite y col., 2004). La conexión entre los efectos antibacterianos de la lignina Kraft y la actividad captadora de los radicales de su fracción soluble también ha sido mencionada por Dizhbite y col. (2004).

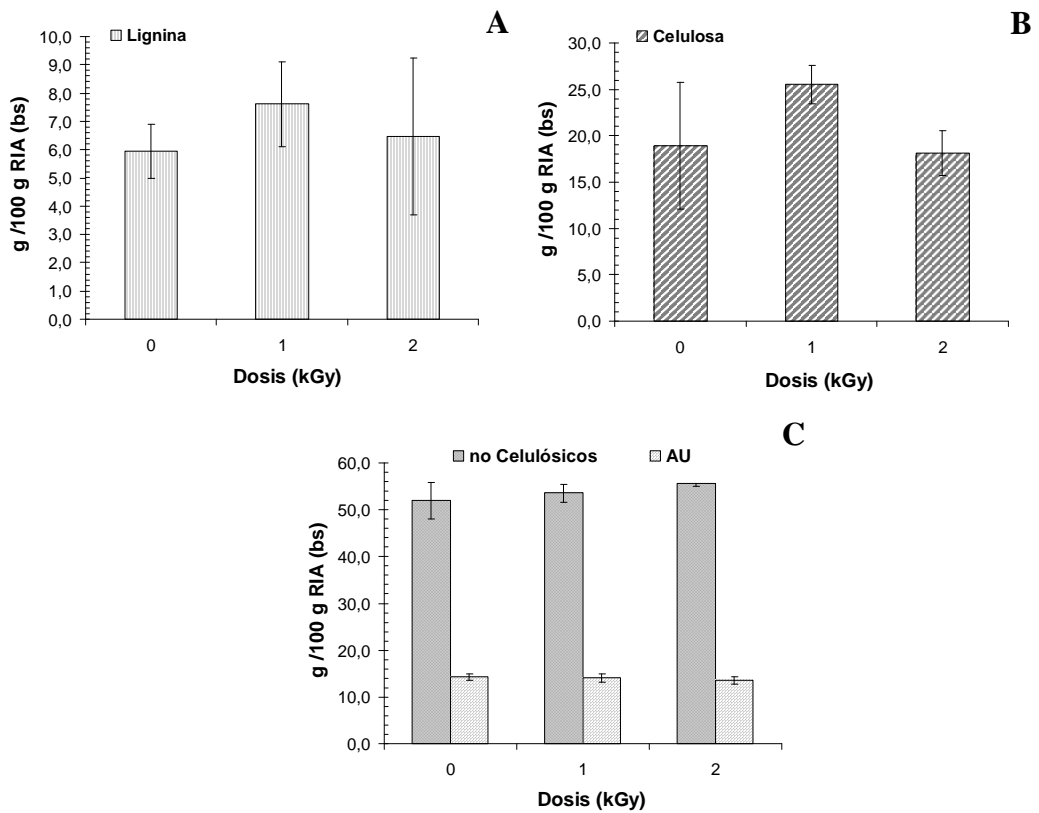


Figura 4.4 (A) Contenido de lignina; (B) contenido de celulosa, (C) contenido de hidratos de carbono no celulósicos y ácidos urónicos (AU), expresados como gramos cada 100 gramos en base seca (bs) de residuo insoluble en alcohol (RIA) y correspondientes a los tejidos control (0 kGy) y tratados con radiación gamma (dosis 1 y 2 kGy).

El contenido de ácidos urónicos (AU) en los residuos de pared celular (RIA), así como el alto grado de acetilación de las pectinas (GA \approx 73 %), típico de raíz de remolacha (Dongowsky, 2001) no mostraron cambios luego del tratamiento del tejido con irradiación gamma para las dosis 1 y 2 kGy (**Figura 4.4C; Tabla 4.3**). El alto grado de metilación (GM) se incrementó significativamente en las pectinas correspondientes a la dosis de 1 kGy. El contenido de humedad del RIA mostró una disminución significativa ($p < 0,05$) para la dosis de 2 kGy, aunque el contenido de humedad de los tejidos irradiados fue semejante al del tejido sin tratar (\approx 85 g/100 g de tejido). Rastogi (2005) observó que la difusividad efectiva del agua en la deshidratación fue mayor para zanahorias previamente irradiadas debido a la ruptura de las paredes celulares por el tratamiento. En nuestro caso, no es coherente asociar la disminución del contenido de humedad observado en el RIA de las muestras de 2 kGy con una ruptura de las paredes celulares, pero sí podría asociarse a una menor retención de agua por parte de los polisacáridos debido a los entrecruzamientos entre los polímeros de la pared celular a consecuencia del tratamiento de irradiación.

Tabla 4.3. Composición química correspondiente a los residuos insolubles en alcohol (RIA) extraído de los tejidos de remolacha roja control (0 kGy) y tratadas con radiación gamma para las dosis de 1 y 2 kGy.

	0 kGy	1 kGy	2 kGy
% Residuo Insoluble en Alcohol (g RIA / 100 g tejido)	3,9 ± 0,8	3,5 ± 0,9	4,0 ± 0,8
Contenido de humedad de RIA ¹ g H ₂ O/100 g RIA (bs)	3,5 ± 0,3 ^a	3,4 ± 0,2 ^a	2,5 ± 0,1 ^b
Grado de metilación de pectinas presentes en RIA (GM) ^{1,2}	79,0 ± 2,0 ^a	86,2 ± 0,6 ^b	80,4 ± 0,9 ^a
Grado de acetilación de pectinas presentes en RIA (GA) ^{1,3}	74 ± 3 ^a	71 ± 1 ^a	72 ± 1 ^a
Proteínas ¹ (g BSA / 100 g RIA bs)	9,0 ± 0,6 ^{ab}	9,8 ± 0,3 ^a	8,6 ± 0,4 ^b
Hidroxiprolina (mg/100 g proteína de RIA, bs)	5,467 ^a	4,325 ^b	4,621 ^c
Tirosina (mg/100 g proteína de RIA, bs)	4,449 ^a	4,014 ^a	4,878 ^b
Contenido de hidratos de carbono en la fracción soluble en agua (% bs) ¹	100 ± 1 ^a	105 ± 3 ^a	103 ± 5 ^a
Contenido AU ^{1,4} en la fracción soluble en agua (% bs)	11,3 ± 0,6 ^a	13,6 ± 0,2 ^b	12,8 ± 0,6 ^{ab}
GM de pectinas de la fracción soluble en agua ¹	63 ± 2 ^{ab}	67 ± 3 ^a	60 ± 1 ^b
Contenido de hidratos de carbono en la fracción soluble en NaCl (% bs)	102 ± 2 ^a	98 ± 3 ^a	101 ± 7 ^a
Contenido AU en la fracción soluble en NaCl (% bs)	16,5 ± 0,1 ^a	19,7 ± 0,3 ^b	27,6 ± 0,7 ^c
Porcentaje de RIA solubilizado luego del tratamiento Na ₂ CO ₃ a 4 °C, 16 h ¹	4,6 ± 0,3 ^a	3,8 ± 0,3 ^a	2,7 ± 0,1 ^b
Porcentaje de RIA solubilizado luego del tratamiento con Na ₂ CO ₃ a 20 °C, 2 h ¹	3,3 ± 0,1 ^a	3,6 ± 0,2 ^a	2,3 ± 0,1 ^b

¹ Valor promedio y desviación estándar ($n=3$). Diferentes letras en la misma línea indican diferencias significativas ($p<0,05$).

² GM: Expresado como la relación porcentual del número de moles de metanol y número de moles de AU cada 100g de RIA.

³ GA: Expresado como la relación porcentual del número de moles de acetilos y número de moles de AU cada 100g de RIA.

⁴ AU: contenido de ácidos urónicos.

bs: base seca

El contenido de proteínas de pared celular, evaluado en los RIA, no mostró diferencias significativas entre el control y los tejidos irradiados (**Tabla 4.3**), pero sí se observó una variación significativa entre las muestras con dosis absorbidas de 1 y 2 kGy, siendo mayor el contenido para la dosis de 1 kGy. Los radicales hidroxilos, generados por la radiólisis del agua de las células y también a través del consecuente aumento de la actividad de POX, son considerados lo más reactivos en los sistemas biológicos. El ataque de los $\bullet\text{OH}$ a las proteínas más cercanas que lo rodean, permite formar una serie de compuestos, como la hidroxiprolina, el semialdehído glutamato y otros. Sin embargo, una tendencia a un menor contenido de hidroxiprolina fue encontrado en las proteínas aisladas de la pared celular de los tejidos de remolacha irradiados respecto al control, aunque fue mayor para la dosis de 2 kGy que para la dosis de 1 kGy y el mayor contenido de tirosina fue encontrado en las proteínas del RIA correspondientes al tejido de remolacha roja con dosis de 2 kGy (**Tabla 4.3**). La oligomerización del ácido ferúlico catalizada por POX fue informada por Oudgenoegn y col. (2002). Ellos determinaron que la POX induce el entrecruzamiento del ácido ferúlico conduciendo a oligómeros superiores cuya unión a péptidos de tirosina, van a proveer las bases espaciales para el anclaje covalente de grupos fenoles sobre la tirosina en las proteínas de pared celular de los tejidos vegetales; esto apoya la hipótesis del anclaje-guiado en el proceso de polimerización de lignina.

La producción de ROS relacionada con el estrés también es requerida para el rápido entrecruzamiento de los componentes de pared celular incluyendo las glicoproteínas ricas en hidroxilprolina (HRGPs), las cuales forman parte de las defensas primarias de las plantas. Las extensinas, siendo el grupo HRGPs más estudiado, son secretadas en el apoplasto como monómeros solubles donde la lisina cargada positivamente y los residuos de histidina protonados, se cree que interactúan iónicamente con los ácidos urónicos negativamente cargados de las pectinas. La solubilidad de la red pectina-extensina en la extracción salina disminuye rápidamente luego de estímulos externos tales como heridas, infecciones o presencia de inductores, resultado de la oxidación (covalente) en el entrecruzamiento (*cross-linking*) de extensina. La formación resultante de una red (covalente) de extensina es un proceso mediado por POX dependiente de H₂O₂. Este mecanismo que ha sido propuesto involucra el acoplamiento mediado por POX de los residuos de tirosina de extensina para formar uniones isoditrosina (Fry, 1986).

4.3.3 Análisis por FTIR

El análisis por FTIR de los RIA obtenidos a partir de los tejidos control e irradiados (**Figura 4.5**) no revelaron diferencias que muestren la aparición o cambios en entrecruzamientos de pectinas feruloiladas presentes en los materiales de la pared celular de todas las muestras, como se observa a través de la banda en 1520 cm⁻¹, presente en todas las muestras y ausente en la pectina cítrica (Synytsya

y col., 2003) que también se muestra con fines de comparación en la **Figura 4.5**. Entre 1020 y 1170 cm^{-1} , la banda correspondiente a la celulosa enmascara las señales características de pectinas en la zona de *huella digital* (1200 a 900-850 cm^{-1}) tales como los picos de los esqueletos poligalacturónicos a 1020 y 1105 cm^{-1} (McCann y col., 1992). Picos típicos de celulosa a 1062 y 1110 cm^{-1} que corresponden al estiramiento asimétrico de los enlaces glucosídicos así como el hombro a 985 cm^{-1} , se pueden observar en su zona de *huella digital*. La contribución de la celulosa también puede observarse a 1390 cm^{-1} , señal ausente en la pectina cítrica. El agua adsorbida en las pectinas de la pared celular da lugar a un pronunciado pico a 1650 cm^{-1} (Wilson y col., 2000), el cual enmascara una ancha banda que aparece generalmente a 1615-1650 cm^{-1} por el estiramiento del carbonilo de los grupos carboxílicos (no-esterificados) de galacturónico y glucurónico, en el caso de residuos pectínicos de remolacha roja (Strasser y Amado, 2001). La banda atribuida al estiramiento C=O característico del grupo carboxilo esterificado se observó en 1740 cm^{-1} , como una única banda principal. La ancha banda del estiramiento del grupo -OH a la frecuencia de $\approx 3430 \text{ cm}^{-1}$, informada como característica de los polisacáridos de pared celular (Coimbra y col., 1999), pudo ser observada así como también una ancha banda, pero más corta a 2940 cm^{-1} , la cual corresponde al estiramiento -OH del grupo carboxílico, ambas también presentes en la pectina cítrica.

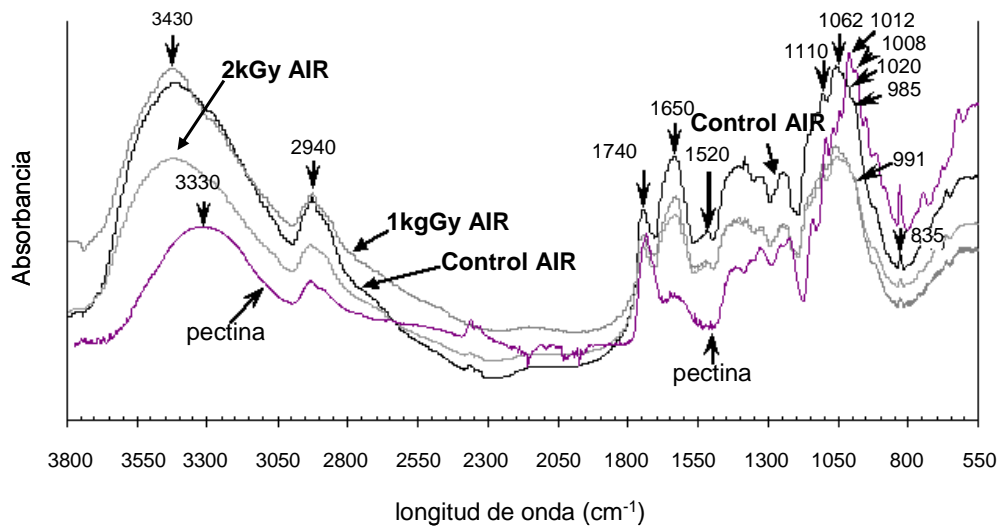


Figura 4.5 Espectros FTIR obtenidos de los residuos insolubles en alcohol (RIA) de los tejidos de raíz de remolacha roja control (0 kGy) y tratados con radiación gamma (dosis 1 y 2 kGy). Con propósitos de comparación, se muestra el espectro de la pectina cítrica (Synytsya y col., 2003).

4.3.4 Caracterización por extracciones secuenciales

La extracción secuencial de los polímeros de pared celular se llevó a cabo a partir de los residuos RIA obtenidos de los tejidos de remolacha roja control y tratados con radiación gamma, comenzando con agua a 18 °C (Brett y Waldron, 1996). La fracción extraída de RIA soluble en agua, no presentó variaciones con la dosis absorbida (**Figura 4.6**); estas fracciones estaban esencialmente constituidas por hidratos de carbono ($\approx 100\%$) y en ellos se presenta una porción pequeña de ácidos urónicos ($\approx 13\%$) altamente metilados ($\approx 63\%$) (**Tabla 4.3**). Se

sabe que el agua extrae las pectinas débilmente unidas a las paredes celulares (Fry, 1986).

La proporción de polímeros iónicamente unidos, pectina-extensina, extraídos por la solución de NaCl 0,136 M (Fry, 1986; Brett y Waldron, 1996), disminuyó significativamente con el aumento de la dosis (**Figura 4.6**). Los polímeros de la pared celular extraídos por la solución de NaCl 0,136 M, se hallaron esencialmente constituidos por hidratos de carbono ($\approx 100\%$) con una menor proporción de ácidos urónicos, que se observó aumentada significativamente con la dosis (**Tabla 4.3**). Ribero y col. (2006) informaron que el incremento mediado por H_2O_2 de la resistencia de la pared a la digestión, estaba acompañado por la formación de una red insoluble de extensina en la pared celular del tejido de uva. Bradley y col. (1992) informaron que el entrecruzamiento de la extensina comienza pocos minutos después de que se produce estrés en el tejido vegetal.

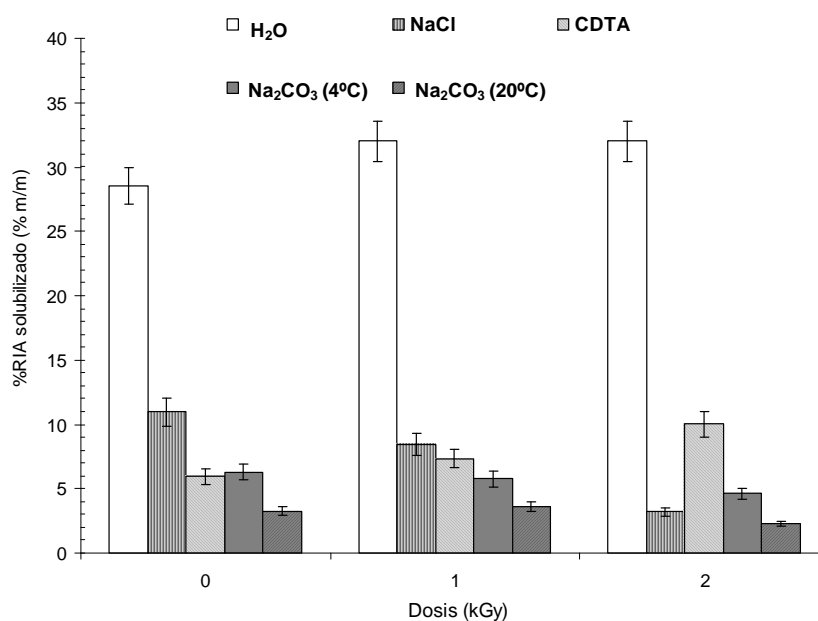


Figura 4.6. Porcentaje de residuo insoluble en alcohol (RIA) solubilizado luego de cada extracción secuencial con: agua, NaCl (0,136 M); CDTA (50 mM) y Na₂CO₃ (50 mM) a 4 y 20 °C. Los resultados corresponden a los sistemas control (0 kGy) e irradiados (dosis 1 y 2 kGy).

A pesar que no se observaron diferencias significativas en la extracción acuosa de los polímeros de la pared celular de los RIA control y tratados con radiación gamma, la solubilización en CDTA de pectinas unidas por Ca⁺², aumentó significativamente con la dosis de irradiación absorbida (**Figura 4.6**). Por lo tanto, la irradiación parece contribuir también al aumento de la adhesión célula-célula a través del aumento de uniones calcio en las regiones de la laminilla media (Vincken y col., 2003). Marry y col. (2006) observaron además, que no sólo las regiones homogalacturonano unidas con calcio de las pectinas son importantes para la adhesión célula-célula en el tejido de remolacha azucarera,

sino que la presencia de puentes covalentes feruloil-éster en las cadenas laterales de arabinogalactanos, también contribuyen. Ellos pueden ser removidos a través de los sucesivos tratamientos de extracción con Na_2CO_3 a 4 °C y 20 °C. Se sabe que la fuerza mecánica que caracteriza a los tejidos de raíz de remolacha luego de la cocción en agua hirviendo, está asociada a las pectinas diferuloilato, antes mencionadas, las cuales se encuentran en la laminilla media y en las esquinas (*cornes*) celulares (Waldron y col, 1997a,b; Marry y col, 2006). Las siguientes extracciones realizadas en este trabajo, con solución acuosa de Na_2CO_3 a 4 y 20 °C, sólo mostraron un porcentaje significativamente menor de polisacáridos extraídos para los residuos RIA correspondientes al tejido de raíz de remolacha con dosis absorbida de 2 kGy (**Tabla 4.3** y **Figura 4.6**). Los polisacáridos de la pared celular solubilizados secuencialmente en CDTA y Na_2CO_3 (4 °C-16h; 20 °C-2h) fueron analizados químicamente y se observó que estaban constituidos sólo por ácidos urónicos. Las extracciones con NaOH (0,1 N) e KOH (1 y 4 M) no mostraron diferencias para los RIA evaluados.

4.3.5 Evaluación textural

El aumento significativo de entrecruzamientos (*cross-linking*) entre los polímeros de pared celular en respuesta a la radiación gamma se evaluó a través de los ensayos mecánicos llevados a cabo en las muestras de tejido control y tratado y por estudios de turgor de las células.

4.3.5.1 Ensayo mecánico de compresión

Como se puede observar en la **Tabla 4.4**, el tratamiento de irradiación incrementó el esfuerzo (*stress*) de compresión (σ) en el primer punto de fractura (*bioyield point*), pero no modificó el valor de la deformación de Hencky (ϵ_H).

Tabla 4.4. Parámetros evaluados a partir de las curvas de fuerza-deformación obtenidas del ensayo de compresión del tejido de raíz de remolacha roja sin tratamiento (0 kGy) y tratadas con radiación gamma (dosis 1 y 2 kGy).

Dosis (kGy)	Esfuerzo 10^{-4} (Pa) ¹	Deformación de Hencky (ϵ_H) ¹
0	$9,2 \pm 0,5^a$	$0,23 \pm 0,05^a$
1	11 ± 1^b	$0,22 \pm 0,07^a$
2	11 ± 1^b	$0,24 \pm 0,07^a$

¹ Valor promedio y desviación estándar ($n=6$). Letras diferentes para una misma columna indican diferencias significativas ($p<0,05$).

4.3.5.2 Ensayo mecánico de relajación

El ensayo de relajación a deformación compresiva constante, para tejidos no fracturados, mostró cambios en la fuerza de relajación normalizada ($F(t)/F_0$) con el tiempo para los distintos tratamientos, el cual fue ajustado al modelo mecánico constituido por dos elementos de Maxwell y un resorte libre (F_∞/F_0) (**Tabla 4.5**). La fuerza residual relativa de relajación (F_∞/F_0) se incrementó significativamente después del tratamiento de irradiación (**Tabla 4.5**), mientras

que el componente F_1/F_0 , fuerza relativa asociada al mayor tiempo característico de relajación (τ_1), disminuyó significativamente con el aumento de la dosis absorbida (**Tabla 4.5**). Esto indica la relación inversa entre la pérdida de energía mecánica por el flujo y la dosis, lo que es coherente con el incremento de la fuerza residual relativa de relajación (F_∞/F_0).

Tabla 4.5 Ensayo de relajación a compresión constante. Parámetros obtenidos del ajuste al modelo mecánico de Maxwell generalizado para los tejidos de remolacha roja sin tratamiento (0 kGy) y tratados con radiación gamma (dosis 1y 2 kGy).

Dosis (kGy)	$F_1/F_0(\%)^{1,2}$	$\tau_1(\text{s})^{1,4}$	$F_2/F_0(\%)^{1,2}$	$\tau_2(\text{s})^{1,4}$	$F_\infty/F_0 (\%)^{1,3}$
0	48 ± 6 ^a	692 ± 182 ^a	10 ± 2 ^{ab}	22 ± 5 ^{ab}	41 ± 8 ^a
1	36 ± 11 ^b	730 ± 247 ^a	9 ± 1 ^a	28 ± 4 ^{ac}	54 ± 11 ^b
2	26 ± 9 ^c	606 ± 224 ^a	9 ± 2 ^a	28 ± 7 ^{ac}	64 ± 11 ^{bc}

¹Valor promedio y desviación estándar ($n=6$). Letras diferentes para una misma columna indican diferencias significativas ($p<0,05$).

²Fuerza de relajación relativa correspondiente a i -ésimo cuerpo de Maxwell.

³Fuerza de relajación relativa a tiempo infinito.

⁴ τ_i : tiempo de relajación correspondiente al i -ésimo cuerpo de Maxwell.

La fuerza residual relativa (F_∞/F_0) y la fuerza relativa correspondiente al primer elemento de Maxwell (F_1/F_0), se hallaron inversamente relacionadas y en una relación similar y esto se puede observar en la **Figura 4.7A**. Ello puede asociarse al aumento de elasticidad del tejido con la dosis absorbida y, consecuentemente, con el aumento de la densidad de entrecruzamientos (McEvoy y col., 1985; Grassi y col., 1996; Narine y Marangoni, 1999), en parte atribuída a

la insolubilización de la red pectina-extensina en la pared celular como consecuencia de una mayor actividad de POX en respuesta al incremento de la producción de H_2O_2 (**Figura 4.2B**) y además al aumento de pectinas unidas por calcio, en la región de la laminilla media de la pared celular, en el tejido luego de la irradiación. Las fuerzas residuales de relajación (F_∞/F_0) mostraron una relación directa y significativa con la actividad de POX (**Figura 4.7B**). Lo mismo se observó para el primer elemento de Maxwell (F_1/F_0) con respecto a la misma enzima.

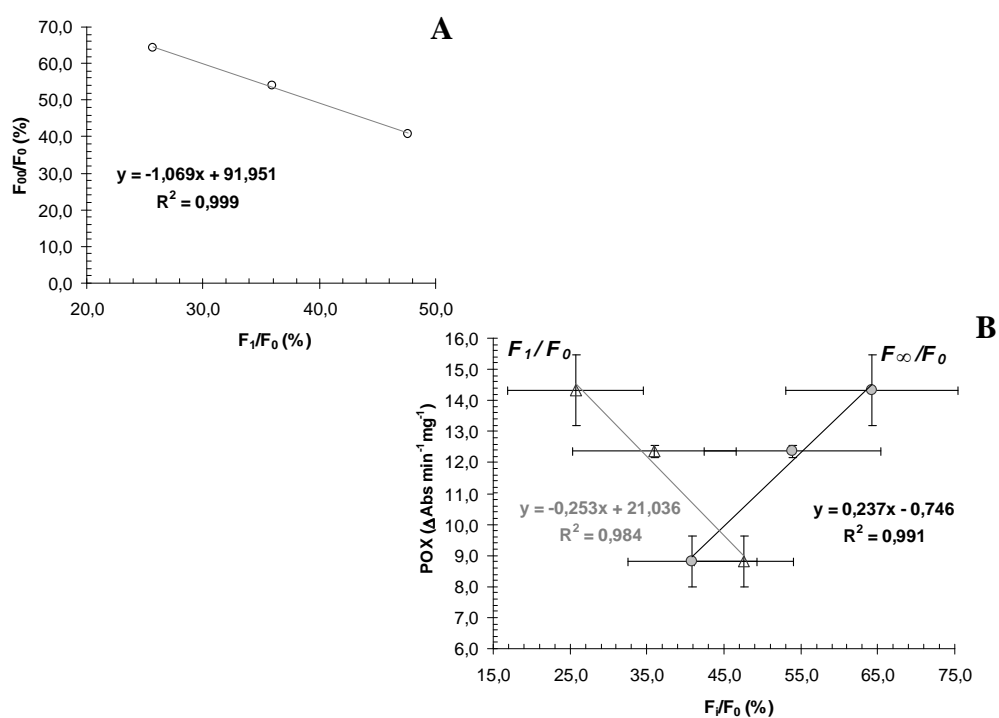


Figura 4.7 (A) Relación entre la fuerza de relajación relativa a tiempo infinito y la fuerza de relajación relativa correspondiente al primer cuerpo de Maxwell. **(B)** Relación de (F_∞/F_0) y (F_1/F_0) con la actividad de peroxidasa (POX) determinados en los tejidos de remolacha roja control y tratados con radiación gamma (dosis 1 y 2 kGy).

4.3.5.3 Influencia del turgor en el comportamiento mecánico de compresión

Como la reología de los tejidos es dependiente de la mecánica de las células individuales y suponiendo que el volumen de la muestra y el volumen de la célula son proporcionales, la relación esfuerzo-deformación de la pared celular derivada del cambio de la presión de turgor en los tejidos, permitió cuantificar el esfuerzo de la pared celular (**Figura 4.8**) de acuerdo a Lin y Pitt (1986). El tejido control de remolacha no mostró diferencias significativas en la resistencia de la pared celular a pequeñas elongaciones (λ) (**Figura 4.8**), seguido por un marcado incremento desde $\lambda \approx 1,30$ (30 % de deformación) y hasta $\approx 1,33$ (33 % de deformación). Una disminución de la velocidad de aumento del esfuerzo se observó finalmente hasta $\lambda \approx 1,40$ (40% de deformación), lo que indicó la capacidad de la pared celular para deformarse bajo condiciones hipotónicas, permitiendo la mayor captación de agua. Este evento puede estar evaluando el desempeño de la matriz péctica para permitir el arrastre viscoso (deformación) de la red microfibrilar de celulosa-xiloglucano, responsable de la contribución elástica a la respuesta mecánica de la pared celular (Rojas y col., 2002).

A pesar de que los tejidos tratados con radiación gamma también presentaron baja resistencia de la pared celular a pequeñas elongaciones, ella siempre fue mayor que la del tejido control (**Figura 4.8**). La resistencia de la pared celular de los tejidos tratados por irradiación se incrementó a $\lambda \approx 1,12$ (12% de deformación) para la dosis de 1 kGy y a $\lambda \approx 1,14$ (14% de deformación) para la

dosis de 2 kGy mostrando mayor resistencia de la pared celular para las muestras de 1 kGy hasta $\lambda \approx 1,19$ (19 % de deformación). Luego de esto, la rigidez de la pared celular de todos los tejidos irradiados aumentó considerablemente observándose que el esfuerzo o resistencia de la pared celular alcanzó valores de 0,46 MPa sin cambio significativo en la elongación a un 19% ($\lambda \approx 1,19$). Esto explica el alto esfuerzo observado en el ensayo de compresión en el primer punto de fractura (*bioyield point*) para los tejidos tratados con radiación gamma, frente a la misma deformación de *Hencky* que las muestras control (**Tabla 4.4**). Ello podría estar indicando que la matriz de pectina no permitió una gran deformación que tolere una máxima captación de agua en la condición hipotónica del tejido, lo cual es coherente con la mayor cantidad de pectinas unidas por calcio, así como con cierta formación de una red pectina-extensina, dentro de la cual la red de celulosa-xiloglucano se extiende, tanto como le es permitido a través de puentes de hidrógeno. La red es sinónimo de una estructura significativamente menos transiente, que en este caso involucra enlaces covalentes derivados de procesos oxidativos mediados por la actividad de POX y dependiente de H₂O₂ (Fry, 1986). El entrecruzamiento de las pectinas llevó, en consecuencia, a presiones de turgor más altas en los tejidos tratados con radiación gamma. Pitt y Chen (1983) observaron que a mayor presión de turgor disminuía la deformación a fractura en los tejidos de manzana, pero el esfuerzo a fractura no se veía afectado. Como la lignina se encuentra localizada en las paredes primaria y secundaria de células vegetales específicas (Oudgenoeg y col., 2002) y en la presente investigación se observó una síntesis de la misma luego del tratamiento de irradiación, esto

también podría contribuir al aumento de la rigidez observado en la pared celular de los tejidos tratados.

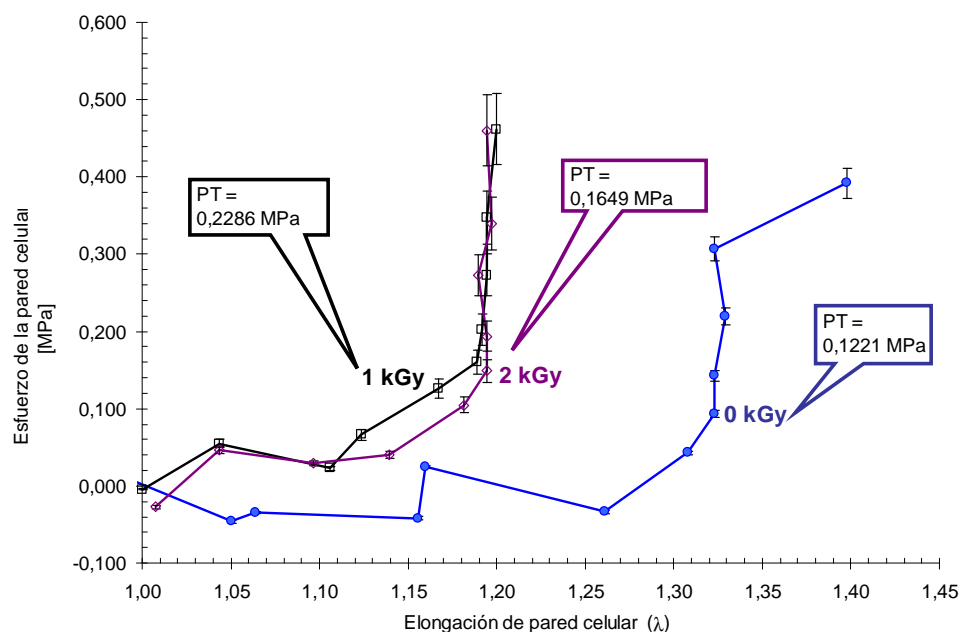


Figura 4.8 Relación del esfuerzo y la elongación (λ) de la pared celular determinados en de tejido de remolacha roja control y tratados con radiación gamma (dosis 1 y 2 kGy) en ensayos de estrés osmótico. Se muestra la presión de turgor calculada en cada tejido y también la posición de la condición isotónica.

4.3.5.4 Ensayo mecánico de punción

El ensayo de punción en los cilindros de tejido de raíz de remolacha mostró que las muestras con dosis absorbida de 2 kGy, presentaron la menor firmeza (fuerza/deformación) con respecto al tejido control (**Tabla 4.6**). De acuerdo a los resultados obtenidos de la evaluación de punción, se puede concluir que probablemente, los consumidores no notarían diferencias entre los

tratamientos, dado que esta prueba no mostró diferencias significativas ($p \geq 0,05$) de la firmeza de los tejidos tratados respecto al tejido control. Cabe recordar que la fuerza de punción no solo evalúa el componente puro de compresión sino también los componentes de cizalla y corte (Bourne, 1982).

Tabla 4.6. Firmeza evaluada ensayo de punción para los tejidos de raíz de remolacha roja control (0 kGy) y tratados con radiación gamma (dosis 1 y 2 kGy).

Dosis (kGy)	Firmeza $\times 10^{-3}$ (N/m) ¹
0	6,9 \pm 0,7 ^{ab}
1	7,2 \pm 0,9 ^a
2	6 \pm 1 ^b

¹Valor promedio y desviación estándar ($n=6$).
Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

4.3.6 Caracterización microscópica del tejido

Como se puede observar en la imagen de microscopía óptica de la **Figura 4.9A**, las células del tejido vivo de raíz de remolacha cortadas a diferentes niveles, mostraron un continuo de paredes celulares espesas rodeando el contenido celular uniformemente teñido, lo cual puede ser atribuido al tonoplasto de la vacuola responsable de la presión de la pared celular y, por lo tanto, al desarrollo de la presión de turgor. La laminilla media no mostró separación en el continuo de pared celular.

Una microestructura similar mostró el tejido irradiado para la dosis de 1 kGy (**Figura 4.9B**), con engrosamiento de la laminilla media en las uniones tri-celulares (*corners* o esquinas). La pared celular mostró continuidad en las muestras de tejido de remolacha para la dosis de 2 kGy (**Figura 4.9C**). Sin embargo, en las uniones tri-celulares se presentó frecuentemente, separación de la laminilla media y podría estar asociada a la generación de espacios de gas intercelulares (Roland, 1978) probablemente debido a una mayor actividad metabólica. Las fuerzas de separación celulares son reducidas por la introducción de espacios intercelulares y decrecen aún más cuando ellos se expanden (Jarvis, 1998). Cuando se rompe la adhesión entre las células de los tejidos vivos, ello ocurre bajo un estricto control del desarrollo o por separación en las uniones tri-celulares específicas, controlados ambos mecanismos por acción enzimática. Donde una unión tri-celular se ha abierto para dar lugar a un espacio intercelular, se refuerzan las zonas con polisacáridos de pectinas estructuralmente semejantes a aquellos de las uniones tri-celulares de origen, los cuales están presentes a lo largo del espacio de unión entre las tres células. De esta manera, las plantas superiores han desarrollado un sistema polimérico definido y localizado, para evitar la separación de células como consecuencia de la presión de turgor (Jarvis, 1998).

El análisis por microscopía electrónica de transmisión (MET), mostró la integridad de la membrana plasmática en los bordes de las paredes celulares (**Figura 4.9D,E,F**), donde algunas organelas fueron empujadas por el tonoplasto intracelular. Las paredes celulares del tejido control (**Figura 4.9D**), así como la de

los tejidos con dosis absorbidas de 1 kGy (**Figura 4.9E**) y 2 kGy (**Figura 4.9F,G**), presentaron leve densidad electrónica en las fibras longitudinales y paralelas a ambos lados de la laminilla media más oscura. Los plasmodesmos fueron observados frecuentemente en los tejidos con dosis de 2 kGy (**Figura 4.9G**) con la intensidad de tinción que caracteriza a los puentes citoplasmáticos y rodeados por el retículo endoplasmático intracelular liso (**Figura 4.9F,G**). Estas áreas constituyeron puntos de refuerzo de la adhesión celular (Hallett y col., 1992).

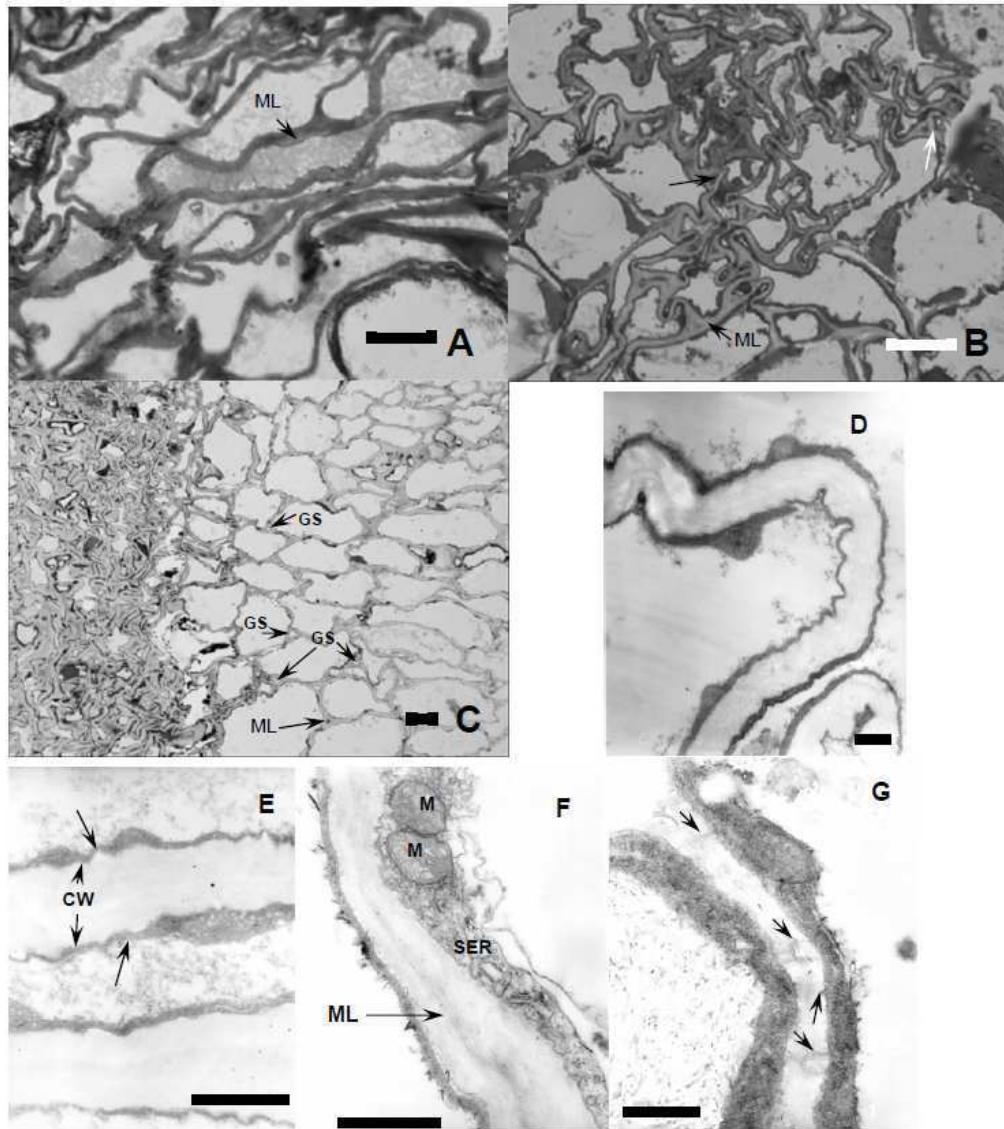


Figura 4.9. Imágenes de microscopía óptica (MO) de los tejidos vivos de raíz de remolacha roja (0 kGy) (A) y tratados con radiación gamma (dosis absorbida B: 1 kGy y C: 2 kGy). Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (MET) tomadas de los tejidos de remolacha control (0 kGy) (D) y tratados con radiación gamma (dosis absorbida E: 1 kGy; y F-G: 2 kGy).

MO: las flechas indican la laminilla media (ML) y espacios de gas (GS).

MET: en la imagen E las flechas indican cómo el contenido celular es empujado contra la membrana celular a lo largo de los bordes de la pared celular (CW) de cada célula vecina. La imagen F muestra la mitocondria (M) y el retículo endoplasmático liso (SER). La imagen G muestra el área del plasmodesmo entre células contiguas y las flechas indican algunos puentes citoplasmáticos.

Barras = 10 μm (A-C); barra = 1 μm (D-G).

4.4 Conclusiones

El contenido de betacianinas y betaxantinas determinados en el tejido de raíz de *Beta vulgaris* L. var conditiva luego del tratamiento con radiación gamma, mostró una marcada disminución para la dosis absorbida de 2 kGy. En particular, la concentración de betacianinas disminuyó con la dosis y de manera significativa, en un 35 %, para 2 kGy. La concentración de betaxantinas mostró un incremento para la dosis de 1 kGy y una disminución para 2 kGy, ambos cambios significativos en un 11 % y un 19 % con respecto al contenido en el tejido control. Considerando el contenido de pigmentos totales, se observó que los pigmentos presentes en el tejido de raíz de remolacha pueden soportar una dosis de 1 kGy.

En general, no se observaron cambios significativos con respecto a los parámetros de color entre los tejidos tratados y control. Además, los valores estuvieron siempre en la zona roja del espectro. De acuerdo a los resultados obtenidos, el incremento de la actividad de PPO en las muestras con dosis absorbida de 2 kGy, no se desvió principalmente a la biosíntesis de melanina y pardeamiento enzimático en el tejido de remolacha, sino hacia la síntesis de betacianina-betaxantina contribuyendo a superar el estrés oxidativo sufrido por el tejido luego de la absorción de dosis bajas de radiación gamma.

La actividad de POX aumentó significativamente con la dosis absorbida. Por otro lado, el contenido de fenoles totales de la pared celular así como los

componentes no ferúlicos, aumentaron frente a la dosis de 1 kGy mientras que disminuyeron para la dosis de 2 kGy con respecto al contenido en el sistema control, siendo los cambios significativos en este último caso sólo para el contenido de fenoles totales. La concentración de ferúlicos muestra una tendencia similar, pero la diferencia fue sólo significativa entre las muestras tratadas.

El contenido de lignina en los residuos insolubles en alcohol (RIA) mostró una tendencia similar a la del contenido de fenoles totales de la pared, aunque las diferencias entre los tratamientos no fueron significativas. El contenido de celulosa, por su parte, mostró una tendencia de aumento con la dosis absorbida. La baja actividad detectada de la PAL no mostró cambios significativos con la dosis. El contenido de ácidos urónicos, así como el elevado grado de acetilación característico de pectinas provenientes de raíz de remolacha, no mostraron cambios a posteriori del tratamiento de irradiación. Sin embargo, el grado de metilación se vió ligeramente incrementado, pero fue significativamente mayor sólo en las pectinas de la pared celular correspondiente a la dosis de 1 kGy. Un menor contenido de humedad se encontró en los RIA de tejidos tratados con dosis de 2 kGy; esto puede ser atribuido a un mayor grado de entrecruzamiento entre los polisacáridos.

El análisis de FTIR de los RIA obtenidos a partir de los tejidos control e irradiados, no mostró diferencias debidas al tratamiento.

La extracción secuencial de polisacáridos de la pared celular mostró menor proporción de pectina-extensina iónicamente unida y un aumento del entrecruzamiento mediado por calcio de las pectinas para los tejidos tratados. Ello contribuiría al aumento de la adhesión entre células y a la resistencia de pared. Las modificaciones químicas producidas en las paredes celulares como respuesta a los elevados niveles de H_2O_2 y a la actividad de POX fueron visualizadas como un aumento del comportamiento elástico de los tejidos irradiados y un aumento de rigidez de las paredes celulares de los tejidos tratados, aunque el ensayo de punción no mostró diferencias significativas. La microscopía mostró un continuo de paredes celulares espesas en el tejido de *Beta vulgaris* L. var conditiva, sin separación de la laminilla media en el tejido control pero las muestras tratadas con dosis absorbida de 1 kGy mostraron engrosamiento de la laminilla media en las zonas de las uniones tri-celulares mientras que se generaron espacios intercelulares para la dosis de 2 kGy como respuesta al estrés tisular producido.

**5. TRATAMIENTOS DE
ESCALDADO DEL TEJIDO DE
RAÍZ DE REMOLACHA ROJA
(Beta vulgaris L. var. conditiva).
POR MICROONDAS Y
EN AGUA A 90 °C**

5.1 Introducción

El uso y la aplicación de la energía de microondas en los procesos de producción agrícolas incluye el secado, el control de insectos y la germinación de semillas (Venkatesh y Raghavan, 2004). En el área de procesamiento de alimentos, aplicaciones tales como atemperado o acondicionamiento, secado al vacío, deshidratación, cocción, horneado, escaldado, pasteurización, esterilización y extracción, son día a día los más usados (Orsat y col., 2005). El uso de microondas se estudia para llevar a cabo el proceso de escaldado de los tejidos vegetales (Andres y col., 2004; Roberts y col., 2004), observando que la tecnología es útil para la inactivación de enzimas, pero que son necesarios mayores conocimientos de sus efectos sobre los nutrientes, la textura y el color de los productos frutihortícolas. El calentamiento a través de las radiaciones de microondas, a fin de lograr la pasteurización o esterilización, es actualmente elegido frente al calentamiento convencional ya que requiere de menor tiempo para alcanzar el proceso deseado. Esto es particularmente aplicable a los productos sólidos y semisólidos, donde es importante la incidencia del lento proceso de difusión térmica en el tiempo total del proceso. La eficiencia del calentamiento por microondas en los alimentos sólidos tiene las características de un proceso de alta temperatura-corto tiempo (AT-CT). De esta manera, los beneficios de un proceso AT-CT, permite reducir la carga microbiana y minimizar la degradación de los componentes (Hayashi, 2002).

La actividad enzimática de los tejidos vegetales es una de las principales causas de pérdida de nutrientes y deterioro de las características organolépticas en los alimentos de origen vegetal. La degradación oxidativa de los compuestos fenólicos se debe principalmente a la acción de dos enzimas, cuyas actividades pueden dar lugar a la producción de polímeros de color marrón. Estas enzimas son la polifenol oxidasa (PPO) y la peroxidasa (POX) (Tomas-Barberán y Espin, 2001). La POX es una de las enzimas más resistente al calor y como tal es a menudo utilizada como marcador de un correcto proceso de escaldado (Flick y col., 1978; Hemedá y Klein, 1990; Barrett y Theerakulkait, 1995). La tirosinasa o PPO es la enzima clave en la biosíntesis de melaninas y pardeamiento enzimático de los tejidos vegetales. El papel de la PPO en el metabolismo secundario de las plantas, aún no está completamente clarificado, pero se ha propuesto su acción en la biosíntesis de betalainas (Steiner y col., 1999; Yamamoto y col., 2002). Esta enzima se encuentra ampliamente distribuída en microorganismos, tejidos vegetales y animales y es responsable del pardeamiento enzimático. Diversos estudios (Richard-Forget y Gauillard, 1997; Subramanian y col., 1999) han demostrado que mientras la PPO desarrolla su acción oxidativa sobre los sustratos, genera H_2O_2 . Las quinonas, formadas por la oxidación y el H_2O_2 son utilizadas por la enzima POX. Esta enzima tiene la capacidad de degradar el H_2O_2 formado a expensas del consumo de sustancias de tipo fenólicas generando sustancias pardas (Hansberg, 2002; Muñoz-Muñoz y col., 2008).

Tomas-Barberan y Espin (2001) han sugerido que una de las mayores preocupaciones de la industria de los alimentos frutihortícolas, es prevenir el desarrollo del pardeamiento enzimático antes y/o durante el procesamiento, ya que los productos formados generan alteraciones en las características organolépticas y repercuten sobre la aceptabilidad de los productos por parte de los consumidores. El escaldado tiene por objetivo inactivar las enzimas indeseables presentes en frutas y hortalizas y, al mismo tiempo, reducir la carga microbiana, eliminar los gases de los tejidos, estabilizar la textura, el color, el flavor (aroma/sabor) y optimizar la calidad nutricional de los productos (Williams y col., 1986). El proceso de escaldado tradicional supone la exposición de los tejidos vegetales a un tratamiento térmico, por ejemplo mediante el uso de vapor o por inmersión en agua caliente (Barret y Theerakulkait, 1995). El grado de inactivación de las enzimas POX y PPO es a menudo utilizado para determinar cuando el tejido vegetal ha sido correctamente escaldado, debido a que estas enzimas se caracterizan por presentar alta resistencia al procesamiento (Collins y McCarty, 1969; Gökmen y col., 2005).

De acuerdo con Chen y col. (1971), la energía de microondas puede ser utilizada para escaldar tejidos vegetales como una alternativa a los tratamientos convencionales con vapor o por inmersión en agua caliente. El calentamiento por microondas se lleva a cabo en materiales dieléctricos, tales como los alimentos debido al efecto de polarización de la radiación electromagnética a frecuencias entre 300 MHz y 300 GHz. Dos son las bandas de frecuencia utilizadas y

permitidas en USA por la Comisión Federal de Comunicaciones (FCC) para las aplicaciones industriales, científicas y médicas. La frecuencia de 915 MHz, se utiliza únicamente para el calentamiento industrial y la frecuencia de 2450 MHz es utilizada tanto en los hornos industriales y los de uso doméstico. Las propiedades dieléctricas de los alimentos juegan un papel clave en la interacción con el campo eléctrico y son dependientes de la composición, la temperatura y la frecuencia de microondas empleada. Por lo tanto, existe una importante influencia de las propiedades dieléctricas de los materiales sobre la eficiencia de la energía electromagnética acoplada en los materiales, la distribución del campo electromagnético y la conversión de energía electromagnética en energía térmica dentro del material (Tang, 2005). La matriz a tratar debe contener especies dipolares o iónicas para que las microondas ejerzan su efecto. El calentamiento ocurre por dos mecanismos, la polarización de los dipolos y la conducción iónica. Los dipolos o iones son inducidos a moverse en la matriz por la interacción con la radiación aplicada. Cuando los dipolos tratan de re-orientarse por si mismos con respecto al campo eléctrico alterno, se pierde energía en forma de calor por fricción molecular (Wathey y col., 2002). Según Venkatesh y Raghavan (2004), el tratamiento térmico convencional es diferente al tratamiento por microondas, debido a que las microondas pueden transferir energía a través del volumen del material; esta transferencia de energía ofrece ventajas como reducción del tiempo de procesamiento y mejoras de la calidad global del producto.

Dorantes-Álvarez y Parada-Dorantes (2005) informaron que el tiempo de escaldado se puede reducir mediante el uso de radiaciones de microondas y concluyeron que el uso de microondas en los pre-tratamientos de las materias primas tendrá un papel importante en la conservación de alimentos, debido a la mayor retención de nutrientes que sigue a la aplicación de microondas como método de escaldado alternativo.

Varias investigaciones (Quenzer y Burns, 1981; Begum y Brewer, 2001; Brewer y Begum, 2003; Roberts y col., 2004; Lin y Brewer, 2005) han informado sobre los efectos de la aplicación de radiaciones de microondas para el escaldado, mostrando eficiencia y óptima adaptación. En los resultados de Ramesh y col. (2002), se observó que los tejidos vegetales escaldados con radiaciones de microondas conservan mejor sus valores nutricionales. Por otro lado, Begum y Brewer (1996) informaron que los espárragos escaldados con microondas conservan su valor nutritivo, sabor y textura mejor que los espárragos escaldados por métodos tradicionales. En muchos estudios informados, la historia *tiempo-temperatura* y *tiempo-potencia* de las muestras no ha sido adecuadamente registrada.

Venkatesh y Raghavan (2004) destacaron en sus estudios las limitaciones de las microondas que incluyen las transformaciones físicas y estructurales, que pueden sufrir los materiales que están siendo procesados y que afectan sus propiedades dieléctricas; por lo tanto la capacidad de las microondas para generar

energía térmica varía durante el proceso. Marcadas transformaciones en la capacidad de las microondas para generar calor pueden afectar el éxito del proceso. Un problema inherente, asociado al calentamiento por microondas, es la falta de uniformidad térmica causado por una desigual distribución espacial del campo electromagnético en el interior de la cavidad (Vadivambal y Jayas, 2007). El éxito del escaldado con microondas depende en gran medida de las características de calidad de las materias primas, el tiempo y la potencia del proceso.

La absorción de la energía de las microondas por los tejidos vegetales da lugar a cambios químicos y físicos. La fricción intermolecular generada a partir del calentamiento por microondas, puede causar aumento de la presión celular interna y conducir a la ruptura, lo que resulta en una pérdida de contenido y de organización celular (Quenzer y Burns, 1981). Por estas razones, es necesario realizar estudios específicos para los diferentes tejidos, tratando de establecer una base de información sistemática que permita encontrar las condiciones óptimas de tiempo y potencia para alcanzar el objetivo del proceso con el mínimo daño nutricional y organoléptico posible.

Durante los tratamientos de preservación de los tejidos vegetales (frutas y hortalizas) ocurren cambios en la textura. La pérdida de la firmeza de los tejidos, como respuesta a los cambios químicos y físicos, puede hacer que el alimento se torne inaceptable para el consumidor. Según Bourne (1982), la *textura* se puede

definir como el "*conjunto de características físicas que se derivan de los elementos estructurales de los alimentos, detectada por la sensación del tacto en relación con la deformación, la desintegración y el flujo de los alimentos bajo la acción de una fuerza*". Varios autores han utilizado la *firmeza* como un índice o parámetro para el estudio de la degradación de los vegetales (Huang y Bourne, 1987; Rizvi y Tong, 1997; Kidmose y Martens, 1999).

La composición de polisacáridos influye en la estructura de la pared celular y en consecuencia, sobre la textura de los tejidos vegetales (van Marle y col., 1997, Ng y col., 1998 a,b; Ratnayake y col., 2003). Kidmose y Martens (1999) estudiaron el escaldado de cilindros de zanahoria y observaron que el tratamiento térmico implicó muchos cambios en la estructura de la pared celular y consecuentemente en el ablandamiento del tejido. Estos cambios involucran la disrupción de la membrana celular y cambios en los polímeros de la pared celular. El conocimiento de la estructura y la composición química puede ayudar a entender las modificaciones que se producen durante el procesamiento (Femenia y col., 1998).

Las raíces de remolacha roja contienen fenoles solubles y otros asociados a la pared celular así como betalaínas, principales pigmentos de la remolacha roja responsable de su color rojo-púrpura los cuales son compuestos bioactivos (Schwartz y Elba von, 1980), siendo su capacidad antioxidante beneficiosa para la

salud del hombre (Kanner y col., 2001; Gliszczynska-Swiglo, 2006). Entre otros efectos, las betalaínas de remolacha son importantes para la salud cardiovascular.

El objetivo de esta etapa de investigación fue evaluar los efectos del escaldado por microonda y su comparación con el escaldado en agua a 90 °C a fin de alcanzar la inactivación de las enzimas peroxidasa (POX) y polifenol oxidasa (PPO) en tejido de raíz de *Beta vulgaris* L. var conditiva. El tiempo necesario, los cambios texturales y de color y la eficiencia energética fueron evaluados para una inactivación de por lo menos el 90% de ambas enzimas. Así mismo, se realizó el estudio de la composición de pared, el contenido de pigmentos y las características estructurales microscópicas para los tratamientos que resultaron más interesantes de acuerdo a los resultados previos. Todo ello con el fin de obtener información sobre las condiciones que conducen a la optimización del procesamiento de los vegetales tendiendo a contribuir al desarrollo de alimentos más saludables.

5.2 Materiales y métodos específicos

5.2.1 Tratamientos

5.2.1.1 Tratamiento por microondas

Se llevó a cabo un proceso batch, sobre cilindros de *Beta vulgaris* L. var conditiva, utilizando un equipo de microondas Ethos Plus (Milestone SRL, Sorisole, Italia) con un magnetrón de 2450 MHz de frecuencia. Se utilizó un sistema ATC-400 para el monitoreo continuo y/o control de la temperatura. El sensor óptico, sujeto en el interior de una vaina de cerámica fue colocado en el centro de uno de los cilindros a tratar. En el centro de la cavidad del microondas, se ubicó un contenedor cilíndrico de polipropileno de 27,9 cm de diámetro y 19,7 cm de altura (**Figura 5.1A**). Dentro del contenedor se ubicaron 18 cilindros de 15 mm de diámetro y 10 mm de altura (peso \approx 36 g) repartidos uniformemente dentro de seis vasos de vidrio (PYREX) (**Figura 5.1B**). El contenedor central presentó durante todo el tratamiento un movimiento programado oscilatorio a derecha e izquierda de giro total de 358° para evitar el acodamiento de la conexión del sensor y para asegurar un tratamiento homogéneo de las muestras. En la **Figura 5.2** se puede apreciar una imagen del equipo de microondas Ethos Plus y del contenedor utilizado.

En cada corrida, el sensor fue colocado en el centro de uno de los especímenes (cilindros de remolacha) ubicado en el interior de uno de los vasos y

permitió registrar el perfil de temperatura. Así mismo el equipo permitió llevar durante los ensayos un registro de la historia tiempo-potencia. Ensayos previos mostraron que para la geometría elegida, no se observaban diferencias significativas de la temperatura entre el centro y la periferia, esto puede deberse al pequeño diámetro de los cilindros usados. Además se observó que la diferencia de temperaturas entre las muestras contenidas en cada uno de los vasos o entre las muestras contenidas en distintos vasos o entre las muestras de distintas corridas bajo iguales condiciones, no superaba el 5 %; probablemente, el movimiento alternante con un recorrido de 358° contribuyó a la homogeneidad de la temperatura en el contenedor.

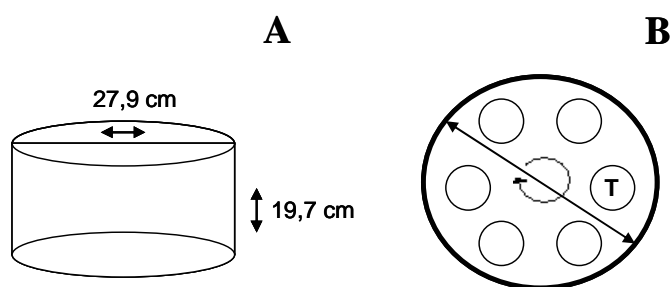


Figura 5.1 (A) Contenedor de polipropileno ubicado en el interior de la cavidad del microondas. (B) distribución espacial de los vasos dentro de la cavidad. T: localización de la sonda de temperatura.

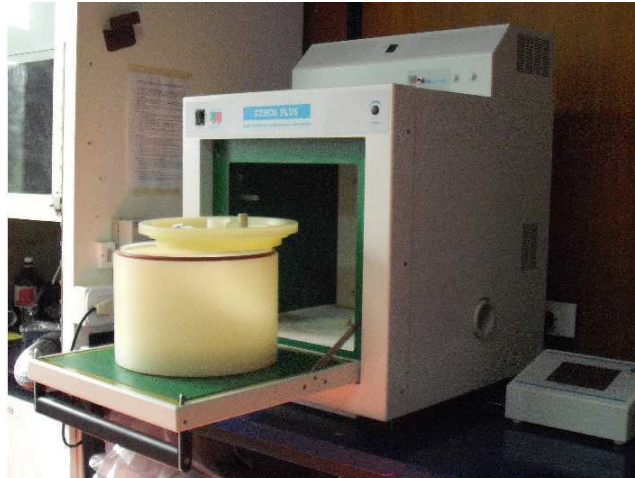


Figura 5.2.Equipo de microondas Ethos Plus-Milestone

5.2.1.1.1 Tratamientos por microondas en ausencia de agua

Cilindros de tejido de raíz de remolacha con una masa ≈ 36 g, se distribuyeron en seis vasos (3 cilindros o ≈ 6 g se colocaron en cada vaso). Se llevaron a cabo tres tratamientos en ausencia de agua a diferentes potencias constantes 100 W, 150 W y 200 W durante 5 minutos. Durante la experiencia se evaluó el perfil tiempo-temperatura del tejido y se controló la constancia de la potencia aplicada. La actividad de las enzimas (POX y PPO) se evaluó en el material de partida así como luego de 5 minutos de tratamiento. Al final de cada tratamiento se evaluó la pérdida de peso total y la variación del diámetro de los especímenes (expresado como grado de encogimiento) como parámetros de control de calidad.

5.2.1.1.2 Tratamientos por microondas en presencia de agua

En esta experiencia ≈ 36 g de material distribuido en vasos de la forma ya explicada, fue inmerso en 300 ml totales de agua deionizada que se distribuyó equitativamente entre los seis vasos. La cantidad de agua usada fue la mínima necesaria para la cobertura del tejido en cada vaso. La misma relación tejido/agua, fue luego usada para el escaldado tradicional con el objetivo de una más adecuada comparación entre ambos tratamientos.

En presencia de agua, se evaluaron cuatro situaciones experimentales diferentes:

a) A potencia constante, siendo las potencias utilizadas 250 W, 350 W y 450 W. El perfil de temperatura con el tiempo y la evolución de la potencia fueron registradas tanto en el tejido como en el agua de inmersión en cada ensayo. El tiempo de tratamiento para cada potencia, fue el necesario para alcanzar al menos una reducción del 90 % de la actividad de ambas enzimas (POX y PPO) en cada caso.

b) El equipo fue programado con potencias variables, con el fin de obtener en el centro de los cilindros un perfil de temperatura con el tiempo similar al obtenido en el tratamiento de escaldado convencional por inmersión del tejido en agua a 90 °C. Este tratamiento se denominó 90MW. Los perfiles de temperatura en los cilindros y en el agua de inmersión, junto a la evolución de la potencia de salida fueron registrados durante el tiempo de proceso necesario para

alcanzar una reducción de la actividad de ambas enzimas (POX y PPO) de, por lo menos, 90 %.

En todos los tratamiento de microondas, finalizada la exposición a la radiación no ionizante, se aplicó un minuto de *venteo* (1 minuto a potencia 0 W) como norma de seguridad. El perfil de temperatura también fue registrado durante dicho período. Todos las experiencias se realizaron por triplicado ($n=3$)

5.2.1.2 Tratamiento térmico convencional por inmersión en agua a 90 °C

El tratamiento térmico convencional se llevó a cabo por inmersión del tejido (cilindros de remolacha) en un baño de agua a temperatura constante de 90 °C. Durante el tratamiento las temperaturas del baño y del centro de los cilindros, fueron registradas cada 10 segundos utilizando termocuplas de cobre constantan. Este tratamiento se denominó 90C. El tratamiento se realizó el tiempo necesario para alcanzar una reducción de la actividad de, por lo menos, el 90 % para ambas enzimas (POX y PPO). La relación tejido/agua fue la misma que la usada en los tratamientos por microondas. Los distintos tiempos evaluados, fueron llevados a cabo por triplicado ($n=3$).

Finalizado cualquiera de los tratamientos antes explicados, las muestras fueron inmersas rápidamente en un baño de agua con hielo (durante 5 minutos)

para detener el calentamiento. Cilindros sin tratar fueron utilizados como muestra control.

5.2.2 Caracterización del tejido sin tratar y tratado

Para los tratamientos antes descritos y el sistema control se evaluó la actividad enzimática (POX y PPO), el color y la relajación de acuerdo a lo explicado en materiales y métodos generales. La evaluación textural por compresión, el modelado de los datos experimentales de la inactivación enzimática y el cálculo de la eficiencia energética del proceso, se explican a continuación.

5.2.2.1 Ensayos mecánicos de compresión

Los ensayos fueron llevados a cabo utilizando una prensa Instron modelo 3345 (Instron Corp, Norwood, Ma, USA) provista de una celda de carga de 500 N y se utilizó una punta plana de 30 mm de diámetro. Para cada ensayo se utilizaron diez especímenes de 15 mm de diámetro ($A = \text{área} = \pi \cdot \text{diámetro}^2/4$) y 10 mm de altura (H_0). En ellas se evaluaron las curvas fuerza-deformación a fractura. La firmeza ($Firm$) de los tejidos tratados y control fueron evaluadas como la relación de la fuerza ($F_{fractura}$) y la deformación ($d_{fractura} = H_0 - H_{fractura}$) en el punto de fractura. La firmeza relativa (F) fue calculada como la relación entre las firmezas ($Firm_i$) de los distintos tratamientos respecto a la firmeza del tejido sin tratamiento ($Firm_0$).

$$Firm_i = \frac{F_{fractura}}{d_{fractura}} \quad 5.1$$

$$F = \frac{Firm_i}{Firm_0} \quad 5.2$$

5.2.2.2 Modelado de la inactivación enzimática

La inactivación de las enzimas POX y PPO es descrita usualmente por una reacción de primer orden (Matsui y col., 2008) como puede observarse en la ecuación (5.3) donde, A_0 (AbU min⁻¹mg⁻¹ proteína) es la actividad enzimática inicial en el tejido (muestra control \equiv tiempo 0 min) y A (AbU min⁻¹mg⁻¹ proteína) es la actividad remanente en el tejido después de un período de tiempo t (min) de tratamiento a temperatura constante (°C), siendo k la constante de velocidad de inactivación:

$$\ln\left(\frac{A}{A_0}\right) = -k.t \quad 5.3$$

Otros parámetros, como el valor D , también se utilizan para modelar esta destrucción, siendo $D=2,303/k$. Este modelo para la inactivación enzimática se presenta en las ecuaciones 5.4a y 5.4b para el tratamiento isotérmico a la temperatura T y en un período de tiempo t (Vieira y col., 2002; Matsui y col., 2008):

$$\ln \frac{A}{A_0} = -\frac{2,303}{D} t \quad \mathbf{5.4(a)} ; \quad \log \frac{A}{A_0} = -\frac{1}{D} t \quad \mathbf{5.4(b)}$$

El valor D (tiempo de reducción decimal) es el tiempo necesario para llevar a cabo el 90 % de reducción de la actividad enzimática en condiciones isotérmicas. El efecto de la temperatura sobre el valor D se expresa mediante el valor de z correspondiente al aumento de la temperatura que reduce el valor D en un 90 %, como se puede observar en la siguiente ecuación:

$$D = D_{T_{ref}} \cdot 10^{\frac{(T_{ref}-T)}{z}} \quad \mathbf{5.5}$$

donde $D_{T_{ref}}$ es el valor de D a la temperatura de referencia (T_{ref}).

De acuerdo con Matsui y col. (2008), en condiciones no isotérmicas y suponiendo destrucción de primer orden, la siguiente ecuación puede ser aplicada:

$$t_{equiv} = \int_0^{\infty} 10^{\frac{T(t)-T_{ref}}{z}} dt \quad \mathbf{5.6}$$

donde t_{equiv} es el tiempo necesario en condiciones isotérmicas a una temperatura de referencia (T_{ref}), que resulta en un mismo efecto de destrucción enzimática que el observado para la historia real tiempo-temperatura sufrida por el producto en estudio, donde el proceso desarrollado es no isotérmico.

En consecuencia, se puede decir que (Deng y col., 2003 y Matsui y col., 2008):

$$\log\left(\frac{A}{A_0}\right)_{\text{modelo}} = \frac{-t_{\text{equiv}}}{D_{T_{\text{ref}}}} = \frac{\int_0^{\infty} 10^{\frac{T_{\text{ref}}-T(t)}{z}} dt}{D_{T_{\text{ref}}}} \quad 5.7$$

En la primera etapa del trabajo, la actividad enzimática residual se evaluó numéricamente a través de la ecuación **5.7** utilizando los datos experimentales T vs t y un estimador inicial de los parámetros $D_{T_{\text{ref}}}$ y z . La temperatura de 90 °C se utilizó como temperatura de referencia (T_{ref}), porque fue ésta la temperatura más alta alcanzada y/o se encontraba dentro del rango en estudio para los sistemas (Matsui y col., 2008). Los períodos de calentamiento y de ventéo en los procesos de microondas, fueron considerados para los cálculos. La temperatura de 90 °C fue coincidente con la temperatura utilizada para el tratamiento de escaldado convencional. Se utilizó el procedimiento de estimación no lineal para reducir al mínimo la suma de los cuadrados de los errores (SCE) entre el valor experimental y el predicho de la actividad enzimática residual, como se define en la **ecuación 5.8**, donde n es el número de corridas experimentales y el subíndice *exper* indica los datos experimentales (Matsui y col., 2008)

$$SCE = \sum_{i=1}^n \left[\log\left(\frac{A}{A_0}\right)_{\text{exper}} - \log\left(\frac{A}{A_0}\right)_{\text{modelo}} \right]^2 \quad 5.8$$

obteniéndose los valores óptimos de los parámetros D_{Tref} y z , para cada tratamiento, utilizando todos los datos experimentales de tiempo y temperatura en cada caso.

Las integrales de las ecuaciones **5.6** y **5.7** se evaluaron numéricamente por el método del trapecoide, utilizando la función SOLVER del programa Excel para Windows XP (Microsoft, USA).

5.2.2.3 Eficiencia energética del proceso

La eficiencia del proceso se estudió desde el punto de vista del consumo de energía para ambos tratamientos de escaldado (convencional y por microondas) para la destrucción del 90 % de la actividad enzimática.

Para el tratamiento por microondas, se evaluó la energía específica emitida (E_s) de acuerdo con Tang y col. (2010) según la siguiente ecuación:

$$E_s = \frac{P \cdot t}{m} \quad \mathbf{5.9}$$

donde P es la potencia de la radiación (Watt), t es el tiempo necesario de exposición (s) de las muestras a las radiaciones de microondas hasta asegurar el 90 % de destrucción de ambas enzimas y m es la masa total (g) de muestra tratada.

Por otro lado, la cantidad de energía requerida para la destrucción enzimática durante el tratamiento por microondas fue calculada de manera aproximada siguiendo la propuesta de Picouet y col. (2007):

$$Q = \frac{dT}{dt} \cdot C_p \cdot m \quad \mathbf{5.10}$$

donde dT/dt es el cambio de temperatura ($^{\circ}\text{C}$) con el tiempo, C_p es la capacidad térmica específica ($\text{J/g } ^{\circ}\text{C}$) y m es la masa (g). La historia térmica determinada experimentalmente para el tejido y para el agua, se usó para calcular el cambio de temperatura con el tiempo durante el tiempo necesario para alcanzar un 90 % de destrucción de ambas enzimas. Con este propósito, la integración numérica de la función $T(t)$ se llevó cabo aplicando el método del trapecioide en el rango estudiado:

$$\frac{\int_{t_0}^{t_f} T(t)dt}{(t_f - t_0)} \approx \frac{\sum_{i=0}^{i=f} T_i \Delta t_i}{(t_f - t_0)} \quad \mathbf{5.11}$$

Los valores usados de capacidad térmica específica fueron; para el tejido de remolacha de $3,77 \text{ J/g } ^{\circ}\text{C}$ (Engineering toolbox) y para el agua, $4,1813 \text{ J/g } ^{\circ}\text{C}$ (Perry y Green, 1997). Ambos Q obtenidos fueron sumados para evaluar la energía total consumida y este valor fue dividido por la masa de muestra de modo tal de obtener la energía específica consumida expresada en J/g para la destrucción enzimática.

Para el tratamiento convencional por inmersión en agua a 90 °C, la energía total consumida se calculó considerando la sumatoria de **(i + ii + iii)**:

- i)** La energía necesaria para calentar el volumen total de agua del baño utilizada desde la temperatura ambiente (≈ 20 °C) hasta 90 °C (tiempo requerido: 5 minutos).
- ii)** La energía necesaria para calentar las muestras desde temperatura ambiente (≈ 20 °C) hasta 90 °C (tiempo requerido: 2 minutos).
- iii)** La energía necesaria para mantener el agua y las muestras a 90 °C hasta el tiempo final de escaldado (destrucción enzimática del 90 %).

La relación de energía total (J) y masa total (g) de tejido de remolacha tratado, describe la energía específica consumida (J/g).

El tiempo necesario para cada proceso fue evaluado mediante el ajuste de los datos experimentales a un modelo semi-logarítmico cuando no se disponía de los datos experimentales para el tiempo exacto de destrucción del 90 %. En los casos en que las enzimas (POX y PPO) requirieron tiempos diferentes para el 90 % de la destrucción, se consideró para los cálculos del consumo específico de energía, el tiempo necesario para la enzima más resistente.

5.2.3 Profundización de la caracterización de los sistemas de interés

Para la segunda etapa del trabajo se eligieron algunos procesos de escaldado con el objetivo de profundizar los estudios sobre ellos. Los criterios usados para su selección fueron el menor requerimiento de tiempo o energía para disminuir la actividad enzimática al 10 % y el deterioro de textura y color. Los estudios que se hicieron sobre estos sistemas de interés fueron:

(A) obtención del RIA en el cuál: **(i)** se determinó el contenido de lignina, celulosa, hidratos de carbono totales no celulósicos, ácidos urónicos, grado de metilación y grado de acetilación de pectinas, contenido de proteínas y humedad; **(ii)** se extrajo y cuantificó el contenido de fenoles; **(iii)** se caracterizaron los polímeros de pared por extracciones secuenciales y se realizó un análisis por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).

(B) evaluación del contenido de pigmentos y estudios microestructurales

Las técnicas correspondientes al ítem **A** así como las de evaluación del contenido de pigmentos y estudios microestructurales, han sido explicadas en la sección materiales y métodos generales.

Los tratamientos elegidos y que aseguraban la disminución de la actividad enzimática al 10 % del valor inicial, fueron:

i) Tratamientos de escaldado por microondas

350W tratamiento a potencia constante 350 W durante 5 minutos, más un minuto de venteo (potencia 0 Watts). Tiempo total de tratamiento 6 minutos.

90MW tratamiento con barrido de potencia variable, durante 2 minutos más un minuto de venteo (potencia 0 Watts). Tiempo total de tratamiento 3 minutos.

ii) Tratamiento de escaldado convencional

90C tratamiento por inmersión del tejido en un baño de agua a temperatura constante de 90 °C. Tiempo total de tratamiento 7 minutos.

iii) Sin tratamiento

CONTROL un lote de cilindros de tejido de raíz de remolacha sin tratar.

Cada experiencia realizada se llevó a cabo el número de veces necesario para obtener una masa total de tejido total de ≈ 500 g, cantidad suficiente para las evaluaciones experimentales.

5.3 Resultados y discusiones

5.3.1 Ensayos preliminares. Tratamiento por microondas en ausencia de agua

Cuando las radiaciones de microondas fueron utilizadas para escaldar cilindros de tejido de raíz de remolacha roja, se observó que 5 minutos de tratamiento en el rango de potencia de 100 a 200 W, no fueron suficientes para alcanzar al menos el 90 % de la inactivación de las enzimas POX y PPO, excepto a 200 W (**Figura 5.3**). A pesar de que estas relaciones de tiempo y potencia no permitieron alcanzar adecuadamente la inactivación de las enzimas, sí produjeron un importante grado de encogimiento del tejido y pérdida de peso tal como se puede observar la **Tabla 5.1**.

Tabla 5.1. Grado de encogimiento y pérdida de peso del tejido de raíz de remolacha roja al cabo de 5 minutos de tratamiento por microondas a potencias de 100, 150 y 200 W

Potencia de tratamiento (Watt)	Grado de encogimiento ¹ (%)	Pérdida de peso ¹ (%)
100	6 ± 3 ^a	9,4 ± 0,6 ^a
150	13 ± 2 ^b	17,3 ± 0,3 ^b
200	17 ± 3 ^b	24,7 ± 0,5 ^c

¹ Valor promedio y desviación estándar ($n=18$). Letras diferentes para una misma columna indican diferencias significativas ($p<0,05$).

Los perfiles de temperaturas registrados en las muestras de tejido a lo largo del tiempo de tratamiento (**Figura 5.4**) muestran que la temperatura máxima alcanzada se incrementó con la potencia aplicada, siendo 73 °C la temperatura

más alta observada para 200 W y POX mostró ser la enzima más resistente en cualquiera de las condiciones ensayadas (**Figura 5.3**).

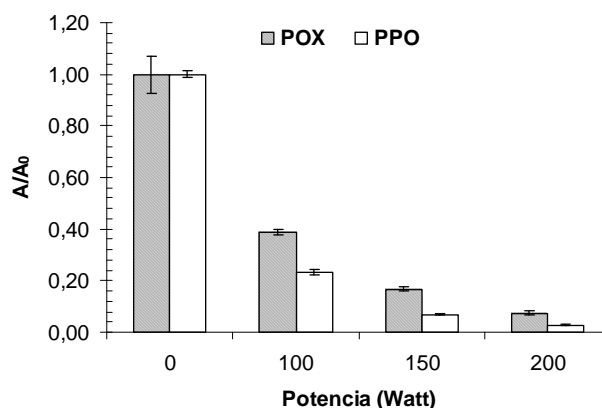


Figura 5.3. Actividad remanente relativa (A/A_0) de las enzimas peroxidasa (POX) y polifenol oxidasa (PPO) en los cilindros de tejidos de remolacha roja luego de 5 minutos de tratamiento por microondas, a potencias constantes de 100, 150 y 200 W. Las barras indican desviación estándar para $n=2$.

Al cabo de estos tratamientos por microondas, la pérdida de peso alcanzó de entre un 9 % y un 25 % y el grado de encogimiento entre un 6 % y un 17 % y ambos aumentaron conforme aumentó la potencia aplicada (**Tabla 5.1**). En particular, a los 5 minutos del tratamiento por microondas a 200 W, se alcanzó el 90 % de la inactivación de las enzimas (**Figura 5.3**), pero los cilindros de remolacha roja mostraron un alto grado de deformación que impide la aplicación de este proceso de escaldado por microondas para este tejido.

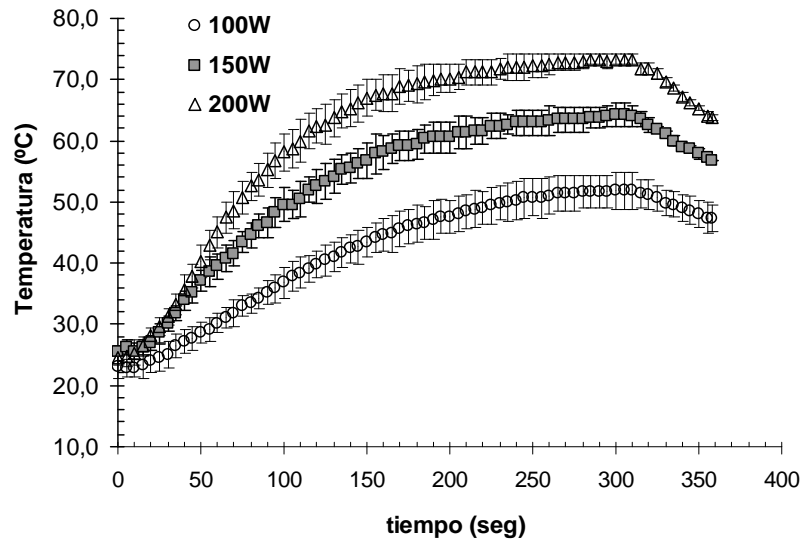


Figura 5.4. Perfiles de temperatura registrados en tejidos de raíz de remolacha roja durante el tratamiento de microondas a potencias constantes, 100 150 y 200 W. Se indican las temperaturas promedio y desviaciones estándar para $n=3$.

Akarapu y col. (2004) desarrollaron un modelo integrado térmico-electromagnético para describir el proceso de calentamiento por microondas. En sus ensayos, utilizaron un gel de proteína de suero en un paquete de dimensiones $140 \times 100 \times 30 \text{ mm}^3$ el cual fue fijado en el centro de la base del aplicador. Ellos observaron que la potencia del microondas era absorbida preferentemente en los dos extremos del paquete y, por lo tanto, las temperaturas más altas se localizaron cerca de los dos bordes. La simetría de la distribución de la temperatura fue consistente con la ubicación del paquete de alimento, colocado en el centro de la cavidad. Desde los bordes hacia el centro, la intensidad del calentamiento se redujo, mientras que pareció haber un calentamiento relativamente fuerte cerca del centro del paquete de alimento. Cuando el paquete de alimento se sumergió en agua y ambos, el paquete de alimento y el agua, se calentaron por las microondas,

la radiación se absorbió en la región central del paquete de alimento, lo que causó que el punto más caliente se produjera, en la región central del producto. Los resultados sugieren que el agua ayudó a redistribuir la potencia de calentamiento por microondas, permitiendo así que la potencia sea entregada en la región central del alimento envasado. Los autores llegaron a la conclusión de que el calentamiento por microondas es más efectivo cuando el paquete no está inmerso en agua. Sin embargo, en presencia de agua, la diferencia entre las temperaturas, máxima y mínima es aproximadamente de 30 °C menor al cabo de diez minutos de tratamiento. Este fenómeno es esperable porque el agua ayuda a redistribuir la energía de microondas, haciendo que la distribución del campo sea relativamente más uniforme en el paquete del alimento, además de producir cambios en el patrón de calentamiento. De acuerdo con estas conclusiones y con el propósito de inactivar las enzimas minimizando el daño del tejido, los siguientes tratamientos se desarrollaron con la presencia de agua en la cavidad del equipo.

5.3.2 Tratamientos por microondas en presencia de agua

Los ensayos preliminares, así como los antecedentes bibliográficos, dieron origen a una segunda serie de ensayos que involucraron la presencia de agua para la inmersión del tejido durante el tratamiento por microondas y ellos son descritos a continuación. Para los ensayos en presencia de agua los tratamientos llevados a cabo fueron: tratamientos por microondas a potencias constantes de 250 W, 350 W o 450 W y un procesamiento por microondas (denominado

90MW), el cual se desarrolló programando el equipo con potencias variables a fin de obtener en el tejido un perfil de temperaturas similar al registrado en el tratamiento convencional por conducción de calor en la muestra (inmersión del tejido en un baño de agua a 90°C).

Los datos experimentales obtenidos en estas experiencias muestran que las actividades residuales de POX y PPO se redujeron significativamente ($p < 0,05$) con el tiempo. Estos datos fueron, en general, adecuadamente ajustados por un modelo semi-logarítmico ($\alpha: 0,05; R^2 \geq 0,83$) como se observa en las **Figuras 5.5** y **5.6**. Ello permitió evaluar los tiempos necesarios para alcanzar un 90 % de destrucción enzimática cuando los datos experimentales para ese nivel de destrucción no estaban disponibles.

Es de destacar que se observó un período *lag* antes del comienzo de la inactivación enzimática para POX a 350 W, 450 W y PPO para los mismos tratamientos 350 W y 450 W.

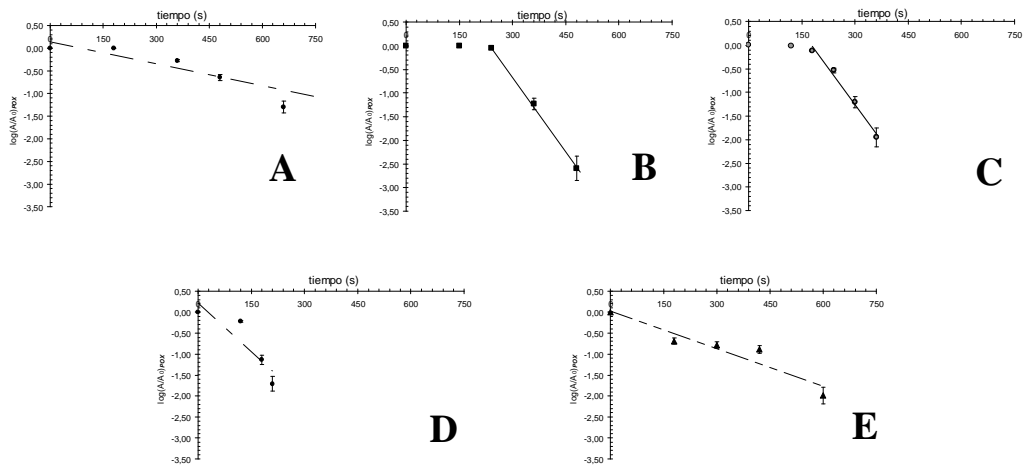


Figura 5.5 Actividad residual experimental de la enzima POX vs el tiempo para los tratamientos por microondas a potencia constante 250 W (A), 350 W (B) y 450 W (C), tratamiento a potencia variable 90MW (D) y tratamiento convencional por inmersión del tejido en baño de agua 90C (E). Regresión de los datos experimentales ajustados al modelo semi-logarítmico.

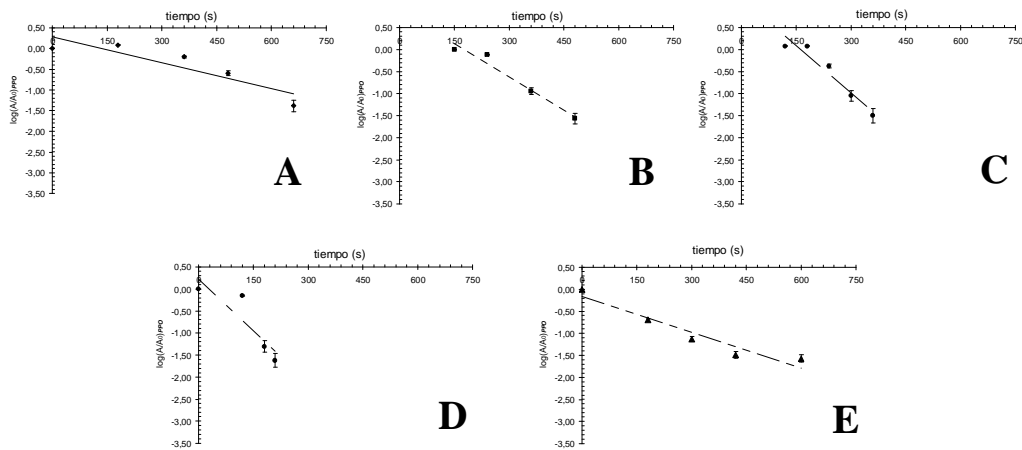


Figura 5.6 Actividad residual experimental de la enzima PPO vs el tiempo para los tratamientos por microondas a potencia constante 250 W (A), 350 W (B) y 450 W (C), tratamiento a potencia variable 90MW (D) y tratamiento convencional por inmersión del tejido en baño de agua 90C (E). Regresión de los datos experimentales ajustados al modelo semi-logarítmico.

Los perfiles de temperatura de las muestras y de potencia de salida observados durante el trabajo experimental, se muestran en la **Figura 5.7** paneles **A** y **B**, respectivamente. La temperatura del tejido aumentó más rápidamente a mayor potencia de microondas empleadas. Para el tratamiento 90MW el aumento de la temperatura en el tejido fue similar al obtenido en el tratamiento convencional (90C) alcanzando el objetivo del perfil de temperatura programado en el equipo.

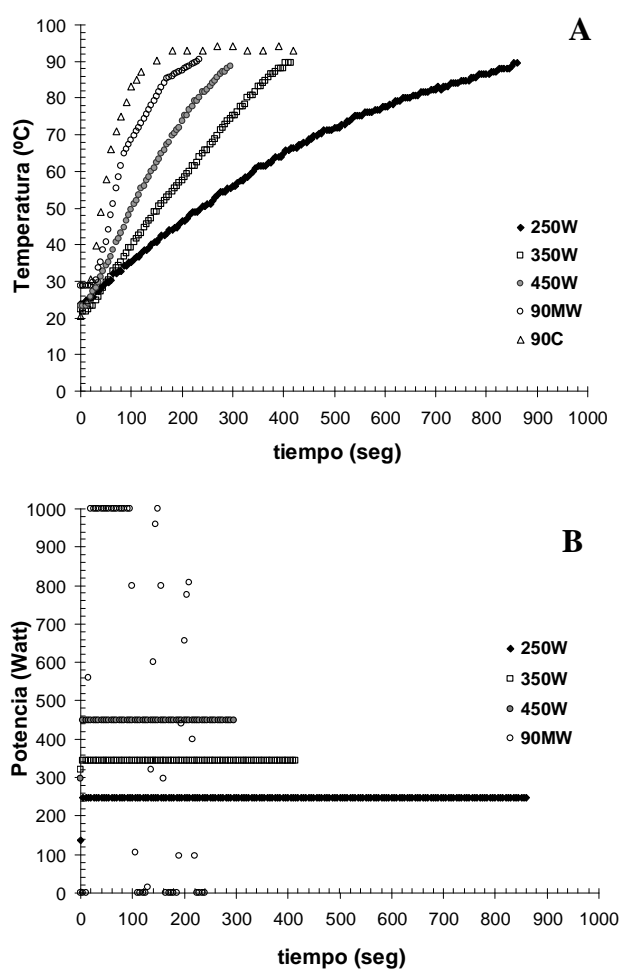


Figura 5.7 Perfiles de temperatura (**A**) y potencia (**B**) en función del tiempo para el tejido de raíz de remolacha tratado por microondas a potencias constantes de 250 W, 350 W, 450 W y potencia variable (90MW) y para el tratamiento 90C. Tiempos experimentales necesarios para alcanzar al menos el 90% de inactivación de POX y PPO, según cada tratamiento.

En la **Figura 5.8** se muestran los tiempos necesarios para alcanzar un 90 % de destrucción enzimática para cada proceso de escaldado estudiado. Se puede observar en la figura que dicho tiempo decreció con el aumento de potencia saliente o sea con el aumento de la temperatura (**Figura 5.7**) y que, a excepción del tratamiento a 250 W, los tratamientos por microondas requirieron menor tiempo que el tratamiento convencional, siendo el tratamiento 90MW el que requirió menos tiempo para la destrucción de la enzima más resistente.

La enzima POX requirió mayor tiempo (7 minutos) para su destrucción que PPO cuando se llevó a cabo el escaldado tradicional por inmersión en agua a 90 °C (tratamiento 90C). Bajo un perfil temperatura-tiempo similar, pero alcanzado con radiaciones de microondas (tratamiento 90MW), la inactivación efectiva de POX y PPO se consiguió en un tiempo más corto (2 minutos de aplicación de radiación de microonda y un minuto de venteo). De acuerdo a Matsui y col. (2008), como las microondas pueden transferir energía a través del volumen del material, existe la posibilidad de reducir el tiempo de procesamiento y mejorar la calidad global. También se necesitó un tiempo levemente mayor para reducir la actividad de POX que la de PPO en el tratamiento a 250 W. Para 350 W y 450 W, PPO requirió más tiempo de procesamiento. Usando un tratamiento de alta presión con dióxido de carbono, a 4,5 MPa, Liu y col. (2008 a, b) determinaron que el tiempo necesario para la destrucción de PPO en extractos de remolacha roja era de 52,6 min, mientras que fueron necesarios 87,7 minutos para la inactivación de POX, siendo ésta la enzima más resistente. De acuerdo con

Matsui y col. (2008), para temperaturas superiores a 77 °C y en agua de coco, PPO es más resistente al procesamiento con microondas que POX.

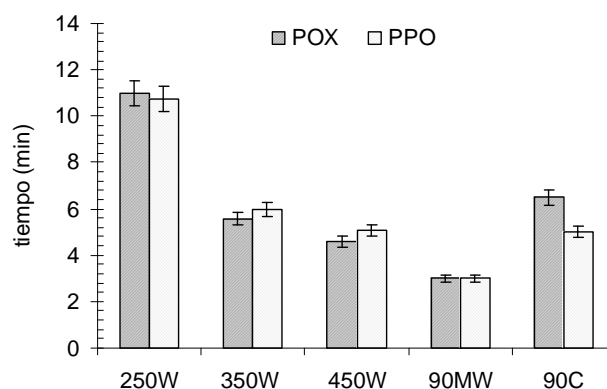


Figura 5.8 Tiempo necesario para la destrucción del 90 % de las enzimas para cada tratamiento. El tiempo informado incluye el tiempo de venteo (1 min). Los tratamientos informados son los realizados con radiación de microondas a potencias de 250 W, 350 W y 450 W o con un perfil de temperatura similar al del tratamiento tradicional, el cual se denominó como 90MW. El tratamiento tradicional se nombra como 90C.

En la **Figura 5.9A** se pueden observar los perfiles de temperatura del agua de inmersión de los cilindros de remolacha y los del punto central de los cilindros. Para los tratamientos por microondas 250 W, 350 W y 450 W, la temperatura del agua de inmersión fue siempre menor que la alcanzada en el centro de los cilindros de tejido, contrario a lo observado habitualmente durante un escaldado convencional tal como es el caso del tratamiento 90C donde el calor es transferido del agua al tejido debido a la alta temperatura del agua. El perfil de temperatura del agua para el tratamiento por microondas 90MW, coincide con el del centro de los cilindros y mas allá de los 2 minutos de tratamiento, la temperatura del agua de inmersión se incrementó ligeramente respecto a la temperatura del tejido (**Figura 5.9B**). Por lo tanto, en general, se puede descartar

la transferencia de calor del agua a la muestra como mecanismo que contribuya al aumento de la temperatura de los tejidos, al menos como factor principal de calentamiento.

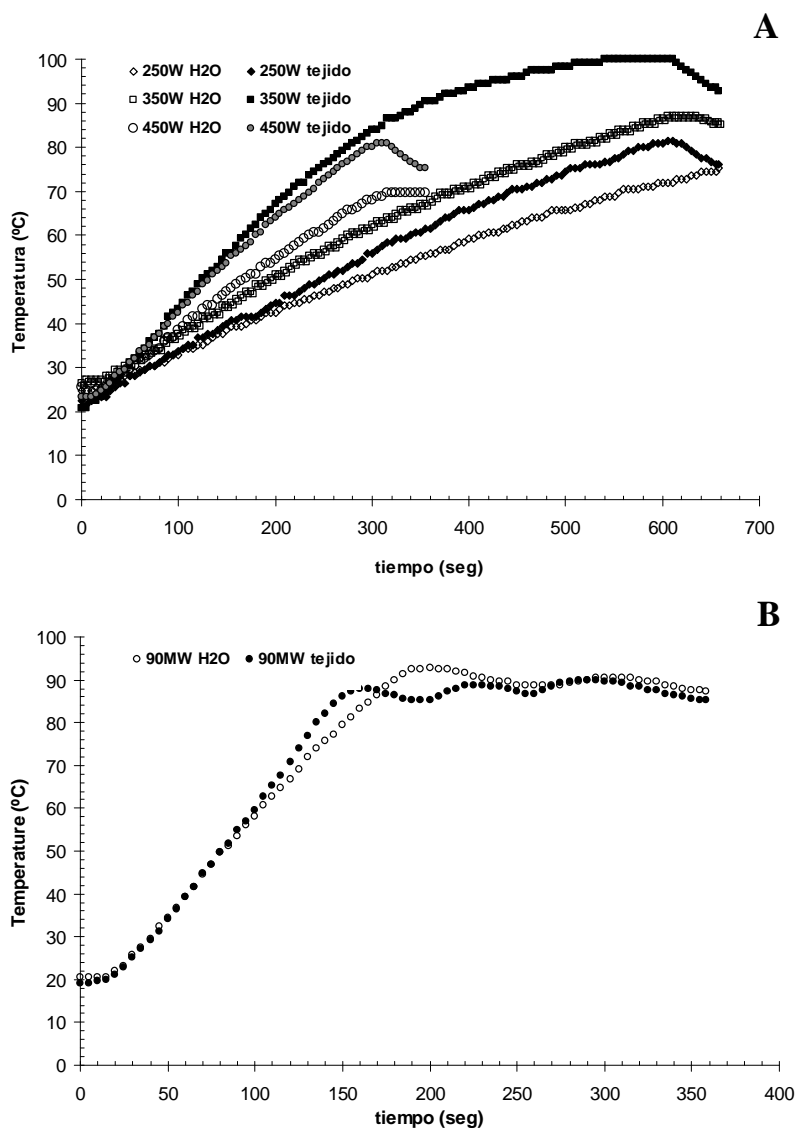


Figura 5.9 Perfiles de temperatura registrados en el centro de los cilindros de remolacha y en el agua de inmersión durante los tratamientos por microondas. **(A)** Tratamientos de microondas a potencias constantes 250 W, 350 W y 450 W. **(B)** Tratamiento de microondas con potencia variable (90MW). Los registros están informados a tiempos extendidos más allá de alcanzado el 90% de inactivación de la enzima más resistente.

Se sabe que el agua pura presenta un valor alto de la constante de permitividad dieléctrica relativa (ϵ_r) de 80 a 20 °C y 1 Hz, y 55,3 a 100 °C y 1 Hz, comparada con otros solventes. La química basada en las radiaciones de microondas se sustenta en la capacidad de la mezcla de reacción de absorber eficientemente la energía de microondas, aprovechando el fenómeno de *calentamiento dieléctrico por microondas*. En la mayoría de los casos esto significa que el solvente utilizado para una transformación determinada, debe ser capaz de absorber las microondas. La habilidad de un solvente específico para convertir la energía de microondas en calor a una dada frecuencia y temperatura es determinado por la tangente de pérdida ($\tan \delta$), expresada como el cociente entre la pérdida dieléctrica ϵ'' (indicador de la eficiencia con la cual la radiación electromagnética se transforma en calor) y ϵ' (constante dieléctrica que describe la habilidad de las moléculas para ser polarizadas por el campo eléctrico). Para una buena absorción de energía y consecuente calentamiento efectivo cuando se opera con una frecuencia estándar en un reactor de síntesis de microondas (2,45 GHz), la reacción requiere de un medio con una alta $\tan \delta$ (Dallinger y Kappe, 2007). El agua presenta un valor de $\tan \delta \approx 0,123$ (Wathey y col, 2002) mientras que el etanol se caracteriza por un $\tan \delta \approx 0,941$ ($\epsilon_r = 30$ a 20 °C). Los valores relativamente bajos de $\tan \delta$ justifican el perfil más bajo de temperatura mostrado por el agua pura donde los cilindros de remolacha estuvieron inmersos durante el tratamiento por microondas (**Figura 5.9**), mientras que las temperaturas en el punto central de los cilindros de tejido fue mayor debido a la presencia de iones y moléculas polares en solución (célula) que incrementan significativamente la

habilidad del solvente para convertir las radiaciones electromagnéticas en calor (Wathey y col., 2002; Dallinger & Kappe, 2007). Aunque la radiación electromagnética con la frecuencia de microondas no es *per se* suficiente para romper enlaces puente de hidrógeno, la absorción de microondas que lleva a un aumento de la rotación a nivel atómico en las moléculas, puede disminuir la barrera de energía de las reacciones (teoría de colisión) como las de inactivación enzimática (desnaturalización de proteínas) aquí evaluadas. En este sentido, Perreux y Loupy (2001) reportaron que los efectos específicos de microondas no son puramente térmicos y puede considerarse la posibilidad de que tengan múltiples orígenes. Estos efectos pueden ser relacionados a la ley de Arrhenius [$k=A.exp(-\Delta G^\ddagger/RT)$] y pueden resultar de la modificación de alguno de los términos de la expresión. El factor pre-exponencial "A" representa la probabilidad de los *choques* moleculares. Se sabe que la eficiencia de colisión es efectivamente afectada por la orientación mutua de las moléculas polares. Como el factor pre-exponencial depende de la frecuencia de vibración de los átomos en la interfase de reacción, se podría postular que el campo de microondas podría afectarlo. La mayor velocidad de difusión, podría ser explicada por el aumento del valor pre-exponencial, sin cambios en la energía de activación. Por otro lado, la disminución de la energía de activación (ΔG^\ddagger) es ciertamente un efecto importante. Al considerarse las contribuciones al valor de ΔG^\ddagger , de los términos en la ecuación $\Delta H^\ddagger - T.\Delta S^\ddagger = \Delta G^\ddagger$, podría predecirse que la magnitud del término entrópico ($-T.\Delta S^\ddagger$), podría incrementarse en una reacción inducida por las microondas, por ser éste un sistema más organizado por la organización dipolar,

cuando se lo compara con el calentamiento tradicional. Los menores tiempos observados en el presente trabajo, para la inactivación enzimática con tratamiento por microondas (350 W, 450W y 90MW) podrían atribuirse a efectos específicos *no térmicos* ausentes en el tratamiento de escaldado convencional (90C).

Lui y col. (2010) atribuyeron las diferencias en la inactivación de las enzimas a un efecto *no térmico* producido por las microondas. Heddleson & Doores (1994) afirmaron que la penetración de las microondas promueve una mayor velocidad de calentamiento y también tiene un efecto *no térmico* en la inactivación de enzimas, lo que reduce el impacto de la temperatura y mejora la retención de los componentes termo-lábiles y las características sensoriales. En este sentido los estudios de Porcelli y col. (1997) y Roy y Grupta (2003) junto a otros, también propusieron que un mecanismo *no térmico* de acción letal existe, siendo dicho efecto atribuible sólo a la naturaleza intrínseca de las microondas y sin relación con la letalidad causada por el calor. Sin embargo otros estudios, como el de Shazman y col. (2007) sobre la reacción de Maillard, desnaturalización de las proteínas y la solubilidad polimérica, informaron que los datos experimentales no mostraron efectos significativos *no térmicos*.

5.3.2.1 Modelado de la inactivación

En la **Tabla 5.2** se informan los parámetros cinéticos ajustados D_{Tref} y z usando la temperatura de 90 °C como temperatura de referencia y para ambas enzimas (POX y PPO). Los valores se calcularon a través de la **ecuación 5.7** utilizando un estimador inicial de dichos parámetros. En dicha tabla también se informa la suma de cuadrado del error (SCE), la cual surge del ajuste usando la **ecuación 5.8**.

La **Figuras 5.10** muestra las actividades residuales de las enzimas POX y PPO vs los tiempos equivalentes o efectivos (t_{ef} ; **ecuación 5.6**). Se puede observar la bondad del ajuste ($R^2 \geq 0,84$; $\alpha: 0,05$) para el modelo y para los tratamientos 450 W y escaldado convencional (90C), a modo de ejemplo.

Tal como se puede observar al comparar los valores de D_{Tref} de la **Tabla 5.2** para el tratamiento de escaldado convencional (90C), POX presentó un menor D_{Tref} (24 seg) que PPO (44 seg) a 90 °C. Cuando el proceso 90MW es desarrollado, las muestras siguen un perfil de temperatura similar al del escaldado convencional (90C), como ya ha sido mencionado (**Figura 5.7A**) y los valores de D_{Tref} para POX (2 s) y PPO (8 s) obtenidos fueron mucho menores que para el tratamiento convencional (90C).

Tabla 5.2 Inactivación de POX y PPO en tejido de raíz de remolacha. Para los distintos tratamientos, se reportan los parámetros cinéticos ajustados ($D_{T_{ref}}$ y z) y SCE. La temperatura de 90 °C se usó como temperatura de referencia.

Tratamiento	$D_{T_{ref}}(s)^1$	z (°C) ¹	SCE ²
POX			
250W	47	68	0,187
350W	3	24	0,063
450W	7	39	0,124
90MW	2	5	0,017
90C	24	3	0,175
PPO			
250W	38	57	0,220
350W	8	30	0,037
450W	8	39	0,169
90MW	8	25	0,289
90C	44	80	0,029

¹ Calculado de acuerdo a la **ecuación 5.7**

² Calculado de acuerdo a la **ecuación 5.8**

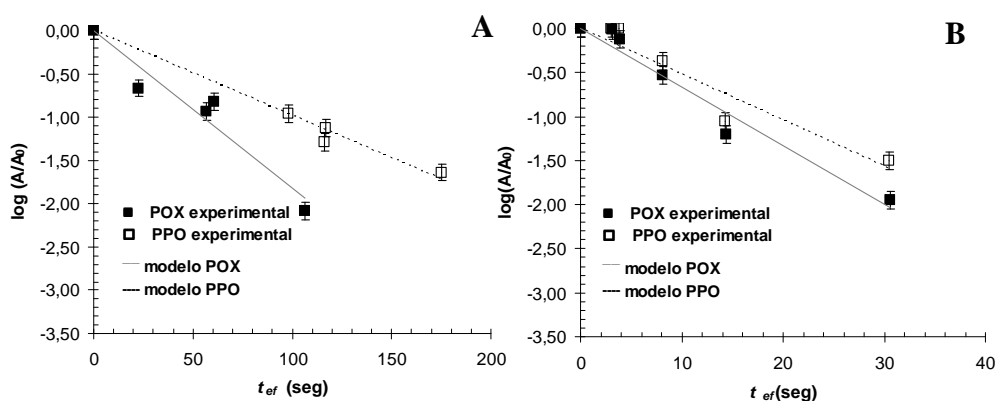


Figura 5.10 Actividad residual (A/A_0) de peroxidasa (POX) y polifenol oxidasa (PPO) vs tiempo efectivo (t_{ef}) para **(A)** escaldado convencional (90C) y **(B)** tratamiento por microondas 450 W. Las barras de error corresponden a la desviación estándar ($n=2$).

También se puede observar en la tabla que los valores de D_{Tref} , tanto para POX como para PPO, fueron aproximadamente un orden de magnitud menor para las potencias de microondas superiores a 250 W cuando comparados con el tratamiento convencional 90C. Así mismo, un valor ligeramente mayor se obtuvo para POX a 250 W comparado con el de PPO, mientras que PPO mostró un mayor valor que POX en los tratamientos 350 W, 450 W (leve) y 90MW.

Siendo que D se ha definido como: $D=2,303/k$, los menores valores observados, en general, para los tratamientos con microondas mostrarían una más rápida destrucción (menor resistencia) de POX y PPO para dichos tratamientos. Además, es importante destacar que para cada tratamiento se observan diferentes relaciones de resistencia enzimática entre POX y PPO. Probablemente, efectos no térmicos específicos de las microondas (Heddleson y Doores, 1994; Perreux y Loupy, 2001; Liu y col., 2010) puedan explicar los menores valores de D_{Tref} observados para los tratamientos 350 W, 450 W y 90MW en comparación con 90C.

Por otro lado, en la **Tablas 5.2** se muestran los valores de z (sensibilidad a la temperatura) los cuales, en general, disminuyeron con el aumento de potencia empleada. Para POX el tratamiento 90MW mostró la mayor sensibilidad a los cambios de temperatura (menor valor de z) entre los tratamientos por microondas y a la vez su valor fue del orden de los valores obtenidos para el escaldado convencional (90C). Para PPO los menores valores de z observados corresponden

a los tratamientos 350 W y 90MW y ambos son similares entre sí. El escaldado convencional (90C) presentó el mayor valor de z para PPO. También se puede observar que para los tratamientos 90MW y 90C, los valores z para PPO fueron superiores a los valores de z correspondientes a POX, mostrando una mayor sensibilidad a la temperatura de la última enzima.

Es de destacar que la sensibilidad diferencial a la temperatura de cada enzima en cada tratamiento y los diferentes valores de D_{Tref} de cada enzima en cada tratamiento junto con el perfil específico de temperatura vs tiempo propio de cada tratamiento, determinaron los distintos tiempos necesarios para alcanzar el 90 % de destrucción enzimática en cada caso.

5.3.2.2 Ensayos mecánicos

5.3.2.2.1 Compresión

La firmeza de los tejidos tratados relativa a la del tejido control (sin tratamiento) no mostró diferencias significativas entre los distintos escaldados (**Figura 5.11**). Todos los tratamientos produjeron una reducción de la firmeza del $\approx 40-50$ %. Estas pérdidas observadas pueden ser atribuidas, en primer lugar, a la pérdida de la presión de turgor y en, segundo lugar, a rupturas adicionales de los entrecruzamientos entre polisacáridos de pared celular incluyendo los de la laminilla media, los cuales están involucrados en la adhesión célula-célula (Latorre y col., 2010; Rojas y col., 2010). Se sabe que temperaturas mayores a 20

°C (Waldron y col., 1997a,b) pueden inducir la β -eliminación en pectinas, como también a un cierto grado de hidrólisis glucósidica (Fry, 1986).

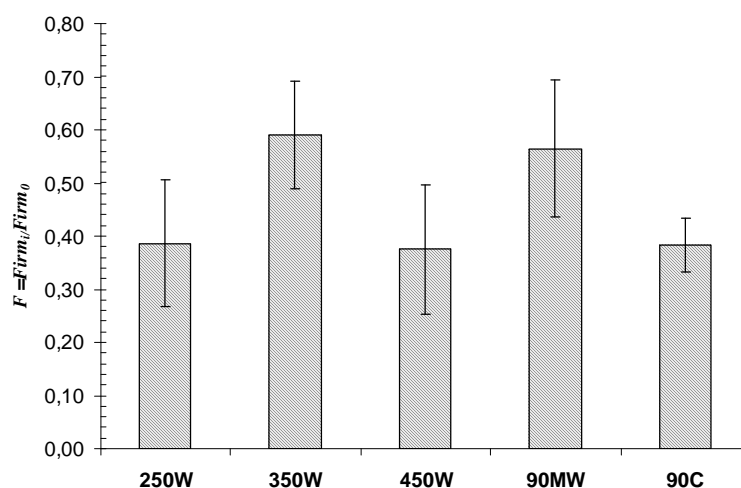


Figura 5.11 Firmeza (F) relativa evaluada como el cociente entre la $Firm_{(i)}$ o resistencia a fractura de los tejidos de raíz de remolacha roja tratados y la firmeza del tejido sin tratamiento ($Firm_0$) evaluada para los distintos tratamientos de escaldados por microondas (250 W , 350 W , 450 W y 90MW) y tratamiento de escaldado convencional (90C). La barras indican la desviación estándar para $n=10$.

5.3.2.2.2 Relajación

Los datos registrados en el ensayo de relajación del tejido, a deformación constante sin fractura, permitieron calcular la variación de la fuerza de relajación relativa ($F_{(t)}/F_0$) con el tiempo para los distintos tratamientos. Los resultados se ajustaron a un modelo mecánico constituido por dos elementos de Maxwell y un resorte aislado (F_{∞}/F_0) (**Figura 5.12A**). La fuerza de relajación relativa (F_{∞}/F_0), que es asociada al comportamiento elástico residual del tejido y principalmente

atribuida a la presión de turgor, disminuyó significativamente respecto al tejido control en todos los tratamientos de escaldado y especialmente al cabo del tratamiento por microondas 90MW. La fuerza de Maxwell F_1/F_0 asociada al tiempo de relajación característico τ_1 , aumentó significativamente para todos los tratamientos y mostró un valor máximo para el escaldado convencional (90C) y no se hallaron diferencias entre los tratamientos por microondas.

La pérdida de elasticidad residual (F_∞/F_0) que ocurrió después del procesamiento 90C fue principalmente ganada por el componente de fuerza de Maxwell (F_1/F_0) con la menor proporción de pérdida de energía por flujo. El componente de fuerza de Maxwell F_2/F_0 , asociado al menor tiempo de relajación (τ_2), fue considerablemente inferior que F_1/F_0 para el tejido control, mientras que mostró un significativo aumento para todos los tratamientos, con un máximo para el tejido escaldado de 90MW, indicando que este último se comportó como el material viscoelástico con la menor estructuración. Las fuerzas relativas residual (F_∞/F_0), así como el primer elemento (F_1/F_0) y segundo elemento (F_2/F_0) de Maxwell asociados a cada tiempo de relajación característico (τ_1 y τ_2 , respectivamente) se observaron como inversamente relacionados y sus cambios con los tratamientos pueden ser atribuidos a la disminución de densidad de entrecruzamientos asociado con/a cambios en los polisacáridos de laminilla media y pared, así como también a la pérdida de turgor (Fry, 1986; Latorre y col, 2010).

Para todos los tratamientos el tiempo característico de relajación mayor (τ_1) decreció en comparación con el tejido control (**Figura 5.12B**). Más aún, el tejido escalado por microondas 90MW mostró el menor valor del tiempo característico de relajación τ_1 y el mayor valor de τ_2 , ambos factores indican que una alta proporción del esfuerzo aplicado se perdió a través del flujo. Aunque los tejidos sometidos a los tratamientos 90MW o 90C mostraron perfiles similares de temperatura (**Figura 5.7A**) un daño mayor se observó para el primero y esta tendencia puede ser atribuida a los efectos *no térmicos* de las microondas a potencia superior a 900W. Somani Omprakash y col. (2003) mencionaron la posibilidad de la ruptura de enlaces de hidrógeno después de los tratamientos de microondas, que puede ocurrir como consecuencia de la disminución de la barrera energética de las reacciones o del factor pre-exponencial relacionado, como ha sido mencionado anteriormente (Bohr y Bohr, 2000; Perreux y Loupy, 2001).

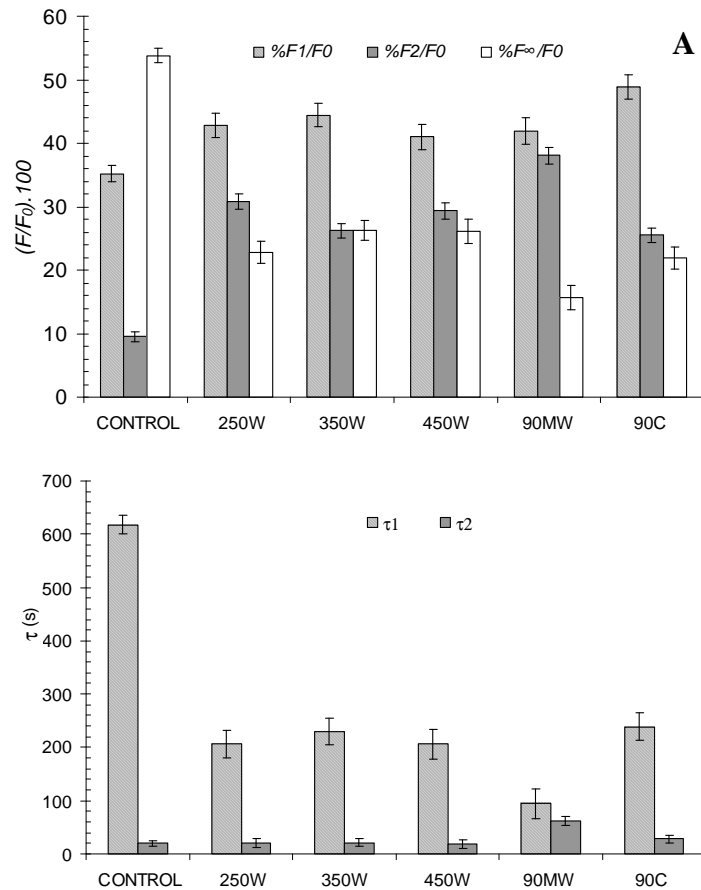


Figura 5.12 Parámetros correspondientes al ensayo de relajación obtenidos a partir del ajuste de los datos experimentales al modelo de Maxwell generalizado (A) Fuerza de relajación relativa. (B) tiempos característicos de relajación. Los tratamientos informados corresponden a los escaldados por microondas a potencia constante 250, 350 y 450 W o bajo potencia variable 90MW y el escaldado convencional (90C). Los parámetros del tejido control son también informados. Las barras de error indican desviación estándar para $n=10$.

5.3.2.3 Color

La raíz de remolacha roja acumula betacianinas, principalmente betanina, durante el almacenamiento (Sepúlveda-Jiménez y col., 2004). Las betalainas (betacianinas y betaxantinas) son los pigmentos principales en la raíz de la remolacha roja y protegen a la planta contra los daños causados por la luz UV y visible, además de otras funciones de pigmento (Yoshikazu y col., 2008). Las betalainas se encuentran localizadas en las vacuolas de las células de las plantas de orden *Caryophyllales*. La presión de turgor es perdida en general a consecuencia del procesamiento lo que produce fundamentalmente desnaturalización de las membranas celulares, pudiendo verse afectado el color como resultado de la compartimentalización de los pigmentos.

Como puede observarse en la **Figura 5.13**, todos los tratamientos térmicos en general produjeron una disminución de las funciones del color; luminosidad L^* y las coordenadas cromáticas a^* (disminución del rojo) y b^* (corrimiento al azul). Esta tendencia, pareciera ser exaltada frente al aumento de las potencias aplicadas entre 250 y 450 W, aunque las diferencias no son siempre significativas. La misma tendencia se observó para el tejido sometido al escaldado convencional (90C), pero L^* , a^* y b^* mostraron el menor cambio con respecto al control para este tratamiento. Como consecuencia, la diferencia de color total (DCT) fue menor para el escaldado convencional en agua a 90 °C, mientras que aumentó con la potencia entre 250 y 450 W, sin cambios adicionales para el tratamiento de microondas 90MW.

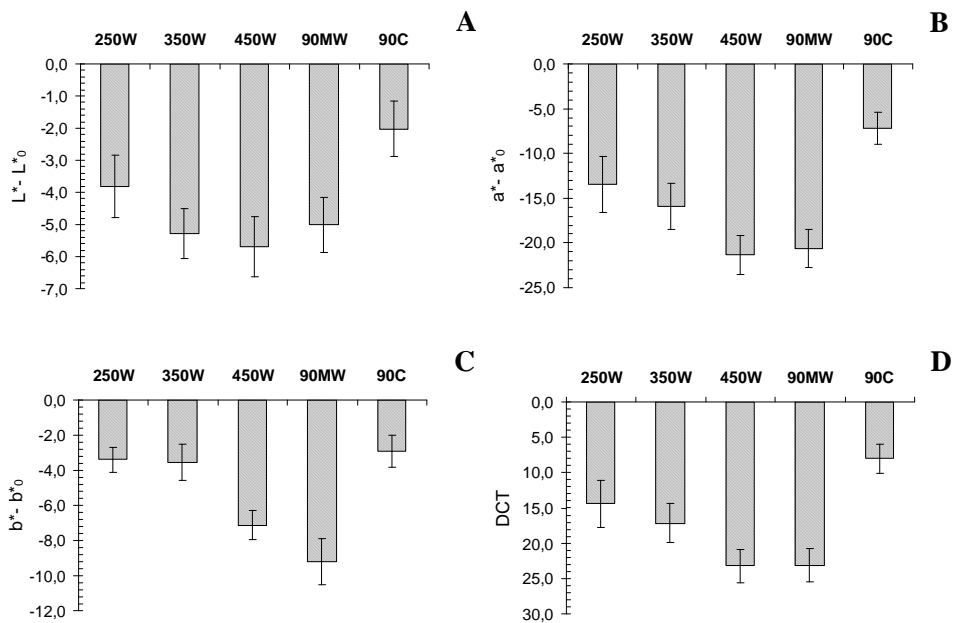


Figura 5.13. Cambios de las funciones de color CIELab (A) $L^*-L_0^*$ (luminosidad), (B) $a^*-a_0^*$ (grado de rojo/verde) y (C) $b^*-b_0^*$ (grado de azul/amarillo) y (D) diferencia de color total (DCT). Se muestran los resultados correspondientes a los tejidos de remolacha roja escaldados por inmersión en agua a 90 °C (90C) y tratamientos de microondas a potencias constantes (250, 350, 450 W) y potencia variable (90MW). Las barras indican la desviación estándar para $n = 10$.

5.3.2.4 Eficiencia energética del proceso

El consumo de energía del proceso se evaluó y los resultados se informan en la **Tabla 5.3**. El escaldado por microondas a 350 W, 450 W y el tratamiento 90MW fueron los tratamientos que mostraron menor consumo de energía para producir el decrecimiento de la actividad de ambas enzimas al 10 % del valor inicial mientras que el proceso 90MW fue el más eficiente si lo que se busca es un tiempo de proceso más corto. (**Figura 5.8**). El procesamiento tradicional (90C)

mostró requerimientos de energía mayores que los previamente mencionados. Se debe destacar que la energía emitida por el equipo empleado tomó valores de 4530 J/g, 2847 J/g, 2960 J/g y 2857 J/g para los tratamientos 250 W, 350 W, 450 W y 90MW. El cociente entre la energía consumida y la emitida para estos cuatro tratamientos de microondas dio valores de 0,43, 0,59, 0,55 y 0,55, mostrando una mayor pérdida energética para el tratamiento 250 W.

Tabla 5.3. Energía requerida para la destrucción del 90 % de ambas enzimas en *Beta vulgaris* L. var. conditiva. Los tratamientos informados son los realizados con radiación de microondas a potencias de 250 W, 350 W y 450 W o con un perfil de temperatura similar al del tratamiento tradicional (90MW) y el tratamiento tradicional (90C).

Tratamiento	Energía consumida ¹ (J/g remolacha)
250W	1941
350W	1687
450W	1614
90MW	1577
90C	2693

¹El tiempo usado para el cálculo fue el necesario para la destrucción del 90% de la enzima más resistente en cada caso.

Tang y col. (2010) investigaron el efecto de la radiación de microondas sobre las membranas celulares de los microorganismos presentes en los efluentes. Los investigadores estudiaron las muestras antes y después de la exposición, mediante microscopía. A modo de ejemplo de los daños causados por las radiaciones de microondas, la presencia de *Arcella hemisphaerica*, utilizada a

menudo para evaluar la calidad de los efluentes, fue seleccionada como indicador de la presencia de microorganismos. Los resultados experimentales mostraron que el grado de daño en las membranas celulares aumenta con el incremento del consumo de energía, pero también observaron un punto de máxima eficiencia para un consumo intermedio de energía.

Hasta aquí han sido evaluados los efectos del tratamiento por microondas (a potencias constantes 250, 350, 450 W y potencia variable tratamiento 90MW) y el tratamiento de escaldado convencional por inmersión en agua a 90 °C, para inactivar las enzimas peroxidasa (POX) y polifenol oxidasa (PPO) y junto a ello los cambios en la textura y el color del tejido, así como el tiempo y el consumo de energía de cada sistema alcanzada la inactivación enzimática del 90 %.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los tratamientos por microondas, el tratamiento 350 W surge como interesante por la economía energética, un cambio moderado de color y de textura; el tratamiento 90MW resulta interesante por la economía de tiempo y energética. El tratamiento 90C a su vez presenta menor cambio de color. Es así que para la profundización del conocimiento sobre los efectos de las radiaciones de microondas en el tejido de *Beta vulgaris* L. var conditiva, se eligieron los tratamientos 350 W, 90MW y 90C. Para el estudio de contenido de pigmentos, de composición de pared y microestructura.

5.3.3 Ensayos adicionales de los tratamientos de interés

5.3.3.1 Pigmentos de remolacha roja

Como se ha descrito anteriormente, las betalaínas (betacianinas y betaxantinas) son los principales pigmentos de las raíces de remolacha roja y además protegen al tejido contra daños causados por factores externos (Yoshikazu y col., 2008). El contenido de betacianina y betaxantina fue determinado en los tejidos de remolacha roja luego de los tratamientos de interés. El contenido de pigmentos en los tejidos escaldados por microondas disminuyeron de forma significativa ($p < 0,05$) respecto al contenido en el tejido control en un 27-30 % para las betacianinas y en un 13 % y 30 % para las betaxantinas en los tratamientos 350W y 90MW, respectivamente (**Figura 5.14**). Como ha sido previamente observado en el tejido de raíz de remolacha roja tratado con radiación gamma, en el caso de radiaciones de microondas las betacianinas fueron más sensibles a las microondas que las betaxantinas.

El escaldado convencional por inmersión del tejido en agua a temperatura constante de 90 °C (90C) produjo sólo una ligera disminución en el contenido de betacianinas en relación con el contenido en el tejido control, pero ningún cambio significativo en el nivel de betaxantinas fue observado (**Figura 5.14**).

Los resultados referentes a pigmentos fueron coherentes con los obtenidos en la evaluación del color de los tejidos de remolacha para los distintos tratamientos de escaldado en los cuales se logra el 90 % de inactivación

enzimática (**Figura 5.13**) y que han sido informados previamente. Es así que la diferencia de color total (DCT) fue mayor para el tratamiento 90MW que para el tratamiento 350W y ambos mostraron un DCT mayor que el tratamiento 90C.

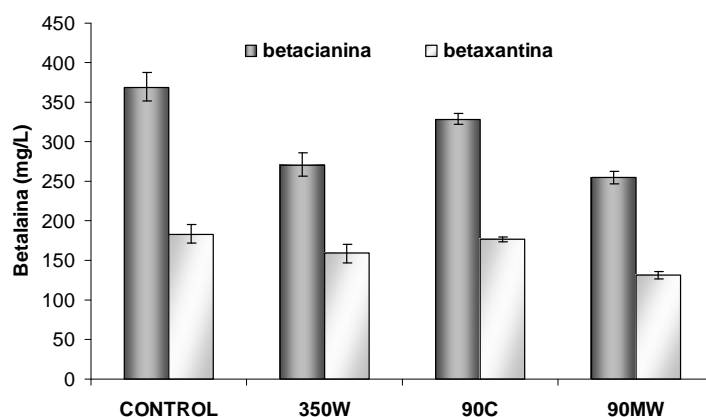


Figura 5.14 Contenido de betacianinas y betaxantinas en los jugos extraídos de los tejidos de raíz de remolacha roja sin tratamiento (control); y luego de los tratamientos de escaldado por microondas (350W, 90MW) y escaldado conveccional (90C). Las barras indican desviación estándar para $n=3$.

Ihl y col. (1998) estudiaron el escaldado de alcachofas en agua, vapor y escaldado por microondas siendo la clorofilasa la enzima de control de proceso. Se observó que para estos tratamientos los valores de croma disminuyeron con el tiempo de escaldado, pero la mayor pérdida de pigmentos, se produjo en las alcachofas en el escaldado con vapor. Avisse y Varoquaux (1977) estudiaron el escaldado de duraznos con microondas a 700 W, como tratamiento previo a ser congelados. Y observaron al cabo de 6 meses de almacenamiento y posterior descongelación, que los tejidos de duraznos escaldados mostraban menor oscurecimiento. Begum y Brewer (1996) estudiaron el escaldado de espárragos

durante 4 minutos en agua hirviendo y con radiaciones de microondas y concluyeron que después de un almacenamiento a temperaturas de congelación, todas las muestras resultaron más oscuras que los tejidos frescos y que no hubo diferencias entre las muestras tratadas mediante los distintos procedimientos de escaldado. Cano y col. (1997) estudiaron el color de banana congelada previamente escaldada a través de vapor o con microondas y observaron que después de calentamiento por microondas se produjeron fenómenos de pardeo, mientras que muestras tratadas con vapor no mostraron cambios significativos de color.

5.3.3.2 Composición química de pared celular

La integridad de los tejidos vegetales multicelulares depende de la adhesión efectiva entre las células que los componen. Esta adherencia obedece a diferentes entrecruzamientos (*cross-linking*), interacciones iónicas, covalentes o débiles, entre las macromoléculas presentes. Para explorar este aspecto, los componentes de la pared celular fueron aislados de los tejidos tratados hasta el 90 % inactivación enzimática, así como del tejido sin tratamiento (control). Los residuos insolubles en alcohol (RIA) extraídos están constituidos principalmente por los polímeros de la pared celular.

La **Tabla 5.4** muestra los rendimientos y composición de la pared celular del tejido sin tratamiento (control), así como las correspondientes a los tejidos de

raíz de remolacha escaldadas por microondas y por el tratamiento convencional. El rendimiento de RIA obtenido a partir del tejido control fue de 3,6 % y este valor mostró variaciones sólo de un 5 % para los tejidos de raíz tratados (**Tabla 5.4**). Greve y col. (1994) en cambio, observaron importantes diferencias para los tejidos de zanahoria escaldados por inmersión en agua hirviendo. Por lo tanto, las paredes celulares del tejido de remolacha pueden considerarse estables y resistentes al tratamiento de escaldado convencional o por microondas respecto a la pérdida de polímeros, al menos durante el tiempo involucrado en cada uno de los tratamientos ensayados.

Las pectinas, que en parte pueden ser más solubles en agua que otros polímeros de la pared celular, no parecieron sufrir depolimerización por β -eliminación de sus cadenas de homogalacturonanos (HG) altamente metoxilados, como es esperable que ocurra al cabo de tratamientos que involucran ascenso de temperatura (van Buggenhout y col., 2009). O probablemente, las pectinas de remolacha fueron capaces de persistir ancladas en la red de la pared celular más allá de que haya ocurrido un cierto grado de degradación. Fissore y col. (2010) encontraron una mayor proporción de arabinanos en las cadenas laterales de RG-I (relación molar; Ara/Rha = 17) de las pectinas de remolacha roja. Estos autores observaron además que la arabinosa en los RG-I podría anclar estas pectinas a la pared celular por entrecruzamientos con la red de celulosa (Fry, 1986), protegiéndolas mejor de la hidrólisis ácida a pH 2,0 con una solución acuosa de ácido cítrico.

Como se observa en la **Tabla 5.4**, los polímeros de la pared celular están constituidos principalmente por hidratos de carbono (≈ 85 % base seca del RIA). El contenido de celulosa representó el 30-37 % (RIA bs), mientras que los hidratos de carbono no celulósicos están presentes en un ≈ 50 % (RIA bs). Siendo un ≈ 35 % (RIA bs) de azúcares neutros (AN) y un ≈ 15 % (RIA bs) de ácidos urónicos. Según lo reportado, por Fissore y col. (2010) se sabe que al menos el 50 % del contenido de AN es arabinosa. Por otro lado, las proteínas de pared celular se encuentran presentes en un 12 % (RIA bs) y la lignina en un 1,9-2,5 % (RIA bs). La composición de la pared celular fue similar en todos los tejidos (control y tratados). Además, el contenido de humedad, así como el grado de acetilación (GA) y metilación (GM) de los ácidos urónicos no mostraron cambios con el procesamiento. Los resultados del GA y GM indican pectinas altamente acetiladas y metoxiladas tal como es esperable del tejido de raíz de remolacha. El mayor contenido de lignina se observó en el RIA correspondiente al tejido de remolacha sometido al tratamiento 350W mientras que una tendencia no significativa a la disminución se encontró en el RIA extraído a partir de tejido tratado por microondas a altas potencias (tratamiento 90MW). Cierta tendencia a un mayor contenido de fenoles totales de pared celular se observó sólo en los tejidos tratados con potencia de 350 W, probablemente por el mayor contenido en compuestos ferúlicos (**Tabla 5.4**). Mayores contenidos de lignina y compuestos ferúlicos en tejidos tratados con potencias de 350 W pueden ser indicativos de la actividad de POX como una respuesta al estrés térmico y no térmico de las microondas. En dicha condición de tratamiento, POX podría haber tenido el

tiempo suficiente (presencia de una fase *lag* \approx 4 min. **Figura 5.5**) para catalizar la formación y acumulación de lignina y de compuestos ferúlicos. Estos últimos también podrían estar involucrados en algún grado, en el entrecruzamiento de pectinas catalizado por la enzima POX (Passardi y col., 2004) en las paredes celulares de los tejidos tratados con potencias de 350 W. La exposición de los seres vivos a radiaciones ionizantes y no ionizantes constituye una importante fuente exógena de especies reactivas a oxígeno (ROS). Las radiaciones que tienen la energía suficiente para producir la vibración de los átomos en una molécula, pero no para remover los electrones, se conocen como radiaciones *no ionizantes* de acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA). Las microondas son un ejemplo de radiación no ionizante. Yamaguchi y col. (2001) determinaron que la actividad de captación de los radicales y el contenido de ácido ascórbico de los vegetales cocidos en un horno de microondas durante 1, 3 y 5 minutos fueron generalmente más altos que en aquellos tejidos cocinados en agua en ebullición. En el presente trabajo, POX podría haber catalizado la reducción de H_2O_2 , la cual puede originarse como respuesta a la injuria del tejido debido al tratamiento por microondas a 350 W, mediante la toma de electrones de los donantes tales como los compuestos fenólicos, dando origen a compuestos ferúlicos y precursores de lignina, para llevar a cabo cierta lignificación. El entrecruzamiento de las cadenas laterales de arabinogalactanos por puentes de éster del ácido ferúlico (covalente) en pectinas de remolacha también podría haber ocurrido. La síntesis de fenoles puede aumentar *in vivo* como consecuencia de la

estimulación del camino enzimático en respuesta a los mayores requerimientos de entrecruzamiento de los biopolímeros de la pared celular.

Tabla 5.4 Rendimiento y composición química de los RIA del tejido sin tratamiento (control) y de los tejidos de remolacha roja escaldados por inmersión en agua a 90 °C (90C); por microondas a potencia constante (350W) y a potencia variable (90MW).

	CONTROL	350W	90C	90MW
RIA (g/100g tejido)	3,6	3,4	3,4	3,8
Contenido de humedad (g H ₂ O/100 g RIA) ¹	6,6 ± 0,6 ^a	6,9 ± 0,1 ^a	6,3 ± 0,1 ^a	8,1 ± 0,1 ^b
Proteína ¹ (g/100 g RIA bs)	11,9 ± 0,9	11,5 ± 0,2	11,6 ± 0,4	11,8 ± 0,1
Celulosa ¹ (g/100 g RIA bs)	37 ± 3 ^a	35 ± 1 ^a	30 ± 3 ^b	31 ± 1 ^b
Carbohidratos no-celulósicos ¹ (g/100 g RIA bs)	49 ± 3 ^{ab}	49 ± 3 ^{ab}	56 ± 4 ^a	40 ± 1 ^b
Contenido de AU ¹ (g/100 g RIA bs)	16 ± 1 ^{ab}	14,6 ± 0,3 ^a	15,9 ± 0,1 ^{ab}	17,0 ± 0,5 ^b
Grado de Metilación (GM) ^{1,2} (% molar)	53,3 ± 0,5	54,4 ± 0,9	55 ± 8	54,0 ± 1,0
Grado de Acetilación (GA) ^{1,3} (% molar)	84 ± 6 ^a	96 ± 5 ^b	87 ± 2 ^{ab}	88 ± 2 ^{ab}
Lignina ¹ (g/100 g RIA bs)	1,9 ± 0,3 ^a	2,5 ± 0,1 ^b	2,0 ± 0,1 ^a	1,5 ± 0,1 ^a
Fenoles totales ^{1,4} (g AGE/100 g RIA bs)	1,179 ± 0,003 ^a	1,33 ± 0,07 ^b	1,12 ± 0,04 ^a	1,22 ± 0,03 ^a
Fenoles no-ferúlicos ^{1,4} (g AGE/100 g RIA bs)	1,04 ± 0,01 ^a	0,84 ± 0,02 ^b	0,93 ± 0,02 ^c	1,09 ± 0,02 ^a
Fenoles ferúlicos ^{1,5} (g AGE/100 g RIA bs)	0,14 ± 0,02	0,49 ± 0,08	0,19 ± 0,06	0,13 ± 0,04

¹ Promedio y desviación estándar (n=3). Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas (p<0,05)

² GM es calculado como la relación porcentual entre los moles de metanol y los moles de ácidos urónicos cada 100g de RIA

³ GA calculado como la relación porcentual entre los moles de acetilo y los moles de ácidos urónicos cada 100g de RIA.

⁴ Contenido de fenoles indicados como g ácido gálico equivalente (AGE) cada 100g RIA.

⁵ Compuestos ferúlicos calculados como las diferencias matemáticas entre fenoles totales y no ferúlicos.

5.3.3.3 Extracciones secuenciales de polímeros de pared celular

Con el fin de completar caracterización y analizar el entrecruzamientos de los polímeros involucrados en la red de la pared celular, se llevaron a cabo extracciones secuenciales a partir de los RIA aislados de los tejidos control y tratados hasta el 90 % de inactivación de las enzimas POX y PPO. La secuencia de extracción se inició con agua a 18 °C (Brett y Waldron, 1996). Algunas de la pectinas del tejido vegetal son solubles en agua fría, lo que indica poco o nada de unión de éstas a la pared celular (Fry, 1986). En el agua fueron solubilizados un ≈ 25 % de los polímeros de pared presentes en el RIA de tejidos control, 350W y tratados por escaldado convencional (90C) (**Figura 5.15**). El RIA del tejido tratado con la mayor potencia (90MW) mostró una proporción significativamente mayor ($p < 0,05$) de polímeros extraíbles en agua (≈ 31 %). Esto sugiere que los polímeros de la pared celular de los tejidos escaldados por microondas a altas potencias, fueron parcialmente degradados (Coimbra y col., 1996) o bien sus redes podrían haberse desorganizado. La composición de los sobrenadantes fue determinada. Los polímeros disueltos en agua fría fueron en su mayoría hidratos de carbono no celulósicos (≈ 80 g/100g RIA bs), lo que incluye una mayor proporción de azúcares neutros (AN) que de ácidos urónicos (11-24 % AU). Un menor contenido de ácidos urónicos se encontró en las fracciones solubles en agua obtenidas a partir de los RIA de los tejidos con tratamientos 350W o 90C (14 % y 11 %, respectivamente). No se observaron diferencias entre el contenido de ácido urónico determinado en las fracciones solubles en agua de los RIA de los tejidos

con tratamiento 90MW y del tejido control (24-21%). Todas estas composiciones indican que el agua extrajo algunos polímeros de origen péctico. Además 3,8-4,7 g de proteína cada 100 g de RIA (bs) fueron extraídos por el agua a 18 °C.

Una proporción significativamente menor de los polímeros de la pared celular se disolvió a partir del RIA en las siguientes soluciones de extracción (**Figura 5.15**). Polímeros de pectina iónicamente relacionados con extensina, proteína de la pared celular rica en hidroxiprolina, son extraídos por la solución acuosa de NaCl (0,136 M) a 18 °C (Fry, 1986; Brett y Waldron, 1996). La cantidad extraída de los residuos correspondiente al tratamiento 350W (5,5 g/100 g RIA, bs) fue significativamente menor ($p < 0,05$) a las extraídas de los demás residuos. Algunas extensinas, principalmente las moléculas recién establecidas, se pueden extraer de las paredes celulares con soluciones salinas. Menor extracción de polímeros con respecto a la fracción de RIA solubilizadas del tejido control (7,5 g/100 g RIA, bs) significa que el entrecruzamiento iónico extensina-pectina podría haber sido en parte transformado a una forma relacionada covalente. Se considera que la POX juega un papel importante en procesos como la insolubilización del complejo pectina-extensina (HRGPs) (Jackson y col., 1994; Passardi y col., 2004). Este complejo puede en parte, derivar del acoplamiento oxidativo entre las cadenas de extensina a través de puentes (éter) isoditrosina. Esta reacción es catalizada por la POX de pared celular o extracelular, que consume H_2O_2 (Fry, 1986; Jackson y Armstrong, 1999). A partir de este entrecruzamiento oxidativo, se forman lazos de extensina los cuales producen una

contención física de las cadenas de HG de pectinas, que les impediría salir de la estructura, debido a que los HG se encuentran flanqueados por dominios altamente ramificados de RGI. (Fry, 1986).

La posterior extracción con CDTA durante 6 horas a 18 °C, disuelve las pectinas que están fijadas en las paredes celulares a través de puentes de Ca^{+2} (electrostáticamente). Los polisacáridos presentes en la pared celular de los tejidos sin tratamiento dieron lugar a un extracto de 6,2 g/100 g RIA (bs). En general, el tratamiento del tejido no afectó la extractabilidad en CDTA, pero el contenido de pectinas entrecruzadas por uniones calcio tendió a aumentar cuando el tejido fue sometido al escaldado tradicional (90C) por inmersión en agua a temperatura constante de 90 °C (**Figura 5.15**). Por lo tanto, este proceso de escaldado pareció contribuir a una mayor adhesión célula-célula a través del incremento de las uniones calcio, en la región de la laminilla media (Vincken y col., 2003). Bartolome y Hoff (1972) informaron que el incremento inicial de la temperatura del tejido de muchos vegetales durante el escaldado tradicional conduce a un aumento inicial de la actividad pectinmetil-esterasa que hidroliza los grupos metoxilados de las pectinas de la pared celular. Luego los grupos carboxilos pueden interactuar con Ca^{+2} , Mg^{+2} y otros cationes similares de naturaleza endógena, fortaleciendo el tejido (Ni y col, 2005).

Marry y col. (2006) observaron que no sólo las regiones de homogalacturonano de pectinas puenteadas con calcio fueron importantes en la

adhesión célula-célula en el caso del tejido de la remolacha azucarera, sino también los puentes (covalentes) de éster de ácido ferúlico en las cadenas laterales de arabinogalactano de las pectinas, los cuales son usualmente removidos a través de sucesivos tratamientos con Na_2CO_3 a 4 °C y 20 °C. La siguiente extracción se realizó entonces a 4 °C con el agente de-esterificante, solución acuosa de Na_2CO_3 (50 mM). Una tendencia al aumento de la extractabilidad de los polisacáridos se observó para los RIA de tejidos sometidos al tratamiento 90C y 90MW. Sin embargo, a 20 °C, la solución de Na_2CO_3 extrajo proporciones significativamente mayores de pectinas de los residuos de RIA correspondientes a los tratamientos 350W y 90C. Como resultado global, Na_2CO_3 (50 mM) extrajo en total más pectinas relacionadas de forma covalente, para el tejido escaldado convencional 90C. Se podría inferir que la actividad de POX no sólo incidió de manera significativa en los tejidos con tratamientos 350W, sino también en los tejidos sometidos al tratamiento 90C (**Figura 5.15**) promoviendo el aumento del contenido de pectinas relacionadas covalentemente a través de entrecruzamientos diferúlicos. Además, las pectinas pueden entrecruzarse con otros componentes de la matriz de la pared celular por uniones ésteres lábiles ante los álcalis, tal como los ésteres *O*-D-galacturonilos (Brown y Fry, 1993; Marry y col., 2006) que también pueden ser extraídos por la solución de Na_2CO_3 . van Buggenhout y col. (2009) informaron que la remolacha roja al igual que la remolacha azucarera contienen los mismos tipos de compuestos fenólicos. Sin embargo, sólo el 10% del ácido ferúlico en la remolacha roja se encuentra en la forma dehidrómero, lo que puede explicar la rápida separación de las células de la remolacha después de

30 minutos de cocción produciendo ablandamiento a diferencia de lo observado en la remolacha azucarera, que tiene un 20 % de contenido de ácido ferúlico en la forma de dímero (8-O-4' diferulato y 8,5'- diferulato en sus formas benzofurano). Ng y col. (1998 a) determinaron que incubando el tejido de remolacha roja con H_2O_2 se producen cambios en las propiedades mecánicas de las paredes celulares y la velocidad de ablandamiento térmico disminuye incrementándose el tiempo necesario del tratamiento de 130 min y 650 min. Esto fue acompañado por una gran disminución del contenido de ácidos ferúlicos y un incremento al doble en el contenido de unidades de ácido diferúlico y, por lo tanto un aumento del entrecruzamiento de la pectina en las paredes celulares de la remolacha. van Buggenhout y col. (2009) sugirieron que la incubación con H_2O_2 podría ser una estrategia para desarrollar la textura de las frutas y vegetales sometidos a tratamientos térmicos, siendo necesaria la actividad de la enzima peroxidasa o de la enzima lacasa.

Al usar NaOH (0,1 N) se observó una extracción significativamente mayor de pectinas covalentemente relacionadas para los residuos de pared celular del tejido tratado con agua a 90 °C respecto al control y al tratamiento 90MW (**Figura 5.15**). Sin embargo, la diferencia no fue significativa entre los RIA de 90C y 350 W. La solución de NaOH (0,1 N) puede remover otros polímeros posiblemente esterificados a la matriz de la pared (Carpita y col., 2001), incluyendo restos de ésteres remanentes de *O*-D-galacturonilos de pectina con celulosa o enlaces éster entre los ácidos urónicos y azúcares neutros (Fry, 1986).

Como las hemicelulosas se unen fuertemente a la superficie de la celulosa a través de puentes de hidrógeno, sólo se pueden extraer de las paredes celulares de los tejidos vegetales con álcalis fuertes (Fry, 1986). Las siguientes extracciones fueron llevadas a cabo secuencialmente con soluciones acuosas de KOH 1 M y 4 M para producir la extracción de las hemicelulosas. Considerando ambas extracciones se puede concluir que se produjo una extracción ligeramente mayor de polisacáridos en los residuos 350W y 90C, respecto al control. Por el contrario, el residuo de 90MW contenía una menor cantidad de material. Recientemente se ha observado en el tejido de tomate que los polímeros de hemicelulosa están presentes en las uniones celulares ejerciendo funciones en la adhesión celular (Ordaz-Ortiz y col., 2009). La disminución en la proporción de hemicelulosas extraídas del RIA de los tejidos con tratamiento 90MW, se puede atribuir a la pérdida de estos polímeros como consecuencia de alteraciones en la red de hemicelulosa-celulosa luego del tratamiento por microondas a elevada potencia (**Figura 5.15**). Esto puede deberse a los resultados a los efectos *térmicos* y *no térmicos* de las microondas (Perreux y Loupy, 2001).

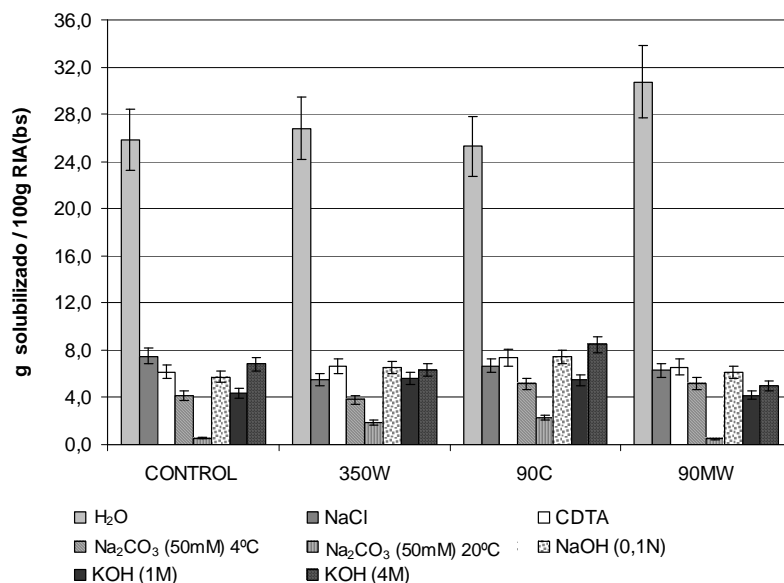


Figure 5.15 Masa de RIA solubilizada cada 100 g de RIA en los diferentes solventes al cabo de cada extracción secuencial para los sistemas tratados (350W, 90MW y 90C) y el sistema control. Todas las extracciones, salvo las especificadas en la leyenda, se llevaron a cabo a 18°C. Las barras indican desviación estándar ($n=2$).

Las características químicas del residuo obtenido, tras el último paso de extracción de los residuos con KOH (4 M), se analizaron a través de espectroscopía FTIR. Los espectros obtenidos de todos ellos sólo indican la presencia de celulosa (**Figura 5.16A**). Los restos de las largas cadenas laterales de arabinanos de las pectinas ancladas a la red de celulosa de la remolacha (Fissore y col., 2010) no se detectaron en los residuos finales. Como se ha mencionado anteriormente, en los RIA fue encontrada lignina (**Tabla 5.4**) y, por tanto, es esperable que se encuentre en el último residuo de la extracción secuencial. Sin embargo, la lignina no fue detectada en los espectros de FTIR, probablemente, debido a su baja proporción. Por lo tanto, la banda típica a 1520 cm^{-1} que se

observó en los espectros de FTIR de los RIA obtenidos de los tejidos de remolacha control, 350W y 90C (**Figura 5.16B y 5.16C**) se pueden atribuir a la presencia de pectinas unidas por enlaces éster con ácido ferúlico (Synytsya y col., 2003 a,b) en las paredes celulares. Esta banda característica no se vio en el espectro obtenido para el RIA del tejido de remolacha 90MW (**Figura 5.16B**). Esto sugeriría la alteración de la integridad de la red de la pared celular tras el escaldado por microondas con altas potencias (**Figura 5.7B**). Este hecho no fue detectado por las diferencias de extractabilidad en el proceso secuencial sobre los polímeros de pared celular con las soluciones de Na_2CO_3 (**Figura 5.15**). Otra diferencia relevante observada con respecto al RIA del control fue el nivel más bajo de hemicelulosas extraídas con las soluciones de KOH para el caso del residuo de pared celular correspondiente a 90MW. Somani Omprakash y col. (2003) mencionaron la posibilidad de ruptura de enlaces de hidrógeno tras el tratamiento de microondas, que podrían proceder como consecuencia de la disminución de la barrera de energía de las reacciones o relacionado con el factor pre-exponencial de la ecuación de Arrhenius (Bohr y Bohr, 2000; Perreux y Loupy, 2001). La remoción de algunas hemicelulosas de las paredes celulares como consecuencia del tratamiento por microondas 90MW podría permitir, por ejemplo la asociación lateral de microfibrillas de celulosa (McCann y col., 1990) con alteración de la respuesta mecánica de la pared celular (Chanliaud y col., 2002). También es notable la mayor solubilidad en agua del RIA 90MW (**Figura 5.15**) que puede explicar en parte el peor desempeño reológico evaluado a través del ensayo de relajación anteriormente informado. Donde el tratamiento 90MW

presentó la menor proporción de elasticidad residual (F_{∞}/F_0) y la mayor proporción de pérdida a través del flujo frente al esfuerzo aplicado.

Por otro lado, una mayor conversión de pectina-extensina iónicamente relacionada a complejos entrecruzados pectina-extensina de unión covalente, se observó para el RIA del tejido tratado con potencia de 350 W, así como cierto aumento de la proporción de pectinas unidas por calcio y de pectinas entrecruzadas con ferúlico para el tratamiento convencional (90C), pudiendo ello explicar la mejor respuesta en los ensayos de relajación a deformación constante de estos tejidos respecto a aquellos con tratamiento 90MW.

5.3.3.4 Análisis por FTIR

Los espectros de FTIR de los RIA obtenidos del tejido control y 90MW (**Figura 5.16B**) y de los tejidos 350 W y 90C (**Figura 5.16C**) mostraron una predominancia de las pectinas. La principal diferencia entre los espectros fue la ausencia de la señal de los ferúlicos de las pectinas a 1520 cm^{-1} en el RIA del tratamiento 90MW, como se mencionó anteriormente. Entre 1020 y 1170 cm^{-1} , las señales de celulosa y hemicelulosa enmascararon parcialmente algunas señales típicas de pectinas como los picos característicos a 1020 y 1105 cm^{-1} del esqueleto poligalacturónico en la zona de la *huella digital* (1200 a $900\text{-}850\text{ cm}^{-1}$) aunque otros picos de pectinas a 1142 , 1082 y 1062 cm^{-1} se pudieron distinguir (McCann y col., 1992). Entre 1440 y 1230 cm^{-1} no se observó ninguna diferencia con

respecto a los perfiles típicos de pectinas. El agua adsorbida en las pectinas de la pared celular llevó a un agudo pico a 1630 cm^{-1} (Wilson y col., 2000), el cual enmascaró la ancha banda que normalmente se manifiesta en $1615\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ por el estiramiento del carbonilo del grupo carboxílico (no esterificado) del galacturónico y glucurónico, en el caso los residuos de pectinas de la remolacha roja (Strasser y Amado, 2001). La banda en la zona atribuida al estiramiento característico del C=O del grupo carboxílico esterificado se observó en 1730 cm^{-1} , como una única señal. Se pudo observar la ancha banda del estiramiento del -OH a la frecuencia $\approx 3310\text{ cm}^{-1}$, reportada como característica de los polisacáridos de las paredes celulares (Coimbra y col., 1999). La banda más corta a 2905 cm^{-1} , que corresponde al estiramiento -OH en los grupos carboxílicos de pectinas y al estiramiento C-H del esqueleto de los polisacáridos también pudo observarse. Las pectinas, celulosa y otros polisacáridos de la pared celular contribuyeron con bandas a longitudes de onda superiores a 2800 cm^{-1} . Fue bien evidente un importante *hombro* a $\approx 3500\text{ cm}^{-1}$, con un agudo máximo a 3275 cm^{-1} para los RIA de 350W y 90C mientras que los RIA del control y 90MW mostraron la típica banda ancha a 3322 y 3383 cm^{-1} , respectivamente. Esto se debería al puente hidrógeno entre grupos -OH de algunos polisacáridos.

Los espectros FTIR del residuo obtenido después de las extracciones secuenciales de RIA para los distintos tratamientos, no revelaron diferencias entre sí indicando que los residuos estaban constituidos por celulosa (**Figura 5.16A**). Picos típicos de este polisacárido a 1643 , 1430 , 1374 , 1322 y 1280 cm^{-1} , así como

aquellos picos en la zona de la *huella digital* de la celulosa (1165, 1115, 1062, 1037 cm^{-1}) se pudieron observar. Otros picos a 899 y 670 cm^{-1} también se detectaron (Oh y col., 2005). La amplia banda correspondiente al estiramiento del grupo -OH informada como característica de los polisacáridos de las paredes celulares (Coimbra y col., 1999) se encontró a $\approx 3460 \text{ cm}^{-1}$ al igual que una banda mas corta a 2905 cm^{-1} .

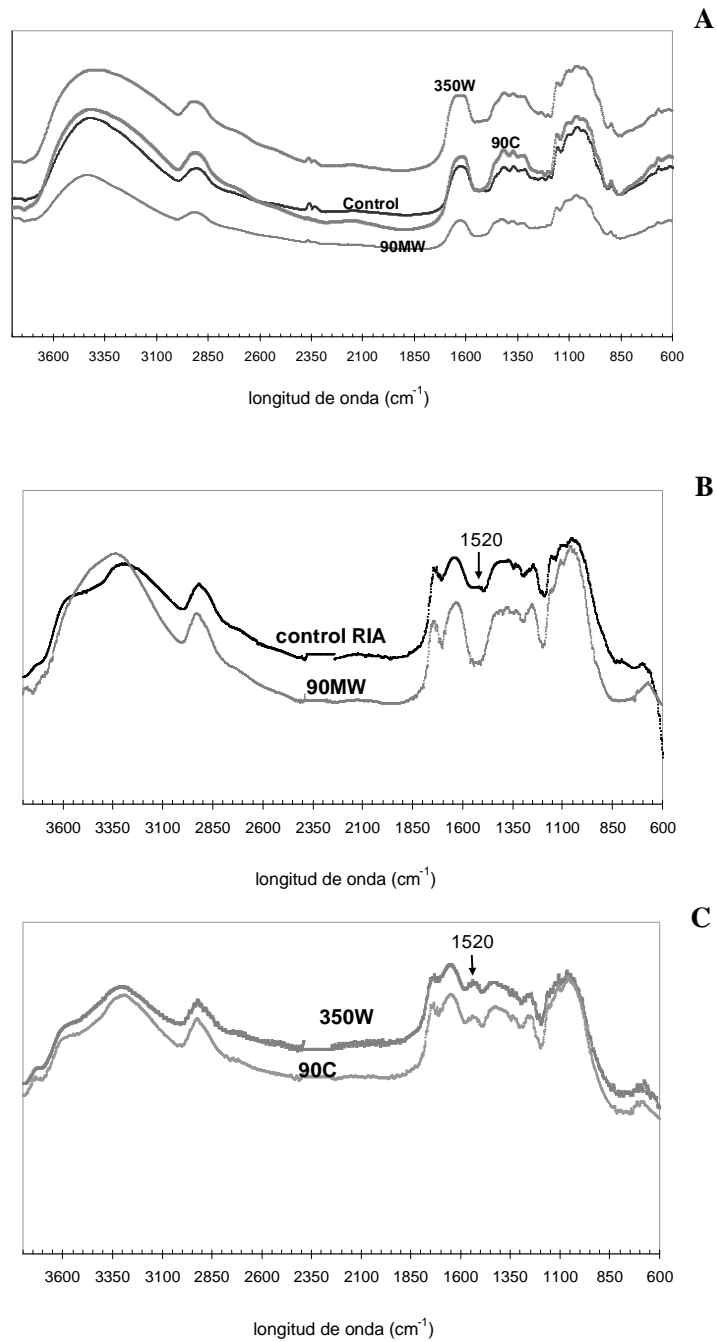


Figura 5.16 (A) Espectros FTIR obtenidos de los residuos finales al cabo de las extracciones secuenciales de los RIA (B) Espectro FTIR de los polímeros de pared celular (residuo insoluble en alcohol, RIA) correspondientes al tejido control y tratados por microondas a potencia variable (90MW) (C) FTIR de los RIA correspondientes a las muestras tratadas por microondas a potencia constante (350 W) y por escaldado convencional (90C).

5.3.3.5 Caracterización microscópica del tejido

Se puede observar en la **Figura 5.17A**, la microscopía óptica del tejido control (sin tratamiento). Las células de la remolacha cortada en distintos niveles mostraron un continuo de paredes celulares espesas que rodean al contenido celular uniformemente teñido. Esto último puede ser adjudicado a las vacuolas del tonoplasto responsables de la presión de la pared celular y, por lo tanto, al desarrollo de la presión de turgor. La laminilla media pudo ser observada sin separación a lo largo del continuo de la pared celular y engrosada en las esquinas de uniones tri-cellulares (*corners*). Los especímenes obtenidos de tejidos tratados, generalmente presentaron células redondeadas (**Figura 5.17B, C, D**). El tejido de remolacha sometido al tratamiento de 350W presentó células con separación de la laminilla media, fundamentalmente en las esquinas (**Figura 5.17B**). Por lo tanto, los contactos entre células vecinas persistió después de este tratamiento de microondas pudiéndose observar con claridad. El escaldado convencional del tejido de la remolacha roja (90C) produjo un gran impacto, fundamentalmente, en las uniones tri-celulares con una nítida separación de la laminilla media de las células, como se indica en la imagen de la microscopía óptica (flechas; **Figura 5.17C**). Altas potencias de microondas (>900 W) produjeron separación de la laminilla media en distintos puntos entre células adyacentes (tratamiento 90MW) y también separación celular (**Figura 5.17D**). No se observaron diferencias notables entre el tejido sometido a los tratamientos 90C y 90MW, pero las paredes celulares se vieron más fuertemente teñidas en las células del tejido sometido al tratamiento 90C (**Figura 5.17C**).

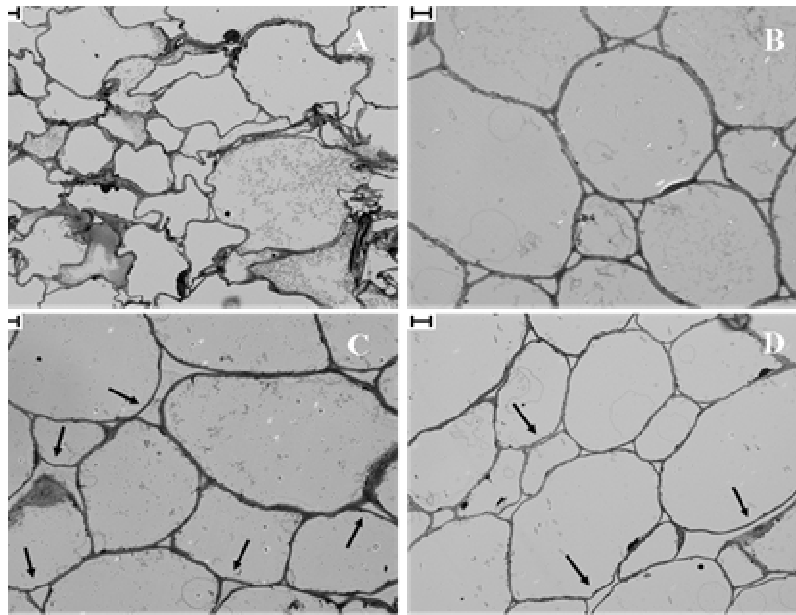


Figure 5.17 Microscopía óptica de los tejidos **(A)** sin tratamiento (control), **(B)** tratados por microondas a potencia constante 350 W, **(C)** escaldado convencional 90C y **(D)** tratamiento de microondas a potencia variable (90MW). Las flechas indican puntos de separación entre células. Barra =10 μ m.

5.4 Conclusiones

El escaldado con radiaciones de microondas en ausencia de agua y a potencias constantes de 100 a 200 W produjo una importante pérdida de peso así como un alto grado de encogimiento de los tejidos.

La inactivación de las enzimas POX y PPO, a potencias constantes (250 W, 350 W, 450 W) y potencia variable (tratamiento 90MW) permitió realizar un 90 % de destrucción enzimática y sus resultados fueron comparados con el escaldado convencional en baño de agua a 90 °C. Los menores tiempos experimentales para alcanzar el escaldado se registraron para los tratamientos con microondas 90MW, 450 W, 350 W siendo 3, 5 y 6 minutos, respectivamente. El tratamiento de escaldado convencional 90C requirió 7 minutos y la menor potencia de microondas evaluada empleó el mayor tiempo de tratamiento (11 minutos). El consumo de energía fue menor para los tratamientos de 350 W, 450 W y 90MW. El proceso menos eficiente, en términos energéticos y de tiempo requerido, fue el tratamiento por microondas 250 W seguido por el tratamiento convencional 90C. El tratamiento de escaldado 90MW fue el más eficiente en términos del tiempo requerido para alcanzar el objetivo del proceso.

Los parámetros cinéticos $D_{T_{ref}}$ ($T_{ref} = 90^{\circ}\text{C}$) y z pudieron ser determinados y se observó que, en general, los valores de $D_{T_{ref}}$ para POX fueron menores que para PPO, a excepción del escaldado por microondas a 250 W. Para

POX, el tratamiento de 90MW mostró la mayor sensibilidad a los cambios de temperatura (menor valor de z) entre los procesos de microondas y su valor fue similar al obtenido para el escaldado convencional (90C). Para PPO, los valores más bajos de z observados corresponden a los tratamientos 350 W y 90MW, que fueron similares entre sí. El escaldado convencional (90C) mostró mayores valores de z que estos.

En cuanto a la textura, todos los tratamientos redujeron las características elásticas del tejido lo que fundamentalmente expresa la pérdida de presión de turgor y disminución de entrecruzamientos en los polisacáridos estructurales. El nivel más alto de degradación de textura, evaluado a través del ensayo de relajación, se observó en el tejido sometido al tratamiento de microondas 90MW. A través de la comparación de los resultados para los procesos 90C y 90MW, se pudo determinar la existencia adicional de efectos *no térmicos* en el proceso con radiaciones de microondas.

El color se vio afectado en todos los casos, pero el escaldado convencional (90C) mostró mínimos cambios de los parámetros de color. Por otro lado, el tratamiento por microondas produjo, principalmente, cambios del color del tejido de remolacha al azul-violeta que se deberían a la disminución de la concentración de los pigmentos del tejido.

Si bien, el tratamiento por microondas con altas potencias (90MW) requirió el tiempo más corto (3 min) para alcanzar el 90 % de inactivación de las enzimas PPO y POX, la microestructura del tejido estudiada para los sistemas de más interés, mostró que este tratamiento afectó fuertemente la estructura debido a mayores alteraciones en la red de celulosa-hemicelulosa y ésteres de pectina y ferúlico, además de la pérdida de turgor común en todos los tratamientos. La presencia de una mayor cantidad de complejo de pectina-extensina de unión covalente en los tejidos tratados con potencias de 350 W y la presencia de mayor cantidad de pectinas unidas por calcio en el tratamiento convencional de escaldado (90C) podrían explicar la mejor respuesta mecánica frente a los ensayos de relajación mostrado por los tejidos sometidos a estos tratamientos cuando comparados con el tratamiento 90MW.

6. CONCLUSIONES GENERALES

La irradiación con radiación gamma y dosis absorbidas de 1 o 2 kGy del tejido de raíz de remolacha roja (*Beta vulgaris* L. var. conditiva) produce cambios químicos y bioquímicos en el contenido celular así como en las redes constitutivas de la pared celular, los cuales no necesariamente van a ser sentidos por los consumidores de acuerdo a las evaluaciones realizadas de punción y de color con ensayos instrumentales. Al mismo tiempo, los cambios mencionados involucran un aumento de la capacidad antioxidante. Todo ello muestra que las dosis ensayadas pueden ser interesantes para ser usadas en el marco de una técnica combinada para el procesamiento de dicho tejido con el fin de prolongar su vida útil.

El escaldado del tejido de raíz de remolacha roja (*Beta vulgaris* L. var. conditiva) por microondas en presencia de agua es posible y presenta ventajas y desventajas en relación con el tratamiento convencional, siendo la energía necesaria y el tiempo de proceso, ventajas a favor del tratamiento por microondas y los cambios de color, la desventaja. La resistencia de las enzimas POX y PPO, varía según el tratamiento aplicado. Cambios en el contenido de pigmentos y en la composición de pared celular afectan el color y la textura de los tejidos escaldados. Los resultados obtenidos muestran la existencia de efectos térmicos y no térmicos en los tratamientos por microondas. De los tratamientos evaluados, el tratamiento por microondas a potencia constante de 350 W en presencia de agua, puede ser una alternativa útil para el escaldado de dicho tejido.

Es de destacar que para implementar las técnicas antedichas, son necesarios más estudios que permitan evaluar, por ejemplo, la influencia de la forma de la muestra y el volumen de trabajo en los resultados obtenidos así como la incidencia de los tratamientos en el costo final del producto.

Se espera que los estudios del efecto de estas tecnologías en *Beta vulgaris* L. variedad conditiva contribuyan al desarrollo de procesos alternativos y aporten a la obtención de alimentos sanos y aceptados por los consumidores.

7. Bibliografía

- AACC. American Association of Cereal Chemists 2001. The definition of dietary fibre. Report of the Dietary Fibre Definition Committee to the Board of directors of the AACC, 1, 10.
- Ahn H., Kim J., Yook H. y Byun M. 2003. Irradiation effects on free radical scavenging and antioxidative activity of phytic acid. *Journal of Food Science*, 68, 2221-2224.
- Akarapu R., Li B.Q., HuoY., Tang J. y Liu F. 2004. Integrated modeling of microwave food processing and comparison with experimental measurements. *Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy*, 39, 3-4.
- Andersson R., Westerlund E. y Åman P. 2006. Cell-Wall Polysaccharides: Structural, Chemical and Analytical Aspects. In *Carbohydrates in food*. Ann-Charlotte Eliasson. Eds. Series: Food Science and Technology-CRC Press 2^{da} Edición. Cap. 4.
- Andres A., Betoret N., Bernardet G. y Fito P. 2004. En: *Proceedings of the 14th International Drying Symposium*. San Pablo, Brasil.
- AOAC.-Association of Official Analytical Chemists 2000. Official methods of analysis, (17^a Ed.). Method 994.12. MD.
- Aquino-Bolaños EN. y Mercado-Silva E. 2004. Effects of polyphenol oxidase and peroxidase activity on browning of cut jicama. *Postharvest Biology and Technology*, 33, 275-283.
- Avisse C. y Varoquax P. 1977. Microwave blanching of peaches. *Journal of Microwave Power*, 12(1), 73-77.
- Barret D.M. y Theerakulkait C. 1995. Quality indicators in blanched, frozen, stored vegetables. *Food Technology*, 49 (1), 62-64.
- Bartolome L.G. y Hoff, J.E. 1972. Firming of potatoes: Biochemical effects of preheating. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 20 (2), 266-270.
- Baydoun EAH., Pavlencheva N., Cumming CM., Waldron KW. y Brett CT. 2004. Control of dehydrodiferulate cross-linking in pectins from sugar-beet tissues. *Phytochemistry*, 65(8), 1107-1115.

- Begum S. y Brewer MS. 1996. Microwave blanching effects on color, chemical and sensory characteristics of frozen asparagus. *Journal of Food Quality*, 20, 471-481.
- Begum S. y Brewer MS. 2001. Physical, chemical and sensory quality of microwave blanched snow peas. *Journal of Food Quality*, 24, 479-493.
- Benoît M.A., D'Aprano G. y Lacroix M. 2000. Effect of Gamma-Irradiation on Phenylalanine Ammonia-lyase Activity, Total Phenolic Content, and Respiration of Mushrooms (*Agaricus bisporus*), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 6312-6316.
- Bohr H. y Bohr J. 2000. Microwave enhanced kinetics observed in ORD studies of a protein. *Bioelectromagnetics*, 21, 68-72.
- Bourne M. 1978. Texture Profile Analylis. *Food Technology*, 32(7), 62-66;72.
- Bourne M. 1982. Food texture and viscosity. Concept and Measurement. 2ªEd. Food Science and Technology, International Series. Academic Press, New York.
- Bradley DJ., Kjellbom P. y Lamb CJ. 1992. Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: A novel, rapid defense response. *Cell*, 70, 21-30.
- Brett C. y Waldron K., 1996. Physiology and biochemistry of plant cell wall. (2^{da} Ed.) Brett C. y Waldron K. (Eds). Chapman & Hall. Gran Bretaña.
- Brewer MS. y Begum S. 2003. Effect of microwave power level and time on ascorbic acid content, peroxidase activity and color of selected vegetables. *Journal of Food Preservation*, 27, 411-426.
- Brown JA. y Fry SC. 1993. Novel O-D-galacturonyl esters in the pectic polysaccharides of suspension-cultured plant cells. *Plant Physiology*, 103, 993-999.
- Budini R., Tonelli D. y Girotti S. 1980. Analysis of Total Phenols Using Prussian Blue Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(6), 1236-1238.
- Bunzel M., Ralph J., Marita J y Stainhart H. 2000. Identification of 4-O-5' Coupled diferulic acid from Insoluble Cereal Fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3166-3169.
- Butz P. y Tauscher B. 2002. Emerging technologies: Chemical aspects. *Food Research International*, 35, 279-284.

- CAA. Código Alimentario Argentino Ministerio de Salud Pública de la Argentina. http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp
- Cano P., Marin MA. y Fuster C. 1990. Freezing of banana slices, Influence of maturity level and thermal treatment prior to freezing. *Journal of Food Science*, 55 (4), 1070.-1078.
- Cano P., Begoña de Ancos M. Lobo G. y Santos M. 1997. Improvement of frozen banana (*Musa cavendishii*, cv. Enana) colour by blanching: relationship between browning, phenols and polyphenol oxidase and peroxidase activities *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und –Forschung*, 204 (1), 60-65.
- Cantos EJ., Espin C. y Tomás-Barberán FA. 2001. Effect of wounding of phenolic enzymes in six minimally processed lettuce cultivars upon storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 322-330.
- Carpita NC., Sobularse D., Montezinos D. y Delmer DP. 1979. Determination of the pore size of cell walls living plant cells. *Science*, 205, 1144-1147.
- Carpita NC. y Gibeaut DM. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant Journal*, 3, 1-30.
- Carpita NC., Defernez M., Findlay K., Wells B., Shouel DA., Catchpole G., Wilson RH. y McCann MC. 2001. Cell Wall Architecture of the Elongating Maize Coleoptile. *Plant Physiology*, 127, 551-565.
- Chanliaud E., Burrows KM., Jeronimidis G. y Gidley MJ. 2002. Mechanical properties of primary plant cell wall analogues. *Planta*, 215, 989-996.
- Charles MT., Kalantari S., Corcuff R. y Arul J. 2005. Post-harvest quality and sensory evaluation of UV-treated tomato fruit. *Acta Horticulturae*, 682, 537-542.
- Charles MT., Makhoul J. y Arul J. 2008. Physiological basis of UV-C induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato fruit. II. Modification of fruit surface and changes in fungal colonization. *Postharvest Biology and Technology*, 47, 21-26.
- Chen SC., Collins JL., Mc.Carty, IE. y Johnston, MR, 1971. Blanching of white potatoes by microwave energy followed by boiling water. *Journal of Food Science*, 36, 742-743.

- Coimbra MA., Waldron KW., Delgadillo I. y Selvendran RR. 1996 Effect of Processing on Cell Wall Polysaccharides of Green Table Olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 2394-2401.
- Coimbra MA., Barros A., Barros M., Rutledge DN. y Delgadillo I. 1999. FTIR spectroscopy as a tool for analysis of olive pulp cell wall polysaccharides extracts. *Carbohydrate Research*, 317, 145-154.
- Collins JL y McCarty IE. 1969. Comparison of microwave energy with boiling water for blanching whole potatoes. *Food Technology*, 23, 337-340.
- Coseteng MY. y Lee, CY. 1987. Changes in Apple Polyphenol Concentrations in Relation to degree of Browning. *Journal of Food Science*, 52(4), 985-989.
- Cruz RMS., Vieira MC. y Silva CLM. 2007. Modelling kinetics of watercress (*Nasturtium officinale*) colour changes due to heat and thermosonication treatments. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8 (2), 244-252.
- Dallinger D. y Oliver Kappe C. 2007. Microwave-Assisted Synthesis in Water as Solvent. *Chemical Reviews*, 107, 2563-2591.
- de Alwis A. y Fryer P. 1990. A finite-element analysis of heat generation and transfer during oh of food. *Chemical Engineering Science*, 45 (6), 1547-1559.
- de Lara R., Vazquez MI., Galan P. y Benavente J. 2006. Modification of cellulose based membranes by gamma-radiation: Effect of cellulose content. *Journal Membrane Science*, 273 (1-2): 25-30.
- Deng Y., Rakesh KS. y Lee JH. 2003. Estimation of temperature profiles in microwaved particulates using enzyme and vision system. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 36, 331-338.
- Dizhbite T., Telysheva G., Jurkjane V. y Viesturs U. 2004. Characterization of the radical scavenging activity of lignins-natural antioxidants. *Bioresource Technology*, 95 (3), 309-317.
- Dongowski G. 2001. Enzymatic degradation studies of pectin and cellulose from red beets. *Molecular Nutrition and Food Research*, 45 (5), 2001, 324-331.
- Dorantes-Alvares L. y Parada-Dorantes L. 2005. The microwave processing of foods. En: "Blanching using microwave processing". Helmar Schubert y Marc

Regier (Eds) Taylor & Francis CRC Press Boca Ratano Boston New York Washington, USA.. Capítulo 9

- Duan X., Su X., You Y., Qu H., Li Y. y Jiang Y. 2007. Effect of nitric oxide on pericarp browning of harvested longan fruit in relation to phenolic metabolism. *Food Chemistry*, 104 (2), 571-576.

- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, y Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.

- Egley E., Paul Jr. RN., Vaughn KC. y Duke SO. 1983. Role of peroxidase in the development of water-impermeable seed coats in *Sida spinosa* L. *Planta*, 157(3), 157-224.

- Engineering toolbox. Resources, Tools and Basic Information for Engineering and Design of Technical Applications!. <http://www.engineeringtoolbox.com>. Accedido el 24 de diciembre, 2010.

- Escribano J., Pedreño MA., García-Carmona F. y Muñoz R. 1998. Characterization of the antiradical activity of betalains from *Beta vulgaris* L. roots. *Phytochemical Analysis*, 9 (3), 124-127.

- Falk S., Hertz H., y Virgin H. 1958. On the relation between turgor pressure and tissue rigidity. I. Experiments on resonance frequency and tissue rigidity. *Physiol Plant*, 11, 802-817.

- Fan X., Sokorai JBK., Sommers CH., Niemira BA., y Matheris JP., 2005. Effects of calcium ascorbate and ionizing Radiation on survival of *Listeria monocytogenes* and Product Quality of fresh-cut “Gala” apples. *Journal of Food Science*, 70 (7), M352-M358.

- Fan X. y Sokorai K.J.B. 2008. Retention of Quality and Nutritional Value of 13 Fresh-Cut Vegetables Treated with Low-Dose Radiation. *Journal Food Science*, 73(7), S367- S372.

- Farkas J. 2006. Irradiation for better foods. *Trends in Food Science and Technology*, 17, 148-152.

- Fars J. 2006 REVIEW-Irradiation for better foods. *Trends in Food Science and Technology*, 17, 148-152.

- Faust M., Chase B.R. y Massey Jr LM. 1967. The effect of ionizing radiation and diphenylamine treatment on glucose metabolism and membrane permeability of "Cortland" apples. Proc. Amer.Soc. Hort. Sci., 90, 25-32.
- FDA. Food and Drug Administration. 2007. Irradiation in the production, processing and handling of food. Proposed rules. Fed.Reg. 72(64):16291–16306. <http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/fr070404.html>.
- Fellows PJ 2000. Processing using electric fields, high hydrostatic pressure, light or ultrasound. En Food Processing Technology Principles and Practice. Cambridge (GB) by CRC.Cap 9.
- Femenia A, Sanchez ES., Simal S. y Rossello C. 1998. Effects of drying pretreatments on the cell wall composition of grape tissues. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 271-276.
- Filisetti-Cozzi TMCC. y Carpita NC. 1991 .Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars.Analytical Biochemistry, 197, 157-162.
- Fissore EN., Ponce NMA., Stortz CA., Rojas AM. y Gerschenson LN. 2007. Characterization of fiber obtained from pumpkin (*Cucumis moschata*, Duch.) mesocarp through enzymatic treatment. Food Science and Technology International, 16 (1), 1-7.
- Fissore EN., Ponce NMA., de Escalada Pla M, Stortz CA., Rojas AM. y Gerschenson LN 2010. Characterization of Acid-Extracted Pectin-Enriched Products Obtained from Red Beet (*Beta vulgaris* L. var. conditiva) and Butternut (*Cucurbita moschata* Duch ex Poiret) Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58 (6), 3793-3800.
- Flick Jr.GJ., Burnnette FS., Aung LH., Ory RL. y St.Angelo A.J. 1978.Chemical composition and biochemical properties of mirlitons (*Sechium edule*) and purple, green and white eggplants (*Solanum melongena*). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 26, 1000-1005.
- Foley D., Euper M., Caporaso F. y Prakash A. 2004. Irradiation and chlorination effectively reduces Escherichia coli O157:H7 inoculated on cilantro (*Coriandrum sativum*) without negatively affecting quality. Journal of Food Protection, 67(10), 2092-2098.

- Fry CS. 1986. Cross-Linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annual Review of Plant Physiology*, 37, 165-180.
- Fry SC. 1998. Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *Biochemical Journal*, 332, 507–515.
- Gandia-Herrero F., Escribano J. y García-Carmona F. 2005. Betaxanthins as substrates for tyrosinase. An Approach to the Role of Tyrosinase in the Biosynthetic Pathway of Betalains. *Plant Physiology*, 138, 421–432.
- Gliszczyńska-Świgło A. 2006. Antioxidant activity of water soluble vitamins in the TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) and the FRAP (ferric reducing antioxidant power) assays. *Food Chemistry*, 99 (1), 131-136.
- Gomes C., Moreira RG., Castell-Perez M.E., Kim J., Da Silva P. y Castillo A. 2008. E-Beam Irradiation of Bagged, Ready-to-Eat Spinach Leaves (*Spinacea oleracea*): An Engineering Approach. *Journal of Food Science*, 73 (2), E95–E102.
- Gómez-Navarro, C. 2009. Efecto antioxidante y antihipertensivo de diferentes compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen "in vitro". Tesis Doctoral Universitat Rovira I Virgili. ISBN: 978-84-692-9051-4/DL: T-2058-2009
- Grabber J. H. 2005. How Do Lignin Composition, Structure, and Cross-Linking Affect Degradability? A Review of Cell Wall Model Studies. *Crop Science*, 45, 820-831.
- Grassi M., Lapasin R. y Priel S. 1996. A study of the rheological behavior of scleroglucan weak gel systems. *Carbohydrate. Polymers*, 29, 169-181.
- Greve C., Shackel AK., Ahmadi H., McArdle R.N., Gohlke JR. y Labavitch JM. 1994. Impact of Heating on carrot firmness: contribution of cellular turgor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 2896-2899.
- Gökmen V., Savas-Bahceci K., Arda Serpen, Jale Acar. 2005. Study of lipoxygenase and peroxidase as blanching indicator enzymes in peas: change of enzyme activity, ascorbic acid and chlorophylls during frozen storage. *LWT - Food Science and Technology*, 38(8), 903-908.
- Hallett IC., MacRae EA. y Wegrzyn TF. 1992. Changes in kiwifruit cell wall ultrastructure and cell packing during postharvest ripening. *International Journal of Plant Science*, 153, 49-60.

- Hansberg TW. 2002. Biología de las especies de oxígeno reactivas. Mensaje Bioquímico, 26, 19-54.
- Harakava, R. 2005. Genes encoding enzymes of the lignin biosynthesis pathway in Eucalyptus. Genetics and Molecular Biology, 28, 3(suppl), 601-607.
- Hayashi R. 2002. Trends in High Pressure Bioscience y Biotechnology. Elsevier Series: Progress in Biotechnology. London, U.K , Capítulo19, pp1-652.
- Heddleson RA. y Doores S. 1994. Factors Affecting Microwave Heating of Foods and Microwave Induced Destruction of Foodborne Pathogens - A Review. Journal of Food Protection, 57, 1025-1037.
- Hemedá HM. y Klein BP.1990. Effects of naturally occurring antioxidants on peroxidase activity of vegetable extracts. Journal of Food Science, 55(1), 184-186.
- Henderson J., Ricker R., Bidlingmeyer B. y Woodward C. 2000. Rapid, accurate, 7 sensitive, and reproducible HPLC analysis of amino acids. Technical report from Agilent Technologies.
- Hendrickx M., Ludikhuyze L., Van den Broeck I., y Weemaes C. 1998. Effects of high pressure on enzymes related to food quality. Trends in Food Science and Technology, 9 (5), 197–203.
- Herbach KM, Stintzing FC. y Carle R. 2004. Impact of thermal treatment on color and pigment pattern of red beet (*Beta vulgaris* L.) preparations. Journal of Food Science, 69(6), 491-498.
- Herbach K.M., Stintzing F.C. y Carle R. 2006. Betalain Stability y Degradation Structural y Chromatic Aspects. Journal of Food Science, 71, R41–R50.
- Herbert P., Barros P., Ratola N. y Alves A. 2000. HPLC Determination of amino acids in 4 musts and port wine using OPA/FMOC derivatives. Journal of Food Science, 65(7), 1130-1133.
- Heredia A., Jiménez A., Fernández-Bolaños J., Guillén R. y Rodríguez R. 2002. Fibra Alimentaria. Madrid, España, Biblioteca de Ciencias. pp. 1–117.
- Huang YT. y Bourne MC.1987. Research note kinetics of thermal softening of vegetables. Journal of Texture Studies, 14, 1-9.

- IAEA, International Atomic Energy Agency 1998. Combination Processes for Food Irradiation.:Proceedings of the final reserach co-ordination meeting, Pretoria, South Africa, 27 Feb. 1995 (Panel Proceeding). Vienna.
- ICGFI, International Consultative Group on Food.1999.Facts about Food Irradiation. IAEA,Viena, Austria.
- Ihl M., Monsalves M. y Bifani V. 1998. Chlorophyllase inactivation as a measure of blanching efficacy and colour retention of artichokes. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologi*, 31 (1), 50-56.
- Ilker R. y Szcseśniak, AS. 1990. Structural and chemical bases for texture of plant foodstuffs. *Journal of Texture Studies*, 21, 1-36.
- Jackson MB. y Armstrong W. 1999. Formation of aerenchyma and the processes of plant ventilation in relation to soil flooding and submergence. *Plant Biology*,1, 274–287.
- Jackson GR., Sampath D., Werrbach-Perez K. y Perez-Polo JR. 1994 Effects of nerve growth factor on catalase and glutathione peroxidase in a hydrogen peroxide-resistant pheochromocytoma subclone *Brain Research*, 634 (1), 69-76.
- Jackson P., Paulo S., Brownleader MD., Freire P. y Ricardo CPP. 1999. An extensin peroxidase is associated with white-light inhibition of lupin (*Lupinus albus*) hypocotyl growth. *Australian Journal of. Plant Physiology*, 26, 313–326.
- Jarvis MC. 1984. Structure and properties of pectin gels in plant cell walls. *Plant Cell and Environment*, 7, 153-164.
- Jarvis MC., 1998. Intercellular separation forces generated by intracellular pressure. *Plant Cell and Environment*, 21(12), 1307-1310.
- Jo C., Son J., Lee H. y Buym M. 2003. Irradiation application for color removal and purification of green tea leaves extract. *Radiation Physics and Chemistry*, 66, 179-184.
- Kanner J., Harel S. y Granit R. 2001. Betalains. A new class of dietar y cationized antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5178-5185.

- Kidmose U. y Martens HJ. 1999. Changes in texture, microstructure and nutritional quality of carrot slices during blanching and freezing Journal of the Science of Food and Agriculture 79, 1747-1753.
- Kovács E. y Keresztes A. 2002. Effects of gamma and UV-B/C radiation of plant cell. Micron, 33, 199-210.
- Knuthsen, P. 1981. Investigations on beetroot colours for the purpose of regulation. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung, 172, 195-200.
- Kujala TS., Loponen JM., Klika KD y Pihlaja K. 2000. Phenolics and betacyanines in red beetroot (*Beta vulgaris*) root: Distribution and effect of cool storage on the content of total phenolics and three individual compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 5338-5342.
- Kunstadt, P. 2001. Economic and technical considerations in food irradiation. En: Food Irradiation: Principles, Applications. Molins Ricardo (Ed.). John Wiley y Sons Inc., NY, USA. Capítulo 16, pp. 415-442
- Lacroix M. y Ouattara B., 2000. Combined industrial processes with irradiation to assure innocuity and preservation of food products. A review. Food Research International, 33, 719-724.
- Langerak DI. y Damen GAA. 1978. Influence of irradiation on the keeping quality of pre-packed soup greens at 10°C. En: Processing by Irradiation: Proceedings of an International Symposium on Food Preservation by Irradiation, Wageningen Netherlands. Vienna: International Atomic Energy Agency. pp.275-282.
- Latorre ME., Narvaiz P., Rojas AM. y Gerschenson LN. 2010. Effects of gamma irradiation on bio-chemical and physico-chemical parameters of fresh-cut red beet (*Beta vulgaris* L. var. *conditiva*) root. Journal of Food Engineering, 98 (2), 178-191.
- LaVerne JA. 2000. OH Radicals and Oxidizing Products in the Gamma Radiolysis of Water. Radiation Research, 153 (2), 196-200.

- Lee J., Kim J., Yook H., Kang K., Lee W., Hwang H. y Buyn M. 2001. Effects of gamma radiation on the allergenicity and antigenicity properties of milk proteins. *Journal of Food Protection*, 64, 272-276.
- Lee Sun-Young 2004. Microbial Safety of Pickled Fruits and Vegetables and Hurdle Technology. *Journal of Food Safety*, 4, 21-32.
- Leistner L. y Gorris LGM. 1995. Application of hurdle technology in developing countries. En: *Food Preservation by Combined Methods*. Gorris, L.G.M. Ed. Final Report Flair Concerted Action No. 7, Subgroup B. Commission of the European Communities, The Netherlands. pp. 95-98
- Levigne S., Ralet MC., Quéméner B., y Thibault JF. 2004. Isolation of diferulic bridges ester-linked to arabinan in sugar beet cell walls. *Carbohydrate Research*, 339(13), 2315-2319.
- Lin S. y Brewer M.S. 2005. Effects of blanching methods on quality characteristics of frozen peas. *Journal of Food Quality*, 28, 350-360.
- Lin T-T, y Pitt RE. 1986. Rheology of apple ypotato tissue as affected by cell turgor pressure. *Journal of Texture Studies*, 17, 291-313.
- Liu X., Gao Y., Peng X., Yang B., Xu H. y Zhao J. 2008(a). Inactivation of peroxidase and polyphenol oxidase in red beet (*Beta vulgaris* L) extract with high pressure carbon dioxide. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(2), 4-31
- Liu X, Gao Y., Wang Q. y Yang B. 2008(b). Impact of high-pressure carbon dioxide combined with thermal treatment on degradation of red beet (*Beta vulgaris* L) pigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 6480-6487.
- Liu X., Gao Y, Xu H., Hao K., Liu G. y Wang Q. 2010. Inactivation of peroxidase and polyphenol oxidase in red beet (*Beta vulgaris* L) extract with continuous high pressure carbon dioxide. *Food Chemistry*, 119, 108-113.
- Llano K.M., Haedo AS., Gerschenson LN. y Rojas AM. 2003. Mechanical and biochemical response of kiwifruit tissue to steam blanching. *Food Research International*, 36(8), 767-775.
- Lowry OH., Rosebrough NJ. y Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.

- Luckey T. D.1980. Hormesis with ionizing radiation. Boca Raton: CRC Press.Florida
- MacDougall AJ. y Selvendran RR.2001. Chemistry, Architecture, and Composition of Dietary Fiber from Plant Cell Walls En: Handbook of Dietary Fiber. S Sungsoo Cho y Mark Dreber Ed. ISBN:08247-8960-1.Copyright® 2001 by Marcel Dekker, Inc.USA Capítulo 9.
- Marangoni AG., Jackman RL. y Stanley DW.1995 Chilling associated softening of tomato fruit is related to increased pectinmethylesterase activity. Journal of Food Science, 60(6), 1277-1281.
- Marry M., Roberts K. Jopson S.J., Huxham I.M., Jarvis M.C., Corsar J., Robertson E. y McCann M.C. 2006. Cell-cell adhesion in fresh sugar-beet root parenchyma requires both pectin esters and calcium cross-links. Physiologia Plantarum,126(2), 243-256.
- Matsui KN, Wilhelms Gut JA, de Oliveira PV. y Tadini CC. 2008.Inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in green coconut water by microwave processing. Journal of Food Engineering, 88, 169-176.
- McCann MC., Wells B. y Roberts K. 1990 Direct visualisation of cross-links in the primary plant cell wall. Journal of Cell Science, 96, 323 334.
- McCann MC., Hammouri M.,Wilson R., Belton P.y Roberts K. 1992. Fourier Transform Infrared Microspectroscopy is a new way to look at plant cell walls. Plant Physiology, 100, 1940-1947.
- McEvoy H. ,Ross-Murphy SB. y Clark AH. 1985. Large deformation and ultimate properties of biopolymer gels: 1. Single biopolymer component systems. Polymer, 26, 1483-1492.
- Mobhammer MR., Maier C., Stintzing FC. y Carle R. 2006. Impact of thermal treatment and storage on color of yellow-orange cactus pear (*Opuntia ficus-indica* L. Mill. cv. `Gialla`) juices. Journal of Food Science, 71(7), 400-406.
- Mongeau R., Scott FW. y Brassard R. 1999. Definition and Analysis of Dietary Fiber. En Complex Carbohydrates in Foods. Leon Prosky , Susan Sungsoo Cho y Mark Dreher Eds. CRC Press -ISBN: 978-0-8247-0187-1 Capítulo 22.

- Moussaid M., Lacroix M., Nketsia-Tabiri J. y Boubekri C. 2000. Phenolic compounds and color of oranges subjected to a combination treatment of waxing and irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*, 57, 273-275.
- Mukandama JP, Fernández A, Peteira B. y González MC. 2003. Efecto de las radiaciones gamma ^{60}Co sobre la actividad enzimática en el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* mill.) *Revista. Protección Vegetal*, 18(2), 79-84.
- Munoz-Munoz JL., García-Molina F., Molina-Alarcón M., Tudela J., García-Cánovas F. y Rodríguez-López JN. 2008. Kinetic characterization of the enzymatic and chemical oxidation of the catechins in green tea, 56(19), 9215-9224.
- Narine SS. y Marangoni AG. 1999. Fractal Nature of Fat Crystal Networks, *Physical Review. E*, 59, 1908–1920.
- Narvaiz P. 2000. Irradiación de los Alimentos - <http://www.nutrinfo.com.ar>
- Naumenko IV. y Phillipov MP. 1992. Colorimetric method for determination of acetyl groups in pectic substances.. *Akad Nauk Rep Moldova Bioli Khim Nauki*, 1, 56-59. (en Ruso).
- Ng A. y Waldron KW. 1997. Effect of cooking and pre-cooking on cell wall chemistry in relation to firmness of carrot tissues. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 73, 503-512.
- Ng A, Harvey AJ, Parker ML, Smith AC, y Waldron KW. 1998(a). Effect of oxidative coupling on the thermal stability of texture and cell wall chemistry of beet root (*Beta vulgaris*). *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3365-3370.
- Ng A., Parr AJ., Ingham ML., Rigby NM., y Waldron KW. 1998(b). Cell wall chemistry of carrots (*Daucus carota* L. cv. Amstrong) during maturation and storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2933-2939.
- Nguyen-The C. y Carlin F. 1994. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34, 371–401.

- Ni L., Lin D. y Barrett D.M. 2005. Pectin methylesterase catalyzed firming effects on low temperature blanched vegetables. *Journal of Food Engineering*, 70, 546-556.
- Niemira BA, Sommers CH. y Fan X. 2002. Suspending lettuce type influences recoverability and radiation sensitivity of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Protection*, 65(9), 1388-1393.
- Niemira BA. y Fan X., 2006. Low dose irradiation of fresh and fresh-cut produce: safety, sensory, and shelf life. En: *Food Irradiation. Research and Technology*. Sommers, C.A. y Fan, X. (Eds) Blackwell y IFT Press, Oxford,UK., Capítulo 10, pp.169-184.
- Niemira BA., 2007. Relative efficacy of sodium hypochlorite wash versus irradiation to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 internalized in leaves of Romaine lettuce and baby spinach. *Journal of Food Protection*,71(11), 2526–2532.
- Nilsson SB., Hertz CH. y Falk S. 1958. On the relation between turgor pressure and tissue rigidity II.Theoretical calculations on model systems. *Physiologia Plantarum*, 11, 818-837.
- Noomhorm A., Ilangantileke SG., Upadhyay IP., Karki DB. y Apintanapong M. 1998. Use of irradiation in combination with preservation techniques to extend the shelf life of tropical fruits and their products. En: “Combination processes for food irradiation”. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria. pp.53-75.
- Nussinovitch A., Peleg M. y Normy MD.1989.A modified Maxwell and a non-exponential model for the characterization of the stress-relaxation of agar and alginate gels. *Journal of Food Science*, 54, 1013-1016.
- Oh SY., Yoo DI., Shin Y. y Seo G. 2005. FTIR analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon dioxide. *Carbohydrate Research*, 340, 417-428.
- Ordaz-Ortiz J.J., Marcus S.E. y Knox J.P. 2009. Cell wall microstructure analysis implicates hemicellulose polysaccharides in cell adhesion in tomato fruit pericarp parenchyma. *Molecular Plant*, 2, 910–921.

- Orsat V., Raghavan V. y Meda V. 2005. Microwave technology for food processing: an overview. En: The microwave processing of foods. Helmar Schubert y Marc Regier (Eds.) Taylor & Francis. CRC Press Boca raton, Boston New York, Washington DC. pp 105-118.
- Oudgenoeg G., Dirksen E., Ingemann S., Hilhorst R., Gruppen H., Boeriu CG., Piersma SR., van Berkel WJ., Laane C. y Voragen AGJ. 2002. Horseradich peroxidase-catalyzed oligomerization of ferulic acid on a template of a tyrosine-containing tripeptide. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 21332-21340.
- Parr A.J., Ng A., y Waldron K.W. 1997. Ester-Linked Phenolic Components of Carrot Cell Walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (7), 2468-2471.
- Passardi F., Cosio C., Penel C. y Dunand C. 2004 (a). Review: Peroxidases have more functions than a Swiss army knife *Plant Cell Reports*, 24 (5), 255-265
- Passardi F., Longet D., Penel C. y Duny C. 2004 (b). The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in ly plants. *Phytochemistry*, 65, 1879-1893.
- Peleg M. y Calzada JF. 1976. Stress relaxation of deformed fruits and vegetables. *Journal of Food Science*, 41, 1325-1329.
- Pereira RN y Vicente AA 2010. Environmental impact of novel thermal non-thermal Technologies in food processing. *Food Research International*, 43, 1939-1943.
- Perreux L. y Loupy A. 2001. A tentative rationalization of microwave effects in organic synthesis according to the reaction medium, and mechanistic considerations. *Tetrahedron*, 57, 9199-9223.
- Perry RH. y Green DW. 1997. *Perry's Chemical Engineers' Handbook* (7a Edición).
- Philip JR. 1958. Propagation of turgor and other properties through cell aggregations. *Plant Physiology*, 33, 271-274.
- Picouet PA., Fernández A., Serra X., Suñol, JJ. y Arnau J. 2007. Microwave heating of cooked pork patties as a function of fat content. *Journal of Food Science*, 72, 57-63.

- Pitt RE. y Chen HL.1983. Time-dependent aspects of the strength and reology of vegetative tissue. *Transactions of ASAE*, 26, 1275-1280.
- Piyasena P., Dussault C., Koutchma T., Ramaswamy H. y Awuah G. 2003. Radio frequency heating of foods: Principles and applications and related properties.A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43 (6), 587–606.
- Porcelli M., Cacciapuoti G., Fusco S., Massa R., d`Ambrosio G., Berdtoldo C., De Rosa M. y Zappia V. 1997. Nonthermal effects of microwaves on proteins:thermophilic enzymes as model system. *FEBS Letters*, 402, 102-106.
- Pothakamury UR., Barbosa-Cánovas GV. y Swanson BG. 1993. Magnetic-field inactivation of microorganisms and generation of biological changes. *Food Technology*, 47 (12), 85–93.
- Pouteau C., Dole P., Cathala B., Averous L. y Boquillon N. 2003. Antioxidant properties of lignin in polypropylene. *Polymer Degradation and Stability*, 81, 9-18.
- Prakash A., Guner AR., Caporaso F. y Foley DM. 2000. Effects of Low-dose Gamma Irradiation on the Shelf Life and Quality Characteristics of Cut Romaine Lettuce Packaged under Modified Atmosphere. *Journal of Food Science*, 65 (3), 549-553.
- Price NJ., Pinheiro C., Soares CM., Ashford DA., Ricardo CP. y Jackson PA. 2003. A Biochemical and Molecular Characterization of LEP1, an Extensin Peroxidase from Lupin. *Journal of Biological Chemistry*, 278 (42), 41389-41399.
- Quenzer NM. y Burns EE. 1981. Effects of microwave, steam and water blanching of freeze-dried spinach. *Journal of Food Science*, 46 (2), 410-413.
- Ramaswamy HS y Tang J. 2008. Microwave and Radio Frequency Heating. *Food Sciences and Technology International*;14 (5), 423–427.
- Ramesh MN., Wolf W., Tevini D. y Bognar A. 2002. Microwave blanching of vegetables *Journal of Food Science*,67 (1), 390-398.
- Rastogi NK. 2005. Impact of gamma-irradiation on some mass transfer driven operations in food processing, *Radiation Physics and Chemistry*, 73, 355–361.

- Ratnayake RM., Sunil MLD. y Hurst PL. 2003. Influence of Cultivar, Cooking, and Storage on Cell-Wall Polysaccharide Composition of Winter Squash (*Cucurbita maxima*). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 1904-1913.
- Regalado C., Garcia-Almendarez BE. y Duarte-Vanquez MA. 2004. Biotechnological applications of peroxidases. Phytochemistry Review, 3(1-2), 243-256.
- Richard-Forget FC. y Gauillard FA. 1997. Oxidation of Chlorogenic Acid, Catechins and 4-methylcatechol in Model Solution by Combinations of Pear (*Pyrus communis* Cv. Williams) Polyphenol Oxidase and Peroxidase: A Possible Involvement of peroxidase in Enzymatic Browning. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 2472-2476.
- Rivera-Pastrana DM., Gardea Béjar AA., Martínez-Téllez MA., Rivera-Domínguez M y González-Aguilar GA, 2007. Postharvest biochemical effects of uv-c irradiation on fruit and vegetables. Revista Fitotecnia Mexicana, 30 (4), 361-372.
- Rizvi F. y Tong C. 1997. Fractional conversion for determining texture degradation kinetics of vegetables. Journal of Food Science, 62 (1), 1-7.
- Roberts J., Walker LT. y Anderson JC. 2004. Assessment of microwave blanching as a preparatory tool for home freezing of yellow squash (*Curcubita pepo*). Institute of Food Technologist Annual Meeting. Las Vegas, NV. 67C-32.
- Rodriguez R., Jimenez A., Fernandez-Bolaños J., Guillen R. y Heredia A. 2006. Dietary fiber from vegetable products as source of functional ingredients. Trends in Food Sciences and Technology, 17, 3-15.
- Rojas AM., Gerschenson LN. y Marangoni AG. 2001. Contributions of cellular components to the rheological behaviour of kiwifruit. Food Research International, 34, 189-195.
- Rojas AM., Delbon M., Marangoni AG. y Gerschenson LN. 2002. Contribution of Cellular Structure to the Large and Small Deformation Rheological Behavior of Kiwifruit. Journal of Food Science, 67(6), 2143-2148.
- Rojas AM., Marangoni AG., Gerschenson LN., Latorre ME. y de Escalada Plá, MF. 2010. Relative Contributions of Turgor, Cell Wall and Middle Lamella to the

Mechanical Performance of Vegetable Tissues Determined through Controlled Osmotic Stress. En: Food Engineering proposals. Brendan C. Siegler (Ed). Nova Science Hauppauge , New York, USA. pp.1-59.

- Roland JC. 1978. Cell wall differentiation and stages involved with intercellular gas space opening. *Journal of Cell Science*, 32(1), 325-336.

- Roy I. y Gupta MN. 2003. Non-Thermal effects of microwave on protease-catalyzed esterification and transesterification. *Tetrahedron*, 59, 5431-5436.

- Sajnín C., Gerschenson LN. y Rojas AM. 1999. Turgor pressure in vegetable tissues: comparison of the performance of incipient plasmolysis technique using mannitol and polyethylene glycol. *Food Research International*, 32, 531-537.

- Sajnín C., Gamba G., Gerschenson LN. y Rojas AM. 2003. Textural histological and biochemical changes in cucumber (*Cucumis sativus* L.) due to immersion and variations in turgor. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83 (7), 731-740.

- Sánchez-Ferrer A., Rodríguez-López JN., García-Cánovas F. y García-Carmona F. 1995. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta* 1247, 1-11.

- Scheneeman BO.1998. Dietary Fiber and Gastrointestinal Function. *Nutrition Research*, 18 (4), 625-632.

- Schwartz SJ., von Elbe JH.; Jackman RL y Smith JL. 1980. Quantitative determination of individual betacyanin pigments by high performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28, 540-543.

- Sepúlveda-Jiménez G., Rueda-Benítez P., Porta H. y Rocha-Sosa M. 2004. Betacyanin synthesis in red beet (*Beta vulgaris*) leaves induced by wounding and bacterial infiltration is preceded by an oxidative burst. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 64, 125–133.

- Shazman A., Mizrahi S., Cogan U. y Shimoni E. 2007. Examining for possible non-thermal effects during heating in a microwave oven. *Food Chemistry*, 103, 444-453.

- Showalter AM., 1993. Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell*, 5, 9-23.

- Shui G. y Leong LP. 2006. Residue from star fruit as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. *Food Chemistry*, 97, 277-284
- Somani Omprakash G., Choudhari Anant L., Rao BS. y Mirajkar SP. 2003. Enhancement of crystallization rate by microwave radiation: synthesis of ZSM-5. *Materials Chemistry and Physics*, 82 (3), 538-545.
- Sommer-Knudsen J., Bacic A. y Clarke AE. 1998 Hydroxyproline-rich plant glycoproteins. *Phytochemistry*, 47, 483–67.
- Stadelmann E. 1966. Evaluation of turgidity, plasmolysis and deplasmolysis of plant cells. En: *Methods in cell physiology*. Eduard Stadelmann (Ed) Prescott DM. Academic Press.N.Y.Vol. II. pp.143-216.
- Steffe JF.,1996. Introduction to Rheology. En: *Rheological methods in food process engineering*. 2ªEd..Fremann Ed Press. MI, USA Capítulo1 pp.1-93.
- Steiner Ulrike, Schliemann Willibald, Böhm Hartmut y Strack Dieter, 1999. Tyrosinase involved in betalain biosynthesis of higher plants. *Planta*, 208 (1), 114-124.
- Stintzing FC y Carle R. 2007. Betalains-emerging prospects for food scientistis. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 514-525.
- Strasser GR. y Amado R. 2001. Pectic substances from red beet (*Beta vulgaris conditiva*). Part I. Structural analysis of rhamnogalacturonan I using enzymic degradation and methylation analysis. *Carbohydrate Polymers*, 44, 63–70.
- Subramanian S., Murugesan R., Devasahayam N., Cook JA., Afeworki M., Pohida T., Tschudin RG., Mitchell JB. y Krishna MC. 1999. High-speed data acquisition system and receiver configurations for time-domain radiofrequency electron paramagnetic resonance spectroscopy and imaging. *Jorunal Magnetic Resonance*, 137, 379-388.
- Synytsya A., Copikova J. y Jankovska P. 2003 Spectroscopic estimation of feruloyl groups in sugar beet pulp and pectin. *International Sugar Journal*, 105, 481–488.
- Synytsya A., Copíková J., Matějka P. y Machovič V. 2003. Fourier transform Raman and infrared spectroscopy of pectins. *Carbohydrate Polymers*, 54, 97–106.

- Talbott LD. y Ray, PM. 1992. Molecular size and separability features of pea cell wall polysaccharides. Implications for models of primary structure. *Planta Physiology*, 98, 357-368.
- Tang B., Yu L., Huang S., Luo J. y Zhuo Y. 2010. Energy efficiency of pre-treating excess sewage sludge with microwave irradiation. *Bioresource Technology*, 101, 5092–5097.
- Tang J., 2005 .Dielectric properties of foods. En: *Microwave processing of foods* Helmar Schubert y Marc Regier (Eds). Taylor & Francis CRC Press Boca raton. Boston, New York Washington DC. pp.22-38.
- Thakur B. y Singh R. 1995. Combination processes in food irradiation. *Trends in Food Science and Technology*, 6, 7-11.
- Thayer DW. 1990. Food Irradiation: Benefits and concerns. *Journal of Food Quality*, 13, 147-169.
- Thayer DW. y Rajkowski KT. 1999. Developments in irradiation of fruits and vegetables. *Food Technology*, 53(11), 62-65
- Toivonen PMA. y Brummell DA. 2008. Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 48(1), 1-14.
- Tomas-Barberán FA. y Espin JC. 2001. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 853-876.
- Trowell HC., Southgate D., Wolever T., Leeds A., Gassull M., y Jenkins D. 1976. Dietary fiber re-defined. *Lancet*, 1, 967.
- Vadivambal S. y Jaya DS. 2007. Changes in quality of microwave-treated agricultural products- a review. *Biosystems Engineering*, 98, 1-16.
- van Buggenhout S., Sila DN., Duvetter T., van Loey A. y Hendrickx M. 2009. Pectins in Processed Fruit and vegetables: Part III. *Texture Engineering Compressive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(2), 105-117.
- Van Buren JP. 1979. The chemistry of texture in fruits and vegetables. *Journal of Texture Studies*, 10, 1-23.

- van Marle JT., Recourt K., van Dijk C., Schols HA. y Voragen AGJ. 1997. Structural Features of Cell Walls from Potato (*Solanum tuberosum* L.) Cultivars Irene and Nicola. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1684-1693.
- Venkatesh MS. y Raghavan GSV. 2004 .An overview of microwave processing and dielectric properties of agri-food materials. *Biosystems Engineering*, 88 (1), 1-18
- Vicente A. y Castro I. 2007. Novel thermal processing technologies. En *Advances in thermal and non-thermal food preservation*. G. Tewari y V. Juneja (Eds.) Blackwell, Oxford,UK.
- Viera MC., Teixeira AA., Silva FM., Gaspar N. y Silva, CLM. 2002. Alicyclobacillus acidoterrestris spores as a target for Cupuacu (*Theobroma grandiflorum*) nectar thermal processing: kinetic parameters and experimental methods. *International Journal of Food Microbiology*, 77 (1-2), 71-81.
- Vincken JP., Schols HA., Oomen RJFJ., Beldman G., Visser RGF. y Voragen AGJ. 2003. Pectin: the hairy thing. En: *Advances in pectin and pectinase research*. Voragen AGJ., Schols HA. y Visser R. Eds. Dordrecht: Kluwer Academic, pp.47-59.
- Vinson JA, Hao T., Su X. y Zubik L. 1998. Phenol antioxidante quantity and quality food: vegetables. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 46, 3630-3634.
- von Elbe JH., Schwartz SJ. y Hildenbrand BE. 1981. Loss and regeneration of betacyanin pigments during processing of red beets. *Journal of Food Science*, 46, 1713-1715.
- Waje CK., Jun SY., Lee YK., Kim BN., Han DH., Jo C. y Kwon JH. 2009. Microbial quality assessment and pathogen inactivation by electron beam and gamma irradiation of commercial seed sprouts. *Food Control*, 20, 200-204.
- Waldron KW., Ng A., Parker ML. y Parr AJ. 1997(a) Ferulic acid dehydrodimers in the cell walls of *Beta vulgaris* and their possible role in texture. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74, 221-228.
- Waldron KW., Smith AC., Parr AJ., Ng A. y Parker ML. 1997(b). New approaches to understanding and controlling cell separation in relation to fruit and vegetable texture. *Trends in Food Science & Technology*, 8, 213–221.

- Waldrom KW., Parker ML. y Smith AC. 2003. Plant Cell Wall and Food Quality. *Comprehensive Reviews in Food Sciences and Food Safety*, 2, 101-119.
- Walton DC. y Sondheimer E.1968. Effects of Abscisin II on Phenylalanine Ammonia-Lyase Activity in Excised Bean Axes. *Plant Physiology*, 43 (3), 467-469.
- Wang J. y Chao Y. 2003.Effect of ⁶⁰Co irradiation on drying characteristics of apple. *Journal of Food Engineering*, 56, 347-351.
- Wang Z., Ma Y., Zhao G., Liao X., Chen F., Wu J., Chen J.y Hu X. 2006. Influence of gamma irradiation on enzyme, microorganism, and flavor of cantaloupe (*Cucumis melo* L.) juice. *Journal of Food Science*, 71 (6), M215-M220.
- Wathey B., Tierney J., Lidström P. y Westman J. 2002. The impact of microwave assisted organic chemistry on drug discovery. *Drug Discovery Today*, 7 (6), 373-380.
- Williams DC., Lim MH., Chem AO., Pangborgon RM. y Whitaker JR. 1986. Blanching of vegetables from freezing- which indicator enzyme to choose. *Food Thecnology*, 40 (6), 130-140.
- Wilson RH., Smith AC., Kacuraková Saunders PK., Weller N. y Waldron KW. 2000. The Mechanical Properties and Molecular Dynamics of Plant Cell Wall Polysaccharides Studies by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy. *Plant Physiology*, 124, 397-406
- Wood P.J. y Siddiqui I.R.1971.Determination of methanol and its application for measurement of pectin ester content and pectin methyl esterase activity.*Analytical Biochemistry*, 39, 418.428.
- Xuan L., Yanxiang G., Xiaoting P., Bin Y., Honggao X. y Jian Z.2008. Inactivation of peroxidase and polyphenol osidase in red beet (*Beta vulgaris* L.) extract with high pressure carbon dioxide. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 24-31
- Yamaguchi T., Mizobuchi T., Kajikawa R., Kawashima H., Miyabe F., Terao J., Kanazawa K., Takamura H. y Matoba T. 2001. Radical-scavenging activity of

vegetables and the effect of cooking on their activity. Food Science and Technology Research, 7, 250-257.

- Yamamoto K., Yoshitama K. y Teramoto S. 2002. Purification and characterization of polyphenol oxidase from callus culture of *Portulaca grandiflora*. Plant Biotechnology, 19 (2), 95-101.

- Yoshikazu T., Nobuhiro S. y Akemi O. 2008. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. The Plant Journal, 54 (4), 733-749.