



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física

**OBTENCIÓN Y RECONOCIMIENTO DE HUELLAS
DIGITALES DE SISTEMAS MULTICOMPONENTES
MEDIANTE NARICES ELECTRÓNICAS.**

**APLICACIÓN A LA DETECCIÓN DE
ESENCIAS EN GELES DE PECTINA.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires

María Eugenia Monge

Director de tesis: Dr. R. Martín Negri

Buenos Aires, 2006

Para Alicia

Agradecimientos

A Martín por confiar en mi, por su optimismo, alegría, paciencia y por enseñarme tanto.

A Delia por su entusiasmo y apoyo.

A Lelia Dixelio por ser mi consejera de estudios.

A mis compañeras y amigas Daniela, Virginia y Diana por apoyarme siempre.

A Olga por su aliento.

A Maga y Nani por su compañerismo y afecto.

A Fernando Molina por ayudarme con el microscopio.

A Estela Andrade y Cecilia Bonazzola por la ayuda con los sensores.

A Pedro, Betty, Yanina, al Dr. G.G., Silvia, Sole, Ana y Lili por los momentos compartidos.

A Adriana Kolender por ayudarme con los experimentos de RMN y por enseñarme a usar el GC-MS.

A Rosa Erra-Balsells por las discusiones de MALDI.

A Donatella, Rosetta, Jeniffer, Enzo y Gigi por su hospitalidad y generosidad en Italia.

A Luc Nagels por las discusiones científicas.

A mis amigas de siempre: Gaby, Beti, Guada, Mer, Jime, Flo y Nati.

A mis padres por el apoyo incondicional y la paciencia.

A mi hermana por confiar en mí.

A mis abuelos por alentarme con su cariño.

A Adelaida por tantos mates y su compañía.

A Leo por todo.

A toda la gente del Departamento de Química Inorgánica y del INQUIMAE.

A ANPCyT y a CONICET por las becas.

Resumen

La tesis que aquí se presenta trata acerca del empleo de Narices Electrónicas para estudiar la detección de sistemas multicomponentes volátiles incorporados en geles biocompatibles de pectinas.

Se analiza la liberación de distintos *flavours* en el tiempo, en distintas condiciones y se logra la discriminación de aceites esenciales. En todos los casos se utilizan métodos de análisis multivariado de datos como Análisis de Componentes Principales y Redes Neuronales Artificiales.

Las propiedades viscoelásticas de los geles que contienen los *flavours* son analizados por experimentos de reología resueltos en el tiempo. Para cada sistema estudiado se comparan las propiedades viscoelásticas en presencia y ausencia del *flavour* incorporado y se determina el efecto que produce la inclusión del mismo en el sistema.

Además, se correlacionan las medidas de liberación de los *flavours* encapsulados, efectuadas con Narices Electrónicas, con las propiedades viscoelásticas de los geles obtenidas por experimentos de reología. Las correlaciones obtenidas concuerdan con las observaciones de estos sistemas por microscopía óptica.

Por otra parte, se efectúa una caracterización estructural de la muestra de pectina por espectroscopía IR, RMN ^1H y ^{13}C y espectrometría de masas UV-MALDI-TOF. Se identifican los principales grupos funcionales, se determina el grado de esterificación del polisacárido, se obtiene amplia información sobre la distribución de pesos moleculares y de unidades repetitivas en los oligómeros.

Por último, la tesis tiene una extensión con vistas a la implementación de Lenguas Electrónicas, dado que se describe el diseño, construcción y prueba de sensores potenciométricos basados en electrodos ión selectivo a iones cobre, plomo y níquel. Se espera que estos sensores puedan incorporarse en un dispositivo diseñado en nuestro laboratorio, que incluye sensores de gases y sensores de iones en fase líquida, patentado bajo el nombre de “Flavorímetro”.

Palabras claves: narices electrónicas, esencias, geles, reología, análisis multivariado, sensores.

Abstract

This doctoral thesis deals with the use of Electronic Noses for studying the detection of multicomponent volatile systems incorporated in biocompatible pectin gels.

The release of different *flavours* in time is studied in different conditions. The discrimination of essential oils is achieved. In all cases, multivariate data analysis such as Principal Component Analysis or Artificial Neural Networks is used.

The viscoelastic properties of gels containing *flavours* are analysed by rheological experiments resolved in time. The viscoelastic properties are compared for each system in presence and absence of the *flavour*, determining its effect in each system.

The *flavour* release measurements (Electronic Noses) are correlated with the viscoelastic properties of the gels (Rheology). These correlations agree with Optical Microscopy results.

In addition, a structural characterization is performed on the pectin sample using IR spectroscopy, ^1H and ^{13}C NMR and UV-MALDI-TOF mass spectrometry. The main functional groups are identified, the degree of esterification of the polysaccharide is determined. The analysis provides information about the distribution of molecular masses.

Finally, the thesis has an extension to the use of Electronic Tongues. The design, construction and test of potentiometric sensors based on ion selective electrodes are described for the detection of copper, lead and nickel ions. These sensors shall be included in a device developed at the laboratory, which contains gas and liquid sensors, patented with the name of "Flavorimetro".

Key words: electronic noses, flavours, gels, rheology, multivariate analysis, sensors.

Artículos científicos publicados durante la tesis

- Delia L. Bernik, Diana Zubiri, María Eugenia Monge and R. Martín Negri: “New kinetic model of drug release from swollen gels under non-sink conditions”, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2006, 273, 165-173.
- María Eugenia Monge, Donatella Bulone, Daniela Giacomazza, Delia L. Bernik and R. Martín Negri: “Electronic Nose screening of limonene release from multicomponent essential oils encapsulated in pectin gels”, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 2004, 7, 337-344.
- María Eugenia Monge, Donatella Bulone, Daniela Giacomazza, Delia L. Bernik and R. Martín Negri: “Detection of Flavor Release from Pectin Gels using Electronic Noses.” *Sensors & Actuators B* 2004, 101, 28-38.
- G. Bazylak, L. J. Nagels, M. E. Monge: “Macrocyclic versus podant-type neutral ionophore in potentiometric detection of mucolytic agents following separation by various HPLC modes”, *Chromatographia* 2003, 57, 757-765.

Artículo enviado:

- María Eugenia Monge, R. Martín Negri, Daniela Giacomazza and Donatella Bulone: “Correlation between Rheological properties and limonene release in pectin gels using an electronic nose”, enviado para su publicación en 2006.

Manuscrito en preparación:

- María Eugenia Monge, R. Martín Negri, Adriana A. Kolender and Rosa Erra-Balsells: “Structural characterization of native highly-methoxylated pectin using UV-MALDI-TOF MS and NMR spectroscopy”, manuscrito en preparación próximo a ser enviado a *Rapid Communications in Mass Spectrometry*.

Índice

I. Introducción General

I. 1. Introducción general.....	3
I. 2. Bibliografía.....	8

II. Metodologías Empleadas

II. 1. Narices Electrónicas.....	11
II. 1. 1. Nariz Electrónica 1: cámara estanca.....	14
II. 1. 2. Nariz Electrónica 2: aspiración de <i>headspace</i>	16
II. 2. Análisis Multivariado de Datos para Nariz Electrónica.....	17
II. 2. 1. Análisis de Componentes Principales.....	17
II. 2. 2. Redes Neuronales Artificiales.....	21
II. 3. Reología.....	22
II. 4. Espectrometría de masa MALDI.....	26
II. 5. Reactivos y compuestos empleados.....	31
II. 6. Bibliografía.....	34

III. Caracterización Estructural de las Pectinas

III. 1. Introducción.....	39
III. 2. Análisis por Espectroscopia IR.....	41
III. 2. 1. Materiales y Métodos.....	41
III. 2. 2. Resultados y Discusión.....	42
III. 3. Análisis por RMN ¹³ C y ¹ H.....	43
III. 3. 1. Materiales y Métodos.....	43
III. 3. 2. Resultados y Discusión.....	44
III. 4. Análisis por espectrometría de masas UV-MALDI-TOF.....	51
III. 4. 1. Introducción.....	51

III. 4. 2. Materiales y Métodos.....	52
III. 4. 3. Resultados y Discusión.....	54
III. 5. Conclusiones y Resumen del Capítulo III.....	60
III. 6. Bibliografía.....	62

IV. Narices Electrónicas: Encapsulamiento de una esencia de tuti-fruti en geles de pectinas.

IV. 1. Introducción.....	69
IV. 2. Materiales y métodos.....	70
IV. 2. 1. Análisis de la esencia de tuti-fruti y preparación de los geles.....	70
IV. 2. 2. Mediciones Reológicas.....	71
IV. 2. 3. Nariz Electrónica 1 (cámara estanca) y protocolo de medición.....	72
IV. 2. 4. PCA y Redes Neuronales Artificiales.....	74
IV. 3. Resultados y Discusión.....	75
IV. 3. 1. Análisis Reológico de los sistemas.....	75
IV. 3. 2. Resultados de Nariz Electrónica.....	79
IV. 3. 3. Liberación del <i>flavour</i> en el tiempo.....	82
IV. 3. 4. Análisis por PCA y Redes Neuronales.....	83
IV. 4. Conclusiones y Resumen del Capítulo IV.....	88
IV. 5. Bibliografía.....	89

V. Encapsulamiento de aceites esenciales en geles de pectinas.

V. 1. Introducción.....	93
V. 2. Materiales y métodos.....	95
V. 2. 1. Análisis de los aceites por cromatografía gaseosa (CG).....	95
V. 2. 2. Preparación de los geles.....	96
V. 2. 3. Mediciones Reológicas.....	97

V. 2. 4. Nariz Electrónica 1 (cámara estanca).....	97
V. 2. 5. Nariz Electrónica 2 (aspiración de <i>headspace</i>).....	98
V. 2. 6. Microscopía Óptica.....	98
V. 2. 7. Liberación del <i>flavour</i> en sistemas cerrados.....	98
V. 2. 8. Experimento de campo.....	99
V. 2. 9. Análisis de Datos.....	100
V. 2. 9. 1. Análisis de Componentes Principales.....	100
V. 2. 9. 2. Redes Neuronales Artificiales.....	100
V. 3. Resultados y Discusión.....	100
V. 3. 1. Análisis de los aceites por CG.....	100
V. 3. 2. Microscopía Óptica.....	101
V. 3. 3. Análisis Reológicos.....	102
V. 3. 4. Análisis por Narices Electrónicas.....	106
V. 4. Conclusiones y Resumen del Capítulo V.....	117
V. 5. Bibliografía.....	119

VI. Efecto de la composición de los sistemas en las propiedades viscoelásticas y en la liberación de limoneno.

VI. 1. Introducción.....	123
VI. 2. Materiales y métodos.....	124
VI. 2. 1. Preparación de los geles.....	124
VI. 2. 2. Mediciones Reológicas.....	125
VI. 2. 3. Determinación de la liberación del <i>flavour</i> utilizando la Nariz Electrónica 2 (aspiración del <i>headspace</i>).....	127
VI. 2. 4. Microscopía Óptica.....	127
VI. 2. 5. Medición del <i>headspace</i> por espectroscopia IR.....	128
VI. 3. Resultados y Discusión.....	129

VI. 3. 1. Efecto de la concentración de pectina, de Tween 80 y de limoneno en las cinéticas de gelificación.....	129
VI. 3. 2. Dependencia del tiempo de gelificación y del módulo elástico con la concentración de pectina.....	134
VI. 3. 3. Resultados obtenidos con la Nariz Electrónica.....	138
VI. 3. 4. Análisis del <i>headspace</i> por espectroscopía IR.....	141
VI. 3. 5. Microscopía Óptica.....	142
VI. 4. Conclusiones y Resumen del Capítulo VI.....	144
VI. 5. Bibliografía.....	146

VII. Sensores Potenciométricos para Lenguas Electrónicas

VII. 1. Introducción.....	151
VII. 2. Materiales y métodos.....	153
VII. 2. 1. Construcción de los electrodos.....	153
VII. 2. 2. Preparación de la membrana de PVC.....	155
VII. 2. 3. Acondicionamiento de los electrodos.....	156
VII. 2. 4. Instrumentos de Medición.....	157
VII. 2.5. Curvas de Calibración.....	157
VII. 3. Resultados y Discusión.....	158
VII. 3. 1. Sensor de Cu ²⁺	158
VII. 3. 2. Sensor de Pb ²⁺	160
VII. 3. 3. Sensor de Ni ²⁺	161
VII.4. Conclusiones y Resumen del Capítulo VII.....	166
VII. 5. Bibliografía.....	168

VIII. Conclusiones Generales

VIII. Conclusiones Generales.....	173
-----------------------------------	-----

Apéndice

A. 1. Espectrometría de masas UV-MALDI-TOF.....	179
A. 2. Materiales y métodos.....	182
A. 3. Resultados y Discusión.....	186
A. 4. Bibliografía.....	202

Listado de símbolos y acrónimos más usados

ANN: Redes Neuronales Artificiales

D : tiempo de incubación de una muestra en días

G' : Módulo elástico

G'' : Módulos viscoso

PCA: Análisis de Componentes Principales

S_i : Señal del sensor i

T : Temperatura

t : Tiempo

t_g : tiempo de gelificación

$\tan(\delta)$: G'' / G'

η^* : Viscosidad compleja

ω : Frecuencia Angular

τ : tiempo que dura una medición

Capítulo I

INTRODUCCIÓN GENERAL

I.1. Introducción General

Cuando en 2002 inicié esta tesis doctoral, el grupo de investigación finalizaba un estudio en conjunto con una empresa internacional de fragancias y sabores sobre la discriminación de compuestos volátiles disueltos en un medio homogéneo, concretamente en formulaciones para fragancias.¹ En ese trabajo se había utilizado con éxito la primera Nariz Electrónica desarrollada en el grupo. Por lo tanto, se decidió iniciar con la presente tesis una nueva etapa de mayor dificultad: utilizar la metodología de Nariz Electrónica para detectar y discriminar compuestos volátiles que se liberan desde un medio microheterogéneo de encapsulamiento (matriz). Esta temática es de central importancia en el área de tecnología de alimentos y por ese motivo iniciamos el primer estudio con aromatizantes-saborizantes que se utilizan corrientemente en alimentos. La metodología de narices electrónicas es de alta potencialidad en estos casos, pues los saborizantes y/o aromatizantes que se encapsulan (referidos como *flavours*) son sistemas multicomponentes de composición química compleja y por lo tanto, parece en principio más apropiado a los fines prácticos, discriminar entre las diversas formulaciones por un análisis de reconocimiento de patrones (como hacen las Narices y Lenguas Electrónicas), que por estudios específicos de la composición.

El primer aspecto fue definir una matriz de encapsulamiento que fuese biocompatible, que se utilizara en productos comerciales reales, y en la cual se pudiera modificar el protocolo de preparación para que fuese posible variar lo más sistemáticamente posible sus propiedades viscoelásticas. Optamos por la preparación de geles de pectinas de alto grado de metilación por tratarse de polisacáridos naturales que reúnen dichas las características. Son compuestos de relativo bajo costo, ampliamente utilizados como espesantes en alimentos y en la industria farmacéutica.

Dado que la pectina utilizada en la tesis es un producto comercial importado de Brasil sin especificaciones, se dedicaron importantes esfuerzos de caracterización. El principal aspecto es que se realizaron por primera vez en el INQUIMAE estudios de espectrometría de masas UV-MALDI-TOF con un equipo propio recientemente adquirido. Estos

estudios requirieron un gran esfuerzo debido a la complejidad inherente a la caracterización de polisacáridos naturales, un tema de alto interés actual en la literatura sobre aplicaciones de MALDI. En el Capítulo III de la tesis se detallan los experimentos de MALDI, de espectroscopía IR y de resonancia magnética nuclear ^1H y ^{13}C que se utilizaron para caracterizar las muestras.²

Una vez definida la matriz de encapsulamiento se estudió por Nariz Electrónica la liberación de un *flavour* relativamente soluble en agua, lo cual simplificó el protocolo de encapsulamiento (Capítulo IV).³ En este trabajo se estudió, a lo largo del tiempo, la liberación hacia el *headspace*, con énfasis en el efecto del envejecimiento de la matriz sobre la liberación. Por este motivo, se realizó simultáneamente la caracterización reológica (viscoelasticidad) de los geles, por lo cual se inició en ese momento una colaboración con el grupo de investigación de la Dra. Donatella Bulone, del Instituto de Biofísica de Palermo, Italia, quien cuenta con experiencia en el análisis reológico de materiales viscoelásticos. Esta colaboración se sostuvo a lo largo de toda la tesis y continúa actualmente. Realicé dos estancias en el grupo de la Dra. Bullone, una de ella de tres meses que permitió hacer un estudio muy sistemático y detallado de uno de los sistemas matriz-*flavour* estudiados. Hemos publicado dos artículos internacionales en colaboración y enviado un tercero.^{3,4,5}

Habiendo concluido la etapa anterior se decidió avanzar hacia el encapsulamiento de sistemas no polares, en un estudio que presenta varias características marcadamente diferenciadas con respecto a los de la etapa anterior (Capítulo V). Se utilizaron en este caso aceites esenciales de plantas nativas, con los cuales trabaja un grupo del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Mar del Plata, debido a que tienen propiedades como acaridas en panales de abejas. El primer objetivo fue el encapsulamiento de compuestos no polares en el medio hidrofílico, lo cual requirió emplear un vehiculizante para los aceites esenciales. Observamos por microscopía óptica que este sistema genera microemulsiones, o sea que constituye un sistema completamente diferente. La segunda diferencia con respecto al Capítulo IV es que ahora el seguimiento temporal de la liberación de los aceites esenciales debe estudiarse hacia una fase aérea de humedad y temperatura controlada,

debido a la aplicación para el control de ácaros en panales. Finalmente, el tercer aspecto de esta etapa fue explorar la capacidad de discriminar dos aceites esenciales encapsulados (*Poleo* y *Tagetes Minuta*) que contienen un componente común (limoneno), empleando la Nariz Electrónica. Esto se logró utilizando un análisis de los datos mediante Redes Neuronales Artificiales.⁴

Como se mencionó, el uso de vehiculizantes para incorporar sustancias no polares implicó pasar a un sistema mucho más complejo en donde se generan microemulsiones, con la formación de microdominios de diferente polaridad. Se pudo seguir, con una filmación desde un microscopio de alto aumento, la evolución hacia la formación de “microgotas” en donde se encuentra un *flavour* no polar. Esto llevó a investigar en estos sistemas la influencia de sus propiedades reológicas sobre la liberación, variando sistemáticamente la composición. Pero claramente existe una intercorrelación, que se puede expresar de este modo: ¿cómo influye la composición del sistema microemulsionado sobre la liberación del *flavour*, en un sistema complejo que evoluciona temporalmente y en donde a la vez el propio *flavour* modifica la estructura? Este estudio, que implica una dificultad mucho mayor, se inició en esta tesis (Capítulo VI) empleando un *flavour* consistente en un único compuesto, limoneno, el cual está presente tanto en la esencia usada en el Capítulo IV como en los aceites esenciales. Se analizaron variables tales como la concentración del polisacárido, la influencia del vehiculizante y del compuesto volátil en las propiedades del sistema y se estudiaron las cinéticas de gelificación de diversos sistemas (transición sol-gel). Las propiedades reológicas se estudiaron durante la pasantía de tres meses que realicé en el grupo de la Dra. Donatella Bulone. Algunos de estos resultados forman parte de un artículo recientemente enviado para su publicación. Uno de los principales resultados está dado por haber encontrado, e informado por primera vez en la literatura en la medida de nuestro conocimiento, una muy buena correlación entre la información procesada con la Nariz Electrónica y determinados parámetros reológicos.⁵

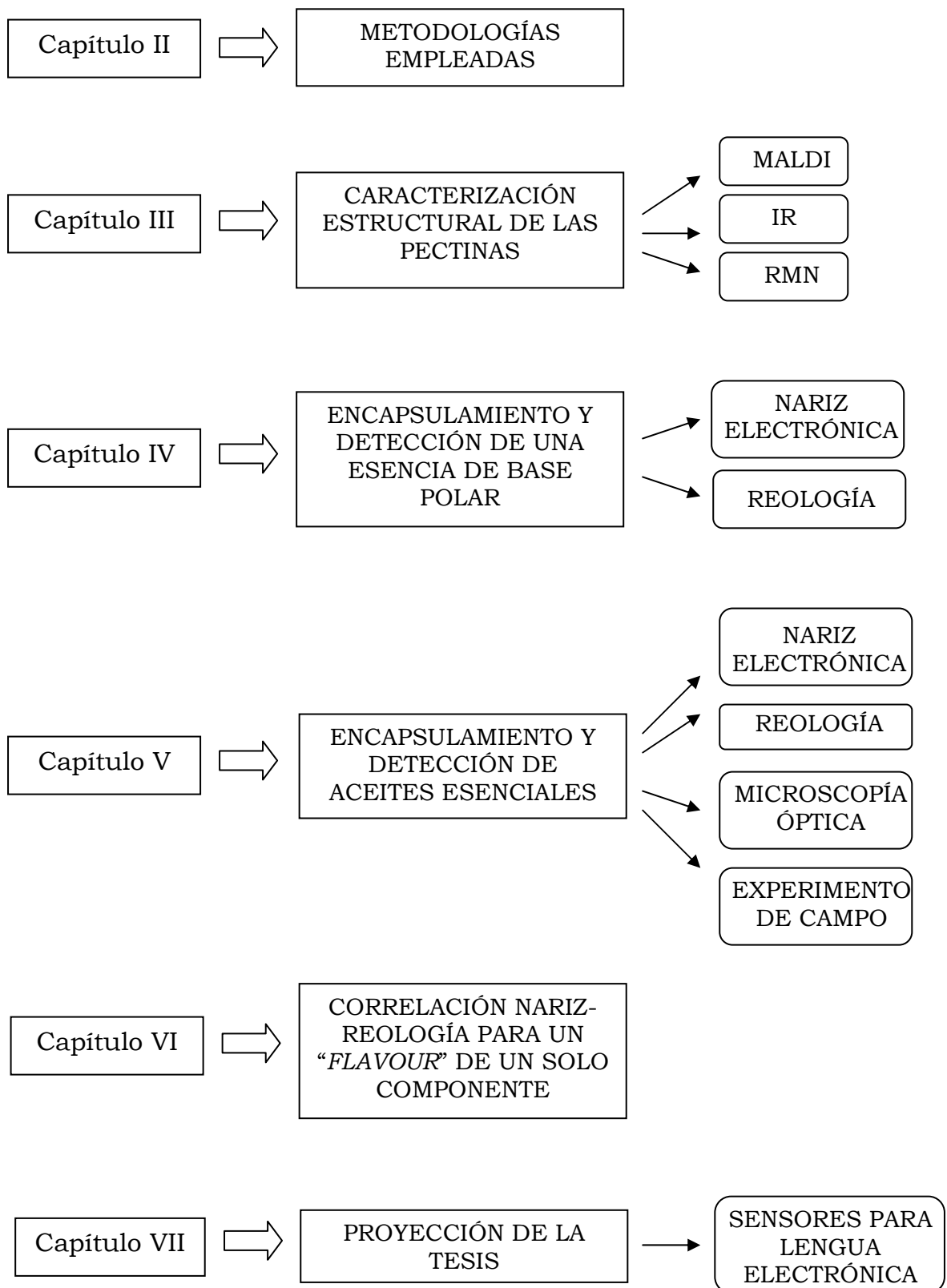
Sobre la finalización de la tesis inicié un estudio que constituye una extensión de la misma para futuras nuevas tesis, orientado hacia el uso de Lenguas Electrónicas. En particular, sobre la posibilidad de

utilizar una “fusión” de Narices y Lenguas Electrónicas, dado que en el grupo de investigación se desarrolló y patentó en Argentina, Europa y EEUU, un dispositivo de ese tipo al cual se le dio el nombre de “Flavorímetro”. La idea fundamental de este dispositivo es medir simultáneamente las fases líquida y gaseosa de una muestra y obtener de esa forma una mayor capacidad de discriminación de patrones. Un aspecto fundamental es contar con la capacidad de desarrollar sensores para la fase líquida (Lengua), lo cual inicié en la parte final de la tesis. En el Capítulo VII se describe el desarrollo y las primeras mediciones de caracterización con sensores potenciométricos basados en membranas de PVC soportadas sobre carbono vítreo. Se muestran resultados de los experimentos realizados para la detección de sistemas simples (soluciones de cobre, plomo y níquel). Parte de estos estudios fueron realizados en 2006 en una pasantía de investigación en el laboratorio del Profesor Luc Nagels de la Universidad de Amberes, Bélgica. Los resultados, si bien preliminares, son promisorios pues en el caso de soluciones de iones sencillas los sensores muestran respuestas Nerstianas en función de la concentración del ión.

Finalmente, es importante indicar que el uso sistemático de Narices Electrónicas en la tesis doctoral constituye un aspecto novedoso importante. Si bien las metodologías de Nariz y Lengua Electrónica son herramientas analíticas de alto potencial para el sensado de “olores” y “sabores”,^{6,7,8} su utilización no es simple en el estado actual de la técnica y requiere un especial cuidado tanto para obtener datos de calidad, como en su posterior análisis. Esto se profundiza más en el caso de Lenguas Electrónicas. Tal vez sea posible afirmar que estas metodologías se encuentran actualmente en un estado intermedio de evolución: se ha avanzado mucho en las dos últimas décadas, pero aún existe un recorrido importante tanto en el área de materiales para sensores como en todos los aspectos de la instrumentación analítica. Estos aspectos aparecen en formas más o menos explícitas a lo largo de todos los capítulos de la presente tesis.

Durante el período de realización de la tesis se publicaron 4 artículos científicos, se presentaron trabajos a diversos congresos nacionales e internacionales y se realizaron servicios de análisis a terceros empleando Narices Electrónicas.

A continuación se muestra un esquema que resume el contenido de la tesis.



I.2. Bibliografía

¹ A. Branca, P. Simonian, M. Ferrante, E. Novas, R.M. Negri, Electronic nose based discrimination of a perfumery compound in a fragrance, *Sens. Actuators B* 92 (2003) 222–227.

² María Eugenia Monge, R. Martín Negri, Adriana A. Kolender and Rosa Erra-Balsells: “Structural characterization of native high methoxylated pectin using UV-MALDI-TOF MS and NMR spectroscopy”, manuscrito en preparación próximo a ser enviado.

³ María Eugenia Monge, Donatella Bulone, Daniela Giacomazza, Delia L. Bernik and R. Martín Negri: “Detection of Flavor Release from Pectin Gels using Electronic Noses.” *Sensors & Actuators B* 101 (2004) 28-38.

⁴ María Eugenia Monge, Donatella Bulone, Daniela Giacomazza, Delia L. Bernik and R. Martín Negri: “Electronic Nose screening of limonene release from multicomponent essential oils encapsulated in pectin gels”, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 7 (2004) 337-344.

⁵ María Eugenia Monge, R. Martín Negri, Daniela Giacomazza and Donatella Bulone: “Correlation between Rheological properties and limonene release in pectin gels using an electronic nose”, enviado para su publicación en 2006.

⁶ J.W. Gardner, P. Bartlett, *Electronic Noses*, Oxford University Press, Oxford, (1999).

⁷ M. O’Connell, G. Valdora, G. Peltzer, R.M. Negri, A practical approach for fish freshness determinations using a portable electronic nose, *Sens. Actuators B* 80 (2001) 149–154.

⁸ T. Hamacher, J. Niess, P. Schulze Lammers, B. Diekmann, P. Boeker, Online measurement of odorous gases close to the odour threshold with a QMB sensor system with an integrated preconcentration unit, *Sens. Actuators B* 95 (2003) 39-45.

Capítulo II

MATERIALES Y METODOLOGÍAS EMPLEADOS

II. Materiales y Metodologías Empleados

II.1. Narices Electrónicas

Las Narices Electrónicas consisten en “arreglos” de sensores químicos no específicos que emplean métodos matemáticos de reconocimiento de patrones y análisis multivariado para la discriminación o clasificación de muestras a partir de sus olores.¹ En general, se utilizan arreglos de sensores de óxidos metálicos semiconductores (MOS), polímeros conductores, balanzas de cuarzo y/o de ondas acústicas superficiales.

El uso de esta tecnología implica un cambio radical en la forma de toma de muestra y procesamiento de la información para comparar y discriminar entre sistemas de composición química compleja. No se trata de medir una propiedad específica en cada sistema, sino de analizar en forma conjunta un grupo de señales proveniente de los sensores de gases no específicos para poder diferenciar entre muestras mediante el uso de análisis multivariado. Por otro lado, implica que la muestra no se separa en sus componentes individuales como ocurre en una técnica cromatográfica, sino que el vapor se analiza como un todo.

Las Narices Electrónicas utilizadas en este trabajo de tesis poseen una cámara que contiene un arreglo de sensores de gases no específicos basados en óxidos metálicos, cuya conductividad eléctrica cambia en presencia de vapores y gases. Dado que un aroma está definido por un alto número de compuestos, el conjunto de sensores químicos provee un patrón de señales que representa una combinación de todos los componentes del olor. El patrón que presenta una muestra al ser analizada con una determinada Nariz Electrónica, es conocido bajo el nombre de “huella digital” o *fingerprnt*. En particular, para las narices utilizadas en el trabajo de tesis, el patrón de cada muestra se construye a partir del cambio de conductividad de los sensores.

La metodología que implica el uso de Narices Electrónicas permite la obtención y discriminación de “huellas digitales” de muestras que poseen muchos componentes. Dado que los sensores químicos no presentan reconocimiento molecular, se realiza un reconocimiento de

patrones o “huellas digitales”. En un análisis es posible comparar cambios individuales en las señales de los sensores y también cambios en las “huellas digitales” provistas por el arreglo de sensores.

Una posibilidad para representar las “huellas digitales” es mediante un gráfico de barras, donde la señal de cada sensor constituye una barra. Sin embargo, visualmente suelen resultar más descriptivos los gráficos en forma de radares, en los cuales cada vértice del radar corresponde a la señal de cada uno de los sensores (ver Figura II.1).

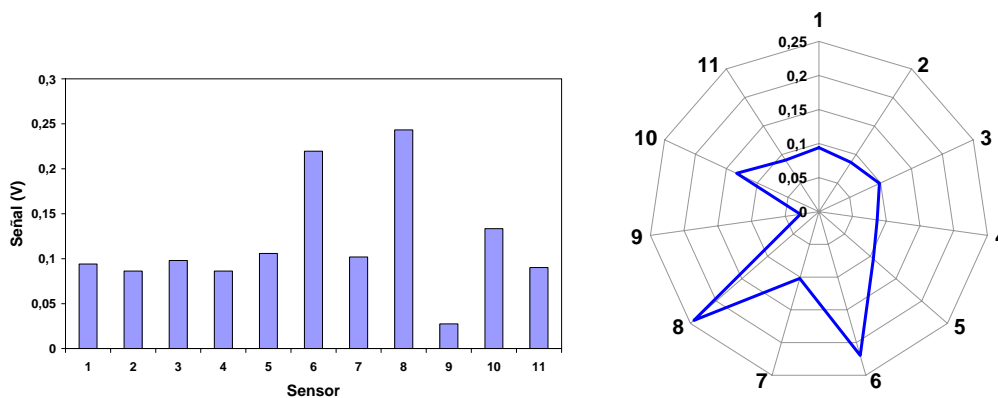
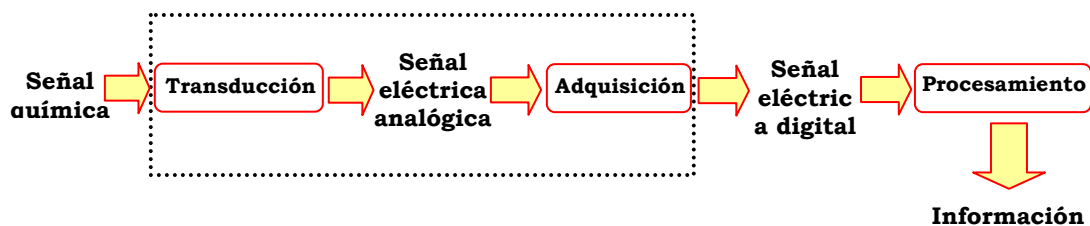


Figura II.1: Gráfico de barra vs. Gráfico radar para una esencia de durazno, obtenidos con una Nariz Electrónica de 11 sensores tipo MOS.

La aplicación principal de esta metodología está basada en el estudio de sistemas de composición compleja como por ejemplo alimentos, bebidas y productos de química cosmética.

El sistema ‘Nariz Electrónica’ consta básicamente de tres subsistemas: un sistema de transducción de señales biofísicas a señales eléctricas, un sistema de adquisición de señales y un sistema de procesamiento de señales:



El subsistema de transducción esta basado en N sensores inespecíficos de gas y de temperatura. Cada uno de estos sensores esta en contacto con la muestra. La señal generada por un sensor dado es proporcional a una o varias de las propiedades de la muestra.

El subsistema de adquisición muestrea periódicamente la señal analógica generada por cada sensor y la convierte a un valor digital. Para realizar esta tarea, es necesario cumplir con los siguientes pasos:

1. Multiplexar los canales de entrada.
2. Muestrear y medir (*sample & hold*) cada valor analógico.
3. Condicionar el valor analógico de entrada para maximizar el rango dinámico del ADC.
4. Transformar este valor analógico a un valor digital.
5. Transmitir este valor digital a una PC para su procesamiento.

La frecuencia de muestreo del sistema (la cual condiciona la velocidad de multiplexación) no puede ser inferior al doble de la frecuencia máxima con que varía la señal proveniente de la variable biofísica de entrada. Afortunadamente, este tipo de señales varían lentamente con el tiempo, de manera tal que una frecuencia de muestreo de 100 Hz es más que suficiente.

Para cumplir con la tarea (1), un sistema de multiplexacion 24x1 en cascada fue implementado. La tarea (2), (3) y (4) es llevada a cabo por un ADC de 12 bits con un control de ganancia digital. El ADC muestrea cada canal 100 veces por segundo, amplifica la señal muestreada hasta lograr el máximo rango dinámico y convierte la señal a 12 bits, equivalente a 4096 valores distintos (Para un rango de 5V, equivalente a una resolución de 1.2 mV). La tarea (5) es llevada a cabo por un microcontrolador PIC, el cual también controla los multiplexores y el ADC (incluido el control de ganancia). Las mediciones ya en formato digital son transmitidas en tiempo real a un PC o Palm utilizando una interfase RS-232 incorporada en el microcontrolador.

Los dos dispositivos de Nariz Electrónica utilizados en este trabajo de tesis fueron desarrollados en la Universidad de Buenos Aires, en el Departamento de Química, Inorgánica, Analítica y Química Física y en el INQUIMAE en el Laboratorio de Arreglos Multisensoriales. Algunas de las principales ventajas de estos dispositivos son su bajo costo, la velocidad de muestreo, la no destrucción de la muestra, la facilidad de transporte de los mismos y la posibilidad de realizar determinaciones *in situ*. A continuación se detallarán más específicamente las características de cada una de las narices empleadas en la tesis.

II.1.1. Nariz Electrónica 1: Cámara Estanca.

Esta Nariz, que se muestra en la Figura II.2, consta de una cámara, en cuya parte superior se hallan los sensores de gases. Además, cuenta con un ventilador ubicado sobre un lateral de la cámara. Se trata de un equipo portátil y no requiere de un sistema inyección del espacio cabeza ni de la separación previa de los componentes de la muestra. En los trabajos de la tesis efectuados con esta nariz, se utilizaron 10 sensores comerciales marca Figaro, basados en dióxido de estaño policristalino (SnO_2). Los códigos de identificación de los sensores son los siguientes: TGS 831 (sensor 1), TGS 813 (sensor 2), TGS 825 (sensor 3), TGS 832 (sensor 4), TGS 880 (sensor 5), TGS 826 (sensor 6), TGS 816 (sensor 7), TGS 842 (sensor 8), TGS 823 (sensor 9) y TGS 800 (sensor 10). Los sensores difieren principalmente en la naturaleza de los dopantes introducidos.

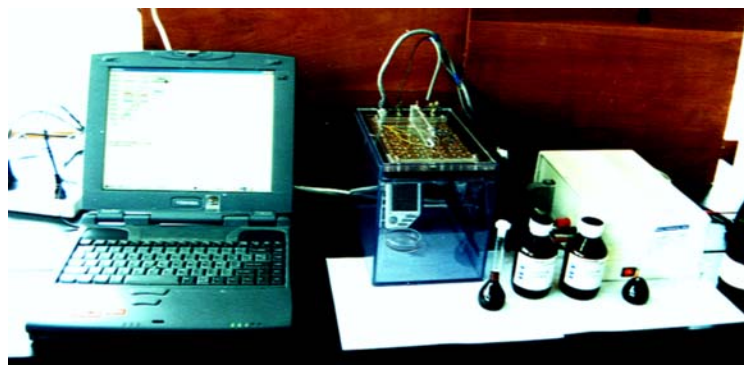


Figura II.2: Nariz Electrónica 1.

La obtención del conjunto de señales que caracterizan una muestra se realiza mediante el siguiente procedimiento. En primer lugar, se efectúa una medición del aire presente dentro de la nariz y se registran las señales de los 10 sensores, con el ventilador encendido, hasta alcanzar un *plateau*. De esta forma, queda constituida la línea de base de la medición, la cual será sustraída de la señal correspondiente a la muestra. Luego, se coloca la muestra dentro de la cámara y una vez cerrada, sin apagar el ventilador, se inicia la medición. El registro de las señales de los sensores se efectúa hasta alcanzar nuevamente un *plateau*. Esta señal estacionaria indicaría un equilibrio entre la concentración de los compuestos de la muestra en la fase vapor y la concentración de los compuestos en el material que los contiene. Por lo tanto, en cada medición se obtiene un grupo de 10 señales $\{S_1, \dots, S_{10}\}$, donde cada señal es indicativa del cambio de conductividad eléctrica en cada sensor, que se produce cuando las moléculas del *flavour* presentes en la cámara se ponen en contacto con la superficie de los sensores. El procedimiento de medición de la línea de base y de la muestra se repite cada vez para cada muestra. Es decir, cada conjunto de señales correspondiente a los vapores de una muestra tiene asociada una línea de base.

Los trabajos realizados con esta Nariz Electrónica, que fue desarrollada en el grupo de investigación, se encuentran publicados en revistas internacionales.^{2,3,4,5}

Controles efectuados

Los geles de pectina con tuti-fruti fueron preparados por quintuplicado para evaluar la reproducibilidad en el encapsulamiento del saborizante. Por lo tanto, las mediciones con la Nariz Electrónica 1 (cámara estanca) también se realizaron por quintuplicado. La Figura II.3 muestra un ejemplo de la reproducibilidad entre muestras mediante la respuesta de uno de los sensores de la Nariz Electrónica. Este resultado se efectuó con los demás sensores y se observó el mismo comportamiento.

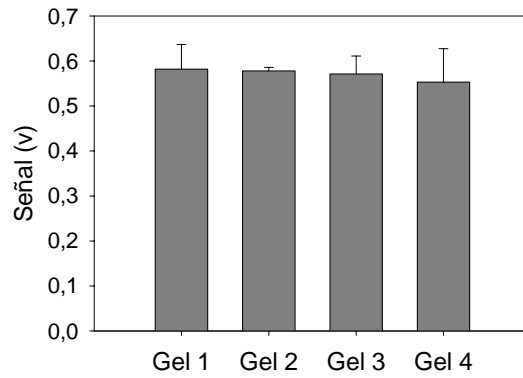


Figura IV.3: Señal en volts del sensor 4 de la Nariz Electrónica 1 (cámara estanca) para diferentes muestras.

II.1.2. Nariz Electrónica 2: Aspiración de *Headspace*.

Este dispositivo también consiste en un arreglo de sensores de gases no específicos ubicados en una cámara de muestreo pero, a diferencia del anterior, los vapores (olores) son aspirados desde la muestra hacia la cámara de sensores. Es decir, el equipo, que se muestra en la Figura II.4, posee una bomba de aspiración y una válvula reguladora que controla el flujo aspirado. En este caso, se utilizaron 8 sensores basados en óxidos policristalinos de SnO_2 .



Figura II.4: Nariz Electrónica 2.

La presencia de la bomba y de la válvula en este modelo diferente de nariz permite el análisis del espacio cabeza de una muestra dada, donde la toma de muestra se realiza mediante un tubo de aspiración.

Éste posee una aguja en su extremo que sirve para perforar el *septum* de goma que cierra los recipientes que contienen la muestra. También se puede obviar el uso de la aguja y utilizar directamente el tubo de aspiración para medir, por ejemplo, en espacios abiertos.

La línea de base se obtiene en este caso, mediante el registro de la respuesta de los sensores a aire comercial operando al mismo flujo que en la toma de muestra, que es controlado por la válvula reguladora. Por lo tanto, en cada medición se obtiene un conjunto de 8 señales $\{S_1, \dots, S_8\}$ luego de la substracción de la línea de base. Cada señal es indicativa del cambio de conductividad eléctrica en el respectivo sensor debido a la presencia del *flavour* en la cámara.

Parte del trabajo que se describe en el Capítulo V constituye el primer trabajo⁶ efectuado con este diseño nuevo de Nariz Electrónica desarrollada en el laboratorio; al que luego le sucedieron otros.⁷

II.2. Análisis Multivariado de Datos para Nariz Electrónica

II.2.1. Análisis de Componentes Principales

La metodología de Nariz Electrónica utiliza análisis multivariado de datos para poder discriminar entre grupos de señales y, en consecuencia, para diferenciar muestras. Uno de los métodos más populares de análisis multivariado es el Análisis de Componentes Principales (PCA), un método no supervisado que sirve para la visualización gráfica de los resultados de discriminación de datos.⁸

Para entender la metodología del análisis de componentes principales es conveniente pensar a cada grupo de señales $\{S_1, \dots, S_N\}$ medidas para cada muestra como un vector en el espacio de dimensión N dado por el número de sensores utilizados en la Nariz Electrónica. Las señales de los sensores representan los componentes del vector medido en la base “canónica” formal de dimensión N . Así, la k -ésima medición es considerada como un vector y puede escribirse en la base canónica de la forma:

$$\vec{V}_k = \sum_{j=1}^N S_{kj} \hat{S}_j \quad 1 \leq k \leq M \quad \text{y} \quad 1 \leq j \leq N \quad (\text{II.1})$$

donde M es el número total de mediciones y \hat{S}_j representa el vector unidad de la base canónica. El índice k indica la medición mientras que j se refiere al sensor.

Ahora bien, se puede demostrar (teorema) que la mayor “variación” de los datos está en la dirección de la base de autovectores de la matriz de covarianza de dimensión N, o sea en la base que diagonaliza la matriz de covarianza. Este teorema le da significado al método de PCA, dado que la información relevante (asociada a la máxima varianza de los datos) es extraída al expresar los vectores \vec{V}_k en una base de autovectores de la matriz de covarianza. En este método, la varianza de un conjunto de vectores $\vec{V}_1, \dots, \vec{V}_M$ asociados a las mediciones queda definida por:

$$V(\vec{V}_1, \dots, \vec{V}_M) = \sum_{k=1}^M \sum_{j=1}^N (u_{kj} - \langle u_j \rangle)^2 \quad (\text{II.2})$$

donde u_{kj} son las proyecciones de los vectores \vec{V}_k en una dada base y

$$\langle u_j \rangle = \frac{1}{M} \sum_{r=1}^M u_{jr} \quad (\text{II.3})$$

Es decir, u_{kj} es el producto escalar (proyección) entre \vec{V}_k y el autovector formal buscado \hat{a}_j .

La condición de máxima varianza está dada por un conjunto de ecuaciones que pueden ser formalmente escritas con notación matricial de la forma: $\frac{\partial V}{\partial u_{jr}} = 0$, indicando que se busca la dirección de máxima variación en el espacio de dimensión N, utilizando los M vectores asociados a las mediciones. La solución de este conjunto de ecuaciones permite obtener una nueva base de vectores unidad $\hat{a}_1, \dots, \hat{a}_N$ así como las proyecciones de los vectores asociados a las mediciones $\vec{V}_1, \dots, \vec{V}_M$ y provee el máximo valor de la varianza. De acuerdo con el teorema mencionado anteriormente, el conjunto $\hat{a}_1, \dots, \hat{a}_N$ puede ser

ortonormalizado para coincidir con un conjunto de autovectores $\hat{p}_1, \dots, \hat{p}_N$, de la matriz de covarianza.

Es importante comprender que PCA es un método de extracción de patrones que busca reducir la dimensionalidad del problema. El análisis consiste en proyectar el conjunto de datos originales en una nueva base de igual dimensión N , la cual está definida por los autovectores de la matriz de covarianza de los datos, dado que en esa base la varianza es máxima. Por lo tanto, los vectores de datos \vec{V}_k se escriben en la nueva base de la forma:

$$\vec{V}_k = \sum_{n=1}^N PC_{kn} \hat{p}_n \quad 1 \leq k \leq M \quad y \quad 1 \leq n \leq N \quad (II.4)$$

donde \hat{p}_n representa a los vectores unidad que son autovectores de la matriz de covarianza mientras que PC_{kn} representa la proyección de \vec{V}_k en la dirección definida por \hat{p}_n . Las proyecciones de los vectores originales de datos en esta nueva base son las llamadas *componentes principales*. En la literatura de Narices Electrónicas, el índice k , que indica la medición específica, es frecuentemente omitido, por lo que las componentes principales se suelen escribir de la forma $\{PC_1, \dots, PC_N\}$. Por lo tanto, cada conjunto de componentes principales $\{PC_1, \dots, PC_N\}$, es obtenido a partir de un conjunto de vectores $\{S_1, \dots, S_N\}$ correspondientes a las señales medidas, donde también suele omitirse el índice k .

Los elementos C_{lm} de la matriz de covarianza \overline{CV} quedan definidos de la forma:

$$C_{lm} = \frac{1}{M} \sum_{k=1}^M (S_{kl} - \langle S_l \rangle)(S_{km} - \langle S_m \rangle) \quad 1 \leq l, m \leq N \quad (II.5)$$

Donde:

$$\langle S_l \rangle = \frac{1}{M} \sum_{k=1}^M S_{kl} \quad 1 \leq l \leq N \quad (II.6)$$

Por lo tanto, los nuevos vectores son de la forma $\{\hat{p}_n\}_{1 \leq n \leq N}$. Luego,

$$(\overline{CV}) \hat{p}_n = \lambda_n \hat{p}_n \quad (\text{II.7})$$

$$\hat{p}_r \cdot \hat{p}_k = \delta_{rk} \overline{I} \quad (\text{II.8})$$

Para obtener los autovalores λ_r es necesario resolver el siguiente determinante:

$$\det (\overline{CV} - \lambda_n \overline{I}) = 0 \quad (\text{II.9})$$

donde $\sum_{r=1}^p \lambda_n = 1$ y por lo tanto, los vectores componentes principales

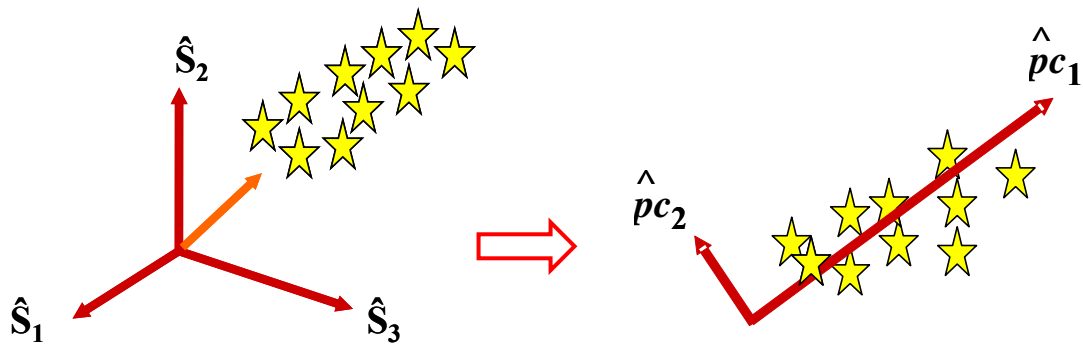
resultan ser la base de autovectores de la matriz de covarianza \overline{CV} , $\{\hat{p}_1, \hat{p}_2, \dots, \hat{p}_N\}_{1 \leq n \leq N}$

En la práctica, el primer autovector de la matriz de covarianza se obtiene calculando la dirección en la cual la varianza de los datos originales es máxima. Los demás vectores de la nueva base se definen por la condición simultánea de ser autovectores de la matriz de covarianza y ser ortogonales entre si y con el primer autovector (de norma unitaria).

El punto importante es que cuando se analiza el nuevo conjunto de datos $\{PC_1, PC_2, \dots, PC_N\}$, un gran porcentaje de la varianza total es acumulado en las primeras componentes principales, debido a que la nueva base está dada por los autovectores de la matriz de covarianza. Por ejemplo, $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$ contienen más del 90% de la suma de λ_i . Por lo tanto, los datos pueden ser discriminados cualitativamente por su agrupación en un gráfico 2D o 3D, lo cual significa una importante reducción de la dimensión del problema. Este tipo de gráficos, por ejemplo PC_2 vs PC_1 , también es conocido como “mapa” de componentes principales. En la mayoría de los estudios realizados con Narices Electrónicas, al menos el 90% de la varianza total es acumulada en las tres primeras componentes principales. Esto representa una sustancial reducción de la dimensión del problema y de su complejidad. De esta forma, los puntos asociados a las muestras pueden ser discriminados cualitativamente al observar cómo se agrupan en un gráfico. El procedimiento se desarrolla sin la necesidad de introducir información adicional acerca de las muestras,

por lo tanto el método es no supervisado. Es importante resaltar que si una nueva medición es incorporada en el análisis, todos los vectores componentes principales son modificados y deben ser recalculados.

Los resultados que se presentan en la tesis fueron obtenidos operando el programa computacional S-PLUS. El Esquema II.1 sintetiza el cambio de base que se produce al efectuar un PCA sobre un grupo de datos.



Esquema II.1: Cambio de base efectuada en el PCA.

II.2.2. Redes Neuronales Artificiales

Una forma de clasificar muestras es mediante redes neuronales artificiales (ANN).⁹

En los trabajos presentados en la tesis se utilizó una red neuronal conocida como *back propagation*, compuesta por una única capa oculta. Al construir una red neuronal de este tipo es importante definir una serie de elementos y parámetros que constituyen la red (cantidad de capas ocultas, número de neuronas en las capas, *momentum rate*, *step size*, etc.). También hay que definir las muestras que se utilizan para entrenamiento de la red, las muestras que se utilizan como datos para realizar una validación cruzada y aquellas que sirven para chequear la red. Por otra parte, hay que definir los *outputs* mediante un código numérico o de letras que luego se convierte en un código numérico binario. También, es requisito definir los *inputs* de la red, los cuales, en los trabajos que se presentan en la tesis, estaban formados por las dos

primeras componentes principales PC_1 y PC_2 , asociadas a los experimentos de liberación.

Los resultados que se muestran en la tesis fueron obtenidos utilizando el programa computacional Neuro Solutions.

II.3. Reología

La Reología es una disciplina que se define como el estudio de la deformación y flujo de materiales bajo condiciones de testeo controladas. La deformación y el flujo dependen tanto del tiempo del experimento como del tiempo de respuesta y recuperación del material que se analiza.¹⁰ Mediante esta técnica se aplican deformaciones muy pequeñas sobre materiales viscoelásticos tal que no se afecte su estructura íntima y se mide su respuesta frente a ese estímulo. En reología la palabra elasticidad está asociada a la rigidez; es decir, a la componente sólida del material mientras que la viscosidad es inversamente proporcional a la fluidez, o sea está relacionada con la componente líquida del material.^{11,12} Las propiedades reológicas de todo material permiten correlacionar formulaciones, condiciones de proceso y su *performance* final en productos terminados.¹³

En la técnica de reometría, se estudian estas magnitudes en forma oscilatoria a fin de preservar la estructura. Las deformaciones son del orden de micro o nano radianes. Se aplica una fuerza tangencial oscilatoria sobre un material viscoelástico. El instrumento mide la respuesta sinusoidal del material frente a esa deformación, la cual también es de tipo sinusoidal. Esta respuesta es similar a una impedancia y se conoce con el nombre de módulo de corte complejo G^* , donde $G^* = G' + i G''$. G' es el módulo elástico que está relacionado con la energía almacenada por el material luego de la aplicación de un esfuerzo de corte sobre el mismo y G'' es el módulo viscoso que está relacionado con la energía disipada por el material. Por lo tanto, se obtiene también $|G| = \sqrt{G'^2 + G''^2}$. La componente elástica está relacionada con el comportamiento aparente sólido del material y la componente viscosa está relacionada con su comportamiento aparente líquido. Si el reómetro

es de esfuerzo de corte controlado, como el utilizado en la tesis, el estímulo aplicado sobre el material es de la forma:

$$\tau = \tau_0 \cdot \text{sen}(\omega t) \quad (\text{II.10})$$

y la respuesta del material es:

$$\gamma = \gamma_0 \cdot \text{sen}(\omega t + \delta) \quad (\text{II.11})$$

donde δ es el desfase por la respuesta pura del material. Si el material fuese un sólido ideal, la respuesta del material al esfuerzo sinusoidal estaría en fase con el estímulo por tener una recuperación instantánea y por lo tanto δ sería cero. De la misma forma, si el material fuese un fluido ideal la respuesta estaría desfasada en 90° . Por lo tanto, para materiales viscoelásticos $0 \leq \delta \leq 90^\circ$. El instrumento indica el valor de $\text{tg}(\delta)$, que es una medida de la sensibilidad entre las componentes elástica y viscosa, puesto que $G' = G^* \cdot \cos(\delta)$ y $G'' = G^* \cdot \text{sen}(\delta)$.

Los parámetros medidos por el instrumento son el desplazamiento angular $\theta(t)$, la velocidad angular $\Omega = d\theta/dt$ y el torque M . A partir de ellos se calcula G^* y los módulos de almacenamiento y pérdida, la viscosidad compleja η^* , etc.

$$G^* = \frac{F_g \cdot M}{\text{Strain}} \quad (\text{II.12})$$

En la práctica, al efectuar un experimento de reología se debe determinar en primer lugar el rango de viscoelasticidad lineal del material. Es decir, determinar cuál es el rango de deformaciones con el que se puede trabajar sin alterar la estructura íntima del material. Para elegir el valor de deformación (*strain*) de trabajo con el cual se efectuaron todos los experimentos de reología que se detallan en la tesis, se midieron los módulos elástico y viscoso en función de la deformación aplicada y el rango de deformaciones a los cuales se podría trabajar se determinó visualmente como aquél en el cual los valores de G' y G'' se mantuvieran constantes. Este rango se muestra en la Figura II.5. El valor de *strain* utilizado en todos los experimentos de la tesis fue de $4 \cdot 10^{-3}$.

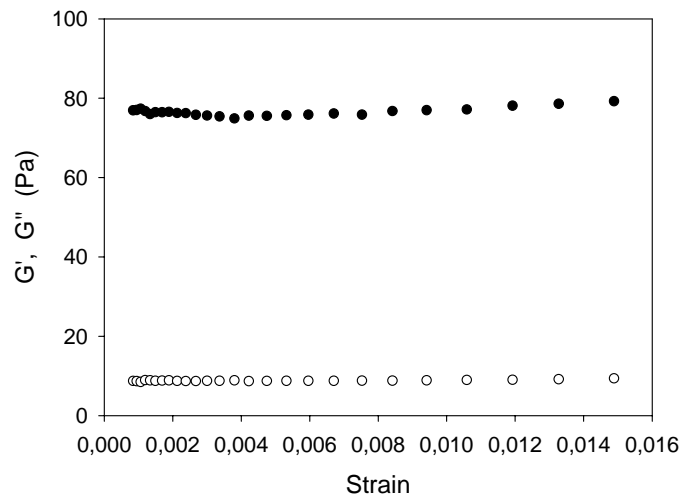


Figura II.5: G' (●) y G'' (○) en función de la deformación.

Para efectuar las mediciones con el reómetro, existen distintos tipos de puntas de medición que poseen distintas geometrías para contener la muestra con dimensiones perfectamente conocidas. Los tres tipos de sistemas son los platos paralelos, el cono y plato y los cilindros concéntricos. Cada uno presenta ventajas y desventajas y el uso de uno u otro depende de las características de la muestra que se desea analizar. Por ejemplo, los cilindros concéntricos requieren de una gran cantidad de muestra (más de 10 mL) mientras que el plato y cono requiere menos muestra (0,5 mL) y provee medidas más absolutas. Los platos paralelos requieren una cantidad de muestra intermedia pero ésta debe poder auto soportarse, de lo contrario se derrama hacia fuera del plato base y no puede ser medida. El uso de una geometría u otra en el reómetro no debería alterar los resultados obtenidos. En los experimentos que se detallan en la tesis se utilizaron los cilindros concéntricos para las muestras con mayor carácter líquido y el plato y cono para las más elásticas. Un ejemplo de esto se muestra en la Figura II.6.

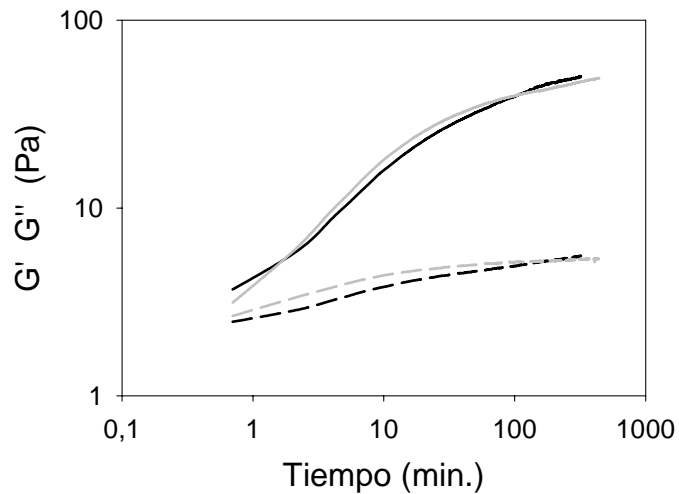
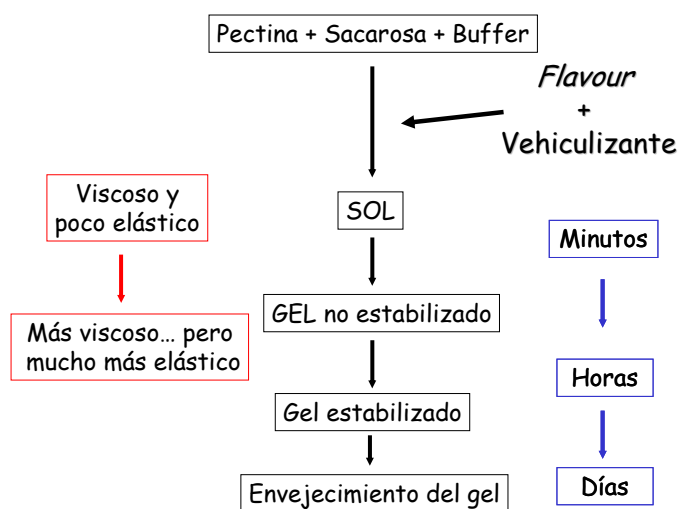


Figura II.6: La muestra medida corresponde a uno de los sistemas empleados en el Capítulo VI (matrices basadas en pectina). G' (—) y G'' (...) en cono y plato; G' (- -) y G'' (· · ·) en cilindros concéntricos.

Como se observa en la figura anterior, mediante la técnica de reometría, se puede estudiar la cinética de gelificación de sistemas. Como discuten muchos autores en la literatura, un sistema puede ser considerado un gel cuando el valor de G' es mayor al de G'' para los valores de deformación y frecuencia elegidos.^{12,14} Por lo tanto, este criterio indica que el cruce entre G' y G'' determina la transición sol-gel y de esta forma el tiempo de gelificación se define como el tiempo en el cual G' iguala a G'' . El esquema II.2 sintetiza la transición sol-gel.



Esquema II.2: Síntesis del proceso sol-gel.

Como en toda técnica es necesario efectuar un blanco de medición, donde se controla el aporte a la componente elástica y viscosa que poseen los reactivos.

Los experimentos de reología que se presentan en la tesis fueron efectuadas con un reómetro de oscilación cizallante de baja amplitud de esfuerzo de corte controlado (controlled stress) AR 1000 (TA Instrument, Reino Unido). Las mediciones que se presentan en los Capítulos IV y V fueron realizadas por el grupo de la Dra. Bulone en el Instituto de Biofísica de Palermo, del Consiglio Nazionale delle Ricerche, Italia; mientras que las mediciones que se presentan en el Capítulo VI, fueron realizadas durante una pasantía de tres meses en Italia con la colaboración de la Dra. Donatella Bulone y de Daniela Giacomazza (ver artículos publicados en conjunto). El equipo utilizado se muestra en la Figura II.7.



Figura II.7: Reómetro dinámico.

II.4. Espectrometría de masas MALDI

La amplia variabilidad estructural de los hidratos de carbono hace que el análisis por espectrometría de masas (EM) de estos compuestos abarque un gran número de técnicas sin que haya un método ideal para todos. Por ejemplo, la ionización por impacto electrónico sólo es aplicable a las moléculas pequeñas con previa derivatización. La espectrometría de masa MALDI (matriz-assisted laser desorption/ionization) es una alternativa más versátil, ya que la mayoría de los compuestos dan señal

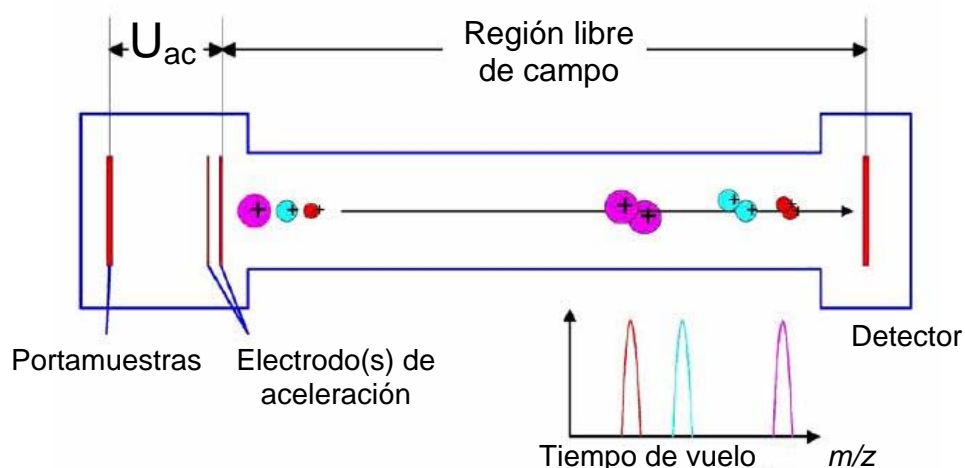
en su estado nativo, proporcionando información sobre varios aspectos del análisis estructural como la determinación de la secuencia, de las uniones y las ramificaciones. Esta técnica fue desarrollada en la segunda mitad de la década de 1980 para el análisis de moléculas lábiles de alto peso molecular como péptidos y proteínas, por el Dr. K. Tanaka¹⁵ y por los Dres. M. Karas y F. Hillenkamp.¹⁶ El Dr. Tanaka recibió el premio Nobel de química en el año 2002 “por su desarrollo en métodos de ionización y desorción suaves para el análisis por espectrometría de masa de macromoléculas biológicas”.

Con el fin de obtener una señal, el analito se mezcla con un compuesto que recibe el nombre de “matriz” en una relación que puede variar entre 1:1000 a 1:10000. La matriz suele ser una molécula orgánica pequeña que absorbe la energía proveniente de un pulso de un láser, generalmente en la región del ultravioleta (UV) y “transfiere” energía al analito. Éste, utiliza esa energía para ionizarse y desorberse, generando iones positivos mediante procesos tales como la unión a un protón o a un catión de un metal alcalino o por el contrario generando iones negativos por la pérdida de un protón. La inclusión de la matriz permitió obtener señales más intensas de la muestra así como también reducir al mínimo de la fragmentación de las moléculas del analito. Además, le dio versatilidad al instrumento dado que con un único láser es posible analizar un abanico de compuestos utilizando diferentes matrices que absorben los fotones correspondientes a la longitud de onda de emisión del láser.¹⁷

Los iones formados en la fuente del equipo son extraídos mediante la aplicación de alto voltaje en la fuente y a la salida de la misma. Un electrodo es colocado a algunos milímetros de distancia en dirección opuesta a la posición de la muestra y es utilizado para generar un campo electrostático en el rango entre 100 V/cm y 1000 V/cm. Dependiendo de la polaridad, iones cargados negativamente o positivamente son acelerados desde la superficie del portamuestra hacia el detector a través de un analizador de tiempo de vuelo (TOF), que trabaja en condiciones de ultra alto vacío.¹⁸

El analizador de tiempo de vuelo (TOF) trabaja tal cual su nombre lo indica, ya que mide el tiempo que tardan los iones en atravesar el analizador y llegar al detector luego de haber sido acelerados en la fuente

y de esta manera separa los iones de acuerdo con su relación masa/carga (m/z) (ver Esquema II.3). La velocidad con la que llegan los iones al detector es proporcional a su relación m/z . Los iones formados durante el pulso del láser dentro de la fuente son acelerados por un campo electrostático hasta una energía cinética de algunos keV. Luego de dejar la fuente, los iones atraviesan una región libre de campo, en la cual son separados por su relación m/z . Esto se produce debido a que para una energía cinética fija, los iones con igual carga pero diferentes valores de m/z son acelerados en la fuente de iones adquiriendo diferentes velocidades. Conociendo el voltaje de aceleración y la longitud de la zona libre de campo, los diferentes valores de m/z pueden ser determinados midiendo el tiempo de vuelo. Los iones de mayores valores de m/z impactan en el detector más tarde que los iones más pequeños. Los ensanchamientos de las señales en el modo de detección lineal se producen debido al intervalo de energías que adquieren los iones de igual masa. La calibración se realiza con masas de compuestos conocidas que se utilizan como referencias. El rango típico de tiempos de vuelo es entre 1 y 100 μs y la región libre de campo suele ser entre 1 y 4m.

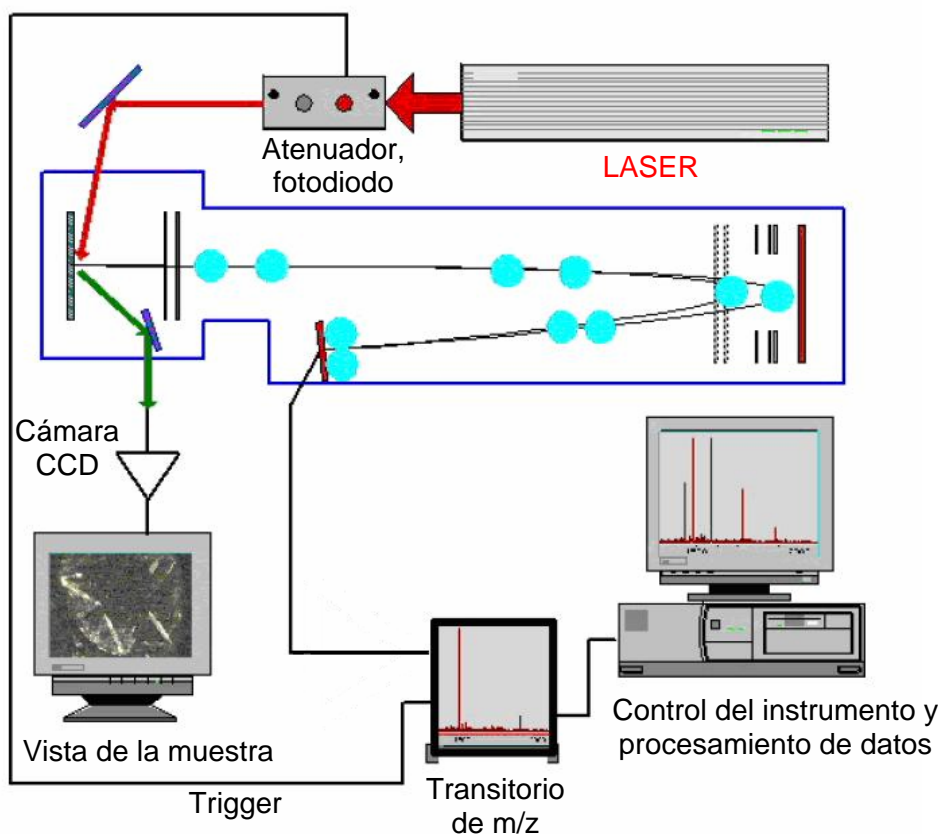


Esquema II.3: Analizador TOF trabajando en modo de detección lineal.

Las mediciones efectuadas en el trabajo de tesis se realizaron con un equipo Bruker Daltonics OmniFLEX MALDI-TOF Mass Spectrometer (Bruker, USA) equipado con un láser pulsado de nitrógeno ($\lambda_{em} = 337$ nm), con tiempo variable de extracción de iones (PDE). Un esquema de

sus componentes se muestra en el Esquema II.4. La primera fuente de iones presentaba un voltaje de aceleración de 19 kV, mientras que el gradiente de voltaje para la extracción de iones fue de 1,7 kV. La muestra fue irradiada justo por encima de la potencia umbral, necesaria para obtener iones. Por lo tanto, esta potencia necesaria para producir un espectro de masa es dependiente del analito.

En la mayoría de los casos se acumularon 60 espectros. Todas las muestras fueron medidas en modo lineal en el modo positivo y negativo. Dado que las señales de los iones correspondientes a los oligómeros no eran lo suficientemente intensas como para realizar experimentos en el modo reflectron, no se realizaron experimentos de PSD (Post Source Decay) para analizar la genética de los iones padres.



Esquema II.4: Espectrómetro de masas MALDI-TOF.

Una vez determinada la elección de la mejor matriz para analizar la muestra, tanto la matriz como la muestra se detectaron en condiciones idénticas para poder así diferenciar las señales correspondientes a la

matriz en el análisis de la muestra. Es decir, se trabajó con los mismos voltajes de las lentes (9,2 kv) y fuentes de iones (19,0 y 17,3 kV para la primera y segunda fuente respectivamente), los cuales dieron lugar al mismo gradiente de aceleración de iones. También se mantuvo constante el mismo tiempo de extracción de iones que fue igual a 200 ns y el vacío generado dentro del analizador de tiempo de vuelo se mantuvo constante en 8×10^{-7} Torr. Se utilizó el mismo método de análisis para la detección de los calibrantes excepto por la potencia del láser, que es una variable que sólo influye en la calidad del espectro de masa obtenido.

La técnica fue desarrollada inicialmente para el análisis de proteínas, pero es capaz de producir iones moleculares a partir de compuestos muy polares como proteínas, oligosacáridos, oligonucleótidos y polímeros sintéticos (polietilenglicol, polimetacrilato, polianilina, etc.). El estudio de polisacáridos por espectrometría de masa con técnicas de ionización “suaves” como ESI (electrospray ionization) o MALDI es más complejo en comparación con el análisis de proteínas. Un espectro de masa MALDI-TOF provee información valiosa acerca de la distribución de pesos moleculares, de grupos terminales y de unidades repetitivas en oligómeros. En primer lugar, los polisacáridos no poseen un único peso molecular sino una distribución de pesos como resultado de su biosíntesis. Por otra parte, las cadenas centrales pueden tener extremos reductores o no reductores diferentes, lo cual genera una distribución de grupos terminales y, finalmente, las moléculas del polisacárido tienen cierta variabilidad estructural, dando origen a una eventual distribución de bloques constituyentes del polisacárido. Por otra parte, Hao *et al.* discutieron el papel importante que posee la matriz en el proceso de ionización de oligosacáridos que se produce en MALDI y comprobaron que la dificultad en el proceso de desorción es mayor a medida que aumenta el peso molecular del analito que se desea analizar. En su trabajo concluyeron que cuando el peso molecular de un azúcar es grande, el proceso de desorción asistida por la matriz es el más importante en MALDI, mientras que cuando el peso molecular del analito es bajo, el proceso preponderante es el de ionización asistida por la matriz.

La ionización de los hidratos de carbono como especies cargadas, principalmente $[M+Na]^+$, no es tan sensible en la EM MALDI como si lo es

la ionización de péptidos, donde la especie predominante es $[M+H^+]$. En consecuencia, es necesario emplear mayores potencias de láser, lo que a su vez lleva a que las muestras depositadas se evaporen más rápidamente que en el análisis de péptidos. Por otro lado, el punto de incidencia del láser debe moverse dentro del *spot* que contiene la muestra con la matriz hasta encontrar la señal y luego mantenerla. Los lugares que generan señales de analito de alta intensidad son conocidos como “sweet spots”.

El alto grado de desarrollo de EM MALDI como método analítico presenta un contraste notorio con el escaso entendimiento sobre el mecanismo teórico del proceso de desorción/ionización. Los iones pueden formarse en el estado sólido o bien en fase gaseosa por reacciones ion-molécula inmediatamente después de la desorción por el láser. Es probable que ocurran ambos procesos en proporciones diferentes según la matriz y la muestra.

En los experimentos de MALDI, el protocolo de preparación de la muestra influye en la sensibilidad, en la selectividad y en la resolución de las masas. Algunas de las formas de tener un depósito de la mezcla de matriz-analito sobre el *spot* que se desea analizar se describen en el Capítulo III de la tesis.

II.5. Reactivos y compuestos empleados

El principal analito utilizado en la tesis fue la pectina cítrica comercial de alto grado de metilación (HMP) tipo 105 *rapid set*. La misma fue importada de Brazil por Rosenfeld, Argentina.

En la preparación de los geles se utilizó agua de calidad Milli Q y los siguientes reactivos fueron de grado analítico: sacarosa, ácido cítrico, citrato de potasio y benzoato de sodio.

El borneol y alcanfor fueron provistos por el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas (UBA).

El tensioactivo Tween 80 fue adquirido en Sigma-Aldrich. Su estructura se muestra a continuación.

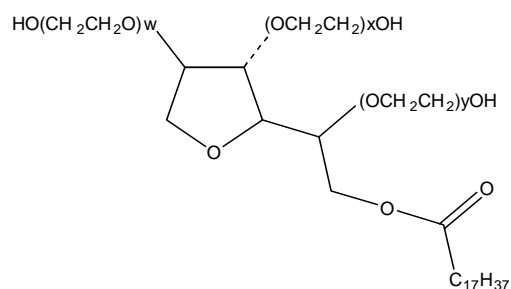


Figura II.7.: Estructura molecular del Tween 80

Esencias empleadas

La esencia de tuti-fruti fue provista por *International Flavours and Fragrances*, Argentina.

El limoneno fue provisto por *Givaudan* Argentina. Su estructura se muestra en la Figura II.8.

Los aceites esenciales *Tagetes Minuta*, *Poleo* y *Alcanfor* correspondientes a extractos de plantas argentinas fueron provistos por el Dr. Martín Eguaras, Profesor de la Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina.

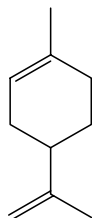


Figura II.8: Estructura molecular del limoneno ($\log P_{o/w}$: 4,2).

Membranas de los electrodos ión selectivo

Los plastificantes, el tetrakis (4-clorofenil) borato de potasio, el tetrahidrofurano (THF) y los ionóforos utilizados en la preparación de las membranas de los sensores potenciométricos fueron adquiridos en Fluka. El PVC fue adquirido en Janssen Chimica. Las sales de los metales ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ y $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) fueron adquiridas en Merk. En la Figura II.9 se muestran las estructuras moleculares de los tres ionóforos utilizados.

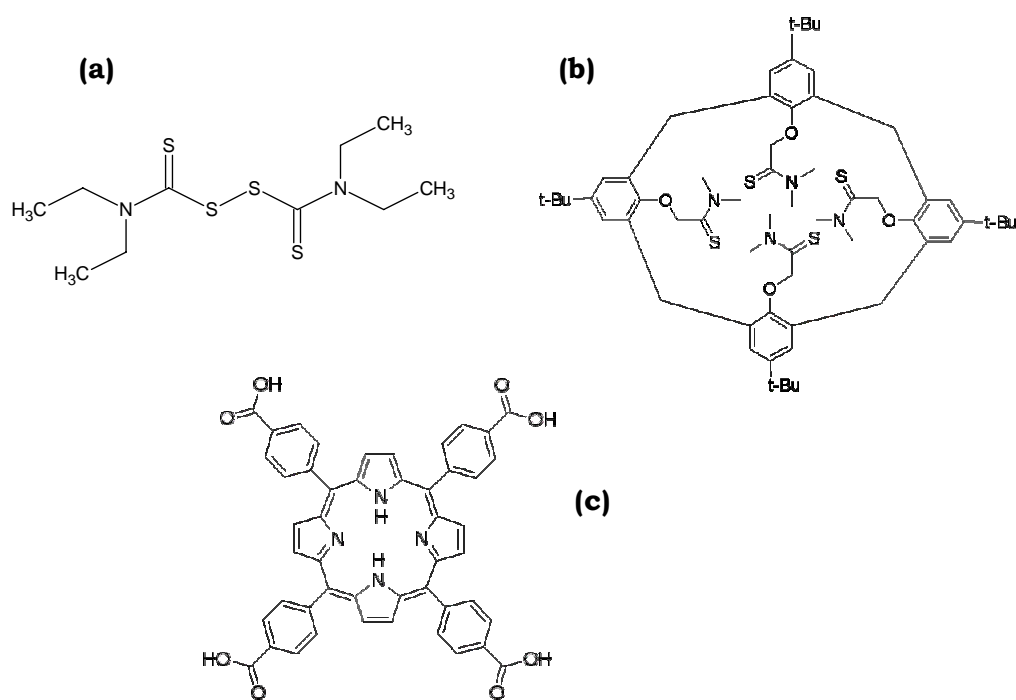


Figura II.9: (a) Estructura molecular del ionóforo de Cu²⁺, (b) estructura molecular del ionóforo de Pb²⁺ y (c) estructura molecular del ionóforo de Ni²⁺.

II.6. Bibliografía

- ¹ J. W. Gardner and P. Bartlett, *Electronic Noses*, Oxford University Press, Oxford, **(1999)**.
- ² M. O'Connell, G. Valdora, G. Peltzer, R. M. Negri. "A practical approach for fish freshness studies using a portable electronic nose". *Sens. Actuators B* **80 (2001)** 149-154.
- ³ A.Branca, P.Simonian, M.Ferrante, E.Novas, R.M.Negri. "Electronic Nose Based Discrimination of a Perfumery Compound in a Fragrance". *Sens. Actuators B* **92 (2003)** 222-227.
- ⁴ M.E.Monge, D.Bulone, D.Giacomazza, D.L.Bernik, R.M.Negri. "Detection of Flavour Release form Pectin Gels Using Electronic Noses". *Sens. Actuators B* **101 (2004)** 28-38.
- ⁵ V. Diz, M.Cassanello, R.M. Negri. "Detection and discrimination of phenol and primary alcohols in water using electronic noses". *Environmental Sci. Tech.* **(2006)** *en prensa*.
- ⁶ M.E.Monge, D.Bulone, D.Giacomazza, R.M.Negri, D.L.Bernik. "Electronic Nose Screening of Limonene Release from Multicomponent Essential Oils Encapsulated in Pectin Gels" *Comb.Chem. High Throughput Screening* **7 (2004)** 337-344.
- ⁷ M. Lovino, F. Cardinal, D.L. Bernik, "Electronic nose screening of ethanol release during sol-gel encapsulation: A novel non-invasive method to test silica polymerisation". *Biosens. Bioelectron.* **21 (2005)** 857-862.
- ⁸ R. A. Jonson and D. W. Wichern, *Applied multivariate statistical analysis*, Prentice Hall, New Jersey, fifth edition.
- ⁹ Gardner, J.W., Hines, E.L., Tang, H.C. "Detection of vapors and odors from a multisensor array using pattern recognition techniques. Part 2: Artificial Neural Networks". *Sens. Actuators B* **9 (1992)** .

-
- ¹⁰ M. A. Rao, “Measurement of viscoelastic properties of fluid and semisolid foods” in *Viscoelastic properties of foods*, Elsevier Applied Food Science Series.
- ¹¹ J. D. Ferry, *Viscoelastic properties of polymers*, John Wiley & Sons Inc., third edition.
- ¹² S.B. Ross-Murphy, Incipient behavior of gelatin gels, *Rheol. Acta* **30** (1991) 401–411.
- ¹³ J. F. Steffe, *Rheological methods in food process engineering*, Freeman Press, second edition, USA, **1992**.
- ¹⁴ G.M. Kavanagh, S.B. Ross-Murphy, Rheological characterisation of polymer gels, *Prog. Polym. Sci.* **23** (1998) 533–562.
- ¹⁵ K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, Protein and polymer analyses up to m/z 100000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2** (1988) 151- .
- ¹⁶ M. Karas, F. Hillenkamp, Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons, *Anal. Chem.* **60** (1988) 2299-2301.
- ¹⁷ D. C. Liebler, J. R. Yates, *Introduction to proteomics: tools for the new biology*, Humana Press Inc., New Jersey, USA, **2002**.
- ¹⁸ R. J. Cotter, *Time-of-flight mass spectrometry: instrumentation and applications in biological research*, ACS professional reference books, Washington DC, USA, **1997**.

Capítulo III

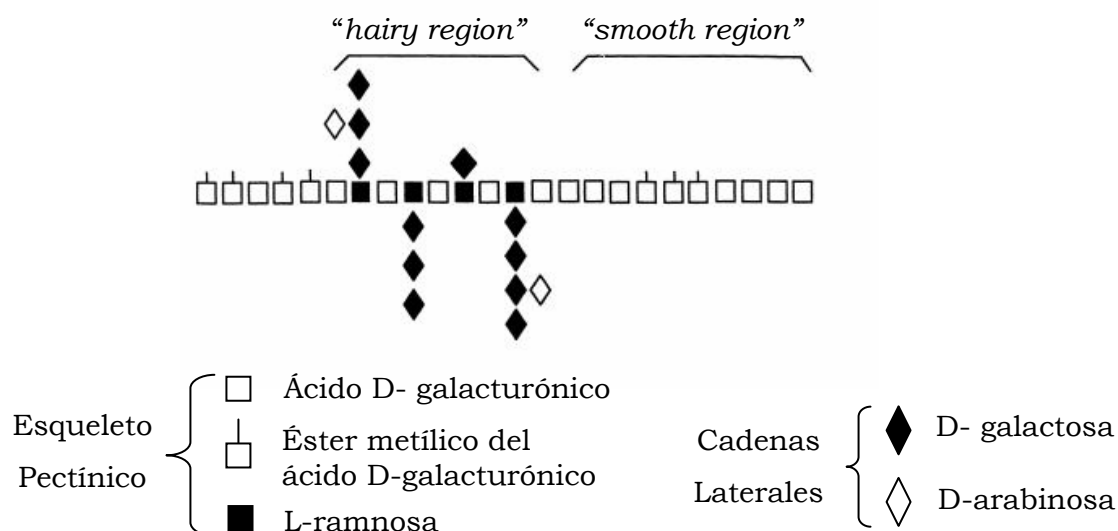
CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS PECTINAS

III. Caracterización estructural de las pectinas

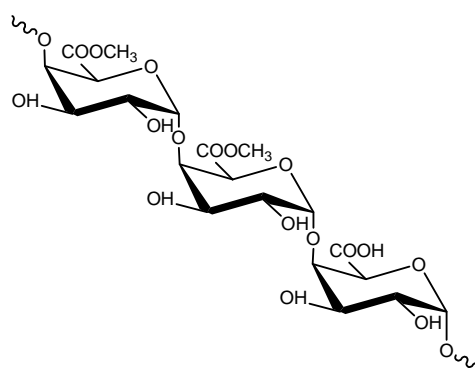
III.1. Introducción

Las pectinas son una familia de polisacáridos heterogéneos y complejos que se encuentran en la pared celular de muchas plantas. Allí juegan un rol estructural ya que proveen flexibilidad y fuerza mecánica a la pared celular. Inclusive se ha demostrado que algunos fragmentos pectínicos poseen actividades regulatorias para los mecanismos de defensas de las plantas^{1,2} y en el desarrollo de las mismas.³

La estructura dominante de las pectinas es una cadena lineal formada por ácidos D-galacturónicos unidos en forma α -(1→4) con un grado variable de metilación en los residuos de ácido carboxílico. Este esqueleto del polisacárido, conocido como la “*smooth region*” o “región suave”, es interrumpido por cadenas laterales ramificadas ricas en azúcares neutros, principalmente ramnosa, galactosa y arabinosa, que forman la “*hairy region*” o “región peluda”.^{4,5,6} El esqueleto de la “región peluda” está compuesto por unidades alternadas de ácido α -D-galacturónico y de α -L-ramnosa, con cadenas laterales de galactanos y arabinanos unidas principalmente en la posición 4 de la ramnosa, que proveen flexibilidad a las cadenas de pectinas.^{7,8,9,10} En los Esquemas III.1 y III.2 se muestran las regiones que componen el polisacárido de pectina.



Esquema III.1: Regiones que componen el polisacárido.



Esquema III.2: Estructura de la “región suave” de la pectina (*smooth region*).

La composición particular de la pectina varía con la fuente de la cual es extraída, así como con las condiciones utilizadas durante su aislamiento y purificación. Las pectinas aisladas de cítricos y manzanas son utilizadas en la industria alimenticia y farmacéutica debido a su capacidad de aumentar la viscosidad de un sistema acuoso o de formar geles bajo ciertas condiciones.¹¹

Además de tener la habilidad de formar hidrogeles, estos hidrocoloides actúan como estabilizantes y espesantes. La demanda industrial de pectinas con diferentes propiedades de gelificación, o con la propiedad de estabilizar frutas u otros productos, aumenta la necesidad de acceder a diferentes tipos de pectinas.

Dependiendo de la proporción de grupos ésteres de metilo, las pectinas se clasifican como de alto grado de metilación ($GM \geq 50\%$) o de bajo grado de metilación. Las pectinas con bajo grado de metilación forman geles termorreversibles en presencia de cationes divalentes como los iones calcio. En cambio, las pectinas con alto grado de metilación forman geles termoestables en medio ácido (pH: 1-3,5) y por la adición de azúcares, generalmente sacarosa, en una concentración mayor al 55 % p/p, lo cual disminuye la actividad acuosa.^{12,13,14} Está bien establecido que los geles de pectinas son estabilizados por uniones de tipo puente hidrógeno y por interacciones hidrofóbicas que involucran principalmente a los grupos ésteres de metilo.¹⁵ La estructura de los geles de pectinas caracterizadas por microscopía de transmisión electrónica aparece como una “red de filamentos con poros”.¹⁶

Para la mayoría de las aplicaciones industriales, el grado y patrón de esterificación es importante. Además, la evaluación del patrón de esterificación es fundamental para entender no sólo la relación entre la estructura y la funcionalidad de pectinas comerciales sino también la especificidad de pectinasas.⁸ Por lo tanto, la dilucidación de la esterificación de la pectina y su análisis estructural es objeto de investigación en la actualidad.¹⁷

Dado que la pectina cítrica utilizada en la tesis era de origen comercial y no poseía una hoja técnica con sus características, nos propusimos realizar una caracterización estructural de la muestra. Se efectuaron experimentos de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C , espectroscopía de infrarrojo y experimentos de espectrometría de masas mediante la técnica de desorción/ionización por láser asistidos por matrices, conocida como MALDI-MS.

Las mediciones realizadas con el espectrómetro de masas forman parte del primer trabajo efectuado con el espectrómetro de masas UV-MALDI-TOF que fue incorporado al INQUIMAE en 2005. Por lo tanto, la obtención de los espectros involucró la puesta a punto del equipo y de los métodos de análisis.

Los experimentos de RMN y UV-MALDI-TOF-MS fueron efectuados sobre la muestra nativa de pectina y también luego de efectuar una hidrólisis ácida sobre la misma, para poder comparar los resultados obtenidos por ambas técnicas antes y después del tratamiento. En cambio, el experimento de IR fue efectuado únicamente sobre la muestra nativa.

En primer lugar, se detallarán los experimentos de IR y a continuación los de RMN y espectrometría de masas MALDI.

III.2. Análisis por espectroscopía IR

III.2.1. Materiales y Métodos

Para efectuar las mediciones de espectroscopía infrarroja se utilizó un espectrofotómetro Nicolet 510 P. Se preparó una pastilla de la muestra de pectina nativa con KBr.

III.2.2. Resultados y Discusión

En la Figura III.1 se muestra el espectro IR obtenido para la muestra nativa, que se superpone con el de literatura.

En el mismo se observa una banda ancha de intensidad mediana centrada en 3420 cm^{-1} , que se puede asignar a la frecuencia de estiramiento de los hidroxilos del polímero.¹⁸ Luego, se distingue una banda pequeña a 2940 cm^{-1} , que podría deberse al estiramiento C-H de los grupos metoxilo de los grupos éster y de los grupos metinos (CH) presentes en el polisacárido. Si se continúa el análisis hacia menores números de onda, se destaca una banda de mediana intensidad a 1750 cm^{-1} , la cual, como indica la literatura, correspondería al estiramiento del C=O en los grupos ésteres. A continuación, se observa una banda intensa centrada en 1630 cm^{-1} , la cual podría adjudicarse al estiramiento de los carbonilos presentes en los carboxilatos del polisacárido.

Las bandas que se observan a menores números de onda corresponden a la zona de la huella digital del espectro y podrían adjudicarse a las frecuencias de vibración correspondientes a los grupos C-O de los ésteres (1050 y 1300 cm^{-1}) y de los hidroxilos unidos a los carbonos secundarios (1100 cm^{-1}).

Este análisis indica que la muestra posee grupos ácidos parcialmente esterificados.

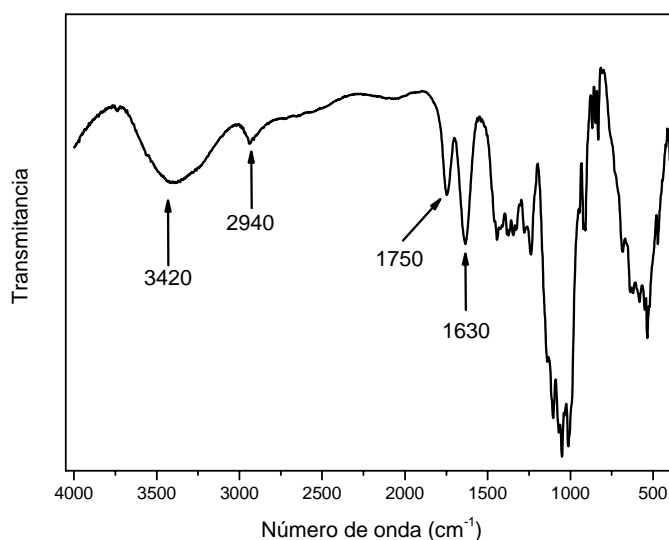


Figura III.1: Espectro IR obtenido para la muestra nativa.

III.3. Análisis por RMN ^{13}C y ^1H

III.3.1. Materiales y Métodos

Los experimentos de RMN se realizaron a temperatura ambiente dado que el instrumental disponible no dispone de un sistema de calentamiento de la muestra. Se efectuaron experimentos de RMN ^1H , ^{13}C , DEPT 135, COSY y HETCOR sobre la muestra nativa y experimentos de RMN ^1H y ^{13}C sobre la muestra hidrolizada.

Experimento RMN ^{13}C

Se disolvieron 30 mg de muestra en 0,5 mL de una mezcla $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ (1:1). Para efectuar la medición se utilizaron las siguientes condiciones: ángulo de pulso: 45° , tiempo entre pulsos: 1,248 seg, ancho espectral: 31,250 Hz y número de pulsos: 29.696.

Experimento RMN ^1H

Se trabajó con una concentración de muestra de 30 mg/mL en D_2O . La solución se congeló y liofilizó y nuevamente el sólido remanente se disolvió en D_2O . Esta nueva solución también se congeló y liofilizó. Este procedimiento se repitió 3 veces a fin de lograr el intercambio de todos los protones de los hidroxilos del polisacárido por deuterio para que no perturben en la medición de las señales correspondientes a los protones unidos directamente a carbono. En este caso las mediciones se efectuaron las siguientes condiciones: ángulo de pulso: 90° , tiempo de espera previo a la irradiación para eliminar el solvente: 7 seg, ancho espectral: 31,250 Hz y número de pulsos: 32.

Tratamiento ácido de la muestra

La muestra fue sujeta a un tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA) 2 M a 80°C durante 2,5 horas. El TFA fue removido mediante burbujeo de N_2 en la solución. Luego, la solución obtenida fue sometida a una diálisis con una membrana de corte de 1000 Da durante 24 horas. A

esta nueva solución se le registraron los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C utilizando las mismas condiciones que para la muestra nativa.

III.3.2. Resultados y Discusión

En las Figuras III.2a y III.2b se muestra el espectro de RMN ^{13}C correspondiente a la muestra de pectina nativa y en la Tabla III.1 se indica la asignación de las señales del espectro de RMN ^1H y ^{13}C de la misma.

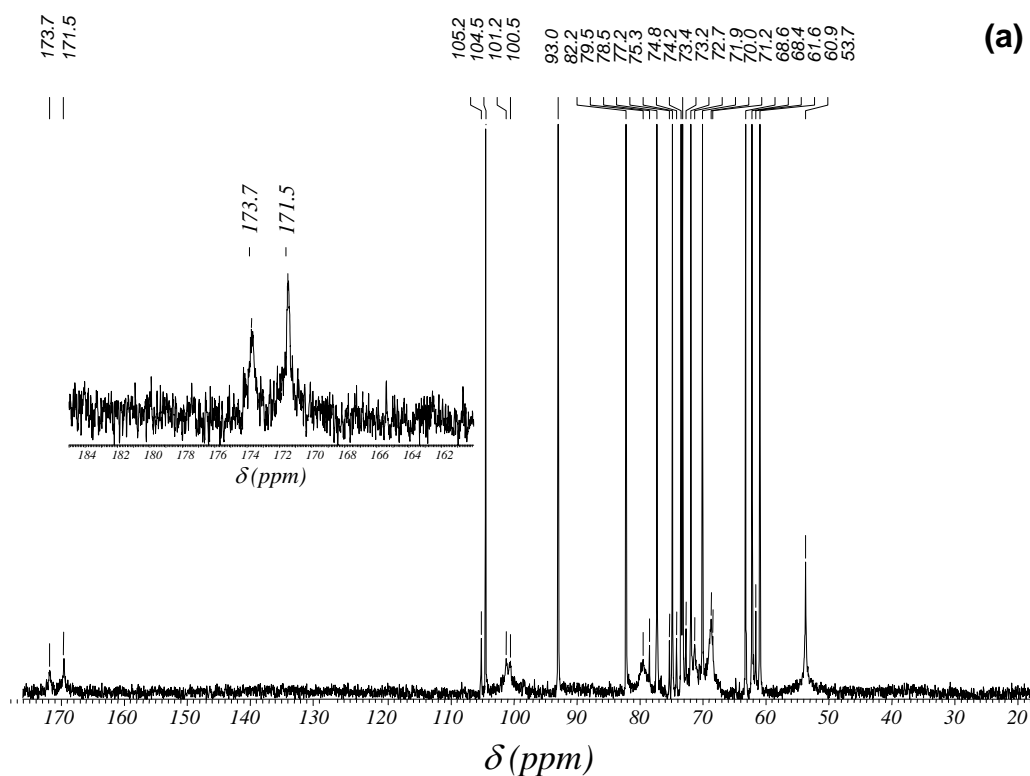


Figura III.2: (a) Espectro de RMN ^{13}C de la muestra nativa.

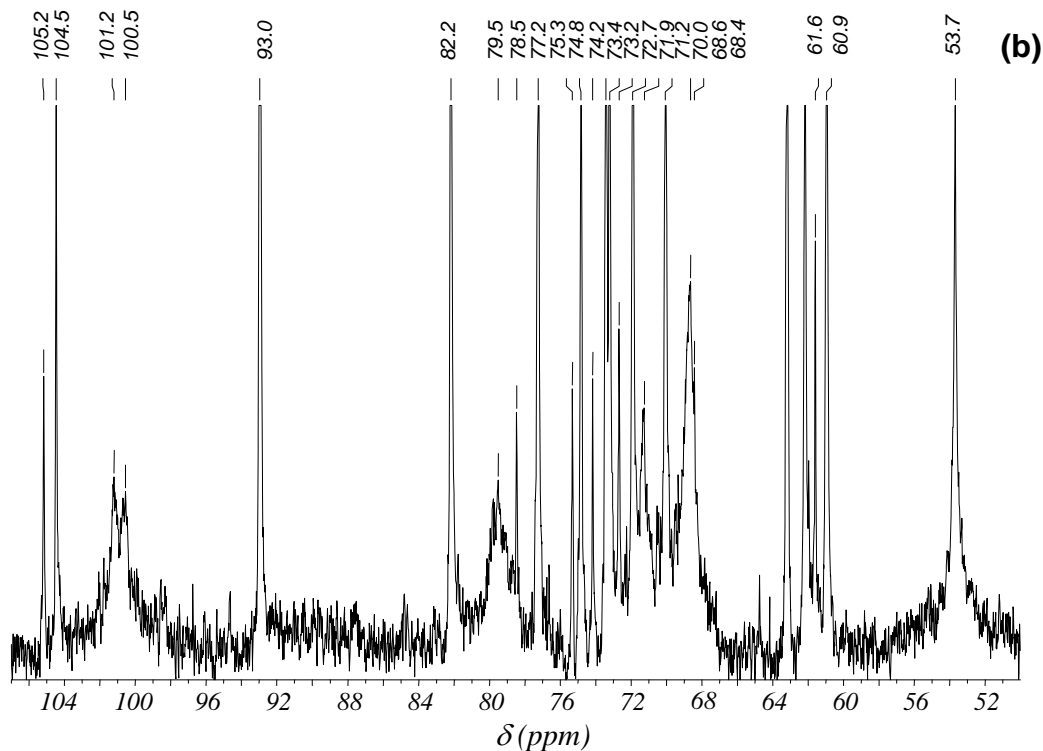


Figura III.2: (b) Ampliación del espectro anterior entre 50 y 110 ppm.

Al observar el espectro de RMN ^{13}C de la muestra de pectina nativa en la Figura III.2, se pueden diferenciar dos tipos de señales: aquellas angostas de alta intensidad y otras ensanchadas de menor intensidad. El ensanchamiento de estas últimas podría adjudicarse a que la parte de la molécula que provee esas señales sea una parte más rígida e interna o también podría deberse a la presencia de irregularidades en las cadenas del polisacárido.¹⁹ Por otra parte, en polímeros como los polisacáridos, los valores de los desplazamientos químicos correspondientes a cada unidad son dependientes de la naturaleza de las unidades vecinas, es decir, del entorno químico.^{20,21}

La asignación de las señales indicó que las más anchas, de baja intensidad y que particularmente se observan en el espectro de RMN ^{13}C de la muestra nativa, corresponden a unidades de la cadena principal de la pectina, correspondientes a las “regiones suaves”. Estas regiones están constituidas por residuos de ácido galacturónico y de ácido galacturónico esterificado. Las señales de los protones asociados a esos carbonos no se observan en el espectro de RMN ^1H ni en el COSY de la muestra nativa. Probablemente, quedan enmascaradas por las señales intensas correspondientes a las cadenas laterales o bien por superposición con la

señal de HDO.

Por otro lado, las señales de mayor intensidad, que se presentan como picos angostos y que son las únicas que aparecen en los espectros DEPT 135 y HETCOR, corresponden a las cadenas laterales o “regiones peludas”. Estas señales pertenecen a las unidades de galactosa, ramnosa y probablemente arabinosa, que son algunos de los constituyentes de las ramificaciones presentes en la pectina.^{5,19}

Los desplazamientos químicos de las unidades que conforman las pectinas son dependientes de la esterificación de cada ácido galacturónico presente en el polisacárido. Este hecho ha sido estudiado con anterioridad por varios autores en compuestos modelos de pocas unidades.^{21,22,23} Este efecto se acentúa más en oligómeros formados por cadenas más largas.²⁴ Por lo tanto, algunas de las asignaciones en los espectros presentan pequeñas desviaciones en sus valores de desplazamientos químicos respecto de los datos bibliográficos. Estas diferencias pueden atribuirse a las diferentes longitudes de cadenas en las muestras y a posibles pequeñas diferencias entre los entornos químicos. Las señales asociadas a cada uno de los residuos identificados en la muestra de pectina nativa se presentan en la Tabla III.1.

Tabla III.1: Desplazamientos químicos en ppm para las señales del espectro de RMN ¹H y ¹³C de la muestra nativa de pectina.

Unidad	C-1 / H-1	C-2 / H-2	C-3 / H-3	C-4 / H-4	C-5 / H-5	C-6 / H-6	-OCH ₃
α -GalpA	100,5	~69	~69	79,5	~71	173,7 (COOH)	—
α -GalpAMe	101,2	68,6	68,4	~80	71,2	171,5 (COOCH ₃)	53,7
β -Galp	105,2	72,7	74,2	78,5	75,3	61,6	—
α -Ramp	93,0 / 5,27	71,9 / 3,42	73,4 / 3,62	70,1 / 3,33	73,2 / 3,71	19,3 / 1,12	—
α -Araf	104,5 / —	77,2 / 4,07	74,8 / 3,91	82,2 / 3,75	60,9 / 3,68	—	—

Como se indicó anteriormente, el análisis espectroscópico muestra que los principales constituyentes de la cadena principal de pectina son el ácido galacturónico y su metil éster. La asignación de las señales del ácido galacturónico coincide con los valores presentados por otros autores en trabajos previos.^{4,25,26,27} La asignación de las señales del ácido galacturónico esterificado con metanol también estuvo basada en datos informados en la literatura.^{4,26,19,28} Entre las señales angostas presentes en el RMN ¹³C se puede distinguir un grupo correspondiente a las señales de menor intensidad y que no salen en los espectros DEPT 135 y HETCOR. En base a datos bibliográficos, estas señales pueden adjudicarse a la galactopiranosas, que forma parte de las cadenas laterales de las pectinas.^{4,26,27,28,19}

Por otra parte, entre el grupo de señales más angostas y de mayor intensidad que aparecen en los espectros RMN ¹³C, DEPT 135 y HETCOR, se pueden distinguir al menos dos residuos. El primero de ellos corresponde a la ramnopiranosas, que está presente en las “zonas peludas” de las pectinas. Tal como se observa en la Tabla III.1, se pudieron asignar tanto los carbonos como los protones de la ramnosa, ya que estos últimos pudieron correlacionarse entre sí en el COSY y con sus carbonos directamente unidos en el HETCOR. La señal asignada al carbono anomérico indica la presencia de residuos de ramnosa ubicados en extremos reductores, ya que se trata de un punto lábil de la molécula. Por otra parte, la señal que aparece en el espectro de RMN ¹H a 3,33 ppm es una señal diagnóstica de residuos de ramnosa no sustituidos y corresponde al H-4, puesto que este protón suele resonar en el rango 3,2 - 3,3 ppm.²⁵ La asignación de las demás señales también está basada en análisis hecho por Renard *et al.*, Bushneva *et al.* y Wang *et al.*^{24,19,27} La otra unidad que se propone que conforma las cadenas laterales de esta pectina cítrica es la arabinofuranosa. Nuevamente, se determinó la presencia de este residuo a partir de la conectividad de los átomos extraída de los resultados de los espectros bidimensionales homo y heteronucleares. Una de las principales señales diagnósticas es aquella observada en el espectro de RMN ¹³C a 60,9 ppm, que también aparece de manera invertida en el espectro DEPT 135, lo cual indica que podría tratarse del C-5 (-CH₂OH) de la arabinosa. Por otra parte, las señales que aparecen a $\delta = 77,2$ ppm y a $\delta = 82,2$ ppm asociadas a los carbonos 2 y 4

respectivamente, también son picos característicos que comprueban la presencia de este residuo. La asignación de estas señales está basada en análisis previos de bibliografía.^{27,29}

La ausencia de señales cercanas a 20 ppm en el espectro de RMN ¹³C y a 2,10 ppm en el espectro de RMN ¹H correspondientes a grupos acetilos, descarta la posibilidad de que las unidades de ácido galacturónico se encuentren esterificadas con etanol,^{27,30} hecho que contribuye a confirmar que la muestra se trata de una pectina cítrica. A su vez, en el espectro de RMN ¹H se evidencian varias señales superpuestas en la zona de 3,76 ppm, que es donde resuenan los protones asociados al grupo metoxilo. Además, la señal observada en el espectro de RMN ¹³C a 53,7 ppm, corresponde al grupo metoxilo del éster del ácido galacturónico, lo cual indica que efectivamente algunos de los ácidos galacturónicos que la conforman están esterificados.

Una manera para estimar el grado de esterificación es a partir de la relación entre la integración correspondiente a la señal de H-5 asociado a las unidades esterificadas respecto de la integración de la señal de H-5 asociado a todas las unidades. Sin embargo, los valores de δ en el espectro de RMN ¹H, asociados a estas señales aparecen entre 4,5 y 5 ppm, los cuales no se distinguen con claridad en el espectro, probablemente debido a que las señales de la región suave de la pectina quedan enmascaradas por las señales correspondientes a las cadenas laterales o bien por la superposición con la señal de HDO. Por lo tanto, la manera alternativa que se propone para estimar el grado de metilación es utilizando las señales correspondientes a los C-1 y C-6 en el espectro de RMN de ¹³C asociadas a las unidades esterificadas y no esterificadas del ácido galacturónico. De esta forma, teniendo en cuenta las intensidades de las señales asociadas a los C-1 el resultado indicaría un grado de metilación de 68 %. Efectuando el mismo procedimiento para las señales asociadas a C-6, se obtuvo un grado de metilación de 60 %. Por lo tanto, se estima que el grado de esterificación de esta muestra de pectinas se halla entre 60 % y 70 %. Estos resultados confirman que se trata de una pectina de alto grado de metilación.

Las Figuras III.3a y III.3b muestran el espectro de RMN ¹³C para la muestra de pectina hidrolizada y la Tabla III.2 contiene la asignación de las señales de los espectros de RMN ¹H y ¹³C de dicha muestra.

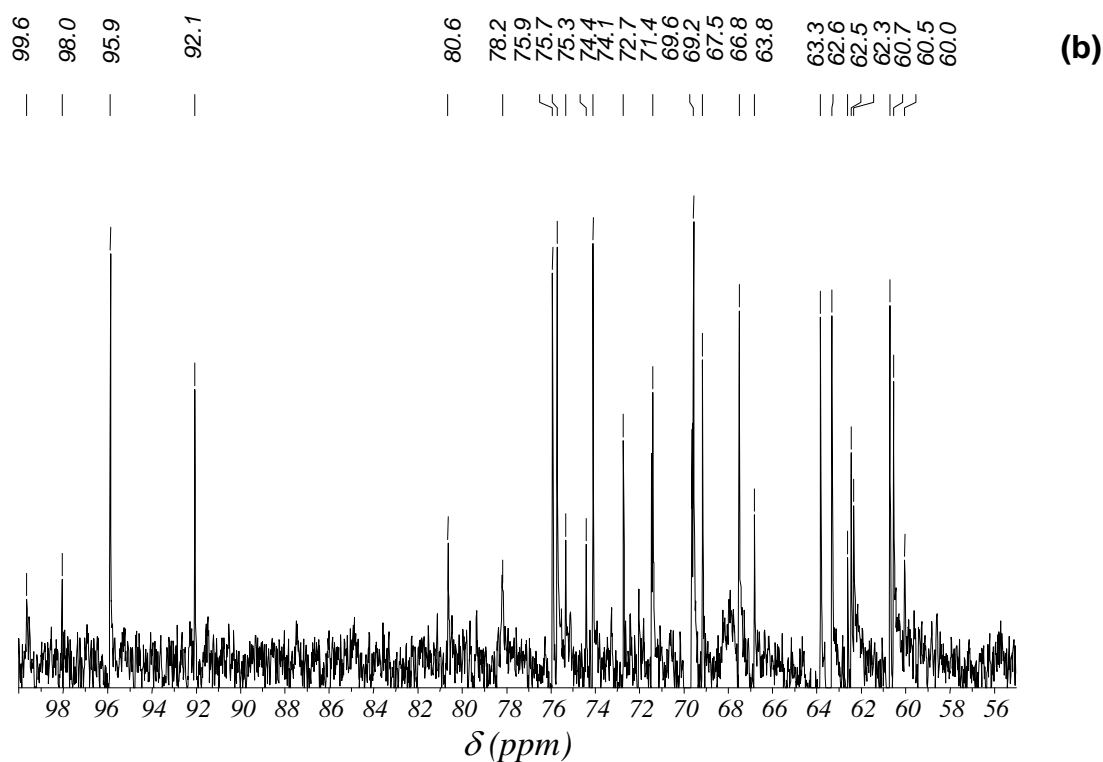
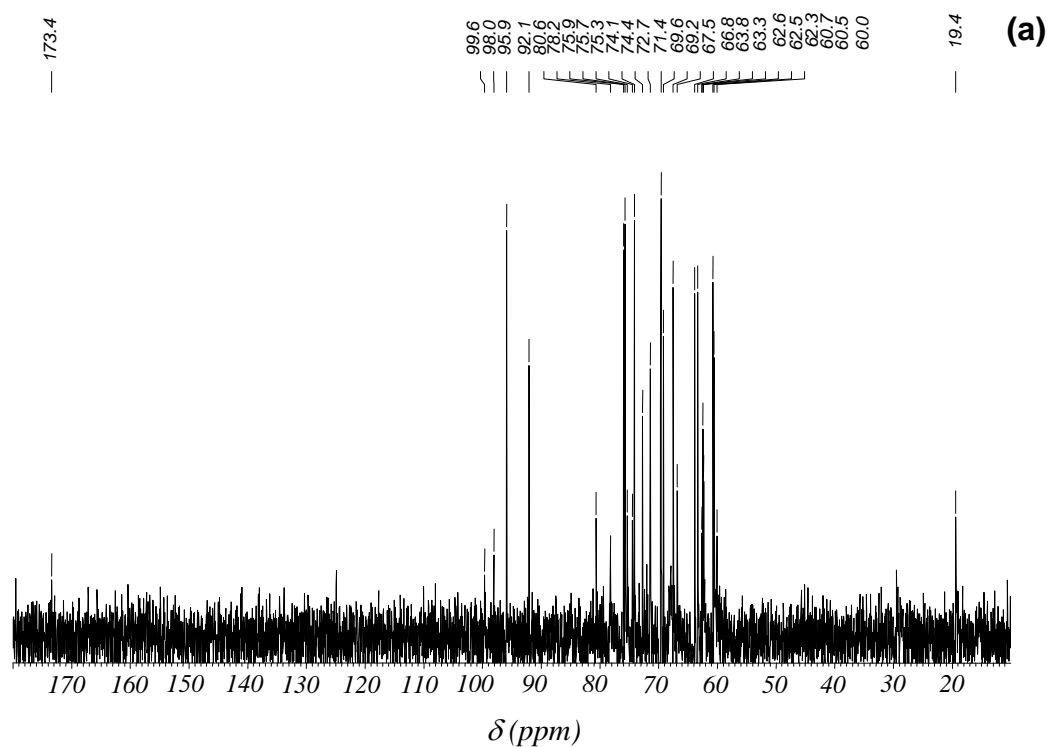


Figura III.3: (a) Espectro de RMN ^{13}C luego de ser efectuado el tratamiento ácido y posterior diálisis. (b) Ampliación del espectro anterior entre 55 y 100 ppm.

Tabla III.2: Desplazamientos químicos en ppm correspondientes al espectro de RMN ^{13}C de la muestra hidrolizada y dializada.

Unidad	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
α -GalpA	95,9	69,2	69,6	80,6	71,4	173,4
α -Ramp	92,1	75,9	71,4	74,1	69,6	19,4
β -Galp	99,6	72,7	74,4	78,2	75,3	62,3
α -GalpMe	98,0	67,5	66,8	75,7	69,6	-

Al efectuar la hidrólisis ácida y posterior diálisis sobre la muestra, todas las señales observadas en el espectro de RMN ^{13}C se presentan en forma de picos angostos (ver Figura III.3). Además, desaparece la señal correspondiente al grupo metoxilo del éster que en la muestra nativa aparece a 53,7 ppm. No obstante, se pueden distinguir las señales correspondientes a las unidades de ácido galacturónico que se muestran en la Tabla III.2 junto a las señales de los otros residuos y que nuevamente fueron asignadas sobre la base de datos de literatura.^{4,28}

El hecho de que los valores de los desplazamientos químicos de las unidades que conforman las pectinas sean dependientes del grado de esterificación, de los entornos químicos y de las longitudes de las cadenas, justifica las pequeñas diferencias en las asignaciones de las señales correspondientes a los residuos en la muestra hidrolizada respecto de la muestra nativa.

Entre las señales observadas en el espectro de RMN ^{13}C también se pueden identificar aquellas que pertenecen a las unidades de ramnopiranososa que estaban presentes en el polisacárido. En particular, la señal que aparece a $\delta = 19,4$ ppm es la señal diagnóstica de ramnosa correspondiente al metilo presente en el C-6.^{25,26,27} También se evidencia el extremo reductor de los residuos de ramnosa en la asignación del carbono anomérico. Las demás señales fueron asignadas en base a resultados de trabajos previos.^{19,28} Por otra parte, es posible adjudicar un grupo de señales a las unidades de galactopiranososa presentes en la muestra, las cuales también se muestran en la Tabla III.2.^{4,19,28}

Finalmente, es posible asignar algunas señales correspondientes a unidades de ácido galacturónico esterificado que no reaccionaron durante el tratamiento ácido de la muestra, a pesar de que no se observa la señal diagnóstica a 53,7 ppm correspondiente al carbono del grupo metoxilo del éster.^{4,28}

La asignación de los carbonos anoméricos para los residuos identificados se realizó en función de los valores de los desplazamientos químicos descritos en bibliografía, así como también en base a las intensidades de las señales en relación con la abundancia relativa de cada uno de los residuos en la muestra.

En resumen, los espectros de RMN indican que la muestra es una pectina de alto grado de metilación. Más aún, se pudo estimar que el grado de esterificación se encuentra entre 60 % y 70 %. También se identificaron los residuos que forman parte de las “regiones suaves” de la cadena principal correspondientes a ácido galacturónico y a su metil éster. Además, fue posible dilucidar la presencia de azúcares neutros como galactopiranososa y arabinofuranosa, que forman parte de las ramificaciones que se insertan sobre unidades de ramnospiranososa, intercaladas en la cadena principal. Por otra parte, se descartó la presencia de grupos acetilo. Estos resultados son consistentes con el origen cítrico de la pectina.

III.4. Análisis por espectrometría de masas UV-MALDI-TOF

III.4.1. Introducción

Como se infiere de los trabajos mencionados en el Apéndice, en los experimentos de MALDI continuamente se busca optimizar la calidad de los resultados obtenidos modificando la elección de la matriz y de las condiciones de trabajo. Un “buen” espectro de masas debería presentar una alta sensibilidad, una buena relación señal/ruido, buena resolución y ser representativo de la distribución real de pesos moleculares. El protocolo de preparación de la muestra es una de las variables que

influye en la obtención de un buen espectro. Por lo tanto, una parte importante del trabajo realizado en la tesis consistió en elegir las condiciones óptimas para obtener el mejor espectro de masa mediante el análisis de la muestra de pectina nativa y de la muestra hidrolizada, ensayando diferentes matrices y diferentes condiciones de trabajo, en presencia y ausencia de sales inorgánicas.

III.4.2. Materiales y Métodos

Preparación de la muestra

Se prepararon soluciones saturadas de matriz disolviendo entre 5 y 7 mg del compuesto en 0,5 mL de solvente. Siempre se utilizaron soluciones frescas. El *nor*-harmano se disolvió en una solución de metanol y H₂O en relación 3:2 (v/v) mientras que tanto el ácido 2,5-dihidroxibenzóico (2,5-DHB) como el ácido sinapínico (SA) se disolvieron en una solución de acetonitrilo: ácido trifluoroacético (TFA) (0,1 % en agua) en proporción 3:7 (v/v).

En el trabajo se analizaron cuatro tipos de soluciones con el analito, indicadas como A, B, C y D. La solución A consistió en una solución acuosa de pectina de concentración 5 mg/mL. La solución B se obtuvo al dializar una alícuota de la solución A con una membrana de corte de 3000 Da. La solución C se obtuvo a partir de un tratamiento de la pectina nativa con ácido trifluoroacético (TFA) 2 M a 80 °C durante 2,5 horas. Luego, el TFA fue removido mediante burbujeo de N₂ en la solución. La solución D se obtuvo al dializar una alícuota de la solución B durante 24 horas, utilizando una membrana de corte de 1000 Da. El tratamiento ácido se efectuó con el fin de comparar los espectros de masa de la muestra nativa e hidrolizada.

Tanto el método *sándwich* como el método *mezcla* fueron utilizados para depositar el analito y la matriz sobre el portamuestras.³¹ En el método *sándwich* se colocaron 0,5 µL de solución de matriz sobre el spot del portamuestras y se dejó evaporar espontáneamente el solvente a temperatura ambiente. A continuación, se colocaron sobre el mismo spot 0,5 µL de la solución de analito, cubriendo y disolviendo parcialmente la

matriz. Nuevamente, se dejó evaporar el solvente y luego se repitió esta operación con otros dos agregados de 0,5 μL de solución de matriz. De esta manera, se realizó el sembrado por capas que presenta una relación analito: matriz 1:3, en el siguiente orden:

MATRIZ + ANALITO + MATRIZ + MATRIZ

En el método *mezcla*, la solución de analito fue mezclada con la solución de la matriz en las siguientes relaciones: 1:2, 1:3, 1:7, 1:10, 1:15 y 1:20 v/v. Una alícuota de 0,5 μL de cada solución mezcla fue depositada en el spot del portamuestras y se dejó evaporar el solvente a temperatura ambiente. Luego, se repitió la operación dos veces más sobre el mismo spot, redisolviendo los residuos anteriores y finalmente se dejó secar naturalmente el portamuestras durante una hora para asegurar evaporación completa del solvente.

Muestras dopadas con sales

Este proceso fue realizado en dos formas diferentes para las sales NaCl, KCl y NH_4Cl . En uno de los métodos (método I), 0,1 μL de solución saturada de la sal fueron depositados sobre el spot que contenía a la mezcla matriz-analito. En el método *sándwich*, la solución de sal fue agregada luego de la evaporación de la solución del analito en la siguiente secuencia:

MATRIZ + ANALITO + SOLUCION DE SAL + MATRIZ + MATRIZ

En el método *mezcla*, 0,1 μL de solución de sal fueron agregados sobre el spot de la muestra luego de la evaporación de las tres alícuotas de la solución analito-matriz.

En el otro método (método II), la solución de analito fue saturada con la sal correspondiente y esta nueva solución se introdujo en el portamuestras ya sea mediante el método *sándwich* o el método *mezcla*. El volumen apropiado de solución de matriz (solución de 2,5-DHB para NaCl, KCl y NH_4Cl y solución de *nor*-harmano para NH_4Cl) fue agregado a una solución fresca de pectina dopada con sales para obtener las mismas

relaciones analito: matriz (v/v) utilizadas en los distintos experimentos sin dopar. La mezcla fue agitada mediante un *vortex* antes de ser transferida al spot del portamuestras.

En todos los casos se realizaron experimentos control en forma simultánea utilizando soluciones de matrices y soluciones de pectina que no estaban dopadas con sales.

Todos los espectros se realizaron en modo de detección lineal.

III.4.3. Resultados y Discusión

Las distintas condiciones ensayadas para obtener un “buen” espectro de masas de la muestra se detallan en el Apéndice.

En la Tabla III.3, se resumen los resultados obtenidos para cada condición ensayada, mostrándose fragmentos seleccionados de los espectros.

Para cada espectro obtenido se analizaron todas las señales observadas. Cada señal fue asignada, de acuerdo con su grado de polimerización y su grado de metilación, a la especie que le dio origen ($[M - H]^-$, $[M + H]^+$, $[M + Na]^+$, $[M + K]^+$ o $[M-H+Cl]^-$ según el caso).

Tabla III.3: Resumen de los resultados obtenidos. Se muestran los fragmentos seleccionados de los espectros.

#	Condiciones	Espectro	Observaciones
1	<i>Pectina nativa</i> usando <i>nor</i> -harmano en modo positivo		No se puede extraer información debido a la baja calidad de las señales obtenidas.
2	<i>Pectina nativa</i> usando 2,5-DHB en modo positivo		Se pueden indentificar señales hasta m/z 1745. Los picos de la muestra aparecen montados sobre las señales de la matriz.
3	<i>Pectina nativa</i> usando <i>nor</i> -harmano en modo negativo		Se distinguen claramente oligómeros de hasta 21 unidades ($m/z \sim 4000$) y se identifica el patrón de metilación de los ácidos galacturónicos del polisacárido.
4	<i>Pectina nativa</i> usando 2,5-DHB en modo negativo		Mejora la calidad del espectro respecto a 2. Se observan señales hasta m/z cercanas a 1000.
5	<i>Pectina dializada</i> usando <i>nor</i> -harmano en modo negativo		Se observan distancias de 130 que podrían adjudicarse a oligómeros de arabinosa presentes en el polisacárido. Se alcanzan valores de m/z cercanos a 2100.

<p>6</p>	<p><i>Pectina hidrolizada con nor-harmano en modo negativo</i></p>		<p>Las señales entre 222 y 676 presentan mayor intensidad que en 3. No posee buena resolución y se alcanzan valores de m/z de 2300.</p>
<p>7</p>	<p><i>Pectina hidrolizada y dializada usando nor-harmano en modo negativo</i></p>		<p>El espectro presenta señales más limpias que en 6 pero se alcanzan valores de m/z cercanos a 1700.</p>
<p>8</p>	<p><i>Pectina hidrolizada usando 2,5-DHB en modo negativo</i></p>		<p>El espectro tiene peor resolución que en 7 pero alcanza valores de m/z superiores (2100).</p>
<p>9</p>	<p><i>Pectina hidrolizada usando 2,5-DHB en modo positivo</i></p>		<p>Mejora respecto de 8. Se alcanzan valores de m/z cercanos a 3000.</p>
<p>10</p>	<p><i>Pectina hidrolizada usando nor-harmano en modo positivo</i></p>		<p>El espectro provee información complementaria respecto de 9 y se identifican nuevas señales respecto de 3. Se alcanzan valores de m/z cercanos a 1400.</p>

<p>11</p>	<p><i>Pectina hidrolizada y dializada</i> usando <i>nor-harmano</i> en modo positivo</p>		<p>El espectro provee la misma información que 7 pero es peor la resolución y hay mayor nivel de ruido en este caso. Se alcanzan valores de m/z cercanos a 1400.</p>
<p>12</p>	<p><i>Pectina nativa dopada con NaCl</i> usando 2,5-DHB en modo positivo</p>		<p>Mejora la resolución respecto de 2 para valores de m/z entre 900 y 1700. Se identifican las señales observadas en 2 por su corrimiento en 23 Da (Na). Se alcanzan valores de m/z cercanos a 1900.</p>
<p>13</p>	<p><i>Pectina nativa dopada con KCl</i> usando 2,5-DHB en modo positivo</p>		<p>Se identifican las señales observadas en 2 por su corrimiento en 39 Da (K) y las señales de 12 por su corrimiento en 16. Se alcanzan valores de m/z cercanos a 2000.</p>
<p>14</p>	<p><i>Pectina nativa dopada con NH4Cl</i> usando <i>nor-harmano</i> en modo negativo</p>		<p>El espectro es más limpio que en 3 pero se observan menos señales. El NH_4Cl ayuda a la detección de oligómeros neutros $[\text{M}-\text{H}+\text{Cl}]^-$. Se alcanzan valores de m/z cercanos a 1700.</p>
<p>15</p>	<p><i>Pectina nativa dopada con NH4Cl</i> usando 2,5-DHB en modo positivo</p>		<p>No aporta información nueva. Se alcanzan valores de m/z cercanos a 1700.</p>

Tal como se observa en los distintos espectros obtenidos en los experimentos de MALDI (ver Apéndice), el protocolo de preparación de la muestra influye en la sensibilidad y en la resolución de las masas.

Luego de efectuar el análisis con distintos tratamientos de la muestra y utilizando distintas matrices con y sin dopaje con sales se determinó que **las mejores condiciones experimentales están dadas utilizando *nor*-harmano como matriz, trabajando en modo iónico negativo y partiendo de una solución de 5 mg/mL de la muestra de pectina nativa** (ver Figura A.3). Es decir, se comprobó que mediante el uso de esta matriz no es necesario efectuar un pre-tratamiento de la muestra ni acondicionarla mediante el agregado de sales inorgánicas, obteniéndose un espectro de la muestra con muy buena resolución que incluye el patrón de distribución de los ésteres metílicos en los distintos oligómeros. Esta forma es rápida y provee señales claras en el espectro permitiendo así una caracterización completa de la muestra.

Respecto de las muestras dopadas con sales, se puede decir que los resultados obtenidos con los métodos I y II muestran que la calidad de los espectros no depende del método utilizado para añadir las sales a las muestras. Por otro lado, el agregado de sales no proporciona más información que la que se obtiene con el espectro efectuado con *nor*-harmano en modo de detección negativo. Sin embargo, los ensayos sirvieron para verificar y validar la información obtenida en ausencia de las sales, mediante la observación de picos correspondientes a $[M + K]^+$ o $[M + Na]^+$.

Como se puede observar en la Figura 3 de la Tabla III.3 (o Figura A.3 del Apéndice), el espectro de masa de la muestra nativa utilizando *nor*-harmano como matriz, operando el equipo en modo iónico negativo, provee información valiosa acerca de la distribución de pesos moleculares, de grupos terminales y de unidades repetitivas en oligómeros. Todas las señales presentes en este espectro corresponden a especies $[M - H]^-$. Las señales más intensas están distanciadas en 176 Da o 190 Da, cuyos valores corresponden al peso molecular de una unidad interna de ácido galacturónico o de ácido galacturónico esterificado respectivamente. Se pueden identificar señales asociadas al monómero de ácido galacturónico y hasta los oligómeros de 21 unidades. Los picos más intensos del espectro corresponden a los oligómeros con mayores

grados de metoxilación. Mediante una inspección minuciosa de cada región de m/z , se observan oligómeros metilados desde el tetrámero hasta el oligómero de 21 unidades. Entre los de menor número de unidades se hallaron* el 2², el 3¹ y el 3², mientras que para los oligómeros metilados de mayor peso molecular se identificaron los siguientes oligómeros: 13⁰-13¹¹; 14⁰-14⁹; 15⁰-15⁸; 16⁰-16¹²; 17⁰-17¹⁴; 18¹-18¹⁶. Las formas metiladas encontradas para los oligómeros de 19, 20 y 21 unidades fueron las siguientes: 19¹⁰, 19¹⁴, 19¹⁷, 20⁵, 20⁷, 20¹⁰, 20¹², 20¹⁵, 21⁶, 21⁹, 21¹⁶, 21¹⁸ (fuera de escala en el espectro de la Figura A.4).

En cuanto a las muestras dializadas se observa que disminuye el peso molecular máximo observado, más aún en el caso donde la diálisis se efectuó luego de la hidrólisis. En el espectro de la muestra dializada (Figura 5 de la Tabla III.3 o Figura A.5) se observa una distribución de oligómeros distanciados en 130 Da formados fundamentalmente por pentosas con grado de polimerización desde 4 hasta 16, que podrían adjudicarse a cadenas neutras de arabinosa teniendo en cuenta los resultados obtenidos por RMN. Paralelamente, el espectro de la muestra hidrolizada y dializada presenta señales de bajo peso molecular con un corte abrupto en m/z 871. Estos hechos llevan a pensar que durante la diálisis habría una retención selectiva de moléculas de alto peso molecular y/o con carga, debido a interacciones electrostáticas con la membrana de diálisis.

Por último, se determinó el peso molecular promedio de la muestra por el método colorimétrico de Park y Johnson³² (ver Apéndice) para comparar con los resultados obtenidos por UV-MALDI-TOF. El ensayo indicó un valor cercano a 6000 Da. Sin embargo, este método sólo refleja un resultado promedio del número de extremos terminales reductores presentes en la muestra.

Como la pectina empleada es un polisacárido con una gran dispersión en su alto peso molecular, pueden aparecer fenómenos de discriminación de iones dependiente de la masa en el análisis por UV-MALDI-TOF. En el proceso de desorción/ionización, puede ocurrir un efecto de supresión de analito donde los iones más livianos inhibirían, al

* X^m: X es el número de unidades de ácido galacturónico que forman el oligómero identificado; m es el número de metoxilos de los grupos éster presentes en cada oligómero. Esta nomenclatura es la utilizada en la literatura.

menos parcialmente, la ionización de los más pesados resultando en una disminución importante de las intensidades de los iones originados por los oligosacáridos de mayor peso molecular en la muestra.³¹ Este fenómeno explicaría la diferencia entre los resultados obtenidos por el análisis colorimétrico y por UV-MALDI-TOF.

III.5. Conclusiones y Resumen del Capítulo III

En esta parte del trabajo se realizó un análisis estructural de la muestra de pectina utilizada en la tesis mediante FTIR, RMN (^1H y ^{13}C) y espectrometría de masas UV-MALDI-TOF.

A partir del espectro infrarrojo de la pectina nativa, se identificaron los principales grupos funcionales de la molécula.

El análisis espectroscópico de resonancia magnética nuclear de ^{13}C y ^1H sobre la muestra nativa y sobre la muestra hidrolizada permitió la identificación de los principales constituyentes del polisacárido por comparación con datos bibliográficos.

Se comprobó que se trataba de una pectina de origen cítrico y se realizó una estimación aproximada del grado de esterificación de la misma (60-70 %).

El ensayo colorimétrico indicó un peso molecular promedio de 6000 Da. Sin embargo, utilizando la técnica de UV-MALDI-TOF fue posible identificar claramente señales cercanas a m/z 4000, indicando que la muestra de pectina posee una amplia distribución de pesos moleculares. Estas diferencias se podrían explicar teniendo en cuenta los procesos de desorción/ionización que se producen en la técnica UV-MALDI-TOF.

Mediante UV-MALDI-TOF se obtuvo información sobre la distribución de pesos moleculares, de grupos terminales y de unidades repetitivas en los oligómeros que forman el polisacárido. Además, para cada grado de polimerización, las especies con mayor intensidad en el espectro corresponden a grados de metilación entre 60 y 70 %, concordante con el porcentaje de metilación obtenido por RMN.

Una parte importante del trabajo consistió en la puesta a punto de las condiciones necesarias para obtener un buen espectro del

polisacárido. Para ello, se ensayaron diferentes matrices en distintas condiciones hasta obtener un espectro de masa de la muestra con muy buena resolución. La principal conclusión, desde un punto de vista práctico, es que los mejores espectros de UV-MALDI-TOF se obtienen al analizar una solución de pectina nativa utilizando *nor*-harmano como matriz en modo de detección negativo. Este estudio presenta una nueva manera de analizar la pectina por UV-MALDI-TOF, que hasta el momento no ha sido planteada en la literatura según nuestro conocimiento.

Los experimentos de RMN se realizaron con asesoramiento de la Dra. Adriana Kolender y los estudios de MALDI se efectuaron con ayuda de la Dra. Rosa Erra-Balsells, ambas investigadoras del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Estos estudios forman parte de un artículo actualmente en redacción.

III.6. Bibliografía

- ¹ F. Côté, M. G. Hahn, “Oligosaccharins: structures and signal transduction” *Plant Molecular Biology*. 26 (1994) 1379-1411.
- ² G. De Lorenzo, A. Ranucci, A. Bellincampi, G. Salvi, F. Cervone, “Elicitation of phenylalanine ammonia-lyase in *Daucus carota* by oligogalacturonides released from sodium polypectate by homogeneous polygalacturonase” *Plant Science* 51 (1987) 147-150.
- ³ V. Marfà, D. J. Gollin, S. Eberhard, D. Mohnen, A. Darvill, P. Albersheim, “Oligogalacturonides are able to induce flowers to form on tobacco explants” *Plant J.* 1 (1991) 217-225.
- ⁴ L. Catoire, R. Goldberg, M. Pierron, C. Morvan, C. Hervé du Penhoat, An efficient procedure for studying pectin structure which combines limited depolymerization and ¹³C NMR, *European Biophysics Journal* 27 (1998) 127-136.
- ⁵ C. Rosenbohm, I. Lundt, T. M. I. E. Christensen, N. W. G. Young, Chemically methylated and reduced pectins: preparation, characterisation by ¹H NMR spectroscopy, enzymatic degradation, and gelling properties, *Carbohydrate Research* 338 (2003) 637-649
- ⁶ C. M. G. C. Renard, M. J. Crépeau and J. F. Thibault, Glucuronic acid directly linked to galacturonic acid in the rhamnogalacturonan backbone of beet pectins, *European Journal of Biochemistry* 266 (1999) 566-574.
- ⁷ B. Quémener, J.C. Cabrera Pino, M.-C. Ralet, E. Bonnin and J.F. Thibault, Assignment of acetyl groups to O-2 and/or O-3 of pectic oligogalacturonides using negative electrospray ionization ion trap mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 38 (2003) 641-648.
- ⁸ R. Körner, G. Limberg, J. D. Mikkelsen and P. Roepstorff, Characterization of enzymatic pectin digests by matrix-assisted laser

desorption/ionization mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 33 (1998) 836-842.

⁹ R. Körner, G. Limberg, T. Christensen, J. D. Mikkelsen and P. Roepstorff, Sequencing of partially methyl-esterified oligogalacturonates by Tandem mass spectrometry and its use to determine pectinase specificities, *Anal. Chem.* 71 (1999) 1421-1427.

¹⁰ P. Daas, P. Arisz, H. Schols, G. De Ruiter and A. Voragen, Analysis of partially methyl-esterified galacturonic acid oligomers by high-performance anion-exchange chromatography and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 257 (1998) 195-202.

¹¹ P. M. Gilsenan, R. K. Richardson, E. R. Morris, Thermally reversible acid-induced gelation of low-methoxy pectin, *Carbohydrate Polym.* 41 (2000) 339-349.

¹² V. J. Morris, en *Functional Properties of Food Macromolecules*; J. R. Mitchell, D. A. Ledward, Eds.; Elsevier Applied Science Publisher: London 1986; capítulo 3, p. 121.

¹³ D. A. Rees, Structure, conformation, and mechanism in the formation of polysaccharide gels and networks, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 24 (1969) 267-332.

¹⁴ D. Oakenfull, A. Scott, Hydrophobic interaction in the gelation of high methoxyl pectins, *J. Food Sci.* 49 (1984) 1093-1098.

¹⁵ J. A. Lopes da Silva, M. P. Gonçalves and M. A. Rao, Kinetics and thermal behaviour of the structure formation process in HMP / sucrose gelation, *Int. J. Biol. Macromol.* 17 (1995) 25-32.

¹⁶ C. Löfgren, S. Guillotin, H. Evenbratt, H. Schols, and A. M. Hermansson, Effects of calcium, pH, and blockiness on kinetic

Rheological behavior and microstructure of HM pectin gels, *Biomacromolecules* 6 (2005) 646-652.

¹⁷ K. E. Mutenda, R. Körner, T. M. I. E. Christensen, J. Mikkelsen, P. Roepstorff, Application of mass spectrometry to determine the activity and specificity of pectin lyase A, *Carbohydr. Res.* 337 (2002) 1217-1227.

¹⁸ L. J. Bellamy, *The infra-red spectra of complex molecules*, second edition, Ed. Wiley, 1958.

¹⁹ O. A. Bushneva, R. G. Ovodova, A. S. Shashkov, Y. S. Ovodov, Structural studies on hairy region of pectic polysaccharide from campion *Silene vulgaris* (*Oberna behen*), *Carbohydrate Polymers* 49 (2002) 471-478.

²⁰ A. K. Andersen, B. Larsen, H. Grasdalen, Sequential structure by ¹H NMR as a direct assay for pectinesterase activity, *Carbohydrate Research* 273 (1995) 93-98.

²¹ H. Grasdalen, A. K. Andersen, B. Larsen, NMR spectroscopy studies of the action pattern of tomato pectinesterase: generation of block structure in pectin by a multiple-attack mechanism, *Carbohydrate Research* 289 (1996) 105-114.

²² M. Hricovíni, S. Bystrický and A. Malovíková, "Conformations of (1→4)-linked α-D-galacturono-di- and -tri-saccharides in solution analysed by n.m.r. measurements and theoretical calculation", *Carbohydrate Research* 220 (1991) 23-31.

²³ A. G. J. Voragen and W. Pilnik, "Analysis of some partly and fully esterified oligogalactopyranuronic acids by P.M.R. spectrometry at 220 MHz", *Carbohydrate Research* 34 (1974) 15-23.

²⁴ C. M. G. C. Renard, M. J. Crépeau and J. F. Thibault, Glucuronic acid directly linked to galacturonic acid in the rhamnogalacturonan backbone of beet pectins, *European Journal of Biochemistry* 266 (1999) 566-574.

-
- ²⁵ C. M. G. C. Renard, M. J. Crépeau, J. F. Thibault, Structure of the repeating units in the rhamnogalacturonic backbone apple, beet and citrus pectins, *Carbohydrate Research* 275 (1995) 155-165.
- ²⁶ J. Duan, X. Wang, Q. Dong, J. Fang, X. Li, Structural features of a pectic arabinogalactan with immunological activity from the leaves of *Diospyros kaki*, *Carbohydrate Research* 338 (2003) 1291-1297.
- ²⁷ X. S. Wang, L. Liu, J. N. Fang, Immunological activities and structure of pectin from *Centella asiatica*, *Carbohydrate Polymers* 60 (2005) 95-101.
- ²⁸ Z. K. Mukhiddinov, D. Kh. Khalikov, F. T. Abdusamiev, Ch. Ch. Avloev, Isolation and structural characterization of a pectin homo and ramnogalacturonan, *Talanta* 53 (2000) 171-176.
- ²⁹ S. Vidal, T. Doco, P. Williams, P. Pellerin, W. S. York, M. A. O'Neill, J. Glushka, A. G. Darvill, P. Albersheim, Structural characterization of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II: evidence for the backbone location of the aceric acid-containing oligoglycosyl side chain, *Carbohydrate Research* 326 (2000) 277-294.
- ³⁰ L. Bédouet, B. Courtois, J. Courtois, Rapid quantification of O-acetyl and O-methyl residues in pectin extracts, *Carbohydrate Research* 338 (2003) 379-383.
- ³¹ A. Kolender, "Polisacáridos de *Nothogenia fastigiata* y *Georgiella confluens* (Rhodophyta). Nuevos métodos de análisis para polisacáridos de algas". Tesis de doctorado presentada el 19/9/2003 en la Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- ³² A. I. Usov, Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups, *Food Hydrocolloids* 12 (1998) 301-308.

Capítulo IV

NARICES ELECTRÓNICAS: ENCAPSULAMIENTO DE UNA ESENCIA DE TUTI-FRUTI EN GELES DE PECTINAS

IV. Narices Electrónicas: Encapsulamiento de una esencia de tuti-fruti en geles de pectinas.

IV.1. Introducción

El primer objetivo planteado en esta tesis fue explorar la capacidad de la metodología de Nariz Electrónica para estudiar la cinética de liberación de un saborizante artificial volátil de composición múltiple (*flavour*)* encapsulado en un gel y analizar la influencia de las propiedades estructurales de la matriz de encapsulamiento sobre la liberación del *flavour*. Para ello, se utilizó la Nariz 1, previamente descrita en *Metodologías empleadas*, desarrollada en INQUIMAE. Este dispositivo fue utilizado en trabajos previos acerca de la frescura de pescados, en la discriminación de fragancias y en la discriminación de alcoholes.^{1,2,3}

Como medio de encapsulamiento se utilizaron geles basados en las pectinas de alto grado de metilación descritas en el capítulo anterior. Las propiedades de los geles obtenidos para el encapsulamiento y liberación dependen de la relación pectina/sacarosa/agua presente en el medio, las cuales fueron optimizadas para lograr geles reproducibles con propiedades reológicas definidas.

La primera parte del trabajo consistió en poner a punto la técnica para obtener los geles en forma reproducible. En la segunda parte, se realizaron mediciones reológicas para estudiar la influencia de las propiedades viscoelásticas de los geles en la liberación de la esencia encapsulada. Estos estudios preanuncian los estudios más sistemáticos

* Se utilizó el término *flavour* tanto para la esencia encapsulada como para sus vapores, lo cual es claramente un abuso de notación. En efecto, dado que el *flavour* encapsulado es un sistema multicomponente y que dichos componentes pueden ser liberados hacia la fase aérea en forma diferenciada, en principio, la composición puede ser diferente en ambas fases (y seguramente lo es). Sin embargo, es corriente en la literatura hacer caso omiso a dicha diferencia al referirse tanto al compuesto encapsulado como a sus vapores. Aquí adoptamos esta convención, llamando irrestrictamente con el nombre "*flavour*" a las mezclas en las dos fases.

que se describen en el Capítulo VI sobre la correlación reología-liberación.

Finalmente, mediante Análisis de Componentes Principales y Redes Neuronales, en los cuales el grupo tiene amplia experiencia,^{1,2,3,4} se estudió la influencia del envejecimiento del gel sobre la cinética de liberación del *flavour* encapsulado.

IV.2. Materiales y Métodos

IV.2.1. Análisis de la esencia de tuti-fruti y preparación de los geles

Análisis de la esencia de tuti-fruti por GC/MS

La composición de la esencia líquida de tuti-fruti fue analizada por cromatografía gaseosa combinada con espectrometría de masas. Se utilizó un cromatógrafo Shimadzu GC-17A con detección de masas en el rango de 40-450 de m/z. Para la separación se empleó una columna capilar de sílica (Supelco; modelo SPB1) cuyas características son las siguientes: 30 m × 0,25 mm d.i. × 0,25 µm film. Como gas carrier se utilizó He (presión en la columna: 80 kPa, flujo en la columna: 1,3 mL/min, relación de split: 7). La temperatura del inyector fue de 220 °C y la temperatura en la interfase de 250 °C. El programa de temperaturas utilizado en la columna fue el siguiente: 5 min a 70 °C y luego una rampa de 15 °C/min hasta 250 °C.

El principal componente detectado en la esencia de tuti-fruti fue limoneno. También se identificó por comparación con los espectros provistos por la librería del espectrómetro de masas, la presencia de 1-hexeno, 2,3-dimethylpentano, 2-fenantrenol, ácido pentanóico, ciclohexano, etanol y 2-methylpentano.

El porcentaje relativo de limoneno estimado es de 80 %. La proporción de los demás componentes fue estimada en los siguientes valores: (8 ± 4) % para 1-hexeno, (4 ± 2) % para 2,3-dimethylpentano y menos del 2 % para cada uno de los demás compuestos mencionados.

Preparación de los geles

Aquí se describe únicamente el protocolo final que se puso a punto. Es importante destacar que esta tarea no fue simple y requirió diversas pruebas y ajustes que no se describen en la tesis.

En primer lugar, se mezcla en seco la pectina con el 10 % del azúcar total. Esta mezcla se disuelve en un buffer de citrato de potasio 12 mM y se calienta bajo agitación hasta 80 °C durante 10 minutos. En ese momento se agrega el resto de la sacarosa y se alcanza la concentración deseada de 62 % p/p. La solución se mantiene bajo agitación durante otros 10 minutos a 80 °C. Luego, el sistema se deja a temperatura ambiente hasta alcanzar aproximadamente 40 °C. En ese momento se separan 4 mL de solución y se le agregan 200 µL de esencia de tuti-fruti y algunas gotas de ácido cítrico 50 % y luego se agita la mezcla con un vortex en un recipiente cerrado durante 30 segundos. Finalmente estos recipientes se incuban a 33 °C en un baño de agua termostatzado. En forma simultánea se trabajó con 5 replicados en cada experimento. La concentración final de pectina en la mezcla fue siempre de 0,4 % p/p. En cada experimento se midió el índice de refracción (refractómetro portátil Arcano Modelo Ref 107, rango 0-90 % Brix) para controlar el contenido de azúcar en las mezclas, obteniéndose 62 °Brix.

Soluciones de Sacarosa

A 4 mL de solución de sacarosa 62 % p/p preparada en buffer citrato en ausencia de pectina, se le agregaron 200 µL de esencia de tuti-fruti. Las soluciones fueron incubadas a 33 °C y el contenido de sacarosa se controló con un refractómetro.

IV.2.2. Mediciones Reológicas

Las mediciones reológicas fueron efectuadas en el laboratorio de la Dra. Bulone (Italia), empleando un reómetro de oscilación cizallante de baja amplitud de esfuerzo de corte controlado (controlled stress) de marca TA Instruments (Reino Unido) y modelo AR 1000. Aprovechando la oportunidad de mi primer visita al laboratorio de la Dra. Bulone pude

dejar muestras de las pectinas y de la esencia de tuti-fruti para que allí pudieran preparar las matrices utilizando exactamente las mismas materias primas. También se ajustó el protocolo de preparación de los geles en forma conjunta.

En este trabajo se utilizó la geometría de doble cilindro (radio externo del rotor: 21,96 mm; radio interno del rotor: 20,38 mm; radio externo del *stator*: 20,00 mm; altura inmersa del cilindro: 59,50 mm; distancia entre cilindros: 500 μm). Las mediciones fueron realizadas a una frecuencia de 0,5 Hz y una deformación de 4×10^{-3} .

La solución a 40 °C fue introducida en la geometría del reómetro, la cual, había sido previamente termostatzada. Con el fin de evitar la evaporación del solvente, la separación superior existente entre los dos cilindros concéntricos fue cubierto por un aceite siliconado. Para mantener la temperatura constante durante el experimento se utilizó un baño termostático Haake DC 30. Los módulos elástico (G') y viscoso (G'') fueron monitoreados en función del tiempo por un período de 24 h. Luego de este tiempo, se registró un espectro mecánico de frecuencias variando las mismas entre 0,02 y 30 Hz.

IV.2.3. Nariz Electrónica 1 (cámara estanca) y protocolo de medición

Cada recipiente cerrado, conteniendo la muestra, es colocado en el interior de la cámara de la Nariz Electrónica para realizar la medición correspondiente. Las señales de los sensores se comienzan a registrar inmediatamente después de destapar los recipientes. El tiempo que lleva que todas las señales lleguen a un *plateau* es el tiempo de medición, el cual se indica como " τ ", siendo del orden de 20 minutos con el equipo utilizado (en los nuevos modelos de narices los valores de τ son aproximadamente 5 minutos). Los valores de las señales de los sensores alcanzados en el tiempo τ fueron utilizados para el análisis de datos luego de substraerse una línea de base. La humedad relativa dentro de la cámara fue medida en todos los experimentos, dando valores entre 30 y 50 %. Sin embargo, estos valores no fueron utilizados en el análisis multivariado.

En la Figura IV.1 se muestra el cambio de las señales de la Nariz Electrónica con el tiempo a partir de que se ingresa una muestra en su interior.

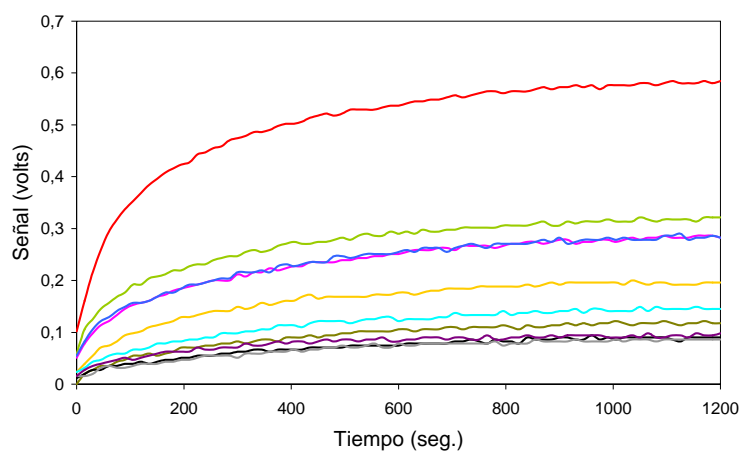


Figura IV.1: Señales de los sensores en función del tiempo de medición desde la introducción de la muestra. Cada curva es la señal de un sensor.

Los recipientes cerrados conteniendo los geles con el *flavour* encapsulado fueron incubados a 33 °C en un baño termostático. Tres horas después del encapsulamiento, uno de los recipientes con la muestra fue abierto y colocado en el interior de la cámara de la Nariz Electrónica e inmediatamente después fue iniciada la medición. El tiempo de incubación fue necesario para asegurar la formación y estabilización del gel. En los días consecutivos a la medición, los demás replicados fueron abiertos y medidos. Una vez medida la liberación del *flavour* de un dado replicado, el mismo fue conservado abierto a 33 °C de manera tal de seguir la cinética de liberación durante los días subsiguientes. Por ejemplo, el tercer replicado fue abierto el día 2 y medido durante los días 2, 3, 4 y 5. Se hará referencia al número de días que el recipiente fue incubado abierto a 33 °C como D . De esta manera, se analizó tanto la influencia del envejecimiento del gel en la liberación del *flavour* en un recipiente cerrado y la liberación del *flavour* desde un recipiente abierto en función de D .[†] Cada experimento consistió en efectuar una medición con la Nariz Electrónica día tras día durante una

[†] D ≡ tiempo de incubación de una muestra en días y τ ≡ tiempo que dura una medición (~20 minutos).

semana. Es decir, un vector $\{S_1, \dots, S_{10}\}$ se obtuvo cada día para cada muestra.

Las huellas digitales de distintos replicados fueron altamente reproducibles. Por otra parte, también se realizaron diversos controles. En primer lugar, se realizaron mediciones con la Nariz Electrónica del gel de pectina en ausencia de una esencia encapsulada, para descartar la posibilidad de que éste proveyera una señal de fondo debido a los componentes del gel, en particular del agua. El medio de encapsulamiento no presentó señal alguna, indicando que esta Nariz Electrónica no “huele” el gel de pectina, por lo que la contribución del gel no interfiere en la detección de la esencia de tuti-fruti con la Nariz Electrónica empleada.

Se utilizará el término “esencia libre” para referirse al *flavour* de la esencia comercial de tuti-fruti sin encapsular. Se realizaron controles utilizando limoneno “libre” y encapsulado, dado que el limoneno es el componente principal de la esencia de tuti-fruti. Los patrones de las muestras control así como de las esencias libres fueron registrados en días diferentes antes y después de realizar los experimentos de liberación, de manera de detectar posibles influencias del *drift* de los sensores a lo largo de los días. Sin embargo, no se hallaron diferencias significativas entre los mismos indicando que la deriva (*drift*) de los sensores no influye en los resultados de este trabajo.

IV.2.4. PCA y Redes Neuronales Artificiales

Para cada grupo de datos $\{S_1, \dots, S_{10}\}$, se calcularon las componentes principales $\{PC_1, PC_2, \dots, PC_{10}\}$. Se realizó un PCA con todos los datos sin normalizar provenientes de todas las mediciones y como resultado, más del 96 % de la varianza total resultó contenida en el grupo definido por los vectores $\{PC_1, PC_2\}$.

Se utilizó una red neuronal tipo *back propagation*, con una única capa oculta. La cantidad de neuronas en las capas ocultas y el número de épocas utilizadas fueron optimizadas durante la etapa de entrenamiento de la red en 5 y 996 respectivamente (*Momentum rate*: 0,7 y *step size*: 0,1). Se utilizaron 36 de las 44 mediciones (80 %) como

muestras para entrenamiento; 4 mediciones (10 %) fueron utilizadas como datos para realizar una validación cruzada y otras 4 mediciones (10 %) fueron utilizadas como datos para el chequeo de la red. Los *outputs* fueron definidos como (1 0 0) para las mediciones correspondientes a la esencia de tuti-fruti “libre”; como (0 1 0) para las mediciones asociadas al aroma liberado de los geles de pectinas en $D = 0$ y como (0 0 1) para las mediciones del *flavour* liberado desde los geles en $1 \leq D \leq 5$. Las dos componentes principales, PC_1 y PC_2 , asociadas al experimento de liberación fueron utilizadas como vectores *inputs* para crear la red neuronal artificial.

IV.3. Resultados y Discusión

IV.3.1. Análisis reológico de los sistemas

En primer lugar, se discute la evolución sol-gel del sistema. En segundo lugar, se analiza la dependencia de G' y G'' con la frecuencia para geles ya estabilizados y por último se estudia la influencia de incorporar un soluto (*flavour*) en la matriz.

La determinación del punto de gelificación o del tiempo de gelificación es un aspecto difícil y ambiguo de definir así como también la definición de gel en sí misma aún es una muy discutida en literatura.⁵ Varios criterios han sido propuestos para responder esta pregunta, pero de todas formas son altamente dependientes de la escala de tiempo elegida.⁶ En este trabajo se seguirá el criterio (adoptado por muchos autores) que consiste en considerar a un gel como a un sistema en el cual G' es mayor que G'' para los valores de deformación y frecuencia elegidos. Por lo tanto, el tiempo de gelificación se define como el tiempo en el cual G' iguala a G'' . Este criterio indica que el cruce entre G' y G'' marca la aparición de un gel. Es importante aclarar que aún sistemas que son microscópicamente fluidos pueden exhibir valores de G' mayores que G'' , como ya fue observado para pectinas a altas concentraciones y altas temperaturas ⁷ o en soluciones de polímeros entrecruzados a altas frecuencias. Los valores de G' y G'' se muestran en la Figura IV.2 en función del tiempo.

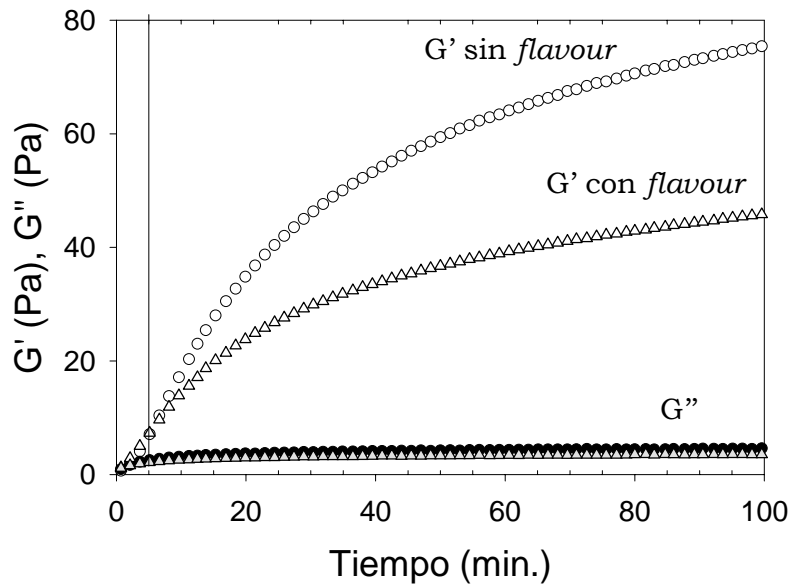


Figura IV.2: Módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') en función del tiempo. $T = 33\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\omega = 0,5\text{ Hz}$. Se muestran resultados para las muestras con (Δ , \blacktriangle) y sin *flavour* (\circ , \bullet). La línea a 5 minutos indica el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio térmico en el reómetro.

En esta figura se observa que luego de los primeros 10 minutos, G' es siempre mayor que G'' , indicando una respuesta de tipo sólido en el sistema desde una etapa temprana en la evolución de la medición. El crecimiento rápido inicial de G' y de G'' es seguido por un crecimiento más lento, reflejando el arreglo de la red. Estos resultados indican que la formación del gel ocurre inmediatamente a partir del enfriamiento de los reactivos. El sistema continúa evolucionando hacia la formación de una red estable aún a tiempos mayores a 100 minutos. La derivada con el tiempo de G' , dG'/dt , es representada en función del tiempo en la Figura IV.2b para apreciar mejor la velocidad de evolución de la estructura del material.⁸ Esta última presenta un máximo en la derivada en alrededor de 6 minutos y alcanza un estado estacionario a los 100 minutos. El tiempo típico para alcanzar el equilibrio térmico utilizando la geometría de cilindros concéntricos en el reómetro, consta de 5–6 minutos. Por lo tanto, los primeros 3 puntos de la Figura IV.2 reflejan un efecto combinado entre la estabilización térmica y la gelificación.

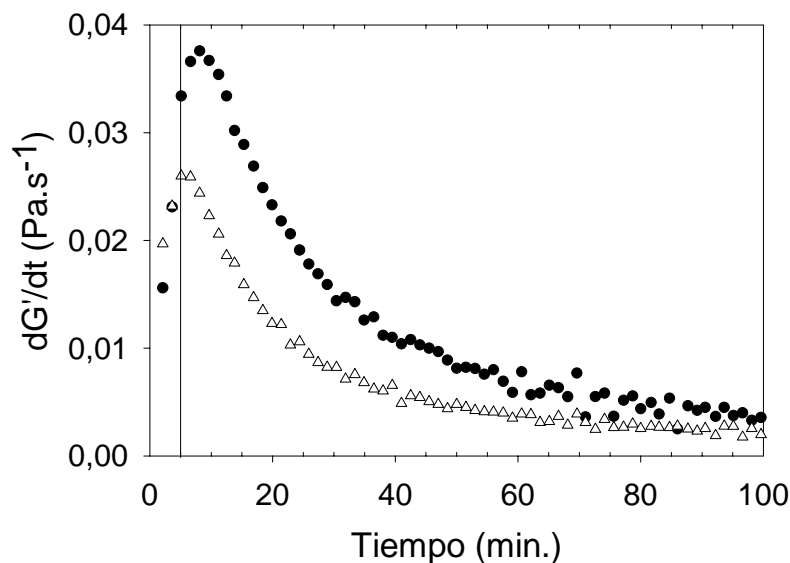


Figura IV.3: Derivada del módulo elástico, dG'/dt , en función del tiempo hasta 100 minutos luego de la incubación. $T = 33\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\omega = 0,5\text{ Hz}$. Se muestran resultados para las muestras con (Δ) y sin (\bullet) *flavour*. La línea a 5 minutos indica el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio térmico en el reómetro.

Estos efectos no son independientes debido a que la formación del gel es también consecuencia de un cambio de temperatura. Si los primeros tres puntos fuesen omitidos en la Figura IV.2, el máximo de la derivada desaparecería y únicamente se observaría la parte de la curva decreciente en la Figura IV.3. Esto es equivalente a decir, en términos de la descripción reportada por Lopes da Silva *et al.*, que la formación del gel es tan rápida que la primera etapa no puede ser resuelta. Por lo tanto, el decrecimiento de dG'/dt a lo largo del tiempo refleja el cambio en la estructura del gel, o sea, una evolución estructural como un acomodamiento de las cadenas de polímero hasta alcanzar una estructura totalmente estabilizada.

La dependencia de G' , G'' y la viscosidad compleja ($\eta^* = \sqrt{G'^2 + G''^2} / \omega$) con la frecuencia angular para geles ya estabilizados se muestra en la Figura IV.4. El valor constante de $\log(G')$ en función de $\log(\omega)$ y el valor de la pendiente cercano a -1 obtenido para la dependencia log-log de η^* con la frecuencia, son típicos de sistemas gelificados y para muestras con carácter sólido.⁷ Es conocido de

experimentos previos,⁹ que las soluciones de pectinas en bajas concentraciones aparecen como un sistema de cadenas ramificadas, por lo cual es razonable que a altas concentraciones el sistema se comporte como una red, al menos desde un punto de vista mecánico.

Los geles sin *flavour* tienen una mayor componente elástica que los geles con *flavour* a tiempos mayores que 20 minutos, en todo el rango de frecuencias considerado. Además, el valor máximo de dG'/dt en presencia de *flavour* (Figura IV.3) es más pequeño que el valor obtenido en ausencia del *flavour*. Estos resultados indican que el *flavour* disminuye tanto el grado de entrecruzamiento entre las cadenas de polímero así como también la velocidad de formación del gel. Resultados similares han sido obtenidos previamente con polímeros hidrofílicos.¹⁰ El valor de G' y la posición del máximo de la derivada dG'/dt son diferentes en presencia de la esencia de tuti-fruti.

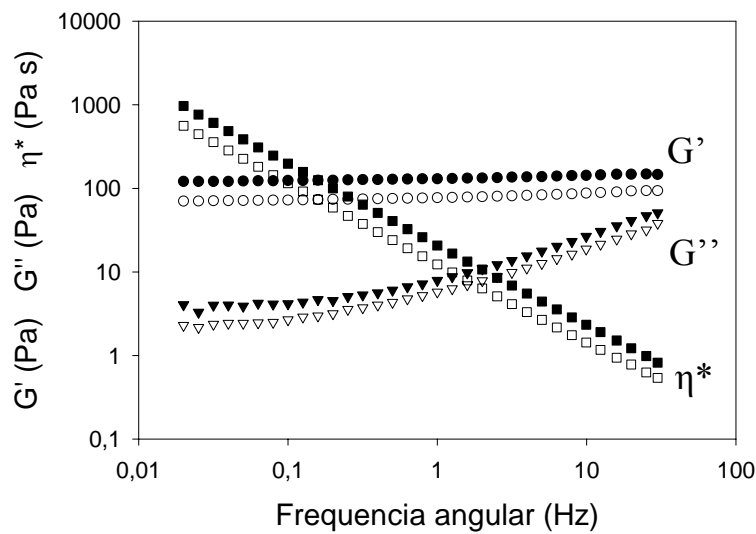


Figura IV.4: Barrido de frecuencias: G' , G'' y la viscosidad compleja (η^*) en el rango desde 0,01 a 30 Hz para el sistema con y sin *flavour*. Las mediciones se realizaron 24 horas luego del inicio de la gelificación (gel estabilizado). $T = 33^\circ\text{C}$, (\circ, ∇, \square): G' , G'' y η^* en el sistema con *flavour*; ($\bullet, \blacktriangledown, \blacksquare$): G' , G'' y η^* en el sistema sin *flavour*.

IV.3.2. Resultados de Nariz Electrónica

Al introducir las muestras en la cámara de la Nariz Electrónica, se observa un aumento rápido de las señales debido a la liberación del *flavour* desde la interfase gel-aire hacia los sensores (Figura IV.1). Las señales aumentan hasta que el *flavour* satura la cámara en el tiempo τ . Este tiempo es de aproximadamente 20 minutos para las muestras que fueron medidas el mismo día en que fueron preparadas ($D = 0$) mientras que es de 40 minutos para las muestras que fueron abiertas por más de 24 hs ($D \geq 1$). Se observó que los valores de las señales $\{S_1, \dots, S_{10}\}$ decrecen en función de D para todas las muestras consideradas (Figura IV.5).

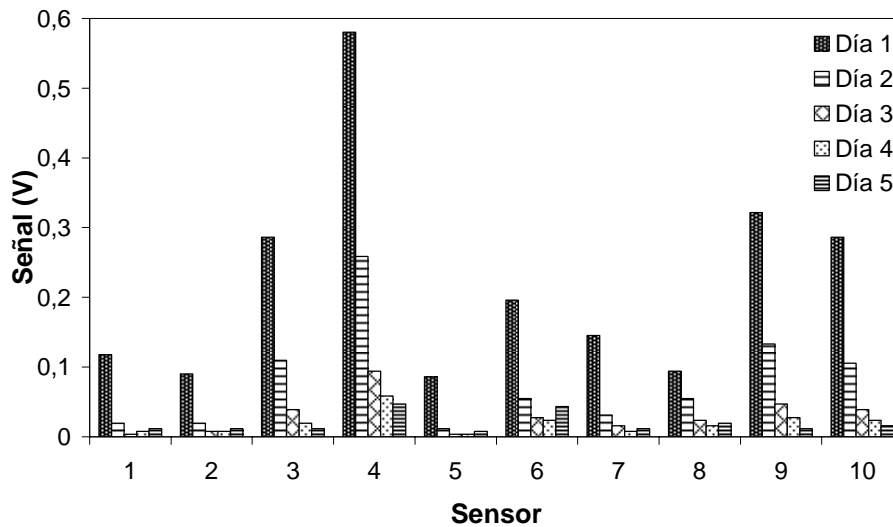
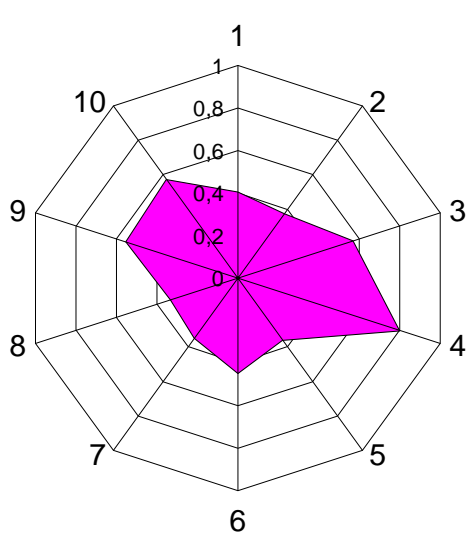


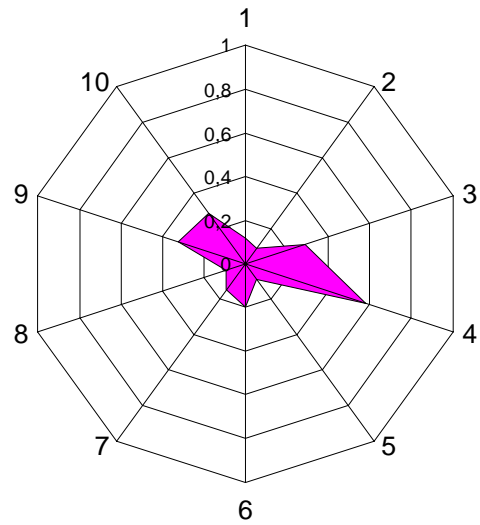
Figura IV.5: Señales del arreglo de sensores correspondiente a la muestra de tuti-fruti encapsulada en un gel de pectinas, obtenidas en diferentes días (D) luego del encapsulamiento. El grupo de 5 barras asociado a cada sensor representa las señales obtenidas para $0 \leq D \leq 4$.

Los valores de las señales disminuyen día tras día y por lo tanto, lleva más tiempo lograr la saturación de la cámara de la Nariz Electrónica, dado que el contenido de *flavour* en el gel disminuye progresivamente. El grupo de señales $\{S_1, \dots, S_{10}\}$ que se muestran en la Figura IV.5 constituyen un patrón o huella digital que es característico de una muestra particular en un dado día D .

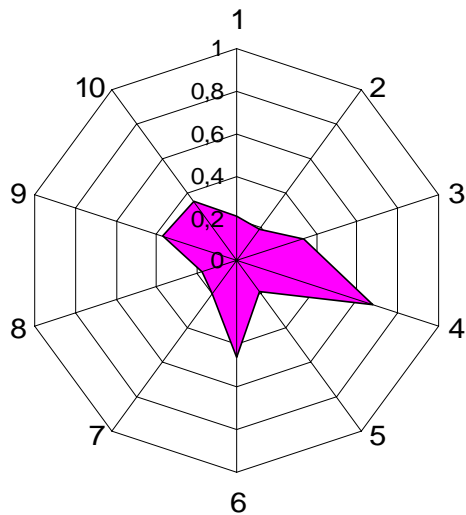
Como se indicó en el Capítulo II, la huella digital de la medición puede ser representada con un gráfico radar o con un gráfico de barras de las señales obtenidas. La Figura IV.6 muestra cuatro gráficos radares. El radar **(a)** corresponde a la esencia de tuti-fruti libre, el **(b)** corresponde al patrón del primer día de liberación del *flavour* encapsulado ($D = 0$), el **(c)** es la huella digital de la esencia de tuti-fruti disuelta en una solución de sacarosa 62 % p/p y el **(d)** corresponde a limoneno libre.



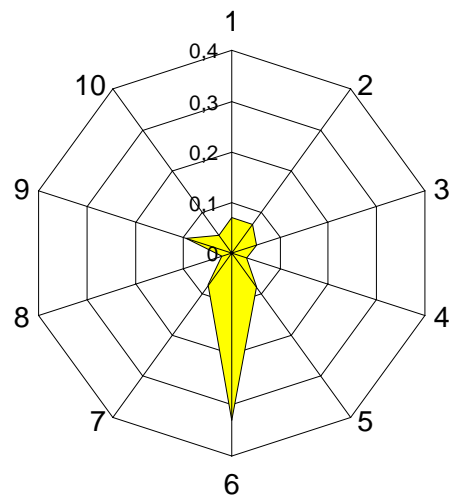
(a) Tuti-fruti libre



(b) Esencia encapsulada en gel de pectina en $D = 0$;



(c) Esencia en solución de sacarosa 62 % p/p



(d) Limoneno libre (otra escala)

Figura IV.6: Gráficos radares para diferentes muestras que contienen la misma cantidad de esencia. Cada vértice en los radares corresponde a la señal de un sensor.

Como se observa en las figuras, la intensidad y la forma de las huellas digitales son diferentes para la esencia libre, la esencia encapsulada y la esencia disuelta en una solución de sacarosa. Comparando los resultados obtenidos para la esencia libre con la encapsulada, se observa que la intensidad registrada es menor para esta última y que el patrón del aroma también ha sido modificado. Como se mencionó en **IV.2.3**, también se realizaron mediciones de limoneno libre y encapsulado dado que éste es uno de los principales componentes de la esencia. Estos experimentos no sólo constituyeron algunos de los controles para la deriva de los sensores sino que además contribuyeron a la interpretación de los datos. En particular, se observó que las huellas digitales del limoneno libre y encapsulado son idénticas en su forma y sólo difieren en la magnitud de la intensidad de sus señales, lo cual es coherente con el hecho de que se trate de un sistema simple de molécula única. Pero el resultado más interesante es que la huella digital del limoneno es completamente diferente de la huella de la esencia de tuti-fruti tanto libre como encapsulada, a pesar de que el limoneno sea el componente principal de la esencia. Esto indica que la contribución de los demás componentes no es despreciable en cuanto a su contribución en la forma de la huella digital.

Los resultados de la liberación a través de los diferentes días fueron coincidentes con la liberación preferencial de algunos compuestos por sobre otros, debido a diferentes factores como cambios en los coeficientes de partición y la diferente solubilidad de los mismos en el sistema. Esta conclusión es validada por la diferencia en el patrón observado para limoneno. De hecho, el punto asociado a la medición de limoneno libre en el Análisis de Componentes Principales (Figura IV.9) es claramente discriminado de los puntos asociados a las mediciones de la esencia de tuti-fruti tanto libre como encapsulada. La intensidad de la huella digital correspondiente a la esencia disuelta en la solución de sacarosa es prácticamente intermedia entre aquella correspondiente a la esencia libre y a la esencia encapsulada. Este resultado muestra el importante efecto del medio en la liberación¹¹ y refleja la presencia de interacción entre los compuestos del *flavour*, el agua y las moléculas de sacarosa. El efecto de la concentración de sacarosa en la liberación del *flavour* es un tema de interés en la actualidad. Hansson *et al.*

demonstraron que un incremento en la concentración de sacarosa aumenta la liberación de los compuestos más polares de un *flavour* debido al efecto de “salting-out” que ejerce la sacarosa y además indicaron que la liberación se vio modificada tras el agregado de pectina sin alcanzar condiciones de gelificación.¹²

Por otra parte, se observó que el porcentaje de *flavour* liberado desde el gel aumenta con la temperatura (Figura IV.7). Sin embargo, esto es probable debido al aumento de la presión de vapor de los componentes individuales de la esencia, por lo que el análisis de los efectos de la temperatura no es sencillo. Obviamente, las propiedades estructurales de los geles de pectina son altamente dependientes de la temperatura tal como se ha comprobado en estudios previos.⁸

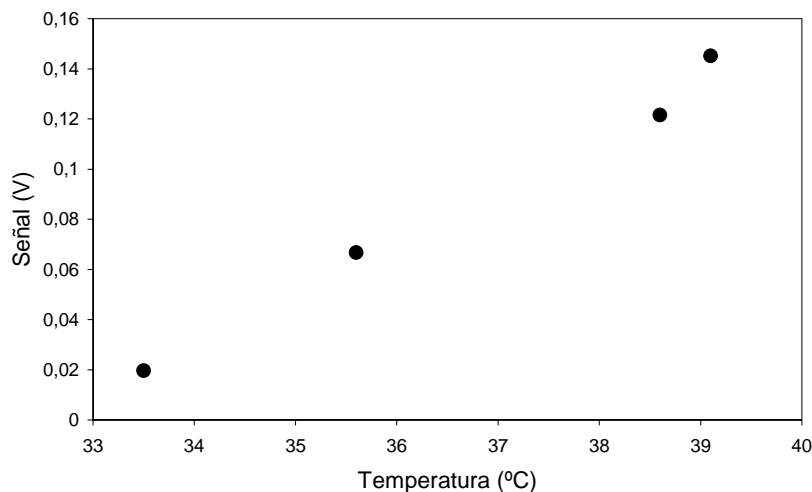


Figura IV.7: Señal asociada a la liberación de tuti-fruti encapsulado en un gel de pectinas en función de la temperatura para $D = 1$.

IV.3.3. Liberación del *flavour* en el tiempo

Como se ha discutido en páginas anteriores, existe una liberación rápida del *flavour* desde el gel, claramente indicada en la Figura IV.5. Esta situación también es ilustrada cuando se analiza el cambio de señal del sensor que provee la mayor señal, el sensor número 4 (Figura IV.8). Se observa allí una disminución muy rápida de las señales durante las

primeras 24 horas. Las señales disminuyen más del 50 % desde $D = 0$ hasta $D = 1$ para el sistema abierto.

Por otra parte, la Figura IV.8 muestra una clara diferencia de la cinética de liberación entre la esencia encapsulada en geles y la esencia disuelta en soluciones de sacarosa. Este resultado ilustra nuevamente la influencia del medio en la liberación del *flavour*.

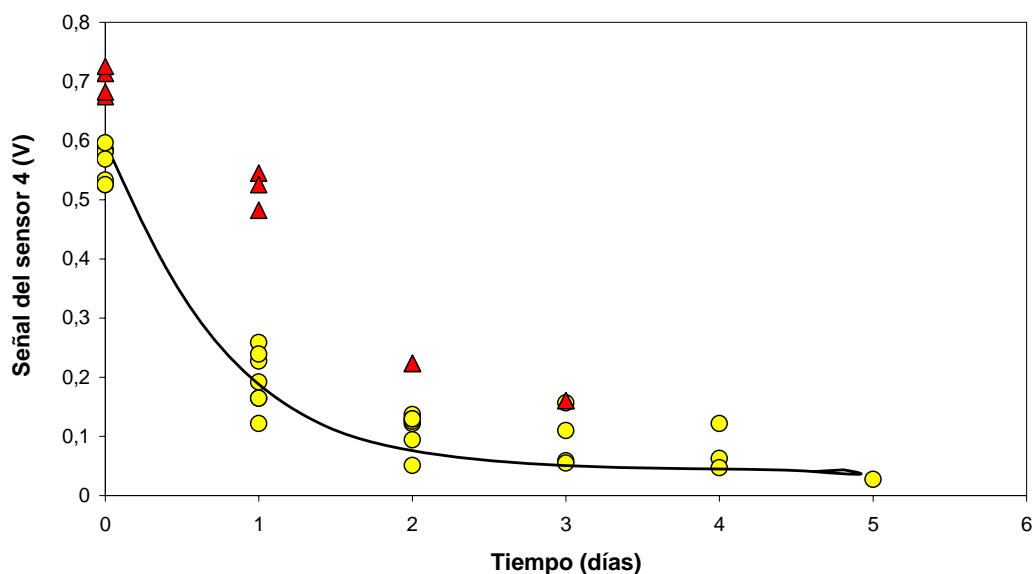


Figura IV.8: Señal (en volts) de un sensor particular en función de D . (●): esencia encapsulada y (▲): esencia disuelta en solución de sacarosa 62 % p/p. Se muestran los resultados de diferentes replicados.

IV.3.4. Análisis por PCA y Redes Neuronales

El conjunto de datos obtenidos para la esencia de tuti-fruti medidos con la Nariz Electrónica fueron primeramente analizados por PCA. Como resultado del Análisis de Componentes Principales, se logró una reducción efectiva de la dimensión del problema dado que las dos primeras componentes contuvieron el 96,6 % de la varianza total de los datos. El gráfico de PC_1 en función de PC_2 se muestra en la Figura IV.9, donde cada punto está asociado a una medición.

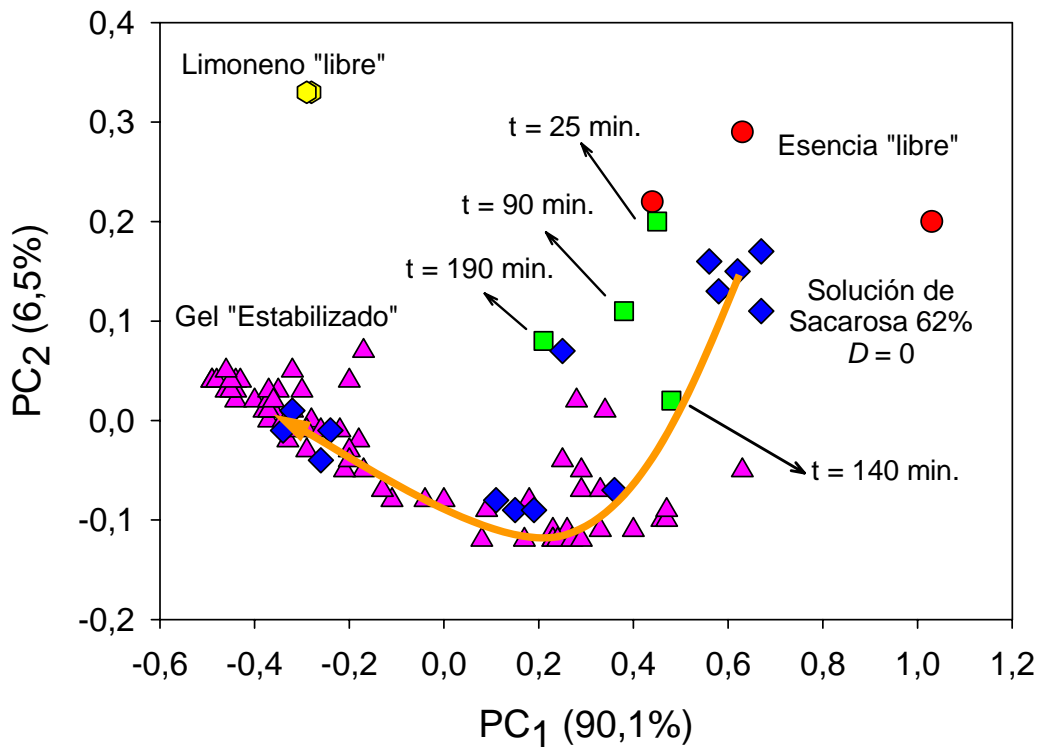


Figura IV.9: Análisis de PCA. (●): esencia libre; (◆): esencia en solución de sacarosa 62%; (■): esencia en gel, liberada durante $D = 0$ medidos en tiempos diferentes luego de ser incubados y que son estructuras no estabilizadas; (▲): esencia en gel liberada entre $0 \leq D \leq 5$; (●): limoneno libre.

Mediante una inspección visual del gráfico se pueden diferenciar distintas regiones en el plano PC_1 - PC_2 . En sentido decreciente de PC_1 , la primera región que se puede distinguir corresponde a la esencia libre. El grupo de puntos que se encuentra a continuación corresponde a la liberación del *flavour* desde soluciones de sacarosa y a continuación se ubican las mediciones asociadas a diferentes tiempos; 25, 90, 140 y 190 minutos a partir de la incubación a 33 °C, luego de la adición del *flavour* de tuti-fruti al sol que daría origen al gel de pectina. Los primeros puntos a 25 y 90 minutos corresponden a la esencia encapsulada en un gel no estabilizado, tal como se discutió en el *Análisis Reológico de los Sistemas*. Esta región está ubicada entre la zona correspondiente a la esencia liberada desde una solución de sacarosa en $D = 0$ y la correspondiente a la esencia encapsulada en geles con una estructura altamente estabilizada. Los puntos correspondientes a diferentes días de liberación

(D) desde geles “estabilizados” se encuentran ubicados en diferentes sub-áreas. La disminución de PC_1 desde 1,2 hasta -0,6 se halla correlacionada con la disminución de la concentración de la esencia en el sistema, comenzando por la esencia libre, continuando con la esencia disuelta en solución de sacarosa y finalizando con la liberación del tuti-fruti desde los geles. De la misma forma, la disminución de los valores de PC_2 es paralela a un aumento del efecto que ejerce la matriz, comenzando sin la presencia de la matriz, continuando con soluciones concentradas de sacarosa y finalmente terminando con geles que evolucionan desde una estructura poco estable o no estable hacia una estructura completamente estabilizada. El efecto de la matriz influye en el grado de retención de los componentes de la esencia. Por lo tanto, el análisis de PCA claramente muestra la influencia que posee el medio sobre el aroma detectado.

Un segundo análisis de componentes principales fue llevado a cabo utilizando únicamente los datos asociados a la liberación de la esencia de tuti-fruti, encapsulada en geles de pectina completamente estabilizados e incluyendo además las mediciones correspondientes a la esencia libre (Figura IV.10).

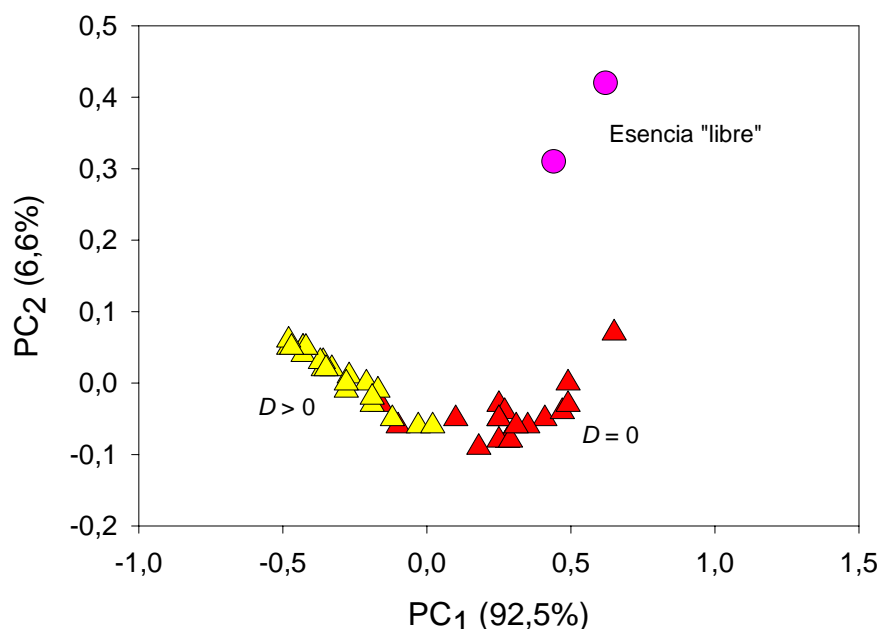


Figura IV.10: Análisis de PCA utilizando exclusivamente los resultados obtenidos en diferentes D . (●): esencia libre; (▲): esencia encapsulada en geles en $D = 0$; (▲): esencia encapsulada para $1 \leq D \leq 5$.

Claramente, los puntos correspondientes al primer día de liberación ($D = 0$) son discriminados de aquellos asociados a las mediciones hechas en los días siguientes así como también de las mediciones de la esencia libre. Los puntos del plano PC_1 - PC_2 asociados a mediciones realizadas en diferentes días se mueven monótonamente hacia valores menores de PC_1 en forma paralela a su envejecimiento del mismo modo en que se observa en la Figura IV.10. Nuevamente, la primera componente principal está asociada a la concentración del *flavour* en el sistema mientras que la segunda está relacionada con la presencia de la matriz como medio de encapsulamiento. Los resultados muestran que el análisis de componentes principales provee una buena descripción visual del comportamiento de liberación de muestras diferentes y por otra parte este análisis puede ser utilizado para estudiar la liberación de un *flavour* a lo largo del tiempo. Por otro lado, el “mapa” PCA muestra que luego de la introducción del *flavour* en la muestra, la liberación durante los primeros 100 minutos presenta diferentes características que aquella correspondiente a tiempos mayores. Este hecho refleja la evolución patrón asociado a la liberación del *flavour* a lo largo de la estabilización de las propiedades del gel (comparar Figura IV.9 con las Figuras IV.2 y IV.3).

También se llevó a cabo el análisis utilizando redes neuronales artificiales para verificar el poder de la Nariz Electrónica en la discriminación de muestras. Como se describió en **IV.2.4** las muestras fueron clasificadas en 3 categorías que consistieron en los *outputs* de la red neuronal. Una de ellas fue la esencia de tuti-fruti libre (1 0 0), otra categoría consistió en la liberación del *flavour* desde geles en $D = 0$ (0 1 0) y la tercera comprendió la liberación de *flavour* desde geles en $1 \leq D \leq 5$ (0 0 1). Estos tres grupos pueden ser distinguidos claramente en el análisis de PCA. De esta forma, los *outputs* de la red neuronal están relacionados con el efecto que tiene la presencia de un medio de encapsulamiento y con el efecto de la liberación del *flavour*. Un replicado del experimento mostrado en la Figura IV.10 fue utilizado como un conjunto de datos totalmente independiente. De esta forma, las muestras fueron desconocidas para la red neuronal construida, de manera de verificar su potencial en la clasificación de los datos en estas tres categorías. Por lo tanto, en primer lugar se realizó un análisis de PCA con

este conjunto de datos independientes correspondiente al experimento replicado y luego los valores de las componentes PC_1 y PC_2 fueron introducidos como *inputs* en la red neuronal para poder ser clasificados. Los resultados referidos a esta clasificación se muestran en la Tabla IV.1, la cual evidencia la eficiencia de la red en la correcta clasificación del 100 % de las muestras.

Tabla IV.1: Resultados obtenidos mediante el análisis por Redes Neuronales Artificiales. Los *outputs* fueron definidos como (1 0 0) para la esencia libre; (0 1 0) para la esencia liberada desde geles en $D = 0$; (0 0 1) para la esencia liberada en $1 \leq D \leq 5$.

Outputs Esperados			Resultados ANN		
1	0	0	1,00	0,01	-0,06
0	1	0	0,00	1,05	-0,05
0	1	0	0,00	1,05	-0,05
0	1	0	0,01	1,05	-0,05
0	1	0	-0,03	1,04	-0,03
0	1	0	-0,01	1,05	-0,05
0	0	1	0,00	0,07	0,92
0	0	1	0,00	0,06	0,93
0	0	1	0,00	0,06	0,93
0	0	1	0,00	0,06	0,94
0	0	1	0,00	0,06	0,94
0	0	1	0,00	0,05	0,94
0	0	1	0,00	0,06	0,94
0	0	1	0,00	0,05	0,94
0	0	1	0,00	0,05	0,94
1	0	0	0,91	0,17	-0,06

En este estudio se muestra la eficacia del método de Redes Neuronales para clasificar muestras analizadas con la Nariz Electrónica.

IV.4. Conclusiones y Resumen del Capítulo IV

En este capítulo se encapsularon en geles de pectinas de alto grado de metilación, sistemas multicomponentes de uso como saborizantes de alimentos y se estudió la liberación de los mismos en el tiempo. La liberación hacia la fase aérea se midió con éxito empleando un arreglo de sensores de gases (Nariz Electrónica). Paralelamente, se siguió la cinética de gelificación mediante reología dinámica en presencia y ausencia del saborizante. Se observó en los geles una transición desde una estructura no estable a una totalmente estable. Se estudió la liberación del *flavour* a lo largo de diferentes días luego del encapsulamiento, analizando la evolución temporal de las señales de los sensores individuales de la Nariz Electrónica así como también el cambio en las “huellas digitales” correspondientes a la mezcla de compuestos liberados. Se aplicaron métodos de análisis multivariado como Análisis de Componentes Principales (PCA) para correlacionar las propiedades reológicas de los geles obtenidos con la liberación de compuestos volátiles encapsulados en los mismos y se construyó una Red Neuronal para clasificar a las muestras según la concentración y composición de los compuestos liberados. Los estudios realizados muestran claramente el efecto de la matriz sobre la liberación.

La correlación entre las medidas realizadas con la Nariz Electrónica (analizadas por PCA) y las mediciones reológicas indican que la Nariz Electrónica es capaz de detectar los cambios en la liberación de un *flavour* en correlación con los cambios estructurales en el medio de encapsulamiento, en este caso la formación y estabilización de un gel.

Las huellas digitales de la esencia liberada desde un gel son claramente diferenciadas de aquellas correspondientes al *flavour* liberado desde soluciones de sacarosa en igual concentración.

La señal de cada sensor correspondiente a la liberación del tutifruiti decrece con el envejecimiento del material por la disminución de la actividad del *flavour* en el gel.

Estos resultados forman parte de un trabajo publicado (M.E. Monge *et al.*, *Sensors & Actuators*, 2004).

IV.5. Bibliografía

¹ M. O'Connell, G. Valdora, G. Peltzer, R. M. Negri, A practical approach for fish freshness determinations using a portable electronic nose, *Sens. Actuators B* 80 (2001) 149–154.

² A. Branca, P. Simonian, M. Ferrante, E. Novas, R. M. Negri, Electronic nose based discrimination of a perfumery compound in a fragrance, *Sens. Actuators B* 92 (2003) 222–227.

³ V. Diz, M. Cassanello, R.M. Negri. “Detection and discrimination of phenol and primary alcohols in water using electronic noses”. *Environmental Science & Technology* (2006) *en prensa*.

⁴ R. M. Negri and S. Reich, Identification of Pollutant Gases and its Concentrations with a Multisensor Array, *Sens. Actuators B* 75 (2001) 172-178.

⁵ S. B. Ross-Murphy, Incipient behavior of gelatin gels, *Rheol. Acta* 30 (1991) 401–411.

⁶ G. M. Kavanagh, S.B. Ross-Murphy, Rheological characterisation of polymer gels, *Prog. Polym. Sci.* 23 (1998) 533–562.

⁷ V. Evangeliou, R. K. Richardson, E. R. Morris, Co-gelation of high methoxy pectin with oxidised starch or potato maltodextrin, *Carbohydr. Polym.* 42 (2000) 233–243.

⁸ J. A. Lopes da Silva, M. P. Gonçalves, M. A. Rao, Kinetics and thermal behaviour of the structure formation process in HMP/sucrose gelation, *Int. J. Biol. Macromol.* 17 (1995) 25-32.

⁹ D. Bulone, V. Martorana, C. Xiao, P. L. San Biagio, Role of sucrose in pectin gelation: static and dynamic light scattering experiments, *Macromolecules* 35 (2002) 8147–8151.

¹⁰ N. Francois, A. M. Rojas, M. E. Daraio, D. L. Bernik, Dynamic Rheological measurements and drug release kinetics in swollen scleroglucan matrices, *J. Control. Rel.* 90 **(2003)** 355–362.

¹¹ D.D. Roberts, J.S. Elmore, K.R. Langley, J. Bakker, Effects of sucrose Guar Gum and carboxymethylcellulose on the release of volatile flavour compounds under dynamic conditions, *J. Agric. Food Chem.* 44 **(1996)** 1321–1326.

¹² A. Hansson, J. Andersson, A. Leufvén, The effect of sugars and pectin on flavour release from a soft drink-related model system, *Food Chem.* 72 **(2001)** 363–368.

Capítulo V

ENCAPSULAMIENTO DE ACEITES ESENCIALES EN GELES DE PECTINAS

V. Encapsulamiento de aceites esenciales en geles de pectinas.

V.1. Introducción

En este capítulo se aborda un aspecto diferente al del anterior, que es la discriminación de dos *flavours* distintos que tienen un componente en común. Para ello, se hicieron estudios con dos aceites esenciales provenientes de plantas argentinas (*Poleo* y *Tagetes Minuta*). Esto requirió el agregado de un vehiculizante por tratarse de compuestos oleosos, a diferencia del capítulo anterior donde se trabajó con un saborizante con base alcohólica.

Estudios previos demostraron que los aceites esenciales mencionados pueden ser utilizados como agentes de control para *Varroa jacobsoni*, un parásito presente en los panales de abejas.^{1,2,3,4} El ácaro *Varroa*, ilustrado en la Figura V.1, es considerado una de las mayores amenazas en la apicultura debido a la alta susceptibilidad de las abejas a este parásito.^{5,6,7} Una posible solución a este problema es el uso de aceites esenciales, los cuales son altamente tóxicos para los ácaros, bacterias y hongos, pero inocuos para las abejas. En esos casos el objetivo es lograr un adecuado sistema de liberación del aceite dentro de las colmenas de manera tal que la concentración de los compuestos volátiles se mantenga efectiva durante un período de tiempo.

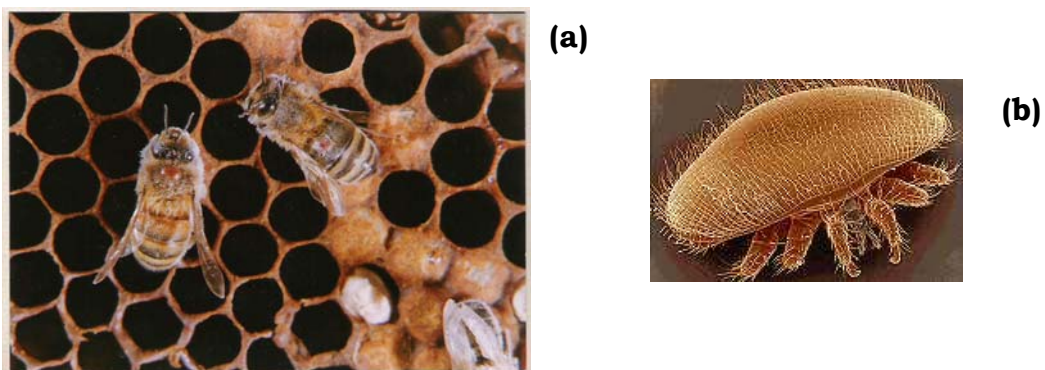


Figura V.1: (a) Fotografía de abejas en la colmena infectadas por ácaros. (b) Fotografía de un ácaro efectuada por microscopía electrónica. Fotos suministradas por el Dr. Martín Eguaras, Profesor de la Universidad Nacional de Mar del Plata.

Por lo tanto, en este capítulo se procuraron diversos objetivos: lograr el encapsulamiento de los dos aceites esenciales en la matriz biocompatible de pectinas, estudiar su liberación en el tiempo hacia la fase aérea mediante Nariz Electrónica y poder discriminar los vapores de ambos aceites encapsulados. En relación al objetivo de discriminación, se estudió el encapsulamiento-liberación del componente común de ambos aceites, el limoneno. Finalmente, se inició el estudio reológico de las nuevas matrices, las cuales difieren de las del capítulo anterior no solo por la presencia de los aceites sino en la del vehiculizante que fue necesario emplear para encapsularlos (Tween 80).

Secouard *et al.* reportaron un análisis acerca de la liberación de limoneno y las propiedades macroscópicas de soluciones de diferentes polisacáridos utilizando la técnica de *solid phase micro extraction* combinada con cromatografía gaseosa.⁸ Sin embargo, como ya se ha visto, una manera diferente de analizar *flavours* evitando efectuar un reconocimiento molecular de la muestra, es mediante el uso de Narices Electrónicas.

En primer lugar, se aborda el análisis de la liberación de los aceites esenciales encapsulados en geles de pectinas en sistemas abiertos a lo largo del tiempo, el cual fue efectuado con la Nariz 1. Las mediciones se efectuaron en condiciones de temperatura y humedad controlada para simular las condiciones de una colmena debido a la potencial aplicación de estos aceites como acaricidas.

A continuación, se estudia la liberación de los aceites esenciales encapsulados en sistemas cerrados, utilizando en este caso la Nariz 2 y se analizan las propiedades reológicas del sistema para determinar el efecto del limoneno encapsulado dado que, como se vio en el capítulo anterior, la presencia de un soluto distorsiona significativamente el empaquetamiento del gel.⁹

Para generar las matrices biocompatibles de encapsulamiento, se utilizaron las mismas pectinas de alto grado de metilación. Con el fin de encapsular aceites esenciales, se debió ampliar el protocolo de preparación de geles de pectinas para poder encapsular estos compuestos de naturaleza oleosa. Esto requiere el agregado de aditivos emulsificantes como el tensioactivo no iónico Tween 80 (utilizado en este trabajo), dada la solubilidad límite de la fase oleosa en el gel hidrofílico.

Para ver la eficiencia de la acción del surfactante en la solubilización de las esencias, se ha variado sistemáticamente la proporción de esencia / surfactante y se verificó la coalescencia de la fase oleosa mediante estudios de microscopía. Simultáneamente, se midió en réplicas la liberación de la esencia hacia fase aérea mediante la metodología de Nariz Electrónica y se evaluó su discriminación mediante métodos de análisis multivariado como Análisis de Componentes Principales y Redes Neuronales Artificiales. Para cada composición del gel total (incluyendo la esencia) se analizaron los cambios en las huellas digitales de los *flavours* liberados, en función de los días de liberación.

V.2. Materiales y Métodos

V.2.1. Análisis de los aceites por cromatografía gaseosa (CG)

Los aceites esenciales fueron analizados por cromatografía gaseosa con detección de ionización de llama (GC-FID) y por cromatografía gaseosa combinada con detección por espectrometría de masas (GC-MS) de manera tal de cuantificar e identificar sus principales componentes. El análisis por GC-FID fue llevado a cabo con una columna capilar de sílica entrecruzada con 5 % fenilmetilpolisiloxano marca Zebtron modelo ZB-5. Sus especificaciones fueron 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,50 μm de film. Se utilizó N_2 como gas *carrier*. Para el análisis de GC-MS se utilizó un equipo Shimadzu GC-17A con detección de masas en el rango de 40-450 m/z utilizando una columna capilar cuya composición fue de 5% fenil-metilpolisiloxano marca Hewlett Packard modelo Ultra 2. Sus especificaciones fueron 50 m de longitud, 0,20 mm de diámetro interno y 0,11 μm de film. Se utilizó He como gas *carrier* (la presión en la columna fue de 80 kPa, el flujo en la columna fue de 1,3 mL/min y el rango de split de 7). La temperatura del inyector fue 220 °C y la temperatura de la interfase fue de 250 °C. El programa de temperaturas para el aceite *Tagetes minuta* consistió en iniciar el calentamiento a 60 °C durante 5 minutos, realizar una primer rampa de 3 °C/min hasta llegar a 160 °C y luego realizar otra rampa de 30 °C/min hasta llegar a una temperatura final de 250 °C. El programa de temperaturas de la columna para el aceite de *Poleo* consistió en calentar

a 90 °C durante 4 minutos, luego realizar una rampa de temperaturas de 5 °C/min hasta alcanzar 136 °C, luego realizar una segunda rampa de 10 °C/min hasta llegar a 150 °C y finalmente una tercer rampa de 30°C/min hasta alcanzar la temperatura final de 250 °C.

V.2.2. Preparación de los geles

En primer lugar la pectina en polvo fue mezclada en seco con un 10% p/p del total de sacarosa. Esta mezcla se disolvió en una solución buffer de citrato de potasio 12 mM y se calentó con agitación hasta 80 °C durante 10 minutos. En ese momento, se agregó el resto de la sacarosa hasta obtener una concentración final de 64,8 % p/p. La solución fue agitada durante otros 10 minutos a 80 °C y luego el sistema continuó bajo agitación a temperatura ambiente hasta que la solución alcanzara una temperatura de 40 °C. En ese momento se agregaron 200 µL de Tween 80 a 4 mL de esta solución y también se introdujeron diferentes volúmenes de agua, limoneno o uno de los aceites esenciales de acuerdo al caso, de manera tal de que la suma entre el volumen de *flavour* y de agua fuese siempre igual a 200 µL. Finalmente, se agregaron 25 µL de ácido cítrico 50 % a cada recipiente conteniendo esta mezcla. La misma fue agitada durante 6 segundos con un vortex y luego la incubación a temperatura controlada dependió del tipo de experimento. Para el análisis de la liberación del aceite en un sistema abierto, cada recipiente consistió en una placa de petri de 10 cm de diámetro, las cuales fueron incubadas en una estufa a 33 °C y humedad relativa de 75 %, para simular las condiciones naturales del interior de las colmenas.

En el caso de los experimentos en sistemas cerrados, los recipientes consistieron en frascos de 10 mL cerrados con viales e incubados a 33 °C en un baño termostático de agua. Se realizaron 3 replicados de la misma masa con la misma concentración de aceite esencial o de limoneno, según el caso, para cada protocolo. El agregado de Tween 80 fue necesario para lograr el encapsulamiento de los aceites y del limoneno sin separación de fases debido a la naturaleza no polar de los mismos. La concentración de pectina en los geles fue de 0,4 % p/p. El índice de refracción fue medido en cada experimento para chequear el

contenido de sacarosa, esperado en 64,8 °Brix. Para ello, se utilizó un refractómetro portátil marca Arcano Modelo Ref 107 0-90 % Brix.

V.2.3. Mediciones Reológicas

En los experimentos que se detallarán a continuación, se utilizó la geometría de cono y plato (ángulo $< 1^\circ$, radio: 20 mm y *gap*: 26 μm). Las mediciones fueron realizadas a la frecuencia de 0,5 Hz y una deformación de 4×10^{-3} , al igual que en los experimentos del capítulo anterior. La solución caliente fue cargada en el reómetro, que había sido previamente termostatzado a 33 °C. La temperatura fue controlada con un sistema Peltier. La interfase fue cubierta con un aceite siliconado para evitar pérdidas de masa por evaporación del solvente. Los módulos elástico (G') y viscoso (G'') fueron monitoreados en función del tiempo durante un período de 2 horas.

V.2.4. Nariz Electrónica 1 (cámara estanca)

Antes de efectuar cada medición se esperó que se alcanzara un estado de equilibrio dentro de la cámara de la Nariz Electrónica. Cada medición se basó en el registro de las señales de los sensores durante 20 minutos. En este tiempo, identificado en el capítulo anterior como τ , las señales de los sensores alcanzaron una situación de estado estacionario con la forma gráfica de un *plateau*. La línea de base en todos los casos se determinó midiendo la respuesta de los sensores a una solución saturada de NaCl colocada en una placa de petri de 10 cm de diámetro en el interior de la cámara de la nariz, dado que las muestras estaban incubadas en estas condiciones de humedad relativa. La temperatura fue medida en el interior de la nariz mediante un sensor y la misma fluctuó entre 29 y 34 °C a lo largo de las distintas mediciones. Los valores de las señales de los sensores luego de 20 minutos fueron utilizados en el análisis de las muestras previo a la substracción de la línea de base. Las mediciones fueron efectuadas durante 31 días y en este lapso de tiempo no se observaron cambios en la deriva (*drift*) de los sensores.

V.2.5. Nariz Electrónica 2 (aspiración de *headspace*)

Antes de efectuar cada medición se esperó que se alcanzara un estado de equilibrio dentro del espacio cabeza de los viales incubados a 33 °C. El vapor presente en el espacio cabeza de la muestra fue extraído mediante una aguja en el extremo de una manguera conectada a la bomba de aspiración. La aguja fue utilizada para perforar el *septum* de goma que cerraba el recipiente conteniendo la muestra y así permitía la aspiración del vapor presente en el espacio cabeza. Cada medición se basó en el registro de las señales de los sensores durante 5 minutos. En este tiempo τ , las señales de los sensores alcanzaron una situación de estado estacionario con la forma gráfica de un *plateau*. Los valores de las señales de los sensores luego de 5 minutos fueron utilizados en el análisis de las muestras previo a la substracción de la línea de base.

V.2.6. Microscopía Óptica

Se utilizó un microscopio óptico marca Leitz DMRX con magnificación de 100 x. Los geles se prepararon siguiendo el mismo protocolo descrito en **V.2.2** de manera tal de observar las superficies de los geles en presencia de un *flavour* y un tensioactivo y así comparar los resultados obtenidos con las diferentes técnicas utilizadas en el trabajo.

V.2.7. Liberación del *flavour* en sistemas cerrados

Como se describió previamente, los recipientes cerrados conteniendo los geles con los aceites y el limoneno encapsulados fueron incubados a 33 °C en un baño termostático de agua. Las muestras fueron analizadas con la Nariz Electrónica dos horas luego del encapsulamiento (como ya fue indicado). Este tiempo fue necesario para asegurar la formación del gel y su estabilización. Además, se realizaron varios controles. En primer lugar, se realizaron mediciones del espacio cabeza de geles de pectina en ausencia de un *flavour* para descartar la posibilidad de tener una señal de fondo debida a los componentes de la matriz. Dado que las señales de los sensores fueron significativamente inferiores a las señales obtenidas para los geles con *flavour*, se concluyó

que la contribución del gel al “aroma” no interfiere en la detección de limoneno o de los aceites esenciales. Las mediciones de los controles y de los replicados fueron realizadas en días diferentes y no se observaron diferencias entre las mismas, demostrando que la deriva de los sensores a lo largo del tiempo de trabajo es despreciable en las situaciones que se describen. Se referirá al limoneno y/o a los aceites no encapsulados que fueron colocados en recipientes cerrados a 33 °C y en equilibrio con sus respectivas presiones de vapor, como “*flavours* libres”. Las mediciones de *flavours* libres también se realizaron a 33 °C para poder comparar su respuesta con las respuestas obtenidas para los mismos encapsulados en geles.

V.2.8. Experimento de campo

El trabajo de campo lo realicé personalmente en el INTA de Balcarce en colaboración con la Dra. Delia Bernik (INQUIMAE) y el Dr. Martín Eguaras, (Departamento de Biología en la Universidad Nacional de Mar del Plata).

El aceite esencial *Tagetes minuta* se incorporó en dos dosis diferentes (dosis A: 4,5 % v/v y dosis B: 11,5 % v/v) en geles de pectina. Los geles fueron preparados en placas de Petri de 10 cm de diámetro. Cada placa conteniendo una dada dosis de aceite fue colocada dentro de una segunda placa de Petri de mayor diámetro (15 cm) junto a 5 abejas, 5 ácaros y un reservorio de azúcar impalpable, que funcionó como alimento para abeja. Cada placa de 15 cm fue sellada con goma espuma y colocada en una estufa a 33 °C y 75 % HR durante 24 hs. También se efectuó un blanco que consistió en un gel de pectinas sin aceite esencial. Los experimentos se realizaron por quintuplicado (i, ii, iii, iv, v). Luego de 24 hs de incubación en estas condiciones, se efectuó el recuento de abejas y ácaros vivos en cada placa.

V.2.9. Análisis de Datos

V.2.9.1. Análisis de Componentes Principales

Se realizó el análisis de componentes principales con los grupos de datos correspondientes a la liberación de limoneno, de *Poleo* y de *Tagetes Minuta* desde geles de pectina. Como resultado del PCA, el 98 % de la varianza total de los datos fue acumulada en las primeras dos componentes principales $\{PC_1, PC_2\}$.

V.2.9.2. Redes Neuronales Artificiales

Se realizó un análisis con redes neuronales artificiales para clasificar las muestras en diferentes grupos. Para ello se utilizó una red neuronal *back propagation*, compuesta por una única capa oculta. Se utilizaron 3 neuronas en la capa oculta en la etapa de entrenamiento y el número de épocas se optimizó en 1000. Se utilizaron 18 de las 27 mediciones (67 %) para el entrenamiento de la red; 5 mediciones (18 %) se utilizaron como datos para validación cruzada y otras 4 mediciones (15 %) fueron utilizadas como datos para verificar la red. Los *outputs* fueron definidos como (0 1) para los datos asociados a la liberación de limoneno desde los geles y como (1 0) para la liberación del *Tagetes minuta* encapsulado en los geles. Como vectores *input* se utilizaron las dos primeras componentes principales PC_1 y PC_2 . Otras características fueron: *momentum rate*: 0,7 y *step size*: 0,1.

V.3. Resultados y Discusión

V.3.1. Análisis de los aceites esenciales por CG

En primer lugar, se muestran los resultados obtenidos al efectuar el análisis por cromatografía gaseosa GC-FID y GC-MS para separar, cuantificar e identificar los componentes principales de los aceites esenciales *Tagetes minuta* y *Poleo*, los cuales son sistemas multi-

componentes. En las tablas V.1 y V.2 se indica la concentración relativa obtenida para los compuestos que se hallan en mayor proporción en los aceites.

Tabla V.1: Composición de *Tagetes minuta*.*

Compuesto	Concentración Relativa (%)
D-Limonene	7,0
[E]-Ocimene + [Z]-Ocimene	68,5
2,6-dimethyl-[E, Z]-2,4,6-Octatriene	1,2
2-Isobutyl-norbornane	2,2
2-Pinen-4-one	5,2
2-Ethylidene-6-methyl-3,5-heptadienal	5,8

Tabla V.3: Composición del aceite de *Poleo*.*

Compuesto	Concentración Relativa (%)
D-Limonene	42,4
Eucalyptol (1,8-Cineole)	4,4
Cinerolone	3,7
Caryophyllene oxide	1,5
Piperitenone oxide	39,2

*Los nombres se indican en inglés, tal como se encontraron en la biblioteca de espectros del cromatógrafo.

A partir de los datos, se puede observar que el contenido de limoneno es muy diferente en cada uno, siendo 7 % para *Tagetes minuta* y 42 % para el aceite de *Poleo*. Estas diferencias serán consideradas al analizar los resultados obtenidos mediante el uso de la Nariz Electrónica (Nariz 2).

V.3.2. Microscopía Óptica

El limoneno fue encapsulado en geles de pectina utilizando el emulsificante Tween 80. Los geles obtenidos fueron observados mediante

microscopía óptica. Esta técnica proveyó información directa acerca de la estructura de los geles. Se observó que los sistemas presentan la característica de ser emulsiones de aceite en agua y las mismas están “congeladas” en un medio gelificado. Además, se observó una distribución de tamaño de gotas que depende de la concentración del *flavour* encapsulado. Los diámetros de las gotas grandes presentaron valores entre 50 y 300 μm . La Figura V.2 muestra gotas grandes de alrededor de 200 μm de diámetro, que contienen gotas pequeñas con diámetros cercanos a 6 μm . Las gotas pequeñas están compuestas de limoneno. La naturaleza no polar de estas gotas fue comprobada mediante dos tinciones diferentes; una con ditizona y otra con rodamina C-18. Ambos colorantes son insolubles en agua. Nuestra hipótesis es que las gotas de limoneno son estabilizadas por el tensioactivo no iónico Tween 80 y así pueden estar inmersas en el medio acuoso de los geles.

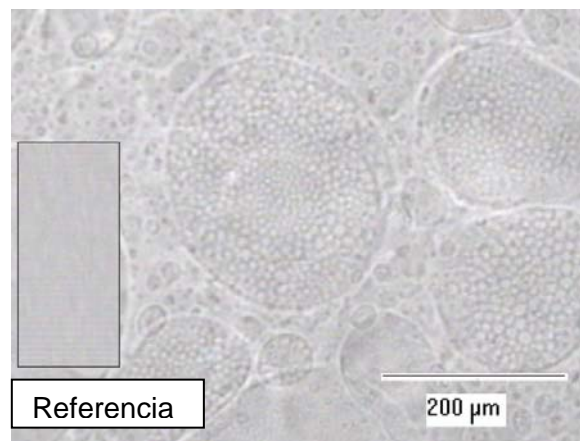


Figura V.2: Microscopía óptica de un gel de pectinas conteniendo 200 μL de Tween 80 y 10 μL de limoneno. El gel de referencia que se muestra en el recuadro no contiene limoneno.

V.3.3. Análisis reológicos

En conexión con diversas preguntas relacionadas con la estructura de estos medios, se efectuaron también mediciones de reología dinámica. Mediante este análisis se desea responder si es posible considerar a estos sistemas estrictamente como geles, si se puede determinar el efecto de incluir Tween 80 en el sistema y cómo se perturba el comportamiento reológico del sistema por el agregado de un *flavour*.

En la Figuras V.3 se muestran valores de G' y G'' a lo largo del tiempo para el sistema completo conteniendo Tween 80 y limoneno, para el sistema con Tween 80 pero sin limoneno y para el sistema sin Tween 80 ni limoneno.

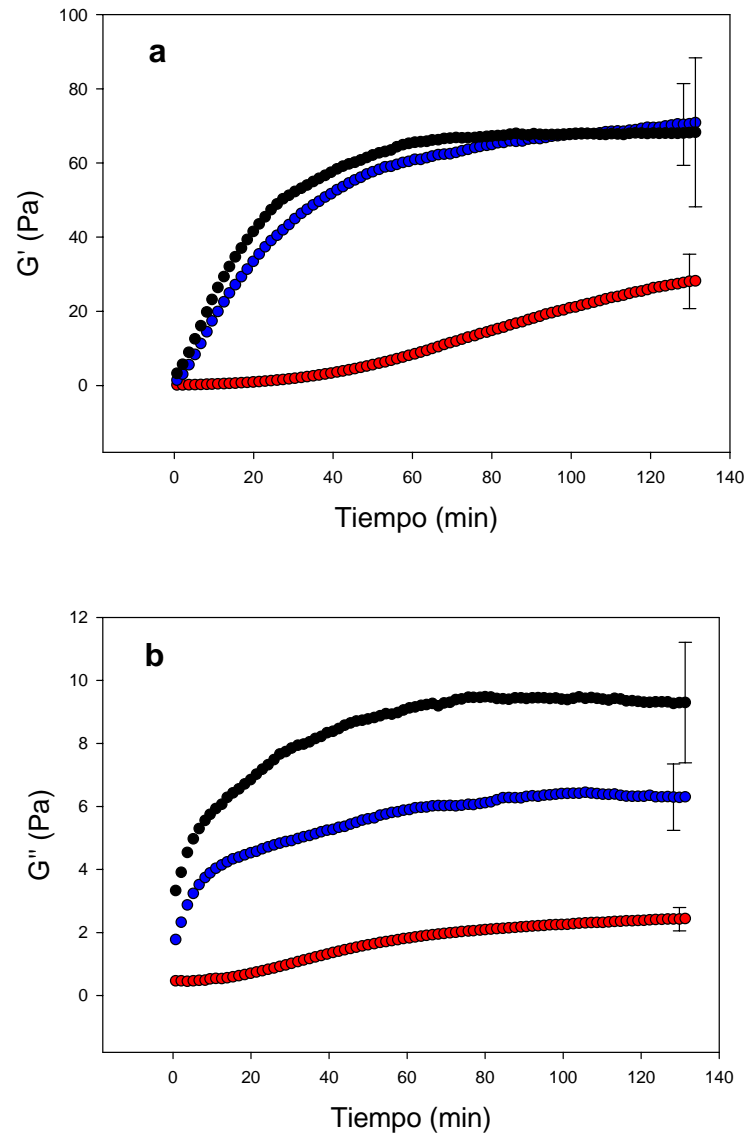


Figura V.3: Valores promedio de G' (a) y G'' (b) para los tres sistemas entre 0 y 130 minutos en escala lineal. Las barras de error se muestran en las figuras. (●): gel de pectina en ausencia de Tween 80 y limoneno; (●): gel de pectina con Tween 80 pero sin limoneno; (●): gel de pectina con Tween 80 y 200 μ L de limoneno.

La Figura V.4, por su parte, muestra las cinéticas de gelificación para cada uno de estos sistemas.

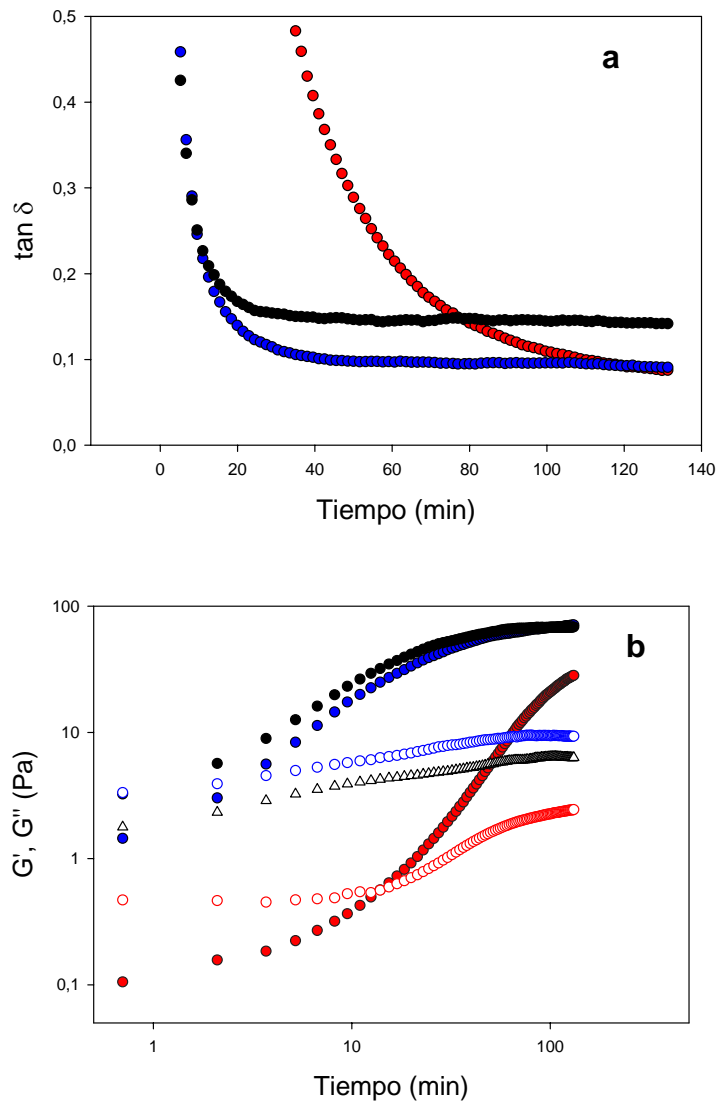


Figura V.4: (a) Promedio de los valores de $\tan \delta$ para los tres sistemas entre 0 y 130 minutos. (●): Gel de pectina en ausencia de Tween 80 y limoneno; (●): gel de pectina con Tween 80 pero sin limoneno; (●): gel de pectina con Tween 80 y 200 μL de limoneno. (b) Valores de G' y G'' para los 3 sistemas entre 0 y 130 minutos en escala logarítmica. (●, ○): G' y G'' para el gel de pectina en ausencia de Tween 80 y flavour (●, ○): G' y G'' para el gel de pectina con Tween 80 pero sin limoneno; (●, ○): G' y G'' para el gel de pectina con Tween 80 y 200 μL de limoneno.

En los tres sistemas la componente elástica (G') es mayor que la componente viscosa (G'') cuando se alcanza un *plateau* en la cinética de gelificación, con lo cual se deduce que las matrices se comportan como geles en todos los casos.

La Figura V.3 muestra que el Tween 80 contribuye al incremento de la componente elástica (V.3a) y de la viscosa (V.3b) en geles de pectinas. Inclusive los valores promedio de G' y de G'' para los sistemas que contienen Tween 80 son significativamente mayores que los obtenidos en ausencia del detergente. Además, el gel con el tensioactivo evoluciona muy rápidamente entre 0 y 50 minutos, indicando que éste incrementa la velocidad de desarrollo de la estructura¹⁰ de un gel de pectinas. Luego de 50 minutos, la evolución se desacelera hasta alcanzar un *plateau* (ver Figura V.4b).

A diferencia del agregado de la esencia de tuti-fruti descrita en el capítulo anterior, la adición de limoneno parecería no afectar al valor de la componente elástica ni a la cinética de desarrollo de la estructura del gel. Probablemente este resultado esté relacionado con la diferencia de polaridad de los *flavours* encapsulados. No obstante, la inclusión de limoneno en el sistema produce un cambio significativo en el valor de G'' (Figura V.3b). Este efecto también se refleja en el gráfico de $\tan(\delta)$ en función del tiempo ($\tan(\delta) = G''/G'$) que se muestra en la Figura V.4a. El sistema con Tween 80 y limoneno presenta un valor de $\tan(\delta)$ mayor que el sistema que no contiene limoneno.

El gran tamaño de las barras de error en la Figura V.3 para el sistema con *flavour* podría deberse a la muy alta heterogeneidad del mismo a causa del protocolo empleado en la preparación de la muestra en Italia, el cual no incluía el uso del *vortex*. Las mediciones de reología fueron llevadas a cabo por un miembro del grupo de investigación de la Dra. Donatella Bulone en Italia, quien preparó las muestras con mi asesoramiento vía e-mail. En cambio, las muestras que se analizan en el capítulo siguiente fueron preparadas y medidas durante mi estadía en Italia. En el Capítulo VI, se observará cómo la forma de preparar los soles que dan lugar a los geles puede influir notablemente en los resultados obtenidos.

Sintetizando los resultados descriptos hasta el momento, se puede decir que los experimentos de microscopía óptica indican que los

sistemas obtenidos se asemejan a una emulsión de aceite en agua estabilizada por el gel de pectinas. Los resultados obtenidos por reología dinámica indican que las propiedades estructurales de estos sistemas se ven afectadas por la presencia del compuesto volátil no polar y por el detergente.

V.3.4. Análisis por Narices Electrónicas

Análisis en sistemas abiertos utilizando la Nariz 1 (cámara estanca)

En primer lugar, se exploró la capacidad de la Nariz Electrónica para discriminar entre tres aceites esenciales diferentes. Por lo tanto, se obtuvieron las huellas digitales de cada uno y se analizaron en forma conjunta. Como puede observarse en la Figura V.5, los patrones de cada uno de los aceites se diferencian entre sí a pesar de presentar similitudes. De la misma forma, en la Figura V.6 se comparan la huella del aceite esencial de alcanfor con aquellas correspondientes a sus componentes individuales. Un sistema multicomponente posee un patrón propio que es inherente a su composición, pero no responde únicamente a la proporción en que los mismos se hallan presentes sino que también influye la volatilidad relativa de cada componente en la mezcla.

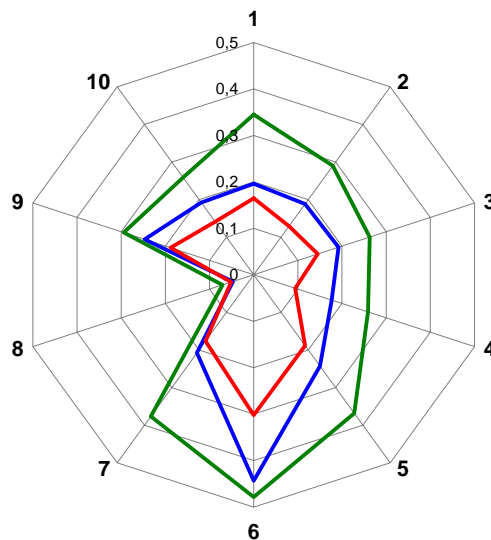


Figura V.5: Huellas digitales correspondientes al aceite esencial de Alcanfor (—), aceite de Poleo (—) y para el aceite *Tagetes minuta* (—).

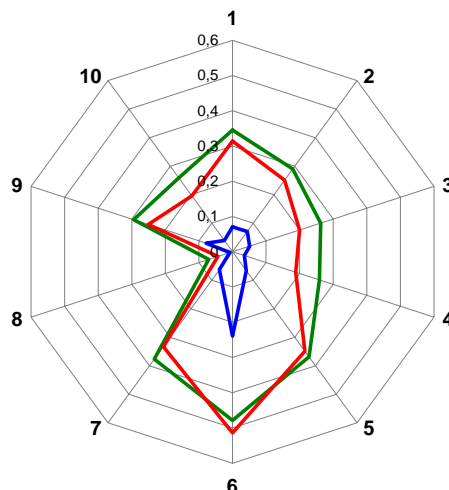


Figura V.6: Huellas digitales correspondientes al aceite esencial de *Alcanfor* (—), alcanfor puro (—) y borneol puro (—).

Una vez comprobada la capacidad de la Nariz Electrónica para diferenciar entre los aceites, se eligió el aceite de *Tagetes minuta* para efectuar el estudio de su encapsulamiento en geles de pectina y posterior liberación a lo largo del tiempo, ya que se tenían resultados previos positivos respecto de su efectividad como acaricida al ser colocado en colmenas en cápsulas de cera. Dado que este aceite no es hidrosoluble, fue necesario elegir un emulsificante para poder incorporarlo en los geles de pectina. El tensioactivo no iónico Tween 80 resultó ser efectivo para lograr su encapsulamiento. Luego de efectuar ensayos con diferentes proporciones, se determinó que la relación 1:1 entre el aceite y el detergente es la óptima.

En primer lugar, se midió la liberación del aceite *Tagetes minuta* incorporado en cápsulas de cera, las cuales se utilizan, entre otros métodos, para liberar los aceites esenciales en las colmenas. Estas huellas digitales se compararon con las huellas de la fase vapor de una solución Tween 80: *Tagetes minuta* 1:1 y también con la fase vapor del aceite puro para determinar el efecto de la inclusión del tensioactivo en el sistema. La forma de las huellas obtenidas con la Nariz Electrónica (Figura V.7) de la liberación desde las cápsulas de cera y desde la solución tensioactivo-aceite son muy similares. Esto indicaría que sería apropiada la incorporación de esta solución en los geles dado que la adición de Tween 80 no produce modificaciones apreciables en el aroma.

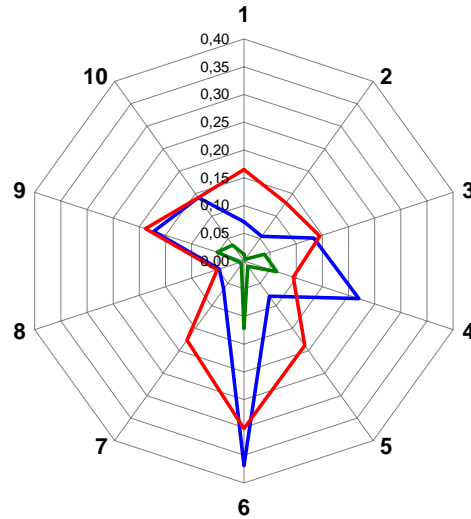


Figura V.7: Huellas digitales correspondientes al aceite *Tagetes minuta* (—), a una solución Tween 80 : *Tagetes minuta* 1:1 (—) y a las cápsulas de cera (—)

En segundo lugar, previamente al análisis de campo, se efectuaron en el laboratorio las mediciones del aceite liberado a lo largo del tiempo. En la Figura V.8 se muestra el resultado de la liberación del aceite luego de transcurrir un día a 33 °C y 75 % HR. Si se compara con la figura anterior, se observa un incremento en la intensidad de la señal de la huella correspondiente al primer día de liberación en comparación con el patrón obtenido por la liberación desde la cápsula de cera.

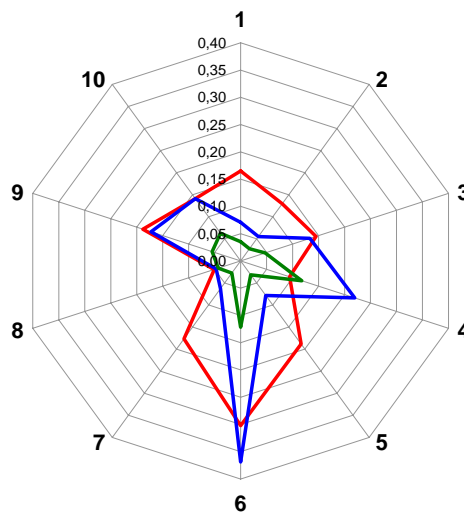


Figura V.8: Huellas digitales del aceite *Tagetes minuta* (—), de la solución de aceite : Tween 80 1:1 (—) y de la liberación del aceite encapsulado luego de un día en un gel de pectinas (—).

La liberación del aceite fue detectada durante 31 días consecutivos, mostrando un patrón similar al del primer día. Este período es considerablemente largo teniendo en cuenta que la reposición de los geles comerciales, para uso como acaricidas, que contienen ácido fórmico se efectúa cada 15 días. En la Figura V.9 se ilustra la detección de la liberación del aceite esencial encapsulado a través de sus huellas digitales en distintos días de medición y en la Figura V.10 se muestra la fluctuación de las señales de los sensores a lo largo del tiempo. En estas figuras se observa la fluctuación de la intensidad de las señales de los sensores en el tiempo y el cambio en la forma de los patrones probablemente debido a la liberación preferencial de ciertos componentes del aceite sobre otros y a los cambios de sus concentraciones en la fase gel con el tiempo.

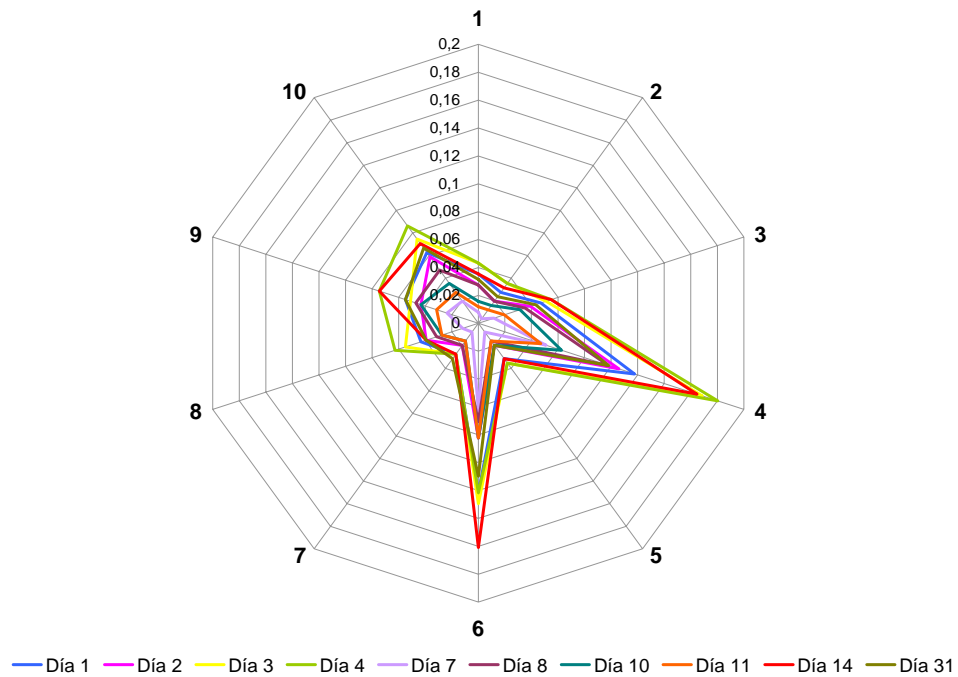


Figura V.9: Huellas digitales de *Tagetes minuta* liberado en el tiempo.

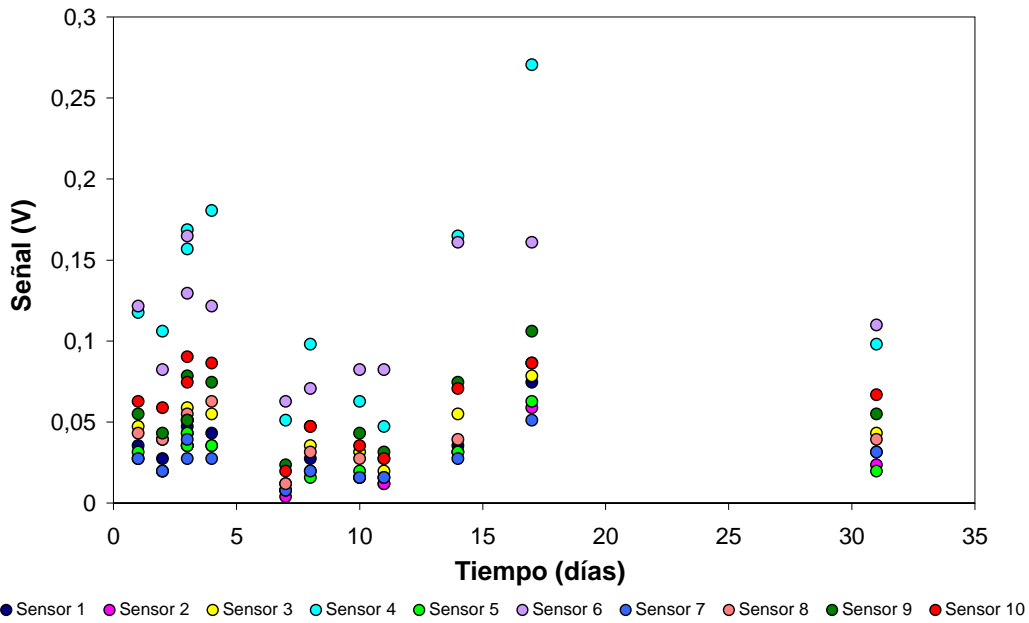


Figura V.10: Señales de los sensores asociadas a la liberación de *Tagetes minuta* en el tiempo.

En la Figura V.11 se ilustra la repetitividad de las mediciones utilizando esta Nariz Electrónica y en la Figura V.12 se comparan las huellas digitales del primer día de liberación del aceite en sus diferentes dosis.

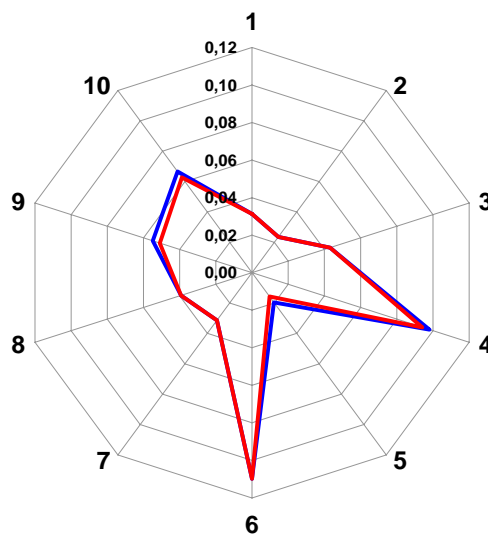


Figura V.11: Aquí se comparan dos duplicados (dosis A) que fueron almacenados durante 31 días a temperatura y humedad controladas.

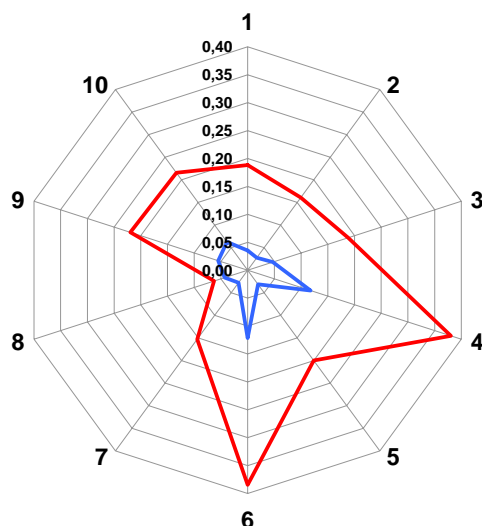


Figura V.12: Comparación entre la liberación del primer día de *Tagetes Minuta* en las dosis A (—) y B (—).

Ensayo de campo

Finalmente, se muestran a continuación los resultados del ensayo de campo de la incubación de dos dosis diferentes de *Tagetes minuta* con abejas y ácaros, realizados en la estación INTA Balcarce.

Tabla V.3: Resultado de la incubación durante 24 hs.

Ensayo		Blanco					Dosis A					Dosis B				
		i	ii	iii	iv	v	i	ii	iii	iv	v	i	ii	iii	iv	v
Abejas	# ^a	1	0	0	0	1	4	1	3	2	2	5	5	5	5	5
	% ^a	20	0	0	0	20	80	20	60	40	40	100	100	100	100	100
Ácaros	#	4	0	0	1	0	5	2	2	3	2	5	5	5	5	5
	%	80	0	0	20	0	100	40	40	60	40	100	100	100	100	100

^a Número o porcentaje de especies muertas.

Los resultados preliminares de la Tabla V.3 indican que la dosis B posee una concentración excesivamente elevada como para efectuar el tratamiento, al menos en las condiciones del experimento. Sin embargo, esta dosis tal vez podría ser efectiva en la colmena por tratarse de un espacio mucho mayor que una placa de 15 cm de diámetro. En cuanto a

la dosis A, probablemente no sea lo suficientemente alta como para colocar el mismo sistema en una colmena ya que no se observó la muerte del 100 % de los ácaros. Por otra parte, el 90 % de las abejas que fueron encontradas muertas en las placas que contenían esta dosis se hallaban pegadas sobre el gel, probablemente debido al encierro en un espacio tan reducido, lo cual, podría evitarse en una colmena. Por otro lado, el análisis del blanco indicaría que los componentes del gel, en ausencia del aceite, son inocuos para las abejas. Por lo tanto, se debería ajustar aún más la dosis adecuada en los experimentos *in vitro* para luego continuar con los estudios en colmenas de experimentación.

Análisis en sistemas cerrados utilizando la Nariz 2 (aspiración de headspace)

En primer lugar, se deseó explorar la respuesta de la Nariz 2 para distintas concentraciones de limoneno encapsulado en geles de pectina, por ser el compuesto volátil presente en los dos aceites esenciales.

La Figura V.13 muestra las señales de los sensores en función del volumen de limoneno encapsulado. Es claro que los sensores no presentan una respuesta lineal con la concentración en el rango de trabajo sino que a medida que aumenta la concentración, la respuesta de los sensores tiende a un *plateau*. A pesar de este resultado, se descarta la posibilidad de saturación electrónica de las señales de los sensores dado que la medición de limoneno libre presentó valores mayores en las señales de todos los sensores. La dependencia con la concentración que se muestra en la Figura V.13 sugiere que probablemente haya un efecto de saturación de limoneno en la superficie de los geles pues sino no se explica por qué no sigue aumentando la señal al aumentar la concentración. Este fenómeno se correlaciona muy bien con la estructura y el número máximo de gotas de *flavour* que puede contener el gel en su superficie, observadas por microscopía óptica.

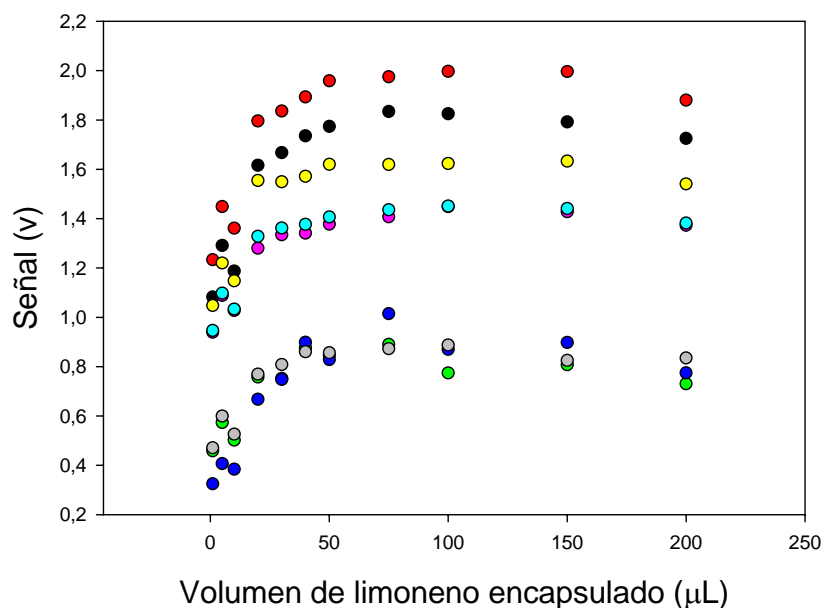


Figura V.13: Señales de los sensores (luego de alcanzar un estado estacionario después de 5 minutos) para diferentes concentraciones de limoneno encapsulado en geles de pectina. (●): Sensor 1; (●): Sensor 2; (●): Sensor 3; (●): Sensor 4; (●): Sensor 5; (●): Sensor 6; (●): Sensor 7; (●): Sensor 8

Por otra parte, se obtuvieron con la Nariz 2 las huellas digitales de los aceites y del limoneno, libres y encapsulados y se evaluó su discriminación por análisis multivariado. Las huellas digitales de estos sistemas se muestran en la Figura V.14.

El gráfico radar del limoneno encapsulado presenta una menor intensidad, pero la misma forma que la huella del limoneno libre. En el caso de los aceites esenciales, no sólo se observa una disminución en las señales de los sensores para los sistemas encapsulados respecto de los aceites libres; sino que además el patrón de cada aroma proveniente de los aceites encapsulados es muy diferente del patrón correspondiente a los vapores del aceite libre, lo cual es de esperar dado que se trata de sistemas multicomponentes (como se mostró en el Capítulo III).

Por otra parte, se puede destacar la similitud entre la huella digital del aceite de *Poleo* encapsulado y la huella del limoneno. Este resultado puede atribuirse al alto porcentaje de limoneno presente en la composición de este aceite, como se observó por cromatografía gaseosa. Esta similitud se halla evidenciada aún más en el análisis de

componentes principales que se muestra en la Figura V.15, donde cada punto corresponde a una medición.

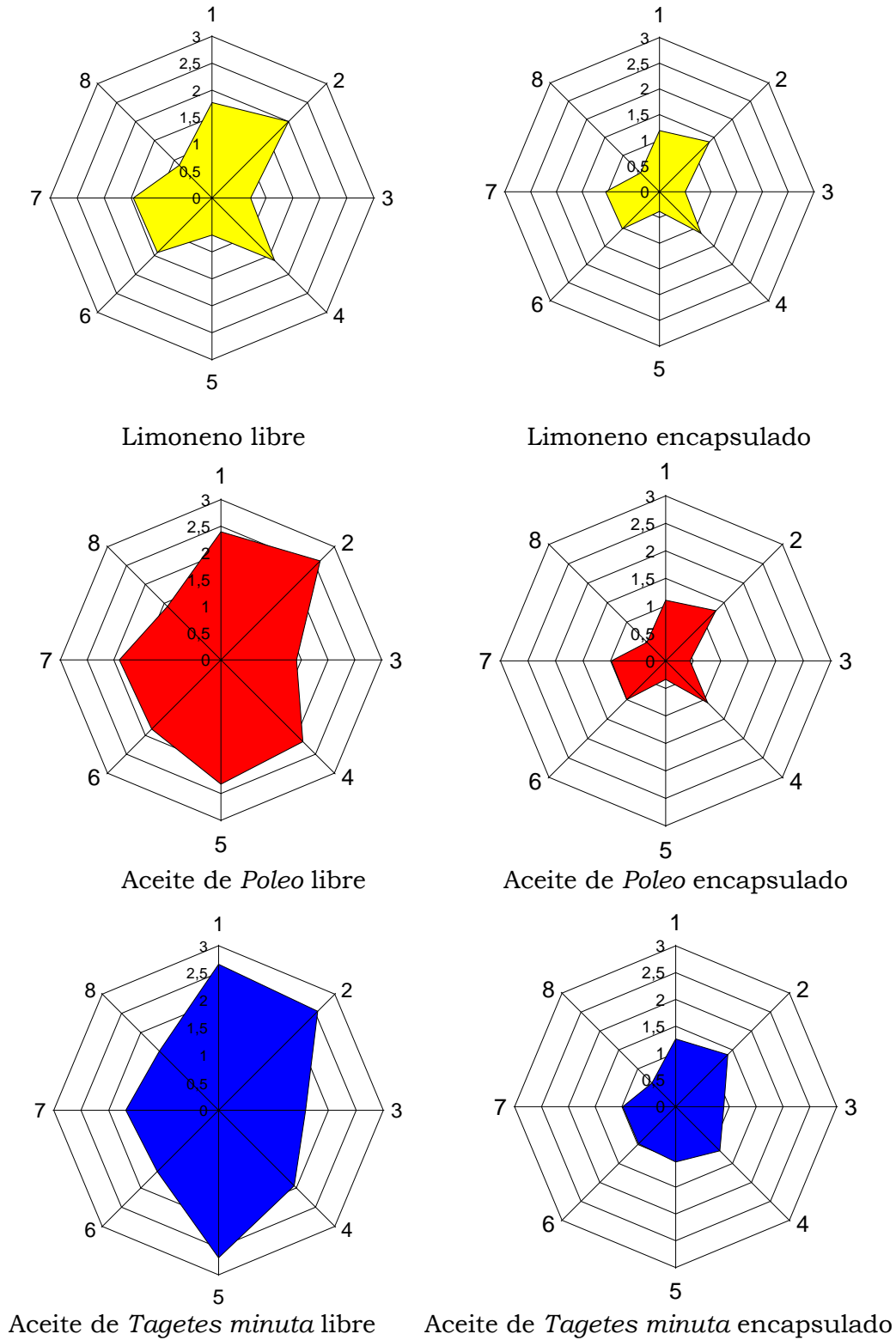


Figura V.14: Gráficos Radares. Volumen de *flavour* encapsulado: 10 μ L.

T: 33 °C

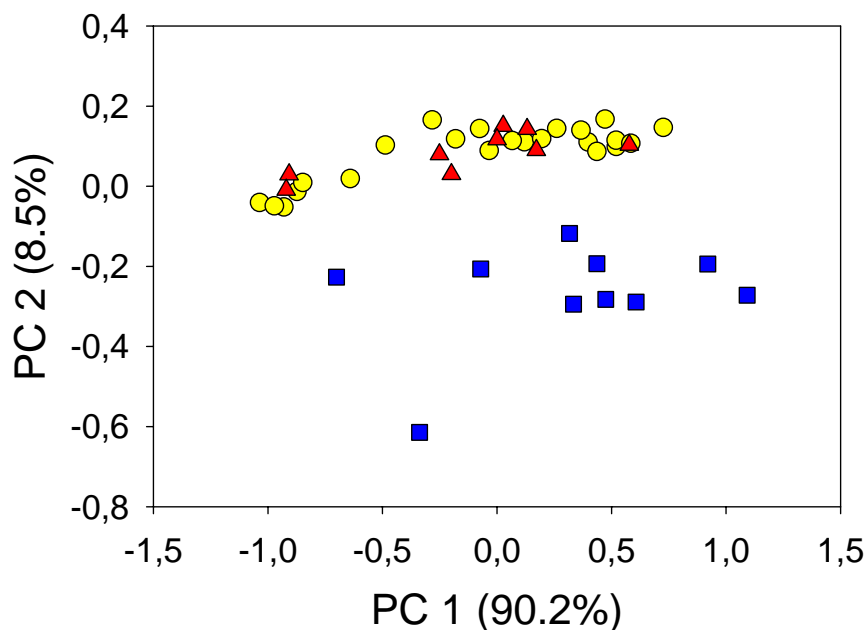


Figura V.15: PCA de diferentes concentraciones de limoneno y aceites esenciales encapsulados en geles de pectina. (●): Limoneno; (■): aceite de *Tagetes minuta*; (▲) aceite de *Poleo*

El conjunto de datos obtenidos de liberación de limoneno y los dos aceites desde geles de pectina fueron analizados en forma conjunta mediante un análisis de componentes principales. Como resultado, las dos primeras componentes principales contuvieron el 98,7 % de la varianza total de los datos.

Como se observa en la Figura V.15, se pueden distinguir dos grupos en el plano PC₁-PC₂. El grupo de datos con los valores de PC₂ más bajos corresponden a la liberación de *Tagetes minuta* desde geles de pectina mientras que dentro del grupo de datos con los valores más altos de PC₂ no es posible distinguir entre muestras que contengan diferentes concentraciones de limoneno y diferentes concentraciones de aceite de *Poleo*. Este resultado coincide con la similitud entre los radares de limoneno y *Poleo* encapsulados y con los resultados obtenidos por cromatografía.

Por otro lado, la clasificación obtenida por PCA está asociada a las semejanzas en las huellas digitales obtenidas para los sistemas encapsulados (ver Figura V.14).

La discriminación de muestras en estos dos grupos fue también lograda exitosamente empleando una red neuronal artificial. Las dos componentes principales obtenidas mediante el análisis de PCA fueron utilizadas como *inputs* en la construcción de la red.

En primer lugar, las muestras fueron clasificadas en tres categorías dependiendo si pertenecían a limoneno encapsulado, *Poleo* encapsulado o *Tagetes minuta* encapsulado, los cuales habían sido elegidos como *outputs* de la red neuronal. En ese caso, las muestras correspondientes a la liberación de limoneno y de *Poleo* no pudieron ser discriminadas por la red neuronal, lo cual está en concordancia con los resultados obtenidos por PCA. Sin embargo, las muestras pudieron ser clasificadas exitosamente en dos grupos. Los outputs de esta nueva red fueron (0 1) para la liberación desde geles conteniendo limoneno y (1 0) para la liberación desde geles conteniendo *Tagetes minuta*. Un conjunto de 6 muestras fue elegido al azar para convertirse en muestras incógnitas para la red y así chequear la eficacia de la misma en la clasificación. Los resultados de la Tabla V.3 indican que la red neuronal fue capaz de clasificar correctamente en las dos categorías el 100 % de este conjunto de muestras independientes.

Tabla V.3: Resultados obtenidos mediante el análisis con una red neuronal artificial. Los outputs fueron definidos como (0 1) para la liberación de limoneno desde geles de pectina y como (1 0) para la liberación del aceite *Tagetes minuta* desde geles de pectina.

Outputs Esperados		Resultados ANN	
0	1	0,0021	1,0023
0	1	-0,0136	1,0144
0	1	0,0189	0,9779
0	1	-0,0306	1,0337
1	0	1,0045	-0,0086
1	0	1,0277	-0,0353

V.4. Conclusiones y Resumen del Capítulo V

Los aceites esenciales *Tagetes Minuta* y *Poleo*, así como también uno de sus principales componentes, el limoneno, fueron encapsulados en geles de pectinas de alto grado de metilación utilizando Tween 80 como vehiculizante.

Las mediciones de microscopía óptica indicaron que los sistemas obtenidos se asemejan a una emulsión de aceite en agua estabilizada por el gel de pectinas.

Las mediciones de reología dinámica muestran que, para la concentración de pectina utilizada en este trabajo, las propiedades estructurales del sistema final y la cinética de gelificación son afectadas por la presencia del limoneno y del detergente.

La liberación de estos compuestos volátiles desde el medio de encapsulamiento fue detectada exitosamente utilizando una de las Narices Electrónicas desarrolladas en el laboratorio, mediante la aspiración del *headspace* de la muestra.

Al igual que en el caso del tuti-fruti, las huellas digitales correspondientes a las mezclas complejas no encapsuladas se diferenciaron de aquellas correspondientes a los aceites encapsulados, evidenciando la liberación preferencial de ciertos compuestos volátiles en las mezclas.

Mediante el uso de análisis multivariado (Análisis de Componentes Principales y Análisis por Redes Neuronales) se lograron discriminar los aceites encapsulados. Sin embargo, el *Poleo* no pudo diferenciarse del limoneno encapsulado, probablemente por el gran porcentaje de este compuesto que presenta este aceite, tal como lo indicaron los resultados de GC-MS.

La liberación de los volátiles hacia la fase aérea fue estudiada en el tiempo a temperatura y humedad controladas para simular las condiciones naturales de una colmena. Los resultados del ensayo de campo y el largo período de tiempo observado para la liberación del aceite encapsulado son altamente promisorios en cuanto a la utilización de matrices de pectinas como medio de encapsulamiento para la liberación controlada de aceites esenciales encapsulados que ejercen una acción acaricida en colmenas de abejas.

Algunos de los resultados detallados en este capítulo forman parte de un artículo publicado¹¹ (M.E.Monge *et al.*, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 2004).

V.5. Bibliografía

- ¹ A. Imdorf, S. Bogdanov, R. Ibáñez Ochoa, N. W. Calderone, Use of essential oils for the control of *Varroa jacobsoni* Oud. In honey bee colonies, *Apidologie* 30 (**1999**) 209-228.
- ² D. Sammataro, G. Degrandi-Hoffman, G. Needham, and G. Wardell, Some volatile plant oils as potential control agents for Varroa Mites (Acari: Varroidae) in honey bee colonies (Hymenoptera: Apidae), *Am. Bee J.* (**1998**) 681-685.
- ³ N. W. Calderone, Evaluation of formic acid and a thymol-based blend of natural products for the fall control of *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) in colonies of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), *J. Economic Entomology* 92 (**1999**) 253-260.
- ⁴ K. S. Delaplane, W. M. Hood, Economic threshold for *Varroa jacobsoni* Oud. in the southeastern USA, *Apidologie* 30 (**1999**) 383-395.
- ⁵ I. Floris, A. Satta, V. L. Garau, M. Melis, P. Cabras, N. Aloul, Effectiveness, persistence, and residue of amitraz plastic strips in the apiary control of *Varroa destructor*, *Apidologie* 32 (**2001**) 1-9.
- ⁶ A. Imdorf, S. Bogdanov, V. Kilchenmann and C. Maquelin, Apilife var: a new varroacide with thymol as the main ingredient, *Bee World* 76 (**1995**) 77-83.
- ⁷ A. Gregorc, I. Planinc, Acaricidal effect of oxalic acid in honeybee (*Apis mellifera*) colonies, *Apidologie* 32 (**2001**) 333-340.
- ⁸ S. Secouard, C. Malhiac, M. Grisel, B. Decroix, Release of limonene from polysaccharide matrices: viscosity and synergy effect, *Food Chem.* 82 (**2003**) 227-234.
- ⁹ N. Francois, A.M. Rojas, M.E. Daraio, D.L. Bernik, Dynamic Rheological measurements and drug release kinetics in swollen scleroglucan matrices, *J. Control. Rel.* 90 (**2003**) 355-362.

¹⁰ J.A. Lopes da Silva, M.P. Gonçalves, M.A. Rao, Kinetics and thermal behaviour of the structure formation process in HMP/sucrose gelation, *Int. J. Biol. Macromol.* 17 (**1995**) 25-32.

¹¹ María Eugenia Monge, Donatella Bulone, Daniela Giacomazza, Delia L. Bernik and R. Martín Negri: “Electronic Nose screening of limonene release from multicomponent essential oils encapsulated in pectin gels”, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 7 (**2004**) 337-344.

Capítulo VI

EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DE LOS SISTEMAS EN LAS PROPIEDADES VISCOELÁSTICAS Y EN LA LIBERACIÓN DE LIMONENO

VI. Efecto de la composición de los sistemas en las propiedades viscoelásticas y en la liberación de limoneno.

VI.1. Introducción

En el capítulo anterior se sugirió que la presencia de limoneno y de Tween 80 en un gel de pectinas modifica las propiedades viscoelásticas del sistema. Esta conclusión se infirió a partir del análisis reológico para una dada concentración del polisacárido.

El objetivo de este capítulo es explorar más exhaustivamente el comportamiento de estos sistemas en presencia y ausencia de un *flavour* y en presencia y ausencia del vehiculizante pero ahora variando en forma sistemática la concentración de pectina para cada caso. También se estudió la relación entre la liberación de limoneno encapsulado con la estructura de los sistemas de distinta concentración de pectinas.

La decisión de usar Tween 80 se debe a dos razones. Por un lado, es uno de los vehiculizantes más empleados en productos comerciales en alimentos y química cosmética y por otro lado, los resultados de los estudios del capítulo anterior indicaron que este tensioactivo “funciona” muy bien en nuestros sistemas. En cuanto al empleo de limoneno como *flavour*, la elección se debió a que decidimos emplear un sistema sencillo de un solo componente para llevar adelante el estudio sistemático propuesto.

Las propiedades viscoelásticas del sistema compuesto por el polisacárido, el *flavour* y el tensioactivo, fueron comparadas con aquellas pertenecientes al sistema polisacárido + tensioactivo y éstas, a su vez, fueron comparadas con las propiedades de un gel de pectinas en ausencia tanto de *flavour* como de tensioactivo. La concentración de pectinas fue variada sistemáticamente en los tres sistemas en forma paralela. Se determinó experimentalmente la transición sol-gel, la formación del gel, el efecto del *flavour* en las propiedades viscoelásticas del material, el efecto del tensioactivo y de la concentración del

polisacárido en los tres sistemas. Las mediciones de reología fueron llevadas a cabo durante una estadía de 3 meses que realicé en el laboratorio de investigación de la Dra. Donatella Bulone, en el Instituto de Biofísica de Palermo del CNR, Italia.

VI.2. Materiales y Métodos

VI.2.1. Preparación de los geles

En primer lugar, se mezcló la pectina seca con un 10 % (p/p) del total del contenido de sacarosa. Esta mezcla seca se disolvió en un buffer de citrato de potasio 12 mM y se calentó con agitación a 100 °C durante 20 minutos. El resto de la sacarosa se agregó durante el calentamiento (hasta alcanzar 60 % p/p) luego de haber pasado 10 minutos después de iniciado el procedimiento. Finalizados los 20 minutos, la muestra fue llevada a 40 °C bajo agitación durante 5 minutos. Luego, se agregaron el Tween 80, el limoneno y algunos microlitros de una solución de ácido cítrico 50 % (50 µL en 10 g de solución). Finalmente, la mezcla fue agitada durante 6 segundos con un *vortex*. Para la realización de las medidas reológicas, luego de la agitación, la mezcla fue inmediatamente cargada en el reómetro, el cual había sido previamente termostatzado a 33 °C. Para los experimentos con la Nariz Electrónica, la mezcla fue separada en igual cantidad en 4 recipientes cerrados y éstos fueron incubados a 33 °C. Los vapores del espacio cabeza de estos replicados fueron analizados con la Nariz Electrónica luego de 180 minutos de almacenamiento de los sistemas.

Se analizaron sistemas con 6 concentraciones diferentes de pectina entre 0,075 % y 0,4 % p/p. También se realizaron pruebas con concentraciones fuera de este rango, pero surgieron diversos inconvenientes. Para concentraciones mayores a 0,4 % la formación del gel era tan rápida que el simple hecho de trasvasar la mezcla al reómetro alteraba sus propiedades viscoelásticas. En el caso opuesto, para concentraciones menores de 0,075 %, el punto de gelificación se observaba recién después de 72 hs, lo cual hacía impracticable las mediciones. Las muestras sin limoneno y sin Tween 80 ni limoneno,

utilizadas en los experimentos de reología, fueron preparadas siguiendo el mismo protocolo y sustituyendo el *flavour* o el tensioactivo por agua según el caso, de manera de obtener las mismas concentraciones de pectina (% p/p) en todos los casos.

VI.2.2. Mediciones Reológicas

Se utilizaron tanto la geometría de cono y plato de titanio como la de cilindros concéntricos, a diferencia de las mediciones del capítulo anterior donde sólo se utilizó cono y plato. Las características del doble cilindro y del cono y plato fueron descritas en los capítulos IV y V respectivamente. Se trabajó en las mismas condiciones de frecuencia y de deformación que los capítulos anteriores, correspondientes a la zona de viscoelasticidad lineal y también se registraron el módulo elástico (G') y el módulo viscoso (G'') en función del tiempo.

Los experimentos para cada concentración de pectina fueron realizados para cada uno de los tres tipos de muestras con el fin de estudiar el efecto del *flavour* y del tensioactivo en las propiedades reológicas del sistema. En uno de los sistemas no se agregó ni Tween 80 ni limoneno; el segundo contenía Tween 80, pero no contenía limoneno y el tercer sistema fue el mismo utilizado en los experimentos de liberación de limoneno encapsulado; es decir, contenía tanto Tween 80 como limoneno. Se referirá a estos sistemas a lo largo del texto como sistemas A, B y C respectivamente. A su vez, para cada sistema y cada concentración de pectina, los experimentos se realizaron por cuadruplicado dada la heterogeneidad de los mismos. Los valores de G' y G'' que se muestran en las figuras corresponden al valor promedio de las distintas mediciones. Para G' se obtuvo un desvío estándar de 10 % mientras que para G'' se obtuvo un desvío estándar de 7 % en todos los casos excepto para el sistema con menor concentración de pectina, donde los desvíos estándares fueron de 25 % para G' y 15 % para G'' . En la muestra que contenía 0,25 % p/p de pectina para el sistema con Tween 80 y limoneno, se realizó un experimento control para verificar la consistencia de los resultados obtenidos utilizando ya sea la geometría de cono y plato como la de cilindros concéntricos (ver Capítulo II). También se obtuvo la cinética de gelificación de los tres tipos de muestras para

una concentración de 0,1 % p/p de pectina a partir de un espectro de frecuencias registrado en el rango de 0,02-30 Hz.

La muestra utilizada para determinar el rango de viscoelasticidad lineal (ver Capítulo II) fue la correspondiente al sistema con Tween y limoneno (sistema C) con la mayor concentración de pectina de manera tal de asegurarse que la deformación elegida fuese también útil para concentraciones más bajas.

Finalmente, se efectuaron controles para determinar la contribución reológica de dos blancos (en ausencia de pectina). La Figura VI.1 muestra el resultado de una cinética para dos blancos del sistema que contiene Tween 80 y limoneno. Se observa en la figura que los blancos no presentan ningún carácter sólido sino simplemente un carácter viscoso pequeño y por lo tanto, deja de comportarse como un sistema viscoelástico. Por ende, es correcto afirmar que la contribución a la elasticidad de los geles está dada por el hidrocoloide. En la Figura VI.1 también se manifiesta la reproducibilidad de la técnica entre los dos blancos.

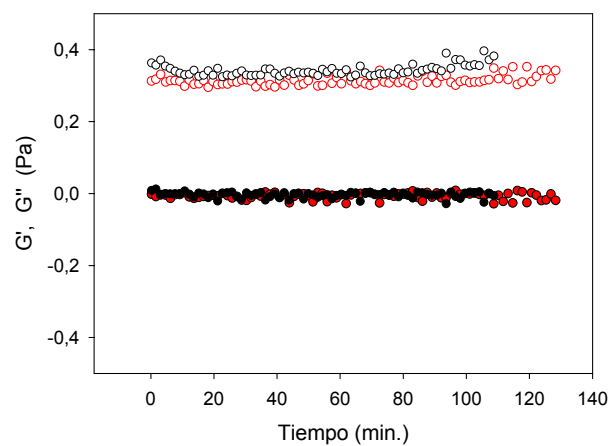


Figura VI.1: Módulo viscoso, G'' (○) y módulo elástico, G' (●) en función del tiempo. Los resultados se presentan por duplicado.

VI.2.3. Determinación de la liberación del *flavour* utilizando la Nariz Electrónica 2 (aspiración del *headspace*)

En este trabajo se utilizó la misma Nariz Electrónica que en el trabajo de liberación de aceites esenciales (8 sensores). Las mediciones se realizaron luego de la incubación de las muestras durante 180 minutos a 33 °C en un baño termostático. Este tiempo corresponde a diferentes momentos en el desarrollo de la estructura de acuerdo con la concentración de pectina. La línea de base se adquirió registrando las respuestas de los sensores con aire comercial, trabajando bajo el mismo flujo controlado.¹

Se realizaron mediciones de geles de pectina sin limoneno para descartar la posibilidad de una señal de fondo debida a los componentes de los geles. Las señales obtenidas fueron significativamente más pequeñas que las obtenidas para los geles con limoneno, indicando que la contribución del “olor” del gel no interfiere con la detección de limoneno.

Las señales de los controles y de los replicados de las muestras fueron realizadas en diferentes días. Sin embargo, no se detectaron diferencias, lo cual evidencia que la deriva de los sensores a lo largo del tiempo es insignificante en las situaciones descriptas en el presente trabajo.

Nuevamente, se utiliza el término limoneno “libre” para referirnos al limoneno no encapsulado que se coloca en un recipiente cerrado, idéntico a los recipientes de las muestras y en equilibrio con su vapor a la misma temperatura controlada de 33 °C.

VI.2.4. Microscopía Óptica

Con el fin de estudiar la microheterogeneidad de los sistemas que contienen pectina, sacarosa, Tween 80 y limoneno (sistema C), se realizaron ensayos con Rodamina C18, que es una sonda fluorescente no polar. Se prepararon geles con y sin la sonda y se observaron con el microscopio las superficies de los sistemas para todas las concentraciones de pectina. La sonda fue disuelta tanto en Tween 80 como en limoneno y fue agregada al sistema con el mismo procedimiento

descrito en *Preparación de los geles* de manera de poder comparar los resultados obtenidos con las diferentes técnicas utilizadas en la tesis. Las fotografías corresponden a las superficies de los sistemas a los 180 minutos de incubación a 33 °C y las imágenes fueron obtenidas con un aumento de 100 x. Las fotografías en blanco y negro fueron tomadas con una cámara de ccd acoplada al microscopio óptico y también conectada a una computadora personal. Por el contrario, la fotografía en colores fue tomada con una cámara digital a través del ocular del microscopio. A continuación se detallan los experimentos y controles realizados:

- 1) Sistema con pectina, limoneno, Tween 80 y Rodamina C18 (previamente disuelta en limoneno).
- 2) Sistema sin pectina, sin limoneno, con Tween 80 y Rodamina (disuelta en Tween 80).
- 3) Sistema con pectina, sin limoneno, con Tween 80 y Rodamina C18 (disuelta en Tween 80).
- 4) Sistema sin pectina, sin limoneno, sin Rodamina y con Tween 80 (fue el único sistema homogéneo por tratarse de una solución de sacarosa con Tween 80).
- 5) Sistema sin pectina, con limoneno, Tween 80 y Rodamina C18 (disuelta en limoneno).

VI.2.5. Medición del *headspace* por espectroscopía IR

Se construyó para este trabajo una celda de infrarrojo para medir la absorbancia de vapores, que se muestra en la Figura V.2. La esencia o el gel conteniendo la esencia se colocan en el recipiente ubicado en la parte inferior de la celda y se espera que la cámara se sature de los vapores del compuesto o los compuestos volátiles a temperatura controlada. En este caso, se utilizó esta celda para poder medir la liberación de limoneno desde geles de pectina.

La línea de base fue efectuada con aire y la temperatura fue medida durante del experimento, siendo igual a 30 °C ± 2 °C. Los experimentos se efectuaron por triplicado para dos concentraciones de limoneno: 4 y 0,4 % y para la concentración de pectina 0,36 %. Los geles

fueron preparados como se describe en el punto VI.2.1 y las mediciones fueron efectuadas luego de la incubación de las muestras durante 3 horas a 33 °C. Por otra parte, fue registrado el espectro del limoneno puro para identificar los principales picos y comparar con los otros espectros.



Figura VI.2: Celda para medir los vapores liberados por espectroscopía IR. Se compara su tamaño con el de un vaso de precipitados de 50 mL.

VI.3. Resultados y Discusión

VI.3.1. Efecto de la concentración de pectina, de Tween 80 y de limoneno en las cinéticas de gelificación.

Como se ha demostrado en los capítulos anteriores, la adición de un soluto puede tener un gran efecto en la cinética de gelificación de los geles de pectinas así como también, la incorporación de un tensioactivo, puede modificar el comportamiento viscoelástico. Por lo tanto, al estudiar la relación entre la liberación de un *flavour* y las propiedades estructurales del sistema, es importante comparar estas propiedades con aquellas correspondientes a un sistema modelo “no perturbado”; es decir, un sistema que no posea *flavour* ni tensioactivo. Por esta razón, se estudió el efecto de la concentración de pectina en los tres sistemas anteriormente mencionados mediante experimentos de reología (A: sistema que no posee Tween 80 ni limoneno; B: posee Tween 80 pero no posee limoneno y C: contienen a ambos componentes en el gel de pectinas).

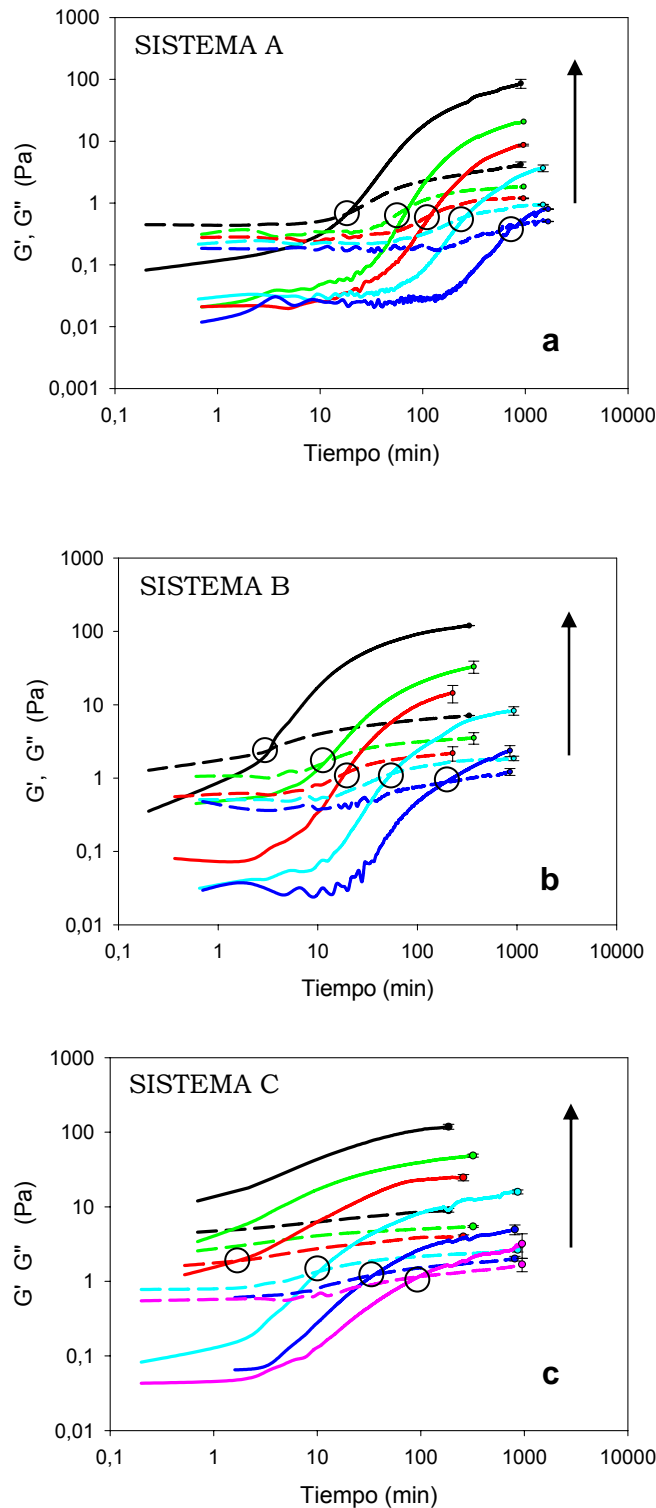


Figura VI.2: G' (—) y G'' (-----) en función del tiempo para diferentes concentraciones de pectina y para los tres sistemas estudiados: **(a)** pectina sin limoneno ni Tween 80; **(b)** pectina con Tween 80 y sin limoneno y **(c)** pectina con Tween 80 y limoneno. Concentraciones de pectina analizadas: (—): 0,075 %; (—): 0,10 %; (—): 0,15 %; (—): 0,20 %; (—): 0,25 %; (—): 0,36 %

La Figura VI.2 muestra la evolución temporal de los módulos elástico (G') y viscoso (G'') para diferentes concentraciones de pectina para los tres sistemas. Asimismo, con el aumento de la concentración del polisacárido, el cruce entre G' y G'' se produce a tiempos menores. Este resultado, indicado por círculos negros en los gráficos de la Figura VI.2, se repite en los sistemas B y C. Siguiendo el criterio utilizado en el Capítulo II, este tiempo puede ser definido como el tiempo aparente de gelificación (t_g) ya que el cruce entre G' y G'' marca la aparición de un carácter sólido en la muestra, al menos para los valores de deformación y frecuencia elegidos.

Por lo tanto, el principal efecto del aumento de la concentración de pectina en todos los sistemas (A, B y C) es favorecer la gelificación mediante la disminución de t_g y el aumento de $G'(t)$ y de $G''(t)$ para todo t . Este efecto también está ilustrado en la Figura VI.3 para el sistema C, en donde se observa que $\tan(\delta)$ decrece rápidamente al aumentar la concentración de pectina. Este resultado se repite en los otros dos sistemas analizados.

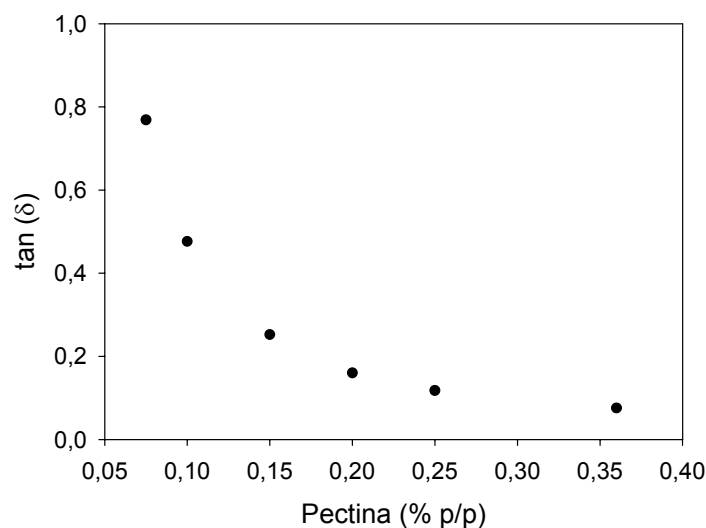


Figura VI.3: G''/G' en función de la concentración de pectina en el sistema C.

El efecto de la inclusión de Tween 80 en el sistema y de la adición conjunta de Tween 80 y limoneno en la cinética de gelificación para las mismas concentraciones de pectina se muestran en las Figuras VI.2b y

VI.2c de la Figura VI.2 respectivamente. Al comparar los sistemas B y A, se observa que la adición del tensioactivo acelera la cinética de gelificación y aumentan los valores iniciales de G' y de G'' . Un efecto similar y aún mayor es observado cuando se comparan el sistema C con el B, debido a la adición de limoneno. Inclusive, para los valores mayores de concentración de pectina (0,25 % y 0,36 %), el primer valor de G' medido es mayor que el primer valor de G'' , lo cual indica que estos sistemas poseen un mayor carácter sólido desde el inicio de la cinética y por ende, pueden ser considerados geles desde el comienzo. De todas formas, a pesar de que los valores iniciales de G' son mayores y además poseen una mayor velocidad inicial de crecimiento al aumentar el número de componentes en el sistema (desde el A hasta el C), los valores de G' alcanzados hacia el final de la cinética de gelificación en cada uno de los sistemas no difieren significativamente entre sí.

Otra manera de apreciar el efecto de la inclusión de Tween 80 y limoneno en los sistemas es comparando las velocidades de desarrollo de la estructura.² Para ello, en la Figura VI.4a se muestra la derivada de G' con el tiempo, dG'/dt , para los tres sistemas a una dada concentración de pectina (0,25 %).

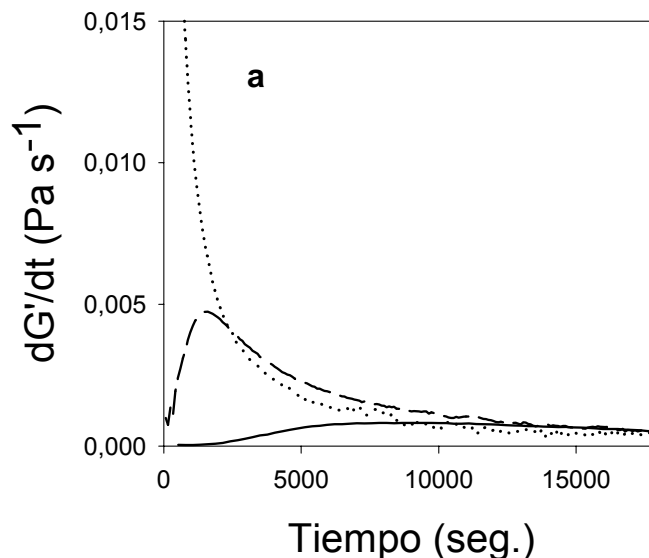


Figura VI.4a: dG'/dt para los tres sistemas con 0,25 % pectina.

(—): sistema A; (- -): sistema B y (...): sistema C.

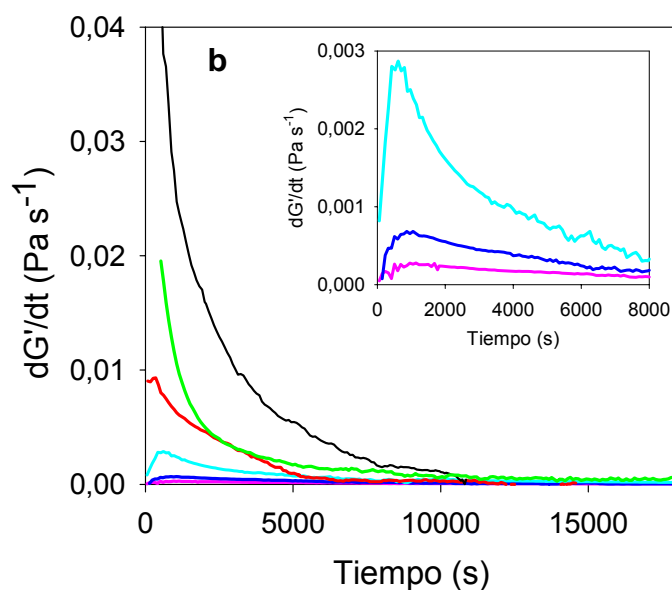


Figura VI.4b: dG'/dt para todas las concentraciones de pectina para el sistema C. (—): 0,075 %; (—): 0,10 %; (—): 0,15 %; (—): 0,20 %; (—): 0,25 % y (—): 0,36 %.

En el caso de la muestra que no posee Tween 80 ni limoneno (sistema A), dG'/dt muestra un crecimiento hasta un valor máximo, seguido de un lento decrecimiento hasta llegar a un *plateau* en un valor pequeño de dG'/dt . Este comportamiento fue interpretado por otros autores en términos de un crecimiento inicial rápido de la red, seguido de un reordenamiento lento de las cadenas de polímeros hacia la formación de una estructura completamente estabilizada.² Un mecanismo similar de dos etapas, fue también observado en la cinética de gelificación de proteínas de suero.³ Al agregar Tween 80, se alcanza un mayor valor máximo de dG'/dt en un tiempo menor y cuando se incluye limoneno en el sistema, el valor máximo deja de ser visible. Únicamente es visible el decrecimiento de dG'/dt desde un valor inicial elevado hasta un valor pequeño que se mantiene constante en un *plateau* que no difiere significativamente del alcanzado por los otros dos sistemas. Como se muestra en la Figura VI.4b, para las muestras que contienen tanto Tween 80 como limoneno, la formación de la red es tan rápida que el máximo de dG'/dt sólo puede ser observado en las concentraciones más bajas de pectina estudiadas. Este hecho sugiere que el principal efecto de

la adición del detergente y del *flavour* es la aceleración de la etapa inicial de formación de la red.

VI.3.2. Dependencia del tiempo de gelificación y del módulo elástico con la concentración de pectina

El tiempo de gelificación, t_g , y el valor del módulo elástico en el equilibrio son dos parámetros importantes en el estudio del proceso de gelificación. El valor del módulo elástico en el equilibrio es el valor de G' obtenido luego de un tiempo suficientemente largo tal que cambios en su magnitud son despreciables.

La Figura VI.5 muestra la dependencia del tiempo aparente de gelificación t_g con la concentración de pectina para los tres sistemas estudiados.

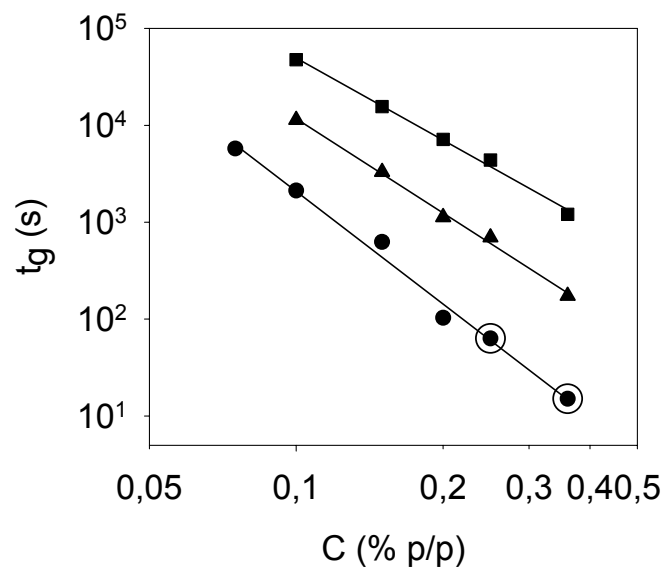


Figura VI.5: Valores de t_g en función de la concentración de pectina en escala logarítmica para los tres sistemas. (■): sistema A; (▲): sistema B y (●): sistema C

En el caso del sistema con Tween 80 y limoneno (C), los dos puntos correspondientes a las mayores concentraciones fueron obtenidos por extrapolación de las curvas de G' y G'' en función del tiempo. Del gráfico surge una diferencia de alrededor de un orden de magnitud en t_g

para los tres sistemas y para cada concentración de pectina. Los datos de cada sistema son ajustados correctamente mediante una ley de potencia con un valor de exponente que aumenta con la complejidad del sistema:

$$t_g \propto C^m \quad (\text{VI.1})$$

Para el sistema sin Tween 80 y limoneno (A) se obtuvo un valor de $m = (-2,8 \pm 0,1)$, el cual está comprendido entre los valores de 2 y 3,6 que fueron hallados experimentalmente por otros autores para pectinas de alto grado de metilación;^{2,4} dependiendo del tipo de muestra y del procedimiento seguido en la preparación de los geles. En el sistema con Tween 80 o con Tween 80 y limoneno (sistemas B y C) los exponentes hallados experimentalmente fueron $m = (-3,2 \pm 0,1)$ y $(-3,9 \pm 0,2)$ respectivamente.

Una ley de potencias es predicha por el modelo cinético desarrollado por Ross-Murphy⁵:

$$t_g^{-1} \propto \left\{ \left(\frac{C}{C_0} \right)^n - 1 \right\}^p \quad (\text{VI.2})$$

donde C_0 es la concentración crítica, debajo de la cual no se forma un gel; n es el orden cinético y p es el exponente crítico.⁶ Los resultados de la Figura VI.5 indican que en el rango de concentración medido no se observa la proximidad hacia la divergencia en C_0 , o sea nos encontramos en una zona donde siempre $C \gg C_0$. En esta zona, la relación de Ross-Murphy predice:

$$t_g \propto C^{np} \quad (\text{VI.3})$$

lo cual coincide con lo observado en nuestros estudios ($m = np$). Según varios autores^{5,6,7} un mayor valor absoluto del exponente m indicaría una mayor interacción entre los componentes del sistema tendientes a favorecer la formación del gel. Esto coincide con lo que hemos observado en nuestro trabajo pues, en efecto, $|m|$ aumenta al agregar limoneno y Tween 80 al sistema.

Por otro lado, las propiedades estructurales de los tres sistemas pueden ser comparadas mediante la inspección de los valores de los módulos elásticos, G' , en el equilibrio. En algunos geles biopoliméricos, los valores de G' en el equilibrio presentan una dependencia de ley de potencia con la concentración, con $|m|$ cercano a 2 en el rango de alta

concentración.⁸ También fue reportado por otros autores que la ley de potencia se mantiene en diferentes etapas de la cinética de gelificación con distintos valores de exponente.^{9,10,11} En los sistemas aquí estudiados, se encontró que la dependencia de G' con la concentración es bien descripta mediante la expresión:

$$G' \propto C^x \quad (\text{VI.4})$$

En la Figura VI.6 se muestra la dependencia de G' con la concentración para los tres sistemas a $t = 180$ min. Sin embargo, la expresión (VI.4) es válida en cada sistema para todo tiempo, teniendo en cuenta que para cada tiempo de incubación, se consideran aquellos valores de concentración para los cuales la gelificación ya se encuentra iniciada, o sea se debe escribir $G'(t) \propto C^{x(t)}$.

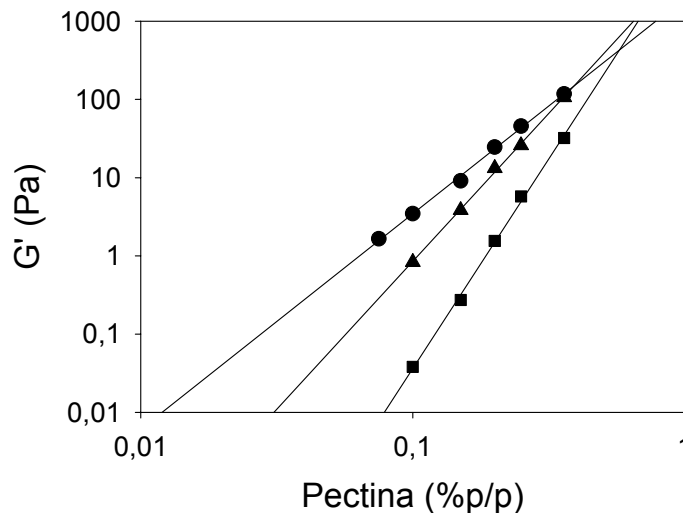


Figura VI.6: G' en función de la concentración de pectina a $t = 180$ minutos en escala logarítmica. (■): sistema A; (▲): sistema B y (●): sistema C

El cambio del exponente x con el tiempo para cada sistema estudiado se muestra en la Figura VI.7. Allí se observa que para todos los sistemas x decrece desde un valor inicial elevado. Un comportamiento similar fue observado en la cinética de gelificación de gelatina¹¹ y de proteínas de suero. Para cada tiempo, el exponente para el sistema sin tensioactivo ni *flavour* (sistema A) es siempre el mayor mientras que el exponente para el sistema que contiene ambos componentes (sistema C)

es siempre el de menor valor. Los valores de los exponentes a tiempo infinito fueron obtenidos al graficar los datos en función de la inversa del tiempo y extrapolando a cero. De esta manera se recuperaron los valores de $n = 3,3; 3,0$ y $2,5$ en orden creciente de complejidad del sistema. El significado de estos valores puede ser discutido en el marco del modelo de Shih¹² propuesto para geles coloidales que superan ampliamente el umbral de gelificación. Este modelo describe la estructura del gel en términos de objetos fractales (o clusters) cercanamente empaquetados, cuyos tamaños están determinados por su dimensión fractal. Según este modelo, en una escala mayor que la del tamaño de un cluster el sistema aparece homogéneo, mientras que en una escala inferior puede ser identificada la estructura fractal. Se predice una ley de potencias al estudiar la dependencia de G' con la concentración, con un exponente determinado por la dimensión fractal. En particular, un valor de exponente grande corresponde a una dimensión fractal pequeña; es decir, a una estructura menos compacta. En este marco, los resultados de la Figura VI.7 indican que en presencia de tensioactivo y de *flavour*, el gel es más compacto. Nuevamente, al igual que en el análisis de t_g , los resultados sugieren que tanto el tensioactivo como el *flavour* interaccionan con las cadenas de pectina, favoreciendo el proceso de entrecruzamiento.

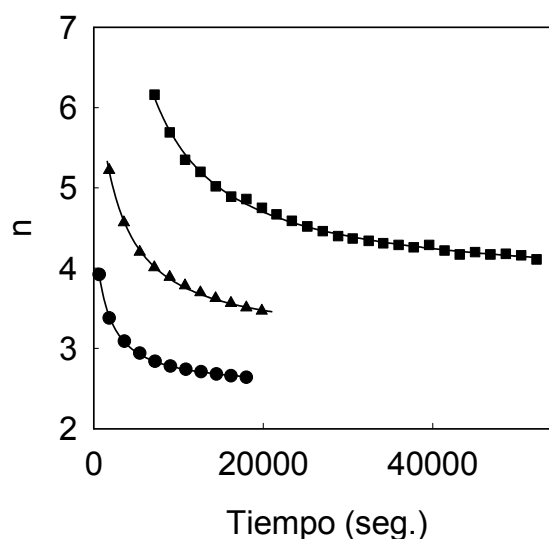


Figura VI.7: Valores del exponente n (ver texto) en función del tiempo para los tres sistemas. (■): sistema A; (▲): sistema B y (●): sistema C

VI.3.3. Resultados obtenidos con la Nariz Electrónica

La Figura VI.8 muestra los gráficos radares para la liberación de limoneno desde diferentes geles de pectina luego de haber sido incubados 180 minutos. Es importante remarcar que a dicho tiempo, la velocidad de desarrollo de la estructura ya ha alcanzado un valor constante y pequeño como se muestra en la Figura VI.4b. En Figura VI.8a se comparan los radares provenientes de limoneno libre y limoneno liberado desde un gel 0,25 % de pectina mientras que la Figura VI.8b incluye los radares asociados a limoneno libre y limoneno liberado desde un gel 0,075 % de pectina. Nuevamente, se evidencia la diferencia en la intensidad de los patrones de un *flavour* libre y uno encapsulado debido al efecto de retención del aroma que ejerce el medio de encapsulamiento. También se observa que las formas de las huellas digitales se conservan en la esencia libre y encapsulada por tratarse de un sistema de un solo componente. Sin embargo, al comparar las huellas digitales de limoneno liberado desde dos geles de igual concentración de limoneno, pero diferente concentración de pectina, se detecta una importante diferencia en la intensidad de las señales que conforman las huellas, evidenciándose una retención diferente del *flavour* en la matriz.

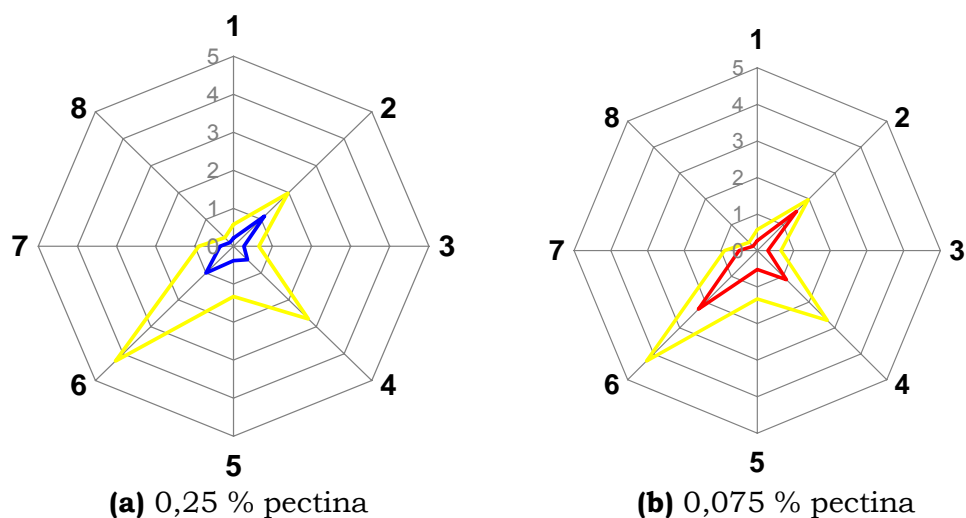


Figura VI.8: Gráficos radares asociados a las mediciones de liberación de limoneno (4 %) desde geles comparados con la huella digital de limoneno libre (—).

Con el fin de comprobar esta conclusión, se realizó un PCA con el conjunto de todas las mediciones realizadas sobre geles de distinta concentración de pectina y distinta concentración de limoneno. Todos los sistemas fueron medidos luego de haber sido incubados durante 180 minutos. En la Figura VI.9 se muestra el gráfico de PCA donde cada punto representa una medición y los distintos símbolos representan las diferentes concentraciones de pectina analizadas. Al analizar el mapa de PCA, se observa que los puntos asociados a las concentraciones más bajas de pectina (0,1 % y 0,075 %) y a la concentración más alta de limoneno (4 %) se encuentran separados del resto de las mediciones. Con el fin de relacionar los resultados del PCA con los gráficos radares, se graficó la primer componente principal PC_1 , que acumula el 94,8 % de la varianza total de los datos, en función de la suma de las señales de los sensores y este gráfico se muestra en la Figura VI.10.

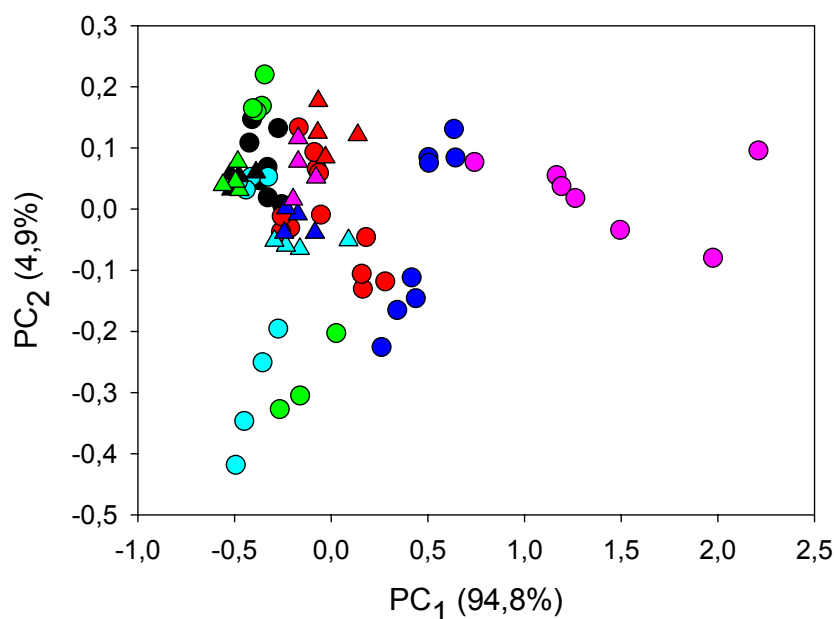


Figura VI.9: Gráfico de PCA para mediciones de liberación de limoneno desde geles de pectina a 180 minutos para distintas concentraciones de limoneno y pectina. Para limoneno 4 %, las concentraciones de pectina fueron (●): 0,075 %; (●): 0,10 %; (●): 0,15 %; (●): 0,20 %; (●): 0,25 % y (●): 0,36% y para limoneno 0,4 % (▲): 0,075 %; (▲): 0,10 %; (▲): 0,15 %; (▲): 0,20 %; (▲): 0,25% y (▲): 0,36 %

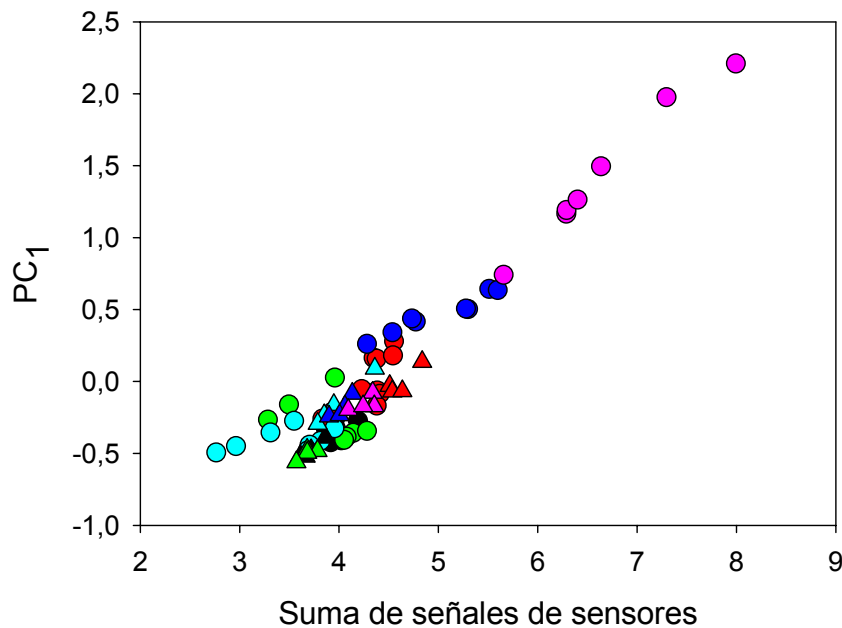


Figura VI.10: PC_1 en función de la suma de las señales de los sensores para las mediciones de liberación de limoneno desde geles de pectina a 180 minutos para diferentes concentraciones de pectina y limoneno.

Dado que la suma de las señales de los sensores crece con el área de los radares, esta suma está relacionada con la “intensidad” de la huella digital. A su vez, PC_1 crece con el área de los radares, por lo que se convierte en un buen indicador de la intensidad del *flavour*. Por lo tanto, para saber si es posible correlacionar la liberación de un *flavour* con las propiedades viscoelásticas del material, se graficó PC_1 en función de G''/G' (ver Figura VI.11). Se recuerda que $\tan(\delta)$ es una medida de la relación entre el carácter líquido y sólido de un sistema. Dado que se midieron diferentes replicados de la misma concentración de pectina con la Nariz Electrónica, en la figura se muestran los valores promedio de PC_1 asociados a sus valores correspondientes de $\tan(\delta)$ ($\tan(\delta) = G''/G'$ fue calculada utilizando los valores promedios de G' y G'' a 180 minutos). La figura muestra que la liberación del *flavour* es mayor para las concentraciones más bajas de pectina, donde el gel tiene una estructura más débil. Por lo tanto, la Nariz Electrónica fue capaz de discriminar entre geles débiles y fuertes.

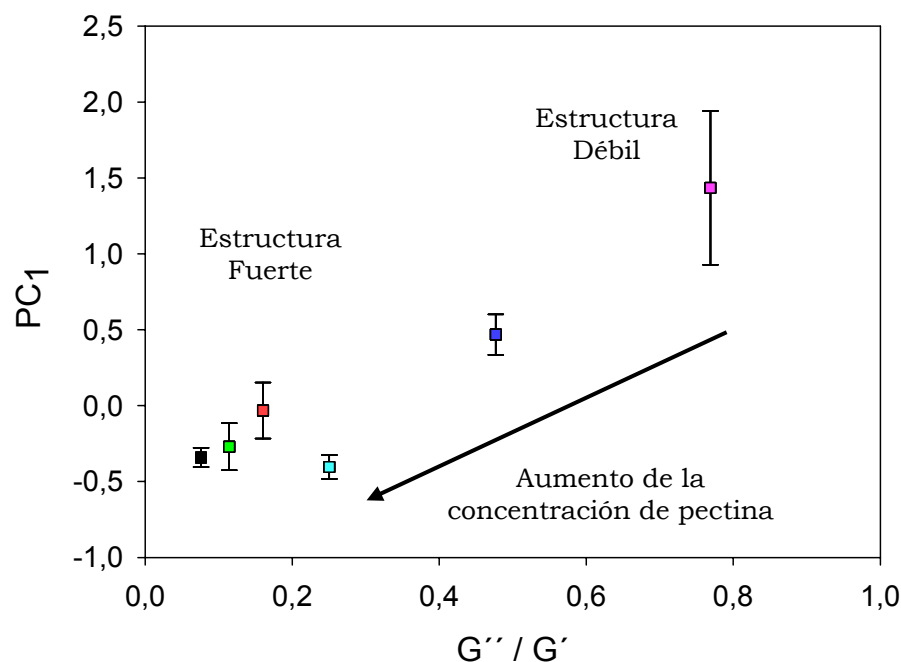


Figura VI.11: PC_1 en función de $\tan(\delta)$ a 180 minutos para diferentes concentraciones de pectina.

VI.3.4. Análisis del *headspace* por espectroscopía IR

En la Figura VI.12 se muestran los espectros IR obtenidos al analizar los vapores en equilibrio con limoneno puro, limoneno liberado de un gel 0,36 % de pectina y 0,4 % de limoneno y los vapores correspondientes a limoneno liberado de un gel de igual concentración de pectina pero con 4 % de limoneno todos efectuados a 30 °C.

Al comparar los espectros obtenidos, se observa que las señales obtenidas para el gel con mayor concentración de limoneno coinciden con las principales señales obtenidas para el limoneno puro. Sin embargo, no es posible analizar por IR los vapores de limoneno liberados desde el gel con menor concentración de limoneno, dado que la concentración de limoneno cae fuera del límite de detección de la técnica. Por el contrario, utilizando la Nariz Electrónica es posible detectar la liberación de limoneno desde un gel de pectinas que contiene limoneno al 0,4 %, evidenciando la potencialidad de Nariz Electrónica para el estudio de este tipo de sistemas.

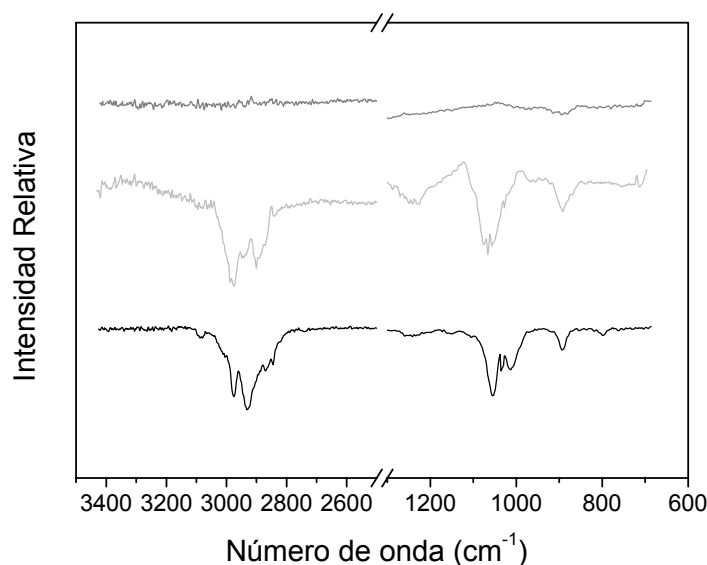


Figura VI.12: Espectros de espectroscopía IR correspondientes al limoneno puro (—), limoneno liberado de un gel 0,36 % de pectinas y 4 % limoneno (—) y de un gel 0,36 % de pectinas y 0,4 % de limoneno (—).

VI.3.5. Microscopía Óptica

Las fotografías de las superficies de los geles que se muestran en la Figura VI.13 indican nuevamente que los sistemas son microemulsiones “congeladas”. Al realizar una inspección cuidadosa de las fotos, se observa que existe una distribución del tamaño de gotas que varía de acuerdo con la concentración de pectina. Es decir, al disminuir la concentración de pectina, aumenta el tamaño de las gotas en la superficie de los geles.

Para entender la heterogeneidad que presentan las muestras de menor concentración de pectina, se efectuaron ensayos en presencia de Rodamina C18. En la Figura VI.13f, correspondiente a la muestra de menor concentración de pectina, se observa que las gotas pequeñas que se encuentran dentro las gotas grandes, son fuertemente coloreadas por

la sonda fluorescente no polar. Se podría asumir que en estos sitios no polares de la superficie de los geles estaría presente el limoneno.

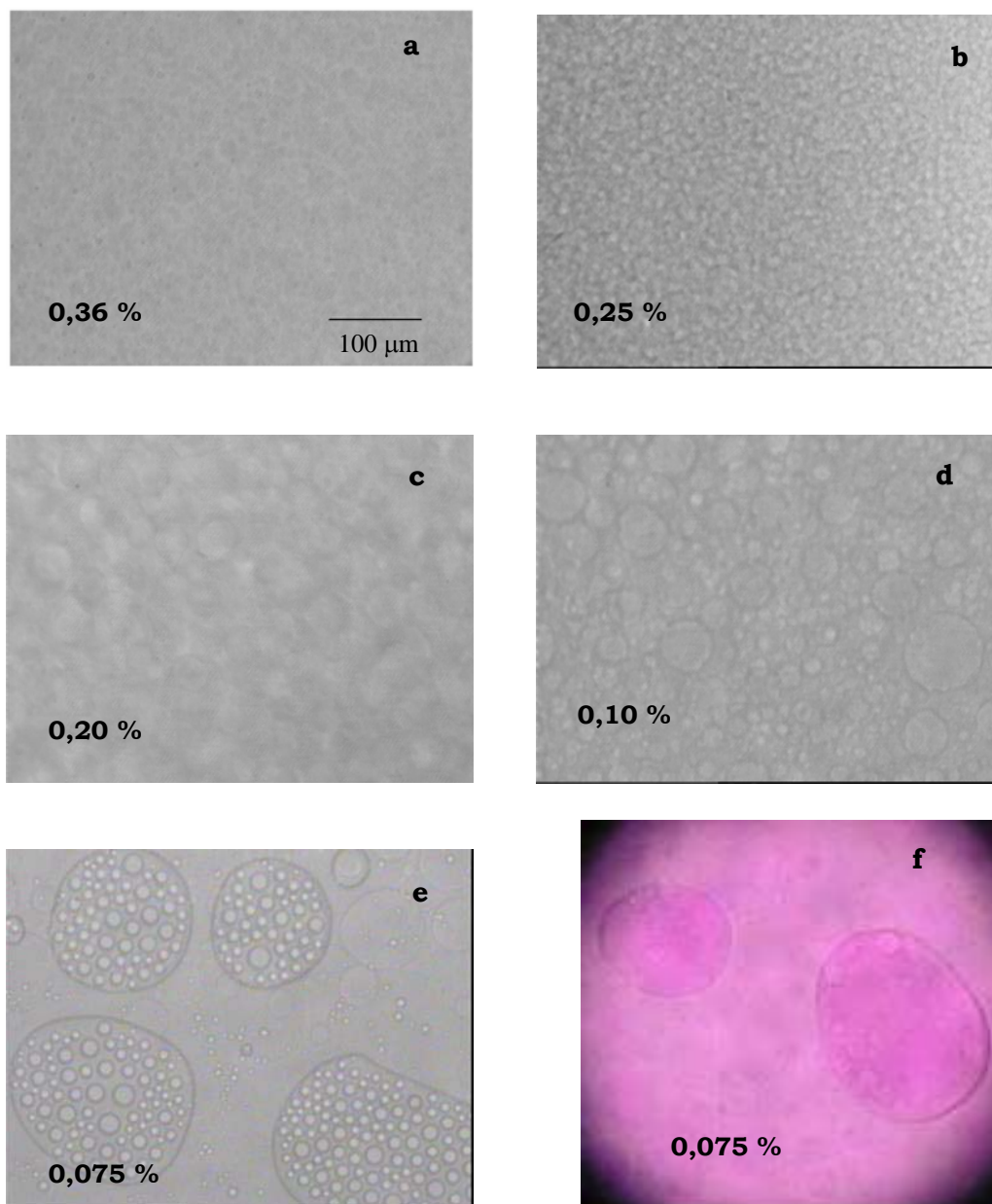


Figura VI.13: Fotografías tomadas por microscopía óptica de las superficies de los geles con 4 % de limoneno y las concentraciones de pectina se indican en las figuras; 13f corresponde al mismo sistema que 13e pero con marcación con Rodamina C18.

La diferencia entre las fotografías de la Figura VI.13 probablemente esté relacionada con las distintas posibilidades de interacción entre el *flavour* y el tensioactivo con las cadenas de pectina, la cual variaría con la concentración del polisacárido presente en cada sistema. Esto se correlaciona bien con la diferencia observada en la liberación de limoneno desde distintos geles y su respuesta viscoelástica tal como lo muestra la Figura VI.11.

VI.4. Conclusiones y Resumen del Capítulo VI

El objetivo de este capítulo consistió en buscar relacionar las propiedades viscoelásticas de geles de pectina con la liberación hacia la fase aérea de limoneno encapsulado. Es decir, se investigó la posible correlación Reología-Nariz Electrónica. Para ello se modificó la composición del sistema, variando la concentración del polisacárido y de limoneno, midiendo G' y G'' a través de experimentos de resolución en el tiempo.

Los resultados indicaron que a mayor concentración de pectina, mayores son los valores de los módulos elástico y viscoso durante toda la cinética de gelificación y además que la transición sol-gel ocurre a tiempos menores. Por lo tanto, el aumento de la concentración de pectina favorece la gelificación, en lo que se refiere a obtener matrices de mayor carácter sólido, como a obtenerlas más rápidamente.

Asimismo, para cada concentración de polisacárido, se analizó el efecto de Tween 80 y de limoneno en la cinética de gelificación y en las propiedades estructurales del gel. La variación de dG'/dt indica que tanto la presencia de limoneno como de Tween 80 aumentan la velocidad inicial de formación de la estructura, aunque no se observaron diferencias significativas entre los valores finales de G' y G'' para los tres sistemas estudiados. Los experimentos realizados parecen indicar que el mayor efecto de agregar Tween 80 y limoneno (en el rango de concentraciones estudiadas) es aumentar la velocidad de gelificación, o sea, un efecto cinético.

Los estudios de liberación de limoneno encapsulado fueron correlacionados con los resultados de mediciones reológicas de los geles.

El uso combinado de estas técnicas permitió la obtención de una relación directa (Figura VII.11) entre la disminución de la cantidad de *flavour* liberado con el aumento del carácter sólido de la matriz. En la medida de nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se reporta en la literatura una buena correlación entre la información procesada con una Nariz Electrónica y los parámetros reológicos. Inclusive, las microscopías ópticas demuestran que los geles con menor cantidad de pectina presentan los mayores tamaños de gota (y posiblemente la mayor dispersión). Por lo tanto, al haber menor cantidad de pectina, el limoneno se agrupa en gotas más grandes. En consecuencia, la correlación nariz-reología y las microscopías ópticas sugieren una mayor exposición superficial de limoneno en los geles débiles, lo cual debe ser confirmado en estudios posteriores.

Debe destacarse que no fue posible detectar la presencia de limoneno encapsulado en bajas concentraciones mediante FTIR de los vapores liberados. Por ello, el estudio presentado en este capítulo pudo ser realizado debido a la excelente detección obtenida con la Nariz Electrónica

Estos estudios forman parte del siguiente trabajo recientemente enviado para su publicación “Correlation between rheological properties and limonene release in pectin gels using an electronic nose” (María Eugenia Monge, R. Martín Negri, Daniela Giacomazza y Donatella Bulone).

VI.5. Bibliografia

- ¹ M.E.Monge, D.Bulone, D.Giacomazza, R.M.Negri, D.L.Bernik, Electronic Nose Screening of Limonene Release from Multicomponent Essential Oils Encapsulated in Pectin Gels, *Comb.Chem.High Throughput Screening* 7 **(2004)** 337-344.
- ² J. A. Lopes da Silva, M.P. Gonçalves, M.A. Rao, Kinetics and thermal behaviour of the structure formation process in HMP/sucrose gelation, *Int. J. Biol. Macromol.* 17 **(1995)** 25-32.
- ³ M. Verheul, S. P. M. N. Roefs, J. Mellema, K. G. Kruif, Power law behavior of structural properties of protein gels, *Langmuir* 14 **(1998)** 2263-2268.
- ⁴ D. Oakenfull, A. Scott, En *Gums and Stabilisers for the Food Industry*; Phillips, G.O.; Wedlock, D.J.; Williams, P.A. Eds.; Elsevier Applied Science Publishers: London **(1983)** p.465.
- ⁵ S.B. Ross-Murphy, The estimation of junction zone size from geltime measurements, *Carbohydr. Polym.* 14 **(1991)** 281-294
- ⁶ Stauffer, D. *Introduction to Percolation Theory*. Taylor & Francis: London **(1985)**.
- ⁷ S.B. Ross-Murphy, Gelation kinetics-problems and prospects, *J. Macromol. Sci. B* 44 **(2003)** 1007-1019.
- ⁸ A.H. Clark, S.B. Ross-Murphy, Structural and mechanical-properties of bio-polymer gels, *Adv. Polym. Sci.* 83 **(1987)** 57-192.
- ⁹ J.A. Lopes da Silva, M.P. Gonçalves, M.A. Rao, *Int. J. Biol. Macromol.* 17 **(1995)** 25-32.
- ¹⁰ M. Verheul, S.P.M.N. Roefs, J. Mellema, K.G. Kruif, *Langmuir* 14 **(1998)** 2263-2268.

¹¹ V. Normand, S. Muller, J.-C. Ravey, A. Parker, *Macromolecules* **33** (2000) 1063-1071.

¹² W.-H. Shih, W. Y. Shih, S.-I. Kim, J. Liu, I. A. Aksay, Scaling behavior of the elastic properties of colloidal gels, *Physical Rev. A* **42** (1990) 4772-4779.

Capítulo VII

SENSORES POTENCIOMÉTRICOS PARA LENGUAS ELECTRÓNICAS

VII. Sensores potenciométricos para Lenguas Electrónicas

VII.1. Introducción

Como se mencionó en la introducción general, el desarrollo de sensores potenciométricos fue efectuado con el fin de que formen parte de un dispositivo electrónico desarrollado en el laboratorio y patentado en Argentina, USA y Europa bajo el nombre de “Flavorímetro”. El mismo está inspirado en una combinación de Nariz y Lengua electrónica, por lo que posee sensores químicos basados en semiconductores de SnO₂ para la detección de gases y sensores potenciométricos para la detección de iones en fase líquida. Tradicionalmente, la investigación en el área de los sensores químicos para medios líquidos estuvo dirigida hacia la obtención de mayor selectividad y sensibilidad para el analito deseado. Una forma posible de incrementar las aplicaciones de estos sensores químicos es mediante la utilización de arreglos de sensores, o sea, de Lenguas Electrónicas, las cuales constituyen un desarrollo relativamente reciente, de fines de la década del noventa. Al igual que la Nariz Electrónica, provee una huella digital del sistema que se analiza, que en este caso se trata de una solución.¹ Los dos tipos de sensores más utilizados en las lenguas electrónicas son potenciométricos y los amperométricos.

La “especificidad” de un sensor para un dado compuesto es un concepto límite que en la práctica no puede ser alcanzado debido a las múltiples interferencias. Normalmente, se suele hablar de la “selectividad” de un sensor para un dado ión; el sensor presenta una respuesta bien definida para el ión para el cual fue diseñado, procurándose que dicha respuesta sea poco perturbada por la presencia de interferencias. Este concepto también debe ser tomado con cuidado, pues puede ser que un sensor sea sensible frente a analitos para el que no fue diseñado. Por ese motivo buscamos desarrollar varios tipos de sensores selectivos (a distintos iones), con el fin de incorporarlos a una “Lengua Electrónica”, en donde los conceptos de “especificidad” y de “selectividad” quedan desplazados frente al de “reconocimiento de

patrones". Desde ya que el paso previo es estudiar la respuesta de los sensores frente a los iones respectivos, que es lo que se propuso en este capítulo.

La mayoría de los electrodos ión selectivos que se reportan en la literatura^{2,3} (y que se adquieren comercialmente) son electrodos de membrana con solución interna. Es decir, la construcción de los mismos, tal como se detalla en Craggs *et al.*⁴, involucra un soporte cilíndrico que contiene una solución concentrada del analito que se desea detectar y que está separada de la solución que se desea analizar por una membrana de PVC que contiene un ionóforo, el cual forma un complejo estable y reversible con el analito. Sin embargo, en los electrodos con solución interna, se genera un gradiente de concentración en la membrana de PVC entre la solución interna y la que se desea medir; por lo cual, en ciertas ocasiones se cometen errores en la determinación.

En el laboratorio se desarrolló otro tipo de electrodo que no requiere de una solución interna ya que la membrana de PVC se coloca directamente sobre un sustrato sólido de carbono vítreo. El diseño y construcción de estos sensores potenciométricos fue llevado a cabo enteramente en el laboratorio. Su *performance* se comparó con otros electrodos similares desarrollados en el laboratorio del Prof. Luc Nagels (Universidad de Amberes, Bélgica), donde realicé en 2006 una estadía de 2 meses. El grupo del Dr. Nagels posee una importante experiencia en el desarrollo de sensores potenciométricos basados en membranas de PVC soportadas sobre carbono vítreo.^{5,6,7,8}

Las medidas potenciométricas que se efectúan con este tipo de electrodos ión selectivo están basadas en la condición de equilibrio que existe entre la actividad del ión complejado en la membrana de PVC y la actividad del ión presente en la solución que se analiza. Por lo tanto, se puede plantear un equilibrio electroquímico entre la actividad del ión en ambas fases y por ende, se espera una respuesta nernstiana para este tipo de sensores.

Resumiendo, el objetivo de esta última parte de la tesis fue obtener electrodos ión selectivo que posean estabilidad y reproducibilidad en su respuesta con el fin de incorporarlos junto con los demás electrodos comerciales que ya integran el Flavorímetro. Por lo tanto, en este capítulo se describe la construcción de tres electrodos de membrana selectivos a

iones cobre, plomo y níquel. La elección de preparar sensores para estas iones, en particular para plomo y níquel, se debe a que se encuentran como contaminantes en aguas residuales y a que hemos observado que la disponibilidad de parte de proveedores de sensores parece ser menor.

Los experimentos que se describen en este capítulo fueron realizados con asesoramiento de la Dra. Estela Andrade, del Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad de Buenos Aires, con quien se realizó el trabajo en colaboración, juntamente con el Dr. Nagels.

VII.2. Materiales y Métodos

VII.2.1. Construcción de los electrodos

Se parte de una barra de bronce de 15 cm de longitud y 8 mm de diámetro, la cual es insertada a presión dentro de un cilindro de *delring* de 16 mm de diámetro y 14 cm de longitud. El mismo presenta una abertura de 2 cm de longitud y 13 mm de diámetro en el extremo que corresponde a la punta de medición donde se ubica el carbono vítreo, tal como se muestra en la Figura VII.1.a y VII.1.b. La punta de la barra de bronce presenta una cavidad circular de 5,5 mm de diámetro y 0,4 mm de profundidad que se utiliza para soportar el cilindro de carbono vítreo, que se fija al bronce con epoxi plata. El cilindro de carbono vítreo posee 2 mm de espesor y 5 mm de diámetro (ver Figura VII.1.c). Luego, se cubre la cavidad que contiene al carbono vítreo con resina Araldit y el electrodo se somete a 30 minutos de sonicación para eliminar las burbujas de aire encerradas y luego se deja secar a temperatura ambiente durante una semana (Figura VII.1.d). Finalmente, se pule el frente del electrodo, utilizando lijas al agua y por último con partículas de alúmina de 1 μ m. Luego de observar la superficie espejada del carbono vítreo, se lava la superficie con agua de calidad Milli Q. En la Figura VII.1.e se comparan dos electrodos antes y después del proceso de pulido. Luego, sobre la superficie pulida y seca se deposita la membrana de PVC.



(a) Barra de bronce



(b) Barra de bronce dentro del cilindro de delring



(c) Pegado del carbono vítreo sobre el bronce.



(d) Relleno de la cavidad con araldit



(e) Electrodo pulido (izquierda) y electrodo sin pulir (derecha)

Figura VII.1: Fotografías de las distintas etapas en la construcción del sensor de **(a)** hasta **(e)**.

VII.2.2. Construcción de la membrana de PVC

Membrana selectiva a Cu^{2+}

Se prepararon membranas de acuerdo con el protocolo informado por Kamata *et al.*⁹ para electrodos con solución interna. Se disolvieron 288 mg de la mezcla de ionóforo, PVC y plastificante en 3 mL de tetrahidrofurano (THF). Se prepararon sensores con membranas de distinto espesor, pero se comprobó que aquellas más delgadas mejoraban la respuesta del electrodo. Para construir la membrana más delgada se colocaron 5 gotas de la mezcla con pipeta *pasteur* sobre la superficie del electrodo y se dejó evaporar el solvente durante 2 horas a temperatura ambiente. De esta forma, se formó una película delgada sobre la superficie. Como ionóforo se utilizó disulfuro de tetraetiltiouram y como plastificante se utilizó 2-nitrofenil-octiléter. Las proporciones de ionóforo, plastificante y PVC fueron 4,1 %; 58,8 % y 41,1 % respectivamente.

Membrana selectiva a Pb^{2+}

Se prepararon membranas disolviendo 290 mg de la mezcla de ionóforo, tetrakis (4-clorofenil) borato de potasio, PVC y plastificante en 3 mL de THF. También en este caso se prepararon membranas de distinto espesor. Los resultados que se muestran corresponden a una membrana que posee 3 capas de 5 gotas de la mezcla, depositadas sobre la superficie del electrodo. Entre cada capa se dejó evaporar el solvente durante 20 minutos y una vez aplicadas las 3 capas se dejó evaporar el THF por 2 horas a temperatura ambiente. De esta forma, se formó una película delgada sobre la superficie. Como ionóforo se utilizó tert-butilcalix[4]areno-tetrakis(N,N-dimetiltioacetamida) y como plastificante se utilizó 2-nitrofenil-octiléter. Las proporciones de ionóforo, sal de borato, plastificante y PVC fueron 1 %; 0,35 %; 66 % y 33 % respectivamente.¹⁰

Membrana selectiva a Ni^{2+}

Se prepararon membranas de acuerdo con el protocolo informado por Singh y Bhatnagar para electrodos con solución interna.¹¹ Se disolvieron 300 mg de la mezcla de ionóforo, PVC, tetrakis (4-clorofenil) borato de potasio y plastificante en 3 mL de THF. Se ensayaron membranas con tres plastificantes diferentes: dibutilftalato, tritolilfosfato y dibutil butilfosfonato.

La disolución de la mezcla en el THF requirió de una agitación prolongada con tiempos de agitación que dependen del plastificante utilizado. Por ejemplo, para la mezcla con dibutilftalato o con tritolilfosfato fue necesario sonicar y agitar con un vortex de forma alternada cada 15 minutos durante 3 horas. En cambio, la mezcla con dibutil butil fosfonato se disolvió rápidamente en THF. Una vez disuelta la mezcla, se generaron las membranas por deposición de distintas capas de la solución utilizando una pipeta pasteur, conteniendo cada capa un número de gotas de la mezcla. Entre cada capa se dejó evaporar parcialmente el THF durante 30 minutos y finalmente se dejó evaporar todo el solvente durante 48 hs horas a temperatura ambiente. Se ensayaron los siguientes espesores de membrana: 1 capa de 5 gotas; 2 capas de 5 gotas cada una y 3 capas de 10 gotas de la mezcla cada una. Esta última resultó ser la que dio origen a una mejor respuesta del electrodo. De esta manera, se formó una película delgada sobre la superficie. Como ionóforo se utilizó el ácido 4,4',4'',4'''-tetracarboxílico de la *meso*-tetrafenilporfirin. Las proporciones de ionóforo, plastificante, tetrakis (4-clorofenil) borato de potasio y PVC fueron 10 %; 30 %; 5 % y 55 % respectivamente.

VII.2.3. Acondicionamiento de los electrodos

Antes de utilizar los sensores de cobre y plomo, una vez evaporado el solvente de las membranas, los electrodos se acondicionaron en una solución 10^{-3} M de $Cu(NO_3)_2$ y de $Pb(NO_3)_2$ respectivamente durante 72 hs. En el caso del sensor de níquel, los electrodos se sumergieron en una solución 0,5 M de $Ni(NO_3)_2$ durante 5 días antes de ser utilizados.

Una vez en uso, se guardan en una solución 0,1 M de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, tal como reportaron Singh y Bhatnagar.¹⁰

VII.2.4. Instrumentos de medición

Los experimentos con los sensores de cobre y plomo fueron llevados a cabo utilizando un potencióstato de alta impedancia de entrada acoplado a un programa de adquisición de datos.

Para trabajar con los sensores de níquel se utilizaron 4 pH metros CyberScan 510 acoplados a un programa de adquisición de datos desarrollado en el laboratorio del Prof. Luc Nagels, en la Universidad de Amberes, Bélgica. De esta forma, se pudieron realizar 4 medidas en forma simultánea con agitación.

En todos los experimentos se registró la diferencia de potencial entre el electrodo ión selectivo y un electrodo de referencia AgCl/Ag .

VII.2.5. Curvas de calibración

Las mediciones de iones cobre y plomo se realizaron registrando la diferencia de potencial entre cada electrodo y el electrodo de referencia, al sumergirlo en una solución de una dada concentración del metal hasta alcanzar un *plateau* en el valor del potencial medido. Se midieron soluciones en el rango entre 10^{-6} M y 10^{-2} M. Una vez alcanzado un *plateau*, se reemplaza la solución de una dada concentración por otra y nuevamente se comienza a registrar el cambio del potencial en el tiempo. Las mediciones de Cu^{2+} fueron realizadas en condiciones estancas (repetiendo experimentos previos de literatura)⁹ mientras que las mediciones de Pb^{2+} y Ni^{2+} fueron efectuadas bajo agitación.

A diferencia de los casos anteriores, para las mediciones de Ni^{2+} se registró la diferencia de potencial entre el ISE y el electrodo de referencia generada luego de la adición de alícuotas de una solución 0,1 M de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ partiendo de una solución 10^{-6} M de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$. De esta manera se evaluaron los tiempos de respuesta del sensor frente a un cambio en la concentración del analito.

VII.3. Resultados y Discusión

VII.3.1. Sensor de Cu^{2+}

El primer electrodo construido en el laboratorio fue el sensor de iones cobre con el fin de verificar el funcionamiento del electrodo, teniendo en cuenta los resultados informados por Kamata *et al.*

En la Figura VII.2 se muestra la respuesta del electrodo y el nivel de ruido para una solución de iones cobre 10^{-3} M.

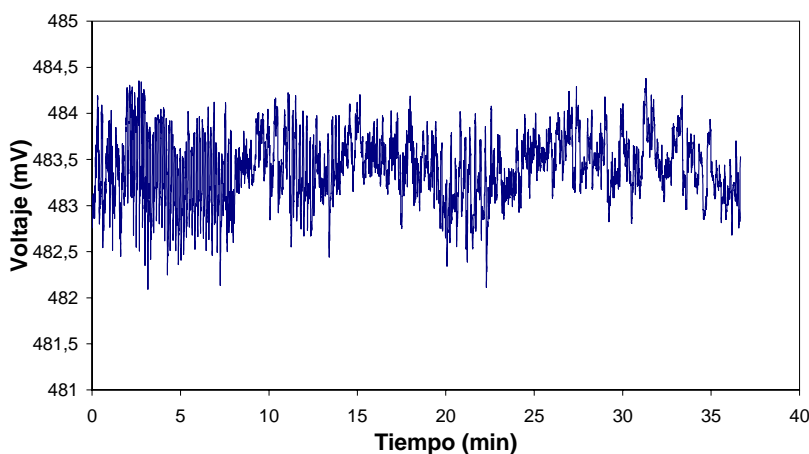


Figura VII.2: Respuesta del electrodo y nivel de ruido para una solución de Cu^{2+} 10^{-3} M.

Como se puede observar, para una solución 10^{-3} M, el tiempo de respuesta del electrodo fue del orden de 1 minuto. Si bien el tiempo de respuesta de un sensor disminuye en general con el aumento de la concentración, en este caso el tiempo promedio fue de 2 minutos para todas las concentraciones.

En la Figura VII.3 se muestra la curva de calibración obtenida con el sensor* y la Tabla VII.1 contiene el resultado del ajuste obtenido de los datos. Los valores de potencial que se observan en la Figura VII.3 provienen de promediar los valores del *plateau* para cada concentración medida. Los valores de actividad fueron calculados utilizando la ecuación

* Las barras de error no se presentan en las figuras debido a que sus valores son en todos los casos menores al 1 % del valor medido de potencial.

descripta por Kamata *et al.*, que es una forma modificada de la ecuación de Debye-Huckel aplicable a cualquier ión.¹²

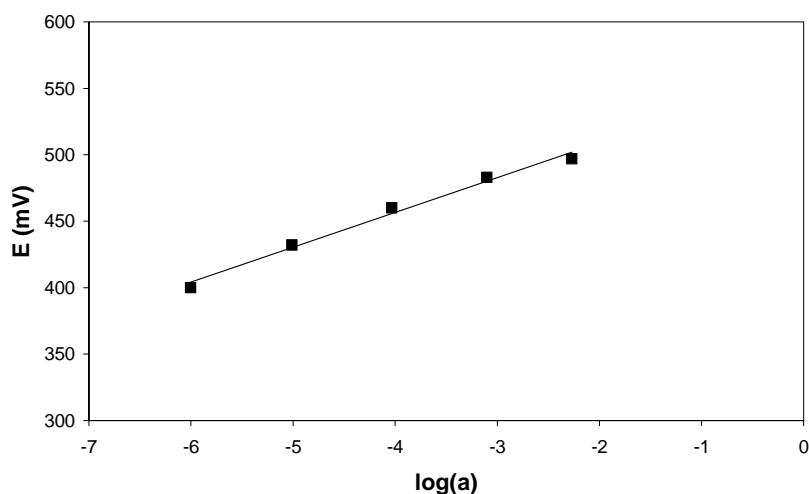


Figura VII.3: Respuesta obtenida con el sensor de Cu^{2+} .

Tabla VII.1: Resultados del ajuste obtenidos con el sensor de Cu^{2+} .

Rango de Concentración	Pendiente	R ²
$10^{-6} \text{ M} - 10^{-2} \text{ M}$	$26,5 \pm 0,1$	0,9819
$10^{-6} \text{ M} - 10^{-3} \text{ M}$	$29,0 \pm 0,2$	0,9956

Como puede apreciarse, se obtuvo una respuesta nernstiana con la actividad de iones cobre en la solución. Sin embargo, con el paso del tiempo se observó que los resultados no fueron reproducibles. Este hecho puede adjudicarse a que el ionóforo utilizado en la membrana de PVC se oxida con el tiempo, con lo cual la vida útil de este sensor no supera los 4 días. Esto se corresponde con la observación de un oscurecimiento de la membrana. Por lo tanto, una vez logrado el objetivo principal de esta primera etapa, que consistía en verificar que el dispositivo diseñado en el laboratorio funcionaba como sensor, se comenzó la preparación de otras membranas con el objeto de detectar iones plomo.

VII.3.2. Sensor de Pb²⁺

A partir de la experiencia obtenida con el sensor de cobre, se prepararon los sensores de iones plomo con membranas delgadas. Sin embargo, en este caso surgieron problemas importantes. El potencial no seguía una tendencia con la actividad y el tiempo de respuesta de los sensores era aproximadamente 30 minutos para todas las concentraciones medidas. Por lo tanto, se aumentó el espesor de las membranas. Los resultados mejoraron porque se obtuvo una respuesta lineal con el log de la actividad de Pb²⁺. Sin embargo, no se evidenció el comportamiento nernstiano. La Figura VII.4 y la Tabla VII.2 ilustran estos resultados.

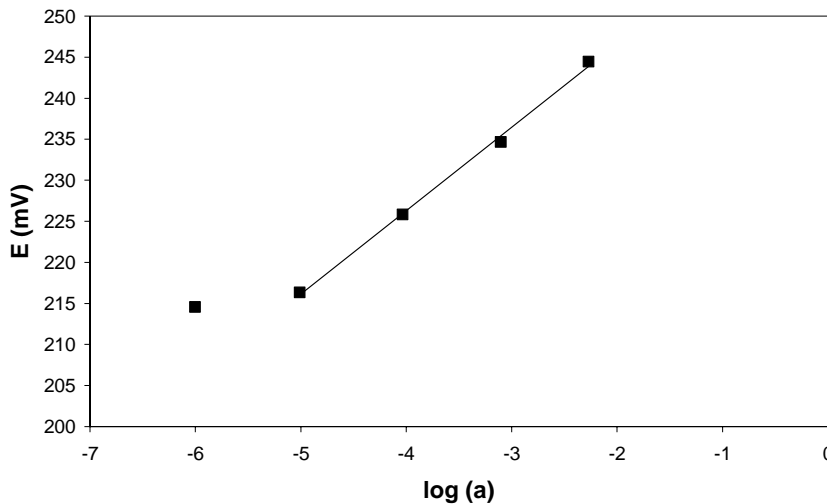


Figura VII.4: Respuesta obtenida con el sensor de Pb²⁺

Tabla VII.2: Resultado del ajuste obtenido con el sensor de Pb²⁺.

Rango de Concentración	Pendiente	R ²
10 ⁻⁵ M – 10 ⁻² M	10,8 ± 0,2	0,9963

De acuerdo con los resultados obtenidos hasta el momento para el sensor de plomo queda claro que aún no se han encontrado las condiciones óptimas de trabajo. Las variables a modificar son el espesor de la membrana y efectuar cambios en la composición de la membrana

y/o cambios en las condiciones de acondicionamiento del sensor. Este trabajo continuará siendo explorado por la alumna de la carrera de Ciencias Químicas de la UBA, Yamili Toum, quien ya ha construido un sensor bajo mi supervisión.

VII.3.3. Sensor de Ni^{2+}

En la Figura VII.5 se muestra la respuesta de dos sensores de Ni^{2+} en función del tiempo frente al agregado de alícuotas de una solución 0,1 M de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ a una solución 10^{-6} M de la sal en agua. Los electrodos fueron preparados en paralelo de manera tal de poder evaluar la reproducibilidad en la preparación de las membranas y en la respuesta de los mismos. En ambos casos se utilizó el plastificante dibutilftalato.

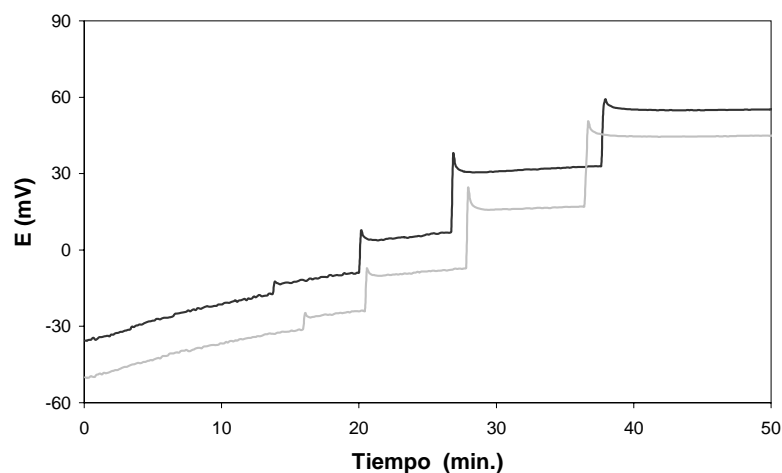


Figura VII.5: Respuesta de los sensores de Ni^{2+} frente a cambios en la concentración de la solución. (—): respuesta del sensor 1 luego de 9 días de acondicionamiento en la solución 0,5 M de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$. (—): idem para el sensor 2 luego de 7 días.

Como puede observarse, los sensores responden en forma rápida frente al cambio en la concentración alcanzando un *plateau*. Cada salto de potencial corresponde al cambio en un orden de magnitud en la concentración de Ni^{2+} .

A partir de las respuestas de cada sensor obtenidas en diferentes días se construyeron las curvas de calibración respectivas. Algunas de ellas se muestran en la Figura VII.6. Cada punto de la curva representa el valor promedio alcanzado en cada *plateau* de la Figura VII.6, graficado

en función del logaritmo de la actividad de Ni^{2+} . En la Tabla VII.3 se muestran los resultados del ajuste obtenido para las curvas de calibrado de los sensores.

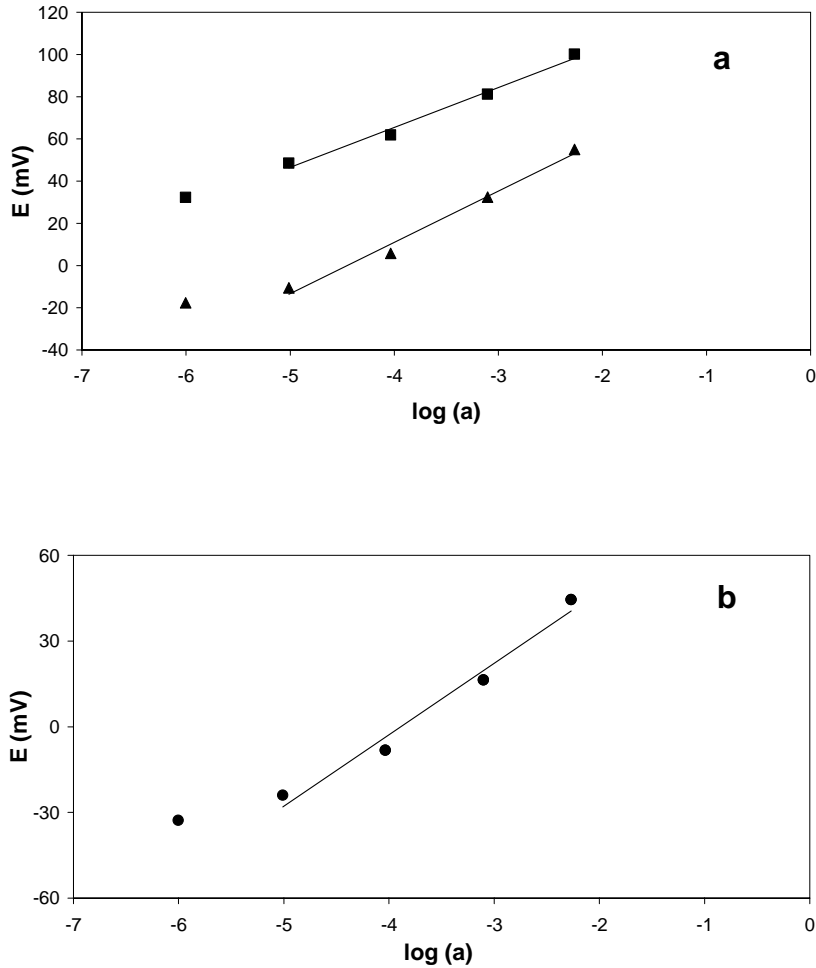


Figura VII.6: (a) Curva de calibración para el sensor 1 luego de 48hs (■), y 9 días (▲) de acondicionamiento en la solución 0,5 M de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$. (b) Idem para el sensor 2 luego de 7 días (●).

Tabla VII.3: Resultados del ajuste obtenidos con el sensor de Ni^{2+} .

Tiempo	Sensor 1		Sensor 2	
	Pendiente	R^2	Pendiente	R^2
48 hs	$20,3 \pm 0,1$	0,9901	-	-
9 / 7 días	$24,7 \pm 0,1$	0,9956	$26,3 \pm 0,1$	0,9891

Es importante el tiempo de acondicionamiento de los electrodos ya que a medida que es mayor el tiempo, la respuesta se acerca más a una

de tipo nernstiana. Los resultados son bastante satisfactorios teniendo en cuenta lo informado en la literatura para electrodos con solución interna.¹⁰

También se ensayaron membranas conteniendo el ionóforo de Ni^{2+} , pero utilizando los plastificantes tritolilfosfato y dibutil butilfosnotano.

En la Figura VII.7 se ilustra la respuesta del sensor que contenía tritolilfosfato frente a los agregados sucesivos de una solución 0,1 M de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ luego de haber sido acondicionado durante 4 días en una solución 0,5 M de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$.

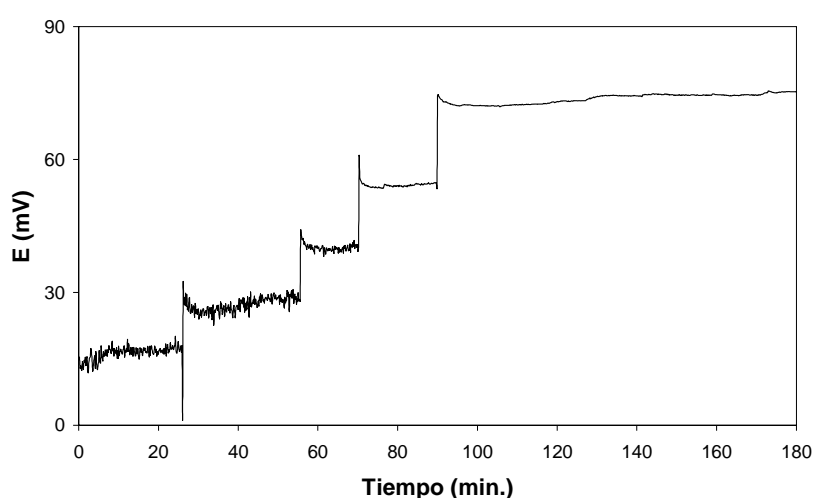


Figura VII.7: Respuesta del sensor con tritolilfosfato frente a cambios en la concentración de Ni^{2+} .

La relación señal/ruido mejora a medida que aumenta la concentración de Ni^{2+} sensada. La respuesta del sensor utilizando este plastificante también fue estudiada en función del tiempo. En la Figura VII.8 se muestran las curvas de calibrado para distintos días de acondicionamiento en la solución 0,5 M de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ y la Tabla VII.4 contiene los resultados de los ajustes de los datos presentados en la Figura VII.8.

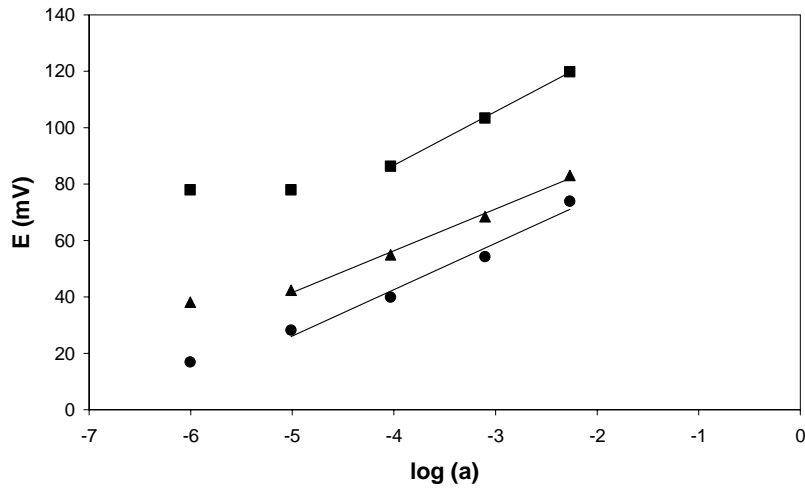


Figura VII.8: Curva de calibración para el sensor conteniendo tritolilfosfato como plastificante luego de 3 días (▲), 4 días (●) y 9 días (■) de acondicionamiento en la solución 0,5 M de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$.

Tabla VII.4: Resultados de los ajustes obtenidos con el sensor de Ni^{2+} utilizando tritolilfosfato como plastificante en la membrana de PVC.

Rango de Concentración	Días de acondicionamiento	Pendiente	R^2
$10^{-5} \text{ M} - 10^{-2} \text{ M}$	3	$14,8 \pm 0,7$	0,9951
$10^{-5} \text{ M} - 10^{-2} \text{ M}$	4	16 ± 2	0,9766
$10^{-4} \text{ M} - 10^{-2} \text{ M}$	9	$19,0 \pm 0,4$	0,9996

A partir de los resultados obtenidos con tritolilfosfato no se evidencia una mejora en la respuesta del sensor frente a la concentración de Ni^{2+} respecto del uso de dibutilftalato. Tampoco se observa una respuesta significativamente mayor con el tiempo de acondicionamiento del sensor.

Finalmente, se realizaron ensayos utilizando el plastificante dibutil butilfosfonato. A continuación se muestra la respuesta del sensor de Ni^{2+} con ese plastificante luego de 4 días de acondicionamiento en la solución 0,5 M de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$.

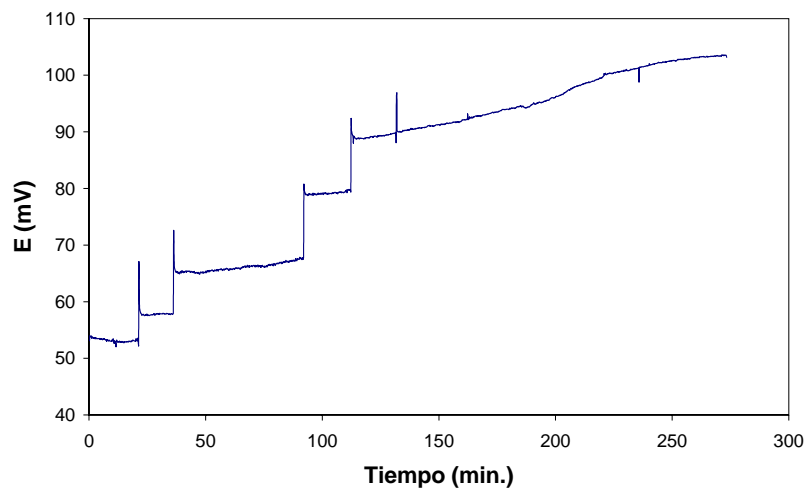


Figura VII.9: Respuesta del sensor con dibutil butilfosfonato frente a cambios en la concentración de Ni^{2+} .

En la Figura VII.10 y en la Tabla VII.5 se muestran las curvas de calibración y los resultados de los ajustes respectivos para el sensor utilizando el plastificante dibutilbutilfosfonato en función del tiempo de acondicionamiento en la solución 0,5 M de Ni^{2+} .

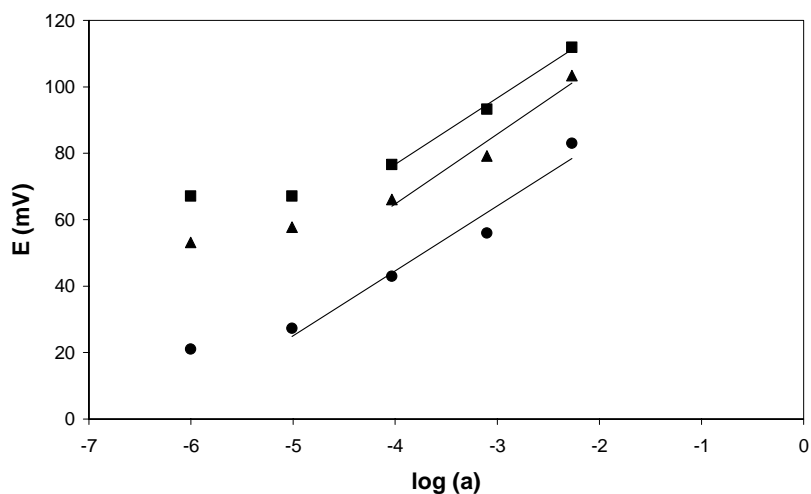


Figura VII.10: Curva de calibración para el sensor utilizando dibutil butilfosfonato como plastificante luego de 3 días (●), 4 días (▲) y 5 días (■) de acondicionamiento en la solución 0,5 M de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$.

Tabla VII.5: Resultados de los ajustes obtenidos con el sensor de Ni²⁺ utilizando tritolilfosfato como plastificante en la membrana de PVC.

Rango de Concentración	Días de acondicionamiento	Pendiente	R ²
10 ⁻⁵ M – 10 ⁻² M	3	20 ± 3	0,9607
10 ⁻⁴ M – 10 ⁻² M	4	21 ± 4	0,9597
10 ⁻⁴ M – 10 ⁻² M	5	20 ± 1	0,9962

Como puede apreciarse en los resultados obtenidos, el uso de dibutil butilfosfonato tampoco mejora la respuesta del electrodo en comparación con los resultados obtenidos con dibutilftalato, aún a mayor tiempo de acondicionamiento, a diferencia de lo informado por Singh y Bhatnagar¹⁰ para electrodos con solución interna.

VII.4. Conclusiones y Resumen del Capítulo VII

En primer lugar, los resultados obtenidos con el sensor de cobre fueron alentadores respecto del correcto diseño desarrollado en el laboratorio y motivaron la exploración de esta área de desarrollo. En cambio, los resultados con el sensor de plomo son aún preliminares y se debe continuar trabajando en la optimización de la respuesta del mismo.

El sensor de iones níquel preparado utilizando dibutilftalato como plastificante presentó una respuesta rápida frente a los cambios de concentración de Ni²⁺ y se obtuvo un comportamiento prácticamente nernstiano con un rango dinámico lineal entre 10⁻⁵ y 10⁻² M. Teniendo en cuenta que la concentración máxima permitida de iones níquel en aguas residuales es de 3,4x10⁻⁵ M y que en agua potable es de 1,7x10⁻⁵ M se puede decir que los resultados obtenidos con los sensores desarrollados son bastante satisfactorios. Tal como se indicó en las tablas, las pendientes fueron en todos los casos menores a 30 mV/década (2,303 RT/2F), que es el valor predicho por la ecuación de Nernst. La misma tendencia ha sido informada por Singh y Bhatnagar y por la responsable del servicio técnico de Sigma-Aldrich en Bélgica, mediante comunicación personal.

Se comprobó que son muchas las variables que influyen en la preparación de un buen sensor ión selectivo. Algunas de ellas son la elección correcta del ionóforo y del plastificante, la elección de las proporciones en que se encuentran presentes en la mezcla que da lugar a la membrana de PVC, el espesor de la membrana y las concentraciones de las soluciones de acondicionamiento y almacenamiento. Además, es importante que los cables del sistema de medición tengan un buen aislamiento ya que las medidas potenciométricas con estos electrodos son muy sensibles al ruido externo. También es importante tener la precaución de observar siempre antes de efectuar una medición la ausencia de burbujas sobre la superficie de la membrana.

La etapa siguiente, que se inicia con este trabajo, consistirá en estudiar la relevancia de incorporar estos sensores junto con los sensores comerciales presentes en el Flavorímetro, determinándose si la inclusión de los mismos en el arreglo de sensores mejora la discriminación entre muestras para casos de estudio determinados.

VII.5. Bibliografía

- ¹ A. Legin, A. Rudnitskaya, L. Lvova, Y. Valsov, C. Di Natale, A. DÁmico. Evaluation of Italian Wine by the Electronic Tongue Recognition, Quantitative Analysis and Correlation with Human Sensory Perception, *Anal. Chimica Acta.* 484 (2003) 33.
- ² P. Bühlmann, E. Pretsch and E. Bakker, Carrier-Based ion-selective electrodes and bulk optodes. 1. General characteristics, *Chem. Rev.* 97 (1997) 3083-3132.
- ³ P. Bühlmann, E. Pretsch and E. Bakker, Carrier-Based ion-selective electrodes and bulk optodes. 2. Ionophores for potentiometric and optical sensors, *Chem. Rev.* 98 (1998) 1593-1687.
- ⁴ A. Craggs, G. J. Moody and J.D.R. Thomas, PVC Matrix membrane ion-selective electrodes, *J. Chem. Ed.* 51 (1974) 541-544.
- ⁵ D. Zielinska, A. Gil, M. Pietraszkiewicz, O. Pietraszkiewicz, D. Van de Vijver, L.J. Nagels, Podand and macrocyclic amine receptors with urea functionalities for potentiometric detection of organic acids in HPLC, *Analytica Chimica Acta* 523 (2004) 177-184.
- ⁶ Y. Bao, J. Everaert, M. Pietraszkiewicz, O. Pietraszkiewicz, H. Bohets, H.J. Geise, B.X. Peng, L.J. Nagels, Behaviour of nucleotides and oligonucleotides in potentiometric HPLC detection, *Analytica Chimica Acta* 550 (2005) 130-136.
- ⁷ J. Sekula, J. Everaert, H. Bohets, B. Vissers, M. Pietraszkiewicz, O. Pietraszkiewicz, F. Du Prez, K. Vanhoutte, P. Prus and L. J. Nagels, Coated Wire potentiometric Detection for Capillary Electrophoresis Studied Using Organic Amines, Drugs, and Biogenic Amines, *Anal. Chem.* 78 (2006) 3772-3779.
- ⁸ B. Vissers, H. Bohets, J. Everaert, P. Cool, E.F. Vansant, F. Du Prez, J.M.Kauffmann, L. J. Nagels, Characteristics of new composite-and

classical potentiometric sensors for the determination of pharmaceutical drugs, *Electrochimica Acta* 51 (2006) 5062-5069.

⁹ S. Kamata, A. Bhale, Y. Fukunaga and H. Murata, Copper (II)-selective electrode using thiuram disulfide neutral carriers, *Anal. Chem.* 60 (1988) 2464-2467.

¹⁰ E. Malinowska, Z. Brzózka, K. Kasiura, R. J.M. Egberink, D. N. Reinhoudt, Lead selective electrodes based on thioamide functionalized calyx [4] arenas as ionophores, *Analytica Chimica Acta* 298 (1994) 253-258.

¹¹ L.P. Singh and J.M. Bhatnagar, PVC based selective sensors for Ni²⁺ ions using carboxylated and methylated porphirine, *Sensors* 3 (2003) 393-403.

¹² S. Kamata, H. Murata, Y. Kubo, A. Bhale, Copper(II)-selective membrane electrodes based on *o*-xylylene bis(dithiocarbamates) as neutral carriers, *Analyst* 114 (1989) 1029-1031.

Capítulo VIII

CONCLUSIONES GENERALES

VIII. Conclusiones Generales

Se cumplió en forma totalmente satisfactoria el objetivo principal de la tesis: explorar el uso de la metodología de Narices Electrónicas para obtener y reconocer huellas digitales de esencias de composición múltiple que se liberan desde un medio microheterogéneo. O sea, los aspectos más novedosos de la tesis consistieron en el uso de Narices Electrónicas para el análisis de estos sistemas, habiéndose podido abarcar casos de diferente naturaleza, tanto esencias de base alcohólica como *flavours* no polares incorporados en los geles de pectina. En particular se pudieron estudiar en cada caso los efectos del gel sobre la huella digital del *flavour* y seguir los cambios de dichas huellas en el tiempo.

A continuación se presenta una lista de los resultados más importantes:

Nariz Electrónica:

- ❖ Se comprobó la utilidad de la Nariz Electrónica para estudiar la liberación de las esencias a lo largo del tiempo de envejecimiento del gel.
- ❖ Se verificó que al encapsularse una esencia multicomponente, hay cambios en la huella digital del *flavor* con respecto a la huella de la esencia “libre” (no encapsulada). Esto se comprobó tanto para tuti-fruti como para los aceites esenciales, evidenciando la liberación preferencial de ciertos compuestos volátiles en los *flavours*.
- ❖ Utilizando Análisis de Componentes Principales y Análisis por Redes Neuronales, se pudieron discriminar los *flavours* provenientes de cada uno de los aceites esenciales *Tagetes Minuta* y *Poleo* encapsulados en geles de pectina.
- ❖ A través de las propiedades reológicas se estudió la evolución de los geles con tuti-fruti, observando como lo mismos varían desde una

estructura no estable a una totalmente estable en función del tiempo y cómo estos cambios son determinantes en la liberación del *flavour* detectado con la Nariz Electrónica.

- ❖ Se pudo correlacionar la disminución de la cantidad de *flavour* liberado (Nariz Electrónica) con el aumento del carácter sólido de la matriz (Reología). Por lo tanto, se obtuvo una relación directa entre los resultados de Nariz Electrónica y de Reología, informada por primera vez en la literatura, hasta nuestro conocimiento.
- ❖ El estudio preliminar que se hizo en la estación de INTA Balcarce, colocando geles de pectina cargados con aceites esenciales en presencia de abejas y ácaros, sumado a los análisis de liberación efectuados en el laboratorio, sugieren que el uso de pectinas como medio de encapsulamiento para la liberación de aceites esenciales en colmenas de abejas es promisorio.

Caracterización de las muestras:

- ❖ Se determinaron los principales grupos funcionales de la pectina por medio de espectroscopía IR.
- ❖ Se comprobó el origen cítrico de la pectina y se estimó el grado de esterificación en 60-70 % a partir del análisis de espectros de RMN ^1H y ^{13}C mono y bidimensionales.
- ❖ Se obtuvo información sobre la distribución de pesos moleculares, de grupos terminales y de unidades repetitivas en los oligómeros que forman la pectina mediante UV-MALDI-TOF. Por primera vez, se realiza este análisis partiendo de una solución de pectina nativa y utilizando *nor*-harmano como matriz.

Propiedades de los geles de pectina:

- ❖ Se puede afirmar que la naturaleza del *flavour* encapsulado influye en las propiedades reológicas de los geles debido a interacciones específicas con las cadenas de pectina.
- ❖ Se observó que a mayor concentración de pectina, disminuye el tiempo de gelificación y por ende, la transición sol-gel ocurre a tiempos menores.
- ❖ Las mediciones de microscopía óptica indicaron que los geles de limoneno se asemejan a una emulsión de aceite en agua estabilizada por el gel de pectinas. Además, se determinó que a medida que disminuye la concentración de pectina, aumenta el grado de microheterogeneidad de las muestras que contienen limoneno y Tween 80.

Sensores potenciométricos:

- ❖ Se diseñaron, construyeron y emplearon sensores potenciométricos basados en membranas de PVC soportadas sobre carbono vítreo, obteniéndose resultados satisfactorios en las mediciones de iones cobre y níquel. En particular, uno de los sensores de níquel presentó una respuesta rápida frente a los cambios de concentración de Ni^{2+} y exhibió un comportamiento prácticamente nernstiano con un rango dinámico lineal entre 10^{-5} y 10^{-2} M.

Palabras finales con respecto al uso de Narices Electrónicas

Desde el punto de vista operativo, los métodos de reconocimiento de patrones que utilizan las Narices Electrónicas comparten características con otras técnicas como espectroscopía de absorción y emisión, cromatografía gaseosa o espectrometría de masa. Por ejemplo, si se analizan 2 muestras utilizando el método de reconocimiento de

patrones y no se observan diferencias entre sus huellas, no es correcto inferir que las muestras son iguales. En efecto, puede ser que la técnica no discrimine muestras que difieren levemente en la composición. En cambio, si las huellas digitales son diferentes, entonces las muestras no pueden ser idénticas. O sea, este método “funciona por la negativa”. De hecho, cuando hay diferencias entre las huellas, éstas se pueden utilizar para clasificar muestras empleando métodos de quimiometría y análisis multivariado.

Si se pretende establecer una base de datos de huellas digitales para emplearlas en el proceso de clasificación, debe tenerse en cuenta que al usar cualquier técnica analítica, la respuesta de los instrumentos está sujeta a fluctuaciones por todos los aspectos involucrados en la instrumentación. Para cada técnica es importante determinar cuáles son las principales fuentes de error. En el caso particular de las Narices y Lenguas Electrónicas, la mayor fluctuación está en la deriva de los sensores (*drift*). En todos los métodos es necesario hacer calibraciones periódicas y/o controles de respuesta, etc. En el caso de la Nariz Electrónica, las bases de datos deben ser controladas y reconstruidas empleando sustancias de referencias, etc., prestando atención a los eventuales cambios de las huellas digitales.

En definitiva, el hecho de que las técnicas de Narices y Lenguas Electrónicas sean todavía al presente relativamente “novedosas” no debería generar mayores ni menores expectativas que las normales al usar técnicas más tradicionales de análisis (GC-MS, HPLC, FTIR, etc). Nótese que en los casos de estudio de la tesis se han efectuado diversos controles y preparado muchas réplicas de las muestras, pudiéndose demostrar el poder de la metodología de las Narices Electrónicas cuando se toman los recaudos necesarios.

APÉNDICE

APÉNDICE

A.1. Espectrometría de masas UV-MALDI-TOF

El análisis estructural de polisacáridos por espectrometría de masa presenta diversos desafíos debido al alto grado de complejidad y heterogeneidad de las muestras. En los últimos años, la espectrometría de masa MALDI se ha convertido en una herramienta muy eficaz para el análisis de oligo y polisacáridos ya que puede proveer valiosa información no sólo respecto de la distribución de pesos moleculares, sino también en diversos aspectos de la estructura de los hidratos de carbono, tal como lo ha reportado Harvey en 1999.¹ En particular, Zaia estableció que la técnica de MALDI-TOF podría ser utilizada para proveer información útil en el estudio de biopolímeros ácidos, como en el caso de las pectinas.²

Las principales ventajas de la técnica de MALDI-MS incluyen la alta sensibilidad, la aplicabilidad en moléculas que exhiben una distribución de pesos moleculares, una obtención rápida de resultados y una fragmentación aproximadamente nula de las moléculas que se están analizando.

El uso combinado del análisis por espectrometría de masa y la digestión enzimática ha hecho una contribución considerable a la caracterización estructural de polisacáridos en general y de pectinas en particular. La gran mayoría de los trabajos en los que se realiza un análisis estructural de pectinas por espectrometría de masa utilizando la técnica de MALDI o de Electrospray, el analito es la muestra hidrolizada por digestión enzimática o por efecto de un tratamiento ácido.³

A continuación se describen los resultados obtenidos por diferentes autores y las condiciones utilizadas al analizar muestras de pectina previamente hidrolizadas.

Körner *et al.* estudiaron la sensibilidad de diferentes matrices como el ácido 2,5-dihidroxibenzóico (2,5-DHB), la mezcla de 2,4,6-trihidroxi-acetofenona (2,4,6-THAP) y nitrocelulosa, la arabinosazona y el ácido 3-hidroxipicolínico en los modos positivo y negativo, con y sin etapas de desalado, para la caracterización de digeridos enzimáticos de pectina parcialmente esterificada con metanol.⁴ El mejor resultado se

logró mediante una mezcla de 2,4,6-THAP y nitrocelulosa en el modo negativo. Un año más tarde, se reportó el uso de espectrometría de masa tandem para la determinación de oligómeros esterificados con metanol provenientes de digeridos enzimáticos de pectinas.⁵ Oligogalacturonatos parcialmente esterificados con metanol hasta un grado de polimerización de 10 fueron fragmentados en la trampa iónica de un cuadrupolo. Se utilizó una cámara de disociación inducida por colisiones en una trampa de iones de un espectrómetro de masa de ionización por nanoelectrospray, con el fin de localizar residuos de ácidos galacturónicos esterificados con metanol en oligómeros. El análisis de los patrones de esterificación proveyó información acerca de la especificidad de sustrato que poseen estas enzimas pectolíticas. Por su parte, Daas *et al.* analizaron digestiones pectolíticas con MALDI con el fin de determinar el grado de polimerización y el grado de esterificación de la muestra.⁶ Lograron detectar oligómeros de ácidos galacturónicos parcialmente esterificados con metanol, provenientes del tratamiento con endopoligalacturonasa. El digerido de pectina fue analizado en el modo iónico positivo con 2,5-DHB, evidenciando la presencia de oligómeros de galacturonatos de sodio con grados de polimerización entre 2 y 12, conteniendo ésteres metílicos en los O-6. Por otra parte, Limberg *et al.* desarrollaron un método para la caracterización de pectinas a través de la determinación de ácidos galacturónicos contiguos en secuencias de bloque, producidos por digestión enzimática y analizados por MALDI TOF MS y ESI MS/MS.⁷ Tanto la endopoligalacturonasa II y la exopoligalacturonasa hidrolizan a las pectinas únicamente entre 2 ácidos galacturónicos libres. Ellos utilizaron una mezcla de 2,4,6-THAP y nitrocelulosa como matriz. Quémener *et al.* utilizaron electrospray con ionización negativa por trampa iónica (ESI-ITMS) para determinar la localización exacta de grupos acetilos en O-2 y/o O-3 de oligogalacturónidos purificados producidos por hidrólisis enzimática de pectinas.⁸ Mutenda *et al.* trabajaron en la determinación de la especificidad y la actividad de la Pectina *liasa A*, analizando digeridos de productos de catálisis enzimática sobre pectinas modelo, utilizando ESI-MS en una trampa de iones de un cuadrupolo en los modos positivo y negativo.⁹ Kester *et al.* estudiaron la acción de la metilesterasa de pectina proveniente de *Aspergillus Niger*, utilizando diferentes oligogalacturónidos

y analizaron los productos de la reacción de hidrólisis mediante cromatografía de intercambio aniónico de alta performance.¹⁰ Con el fin de localizar los grupos ésteres metílicos en los productos de reacción marcados con ¹⁸O utilizaron la técnica de ionización por electrospray. Por su parte, Rosenbohm *et al.* analizaron mediante la técnica de MALDI una muestra de pectina reducida que previamente fue sujeta a una digestión total con Poligalacturonasa II.¹¹ Trabajaron en el modo de detección negativo utilizando 2,4,6-THAP- nitrocelulosa como matriz. Guillaumie *et al.* utilizaron la técnica de MALDI para analizar los productos de ruptura de oligogalacturónidos pectínicos inmovilizados, que fueron previamente biosintetizados a través de reacciones en fase sólida.¹² Mohamed *et al.* analizaron los productos formados por digestión enzimática de una pectinas de lima y de azúcar de remolacha con el fin de determinar la especificidad de la hidrólisis de nuevas poligalacturonasas provenientes de *Trichoderma reesei* a diferentes tiempos de incubación.¹³ Utilizaron la mezcla 2,4,6-THAP-nitrocelulosa como matriz en el modo negativo. Bonnin *et al.* también trabajaron en el modo iónico negativo utilizando 2,4,6-THAP como matriz para determinar la especificidad de poligalacturonasas de *Fusarium* hacia hidrolizados de pectinas.¹⁴ También se utilizó la técnica de MALDI para estudiar los productos de la reacción de amidación de oligogalacturónidos esterificados con metanol, indicando el grado de amidación y el grado de hidrólisis de los grupos metil ésteres.¹⁵ Los espectros fueron realizados en modo positivo y utilizando la mezcla 2,4,6-THAP-nitrocelulosa como matriz. Por su parte, Simpson *et al.* utilizaron la técnica de MALDI como herramienta para asegurar la pureza y el tamaño de ácidos galacturónicos que fueron separados previamente por cromatografía de intercambio aniónico, utilizando 2,5-DHB como matriz en modo positivo.¹⁶ Por otra parte, Jacobs y Dahlman utilizaron un portamuestras cubierto con un film de Nafion para analizar alginatos, pectinas y carboximetilcelulosa partiendo de muestras hidrolizadas. Demostraron que se mejora la calidad de los espectros de masa dando señales del tipo [M-H]⁻, en comparación con superficies de oro no modificadas. En este trabajo utilizaron 2,5-DHB como matriz y no observaron diferencias en la calidad del espectro entre los métodos de sembrado de *sandwich* y de mezcla. Finalmente, Marie *et al.* propusieron en su trabajo, suprimir el uso de solventes en la

preparación de las muestras para analizar polímeros sintéticos que poseen polidispersidad.¹⁷

Otro trabajo¹⁸ muestra que la adición de sales alcalinas en un análisis de polímeros sintéticos por MALDI sirvió para cationizar los iones moleculares en polímeros polares como es el caso de polimetilmetacrilato (PMMA) u óxido de polietileno (PEO) usando ditranol y 2,5-DHB como matrices. Particularmente, en el caso de polisacáridos ácidos como las pectinas, los iones metálicos de sodio y potasio pueden formar sales con los grupos ácidos, produciendo señales múltiples, dando iones tanto positivos $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$ como negativos $[M-H]^-$ con matrices como 2,5-DHB y en algunos casos produciendo ensanchamiento de los picos.¹

A.2. Materiales y Métodos

Dosaje de Grupos Reductores

El dosaje de grupos reductores se efectuó por el método de Park y Johnson¹⁹

Reactivos Necesarios:

- 1- Solución A: ferricianuro de potasio (0,05 % p/v), almacenado en botella color caramelo.
- 2- Solución B: carbonato de sodio (0,53 %) + cianuro de potasio (0,065 %)
- 3- Solución C: sulfato amónico-férrico (1,5 g) + dodecilsulfato de sodio (SDS) (1 g) en ácido sulfúrico 0,025 M (1 L).

Procedimiento:

A una solución (0,5 mL) conteniendo 1-10 μg de galactosa, manosa, o su equivalente en polisacárido-según corresponda-, se le agregaron la solución A (0,5 mL) y la solución B (0,5 mL), mezclando después de cada adición. El tubo de ensayo se tapó con una bolita de vidrio y se calentó en baño de agua hirviendo durante 15 min. Se llevó la solución a temperatura ambiente, se agregó la solución C (2,5 mL) y se dejó durante 15 min adicionales, para permitir el desarrollo del color. Se

determinó la absorbancia a 690 nm contra un blanco realizado con agua en las mismas condiciones.

El poder reductor de la muestra se determina por referencia a una curva de calibración de galactosa –o de manosa-; el peso molecular (promedio numérico) se calculó según la siguiente ecuación:

$$M_n = \frac{m_{mtra}}{P_r} \times 180 \times d \quad (A.1)$$

donde: M_n : peso molecular promedio numérico

m_{mtra} : masa de muestra

P_r : poder reductor, expresado como masa correspondiente del monosacárido empleado en la curva de calibración

d : factor de corrección por diluciones

Matrices para MALDI-TOF MS

Los compuestos utilizados como matrices fueron obtenidos de diversas fuentes: la β -carbolina *nor*-harmano (9H-pirido[3,4-*b*]indol, PM = 168,2) y el ácido 2,5-dihidroxibenzóico (2,5-DHB, también conocido como ácido gentísico, PM = 154,1) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich, el ácido *trans*-3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (SA, ácido sinapínico, PM = 224,2) fue obtenido de Fluka y el ácido *trans*- α -ciano-4-hidroxicinámico (CHC, PM = 189,2) fue obtenido de Aldrich. Las sales NaCl, NH₄Cl y KCl fueron de grado analítico.

Estándares para Calibración

β -ciclodextrina (cicloheptaamilosa, PM = 1135,0), insulina bovina (I5500, PM = 5733,5) y microperoxidasa (MP-11) de citrocromo C (PM = 1863,608) fueron adquiridas de Sigma-Aldrich. Se prepararon soluciones de concentración 100 pmol/ μ L en soluciones de 30 % ACN/70 % agua/0,1 % TFA excepto para β -ciclodextrina, que fue disuelta en agua.

Solventes

Acetonitrilo (Sigma-Aldrich grado HPLC), ácido trifluoroacético

(TFA) (Fluka) y Metanol (Sintorgan grado HPLC) fueron utilizados sin purificación adicional. También se utilizó agua de calidad Milli-Q.

Calibración de los espectros

Se utilizó el método de calibración externa utilizando los siguientes estándares: péptidos y proteínas comerciales (microperoxidasa de citocromo C, insulina) utilizando SA como matriz en modo positivo y β -ciclodextrina con *nor*-harmano como matriz en los modos positivo y negativo. Los pesos moleculares de las matrices también sirvieron como estándares para calibración. En las Tablas A.1 y A.2 se muestran los calibrantes ensayados y las condiciones probadas para obtener un buen espectro de masa.

Tabla A.1: Calibrantes utilizados.

Calibrante	Peso Molecular	Matriz	Modo	Método
Microperoxidasa de Citocromo C	1863,608	CHC y SA	+	Mezcla / Sándwich
Insulina	5734,560	SA	+	Mezcla / Sándwich
β -ciclodextrina	1135	<i>Nor</i> -harmano	- / +	Mezcla / Sándwich
Lizosima	14522,050	SA	+	Mezcla / Sándwich
BSA	66459,791	SA	+	Mezcla / Sándwich

A continuación se muestra un esquema que indica la disposición de las muestras en el portamuestras, que fue utilizado para efectuar la calibración externa en todas las condiciones ensayadas.

P	P	P	M
P	C	P	M
P	P	P	M

Donde C: calibrante, P: muestra de pectina, M: matriz

Esquema A.1: Sembrado de la muestra, de los calibrantes y de la matriz.

Tabla A.2: Condiciones ensayadas.

Analito	Matriz	Dopante	Modo	Método
Pectina 0,5 mg/mL	<i>Nor</i> -harmano	-	-	Mezcla
	<i>Nor</i> -harmano	-	-	Sandwich
	2,5-DHB	NaCl	+	Mezcla
	2,5-DHB	NaCl	+	Sandwich
	2,5-DHB	KCl	+	Mezcla
	2,5-DHB	KCl	+	Sandwich
Pectina 5 mg/mL	<i>Nor</i> -harmano	-	-	Mezcla
	<i>Nor</i> -harmano	-	+	Mezcla
	<i>Nor</i> -harmano	-	-	Sandwich
	<i>Nor</i> -harmano	NH ₄ Cl	-	Mezcla
	2,5-DHB	-	+	Sandwich
	2,5-DHB	-	+	Mezcla
	2,5-DHB	-	-	Sandwich
	2,5-DHB	NaCl	+	Mezcla
	2,5-DHB	NaCl	+	Sandwich
	2,5-DHB	KCl	+	Mezcla
	2,5-DHB	KCl	+	Sandwich
	2,5-DHB	NH ₄ Cl	+	Mezcla
Pectina 5 mg/mL + Diálisis	<i>Nor</i> -harmano	-	-	Sandwich
Pectina 10 mg/mL	<i>Nor</i> -harmano	-	-	Mezcla
	<i>Nor</i> -harmano	-	-	Sandwich
Pectina 5 mg/mL + Hidrólisis TFA 2M	<i>Nor</i> -harmano	-	-	Sandwich
	<i>Nor</i> -harmano	-	+	Sandwich
	2,5-DHB	-	+	Sandwich
	2,5-DHB	-	-	Sandwich
Pectina 5 mg/mL + Hidrólisis + Diálisis	<i>Nor</i> -harmano	-	-	Sandwich
	<i>Nor</i> -harmano	-	+	Sandwich

Para mejor interpretación de los espectros, en la Tabla A.3 se indican los pesos moleculares de las unidades que forman el polisacárido de pectina y también el peso de cada unidad interna (deshidratada) que puede manifestarse en los espectros como masa perdida. A continuación, se indica en la Tabla A.4, la nomenclatura con la que se referirá a las distintas muestras de pectina analizadas a lo largo de la discusión.

Tabla A.3: Fórmulas y pesos moleculares de las unidades que forman las pectinas.

Unidad presente en las pectinas	Fórmula Molecular	PM	PM – H ₂ O
Ester del ácido galacturónico	C ₇ H ₁₂ O ₇	208	190
Ácido Galacturónico	C ₆ H ₁₀ O ₇	194	176
L-Ramnosa	C ₆ H ₁₂ O ₅	164	146
D-arabinosa	C ₅ H ₁₀ O ₅	150	132
D-Galactosa	C ₆ H ₁₂ O ₆	180	162

Tabla A.4: Códigos de letras con las que se referirá a las muestras analizadas.

Muestra	Tratamiento
A	Pectina 5 mg/mL
B	Pectina 5 mg/mL + Diálisis (corte 3000 Da)
C	Pectina 5 mg/mL + Hidrólisis TFA 2 M
D	Pectina 5 mg/mL + Hidrólisis TFA 2 M + Diálisis (corte 1000 Da)

A.3. Resultados y Discusión

Análisis de la pectina nativa

En primer lugar, se determinó el peso molecular promedio de la muestra por el método colorimétrico de Park y Johnson, que indicó un resultado cercano a 6000 Da. Sin embargo, este método sólo refleja un valor promedio del número de extremos terminales reductores presentes

en una muestra. Por lo tanto, se efectuaron los análisis de espectrometría de masa para estudiar más en detalle la estructura del polisacárido. Se realizó una comparación entre los resultados obtenidos al realizar distintos tratamientos de la muestra, al utilizar distintas condiciones y distintas matrices. El uso de β -carbolinas como matrices para hidratos de carbono neutros fue propuesto por Nonami *et al.* en 1998 y su utilización fue exitosa en el análisis de xilomananos sulfatados.^{20,21,22} Por lo tanto, en este trabajo se ensayó el uso de *nor*-harmano en modo positivo sobre la muestra nativa. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura A.1.

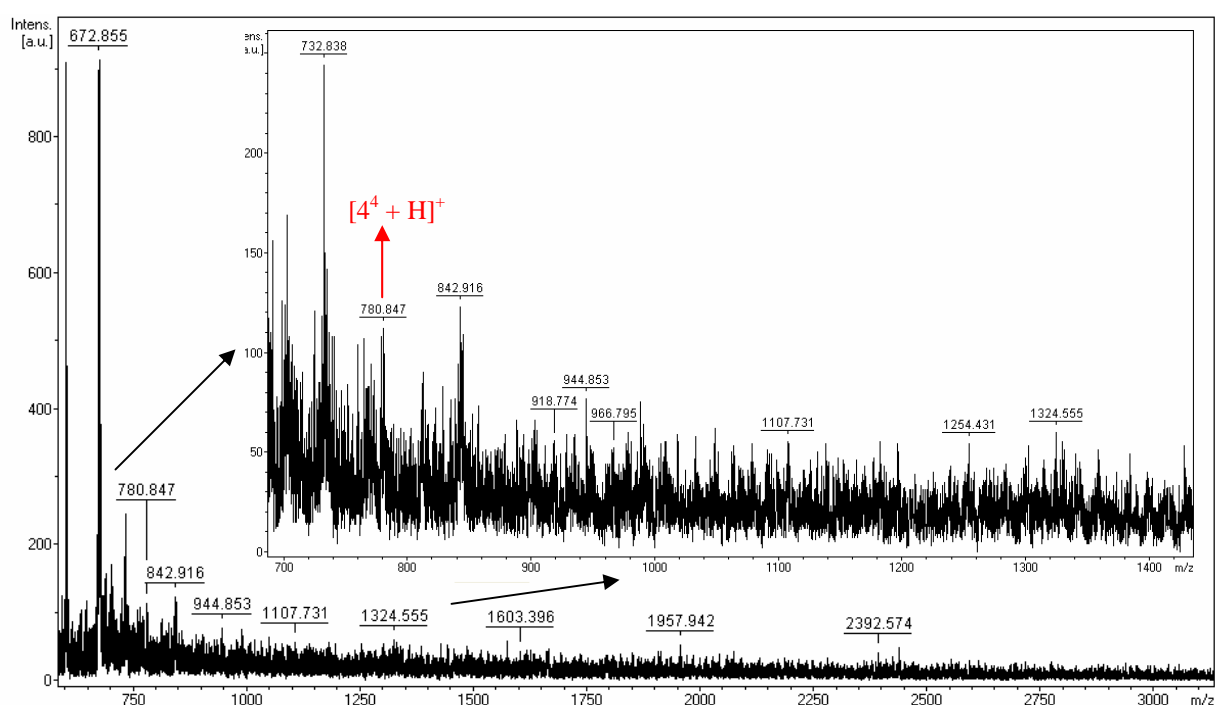


Figura A.1: Espectro de pectina nativa usando *nor*-harmano en modo positivo.

Tal como se observa, este espectro no presenta señales claras ni resueltas, por lo que no se puede extraer información en estas condiciones. Por lo tanto, con el fin de comparar estos resultados con aquellos utilizando 2,5-DHB como matriz, se analizó nuevamente la muestra de pectina nativa en el modo positivo, dado que el uso de 2,5-DHB fue exitoso en el análisis de oligómeros pectínicos con 12 residuos galacturónicos. Los resultados se muestran en la Figura A.2.

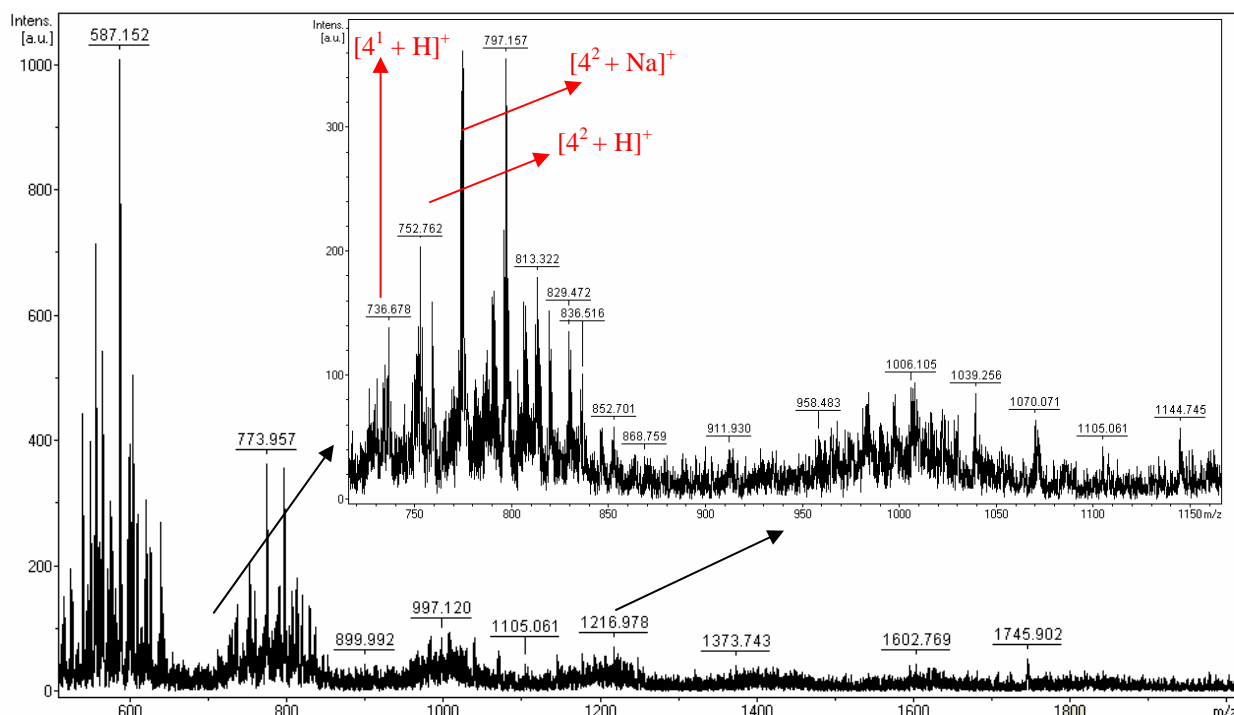


Figura A.2: Espectro de pectina nativa usando 2,5-DHB en modo positivo.

Como se puede observar, el espectro del analito aparece montado sobre las señales correspondientes a la matriz (m/z : 501,7; 523,5; 551,5; 621,3; 648,6; 691,6; 731,3; 769,4; 792,5; 907,8; 949,5). Una de las desventajas de esta matriz es que forma clusters de alto m/z (hasta 1000) y sus señales aparecen superpuestas con las del analito. Sin embargo, el ácido gentísico es más eficiente en el proceso de desorción en modo positivo en comparación con *nor*-harmano en ese modo. Otra mejoría respecto del análisis con *nor*-harmano en modo positivo es que se distinguen señales hasta m/z 1745. Todas las señales presentes en este espectro como $[M + H]^+$ o como $[M + Na]^+$ también pueden observarse en el espectro de A con *nor*-harmano en modo negativo como $[M - H]^-$.

Dado que el análisis combinado del modo positivo y negativo provee más información que el uso de simplemente uno de ellos,⁹ se realizó el espectro de masa de la muestra nativa utilizando nuevamente *nor*-harmano como matriz pero esta vez efectuando el análisis en modo negativo, cuyos resultados se muestran en la Figura A.3.

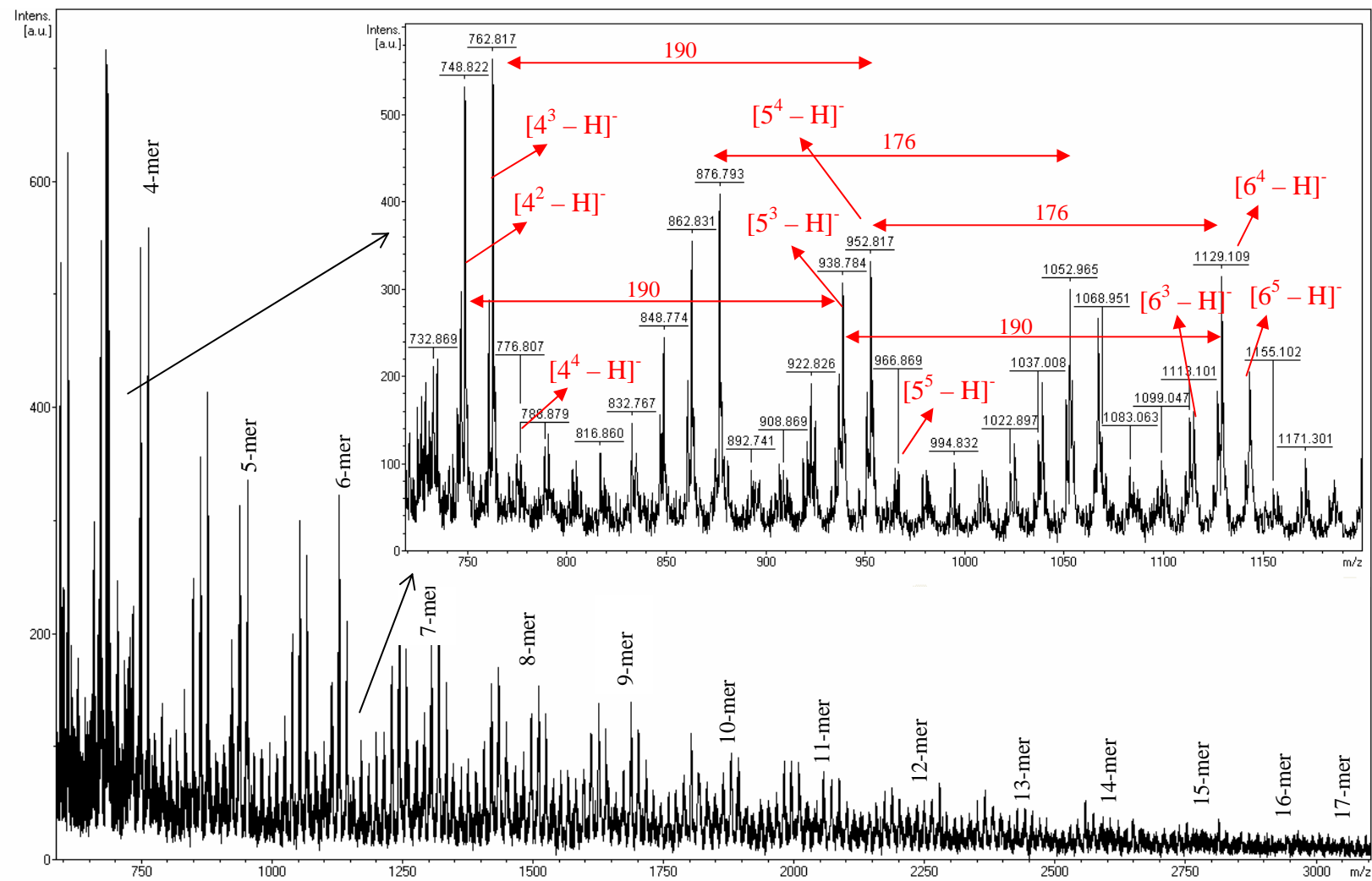


Figura A.3: Espectro de pectina nativa usando *nor*-harmano en modo negativo

Como se puede observar, el espectro provee información valiosa acerca de la distribución de pesos moleculares, de grupos terminales y de unidades repetitivas en oligómeros. Todas las señales presentes en este espectro corresponden a especies $[M - H]^-$. Se observan distancias de 190 y 176 Da entre las señales más intensas, asociadas al peso molecular de una unidad interna de ácido galacturónico esterificado y de un ácido galacturónico interno respectivamente. Se pueden identificar señales asociadas al monómero de ácido galacturónico y hasta los oligómeros de 21 unidades. Los picos más intensos del espectro corresponden a los oligómeros con mayores grados de metoxilación. Mediante una inspección minuciosa de cada región de m/z , se observan oligómeros metilados desde el tetrámero hasta el oligómero de 21 unidades. Entre los de menor número de unidades se hallaron* el 2², el 3¹ y el 3², mientras que para los oligómeros metilados de mayor peso molecular se identificaron los siguientes oligómeros: 13⁰-13¹¹; 14⁰-14⁹; 15⁰-15⁸; 16⁰-16¹²; 17⁰-17¹⁴; 18¹-18¹⁶. Las formas metiladas encontradas para los oligómeros de 19, 20 y 21 unidades fueron las siguientes: 19¹⁰, 19¹⁴, 19¹⁷, 20⁵, 20⁷, 20¹⁰, 20¹², 20¹⁵, 21⁶, 21⁹, 21¹⁶, 21¹⁸ (fuera de escala en el espectro de la Figura A.4).

Por otra parte, para cada grado de polimerización, las especies con mayor intensidad en el espectro corresponden a grados de metilación entre 60 y 70 %, concordante con el porcentaje obtenido por RMN.

En estas condiciones fue posible identificar claramente señales cercanas a m/z 4000, equivalentes a un grado de polimerización de 21 unidades. Por otra parte, la resolución de los picos es mejor en este espectro que en el obtenido con 2,5-DHB en modo positivo. Asimismo, las señales menos intensas en este espectro son las más intensas en el espectro de A con 2,5-DHB en modo positivo y viceversa. Por lo tanto, se repitió el análisis con 2,5-DHB pero cambiando nuevamente el modo de detección.

El espectro de la muestra nativa analizada en modo negativo con 2,5-DHB se muestra en la Figura A.4. El espectro en modo negativo es mucho más limpio que en modo positivo con esta matriz. Se observan

* X^m: X es el número de unidades de ácido galacturónico que forman el oligómero identificado; m es el número de metoxilos de los grupos éster presentes en cada oligómero. Esta nomenclatura es utilizada en la literatura.

distancias entre señales significativas, asociadas al peso molecular de una unidad interna de ácido galacturónico (177 Da) y a un ácido galacturónico esterificado interno (190 Da). El máximo m/z que se obtiene es 1059. En comparación con el espectro con *nor*-harmano en modo negativo, el número de señales que se observa es inferior y a su vez, están contenidas en el espectro de la Figura A.2. Por lo tanto, el espectro de A con *nor*-harmano en modo negativo abarca toda la información del espectro de A con 2,5-DHB en modo negativo.

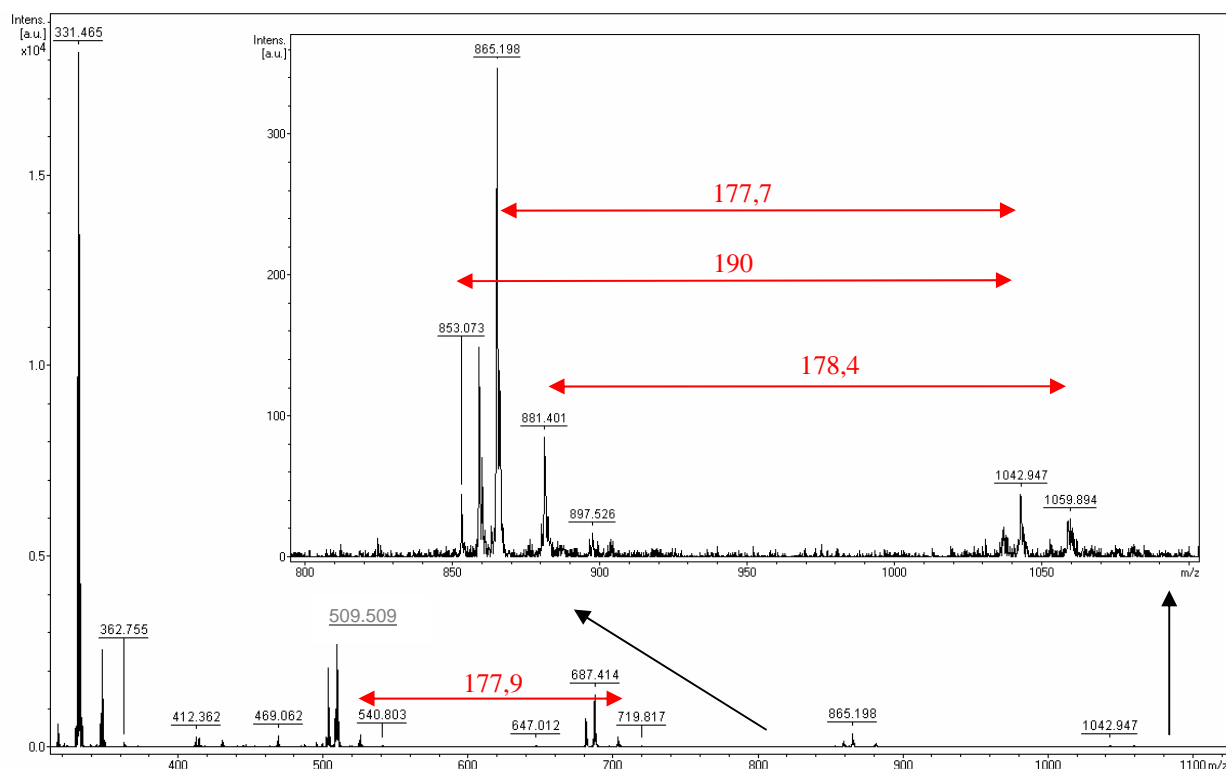


Figura A.4: Espectro de pectina nativa usando 2,5-DHB en modo negativo.

Para estudiar las consecuencias de realizar una diálisis de la muestra contra una membrana de corte 3000, se registró un espectro utilizando *nor*-harmano como matriz en modo negativo (Figura A.5).

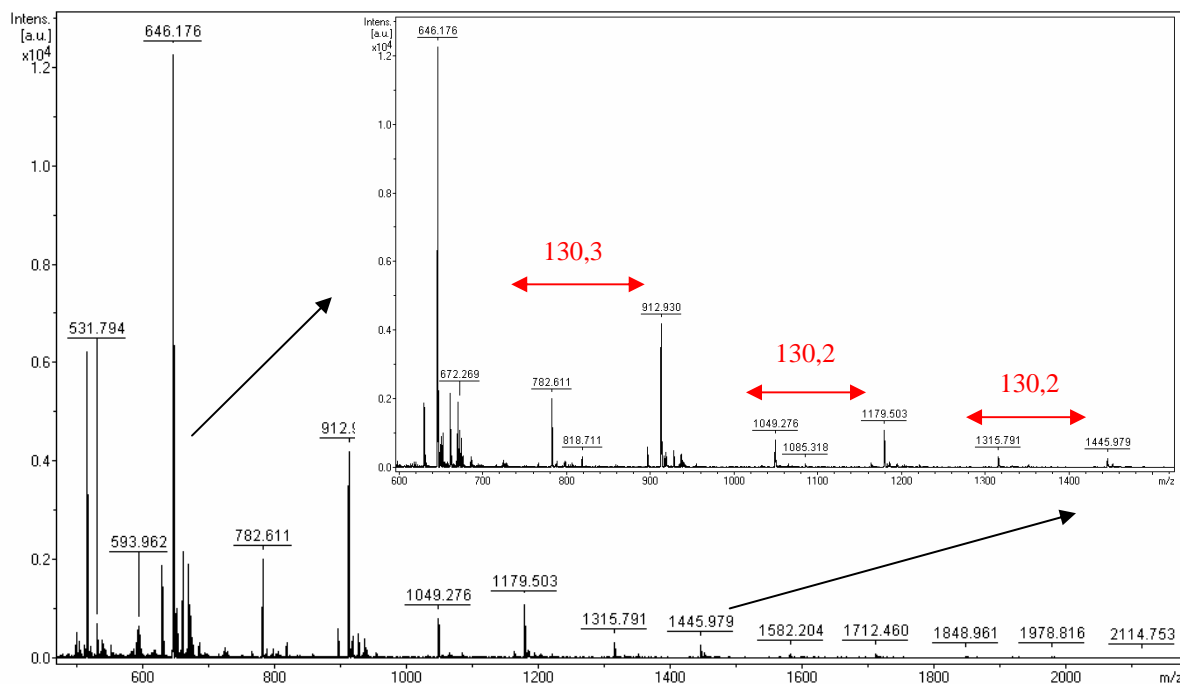


Figura A.5: Espectro de pectina dializada usando *nor*-harmano en modo negativo.

Nuevamente, se observa que todas las señales allí presentes también se pueden encontrar, aunque con intensidad mucho menor, en el espectro de A con *nor*-harmano en modo negativo. Se observa una distribución de oligómeros distanciados en 130 Da formados fundamentalmente por pentosas, con grado de polimerización desde 4 hasta 16, que podrían adjudicarse a cadenas de arabinosa teniendo en cuenta los resultados obtenidos por RMN. Por otra parte, el espectro presenta señales hasta m/z 2114.

Análisis de la pectina hidrolizada

Con el fin de comparar los resultados obtenidos utilizando como analito la muestra nativa con aquellos generados a partir de la muestra hidrolizada se efectuó un tratamiento ácido con TFA y se analizaron los productos. Luego de efectuar este tratamiento, se ensayaron distintas condiciones para la obtención de los espectros de masa, comenzando por el uso de *nor*-harmano como matriz y operando en modo negativo tal como se muestra en la Figura A.6.

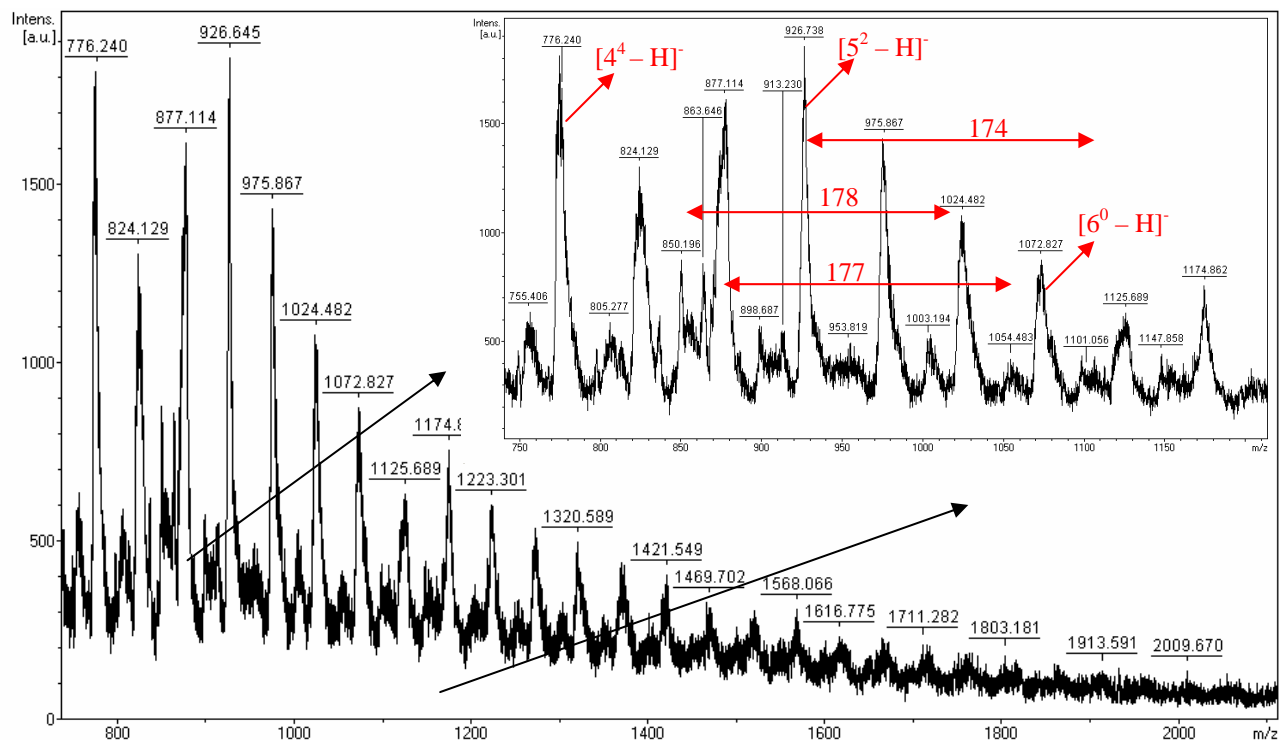


Figura A.6: Espectro de pectina hidrolizada con *nor*-harmano en modo negativo.

Nuevamente, todas las señales que aparecen en el espectro se encuentran contenidas en el espectro de A con *nor*-harmano en modo negativo; excepto las relaciones m/z más pequeñas entre 222 y 676. Estas señales corresponden a las señales de baja intensidad en el espectro de A con *nor*-harmano en modo negativo que evidentemente se distinguen con más intensidad luego de haber sido efectuada la hidrólisis ácida. Como se muestra en la figura, se distinguen distancias cercanas a 176 (debido al ancho de las señales) asociadas a unidades de ácido galacturónico. En este espectro las señales no poseen una muy buena resolución y se hasta m/z 2300.

Dado que a la muestra hidrolizada se le efectuó una diálisis con una membrana de corte de 1000 Da, la misma fue analizada con *nor*-harmano en modo negativo. Tal como se observa en la Figura A.7, en este espectro se extrae la misma información que en el caso anterior con la única salvedad que presenta señales más limpias hasta m/z 1717.

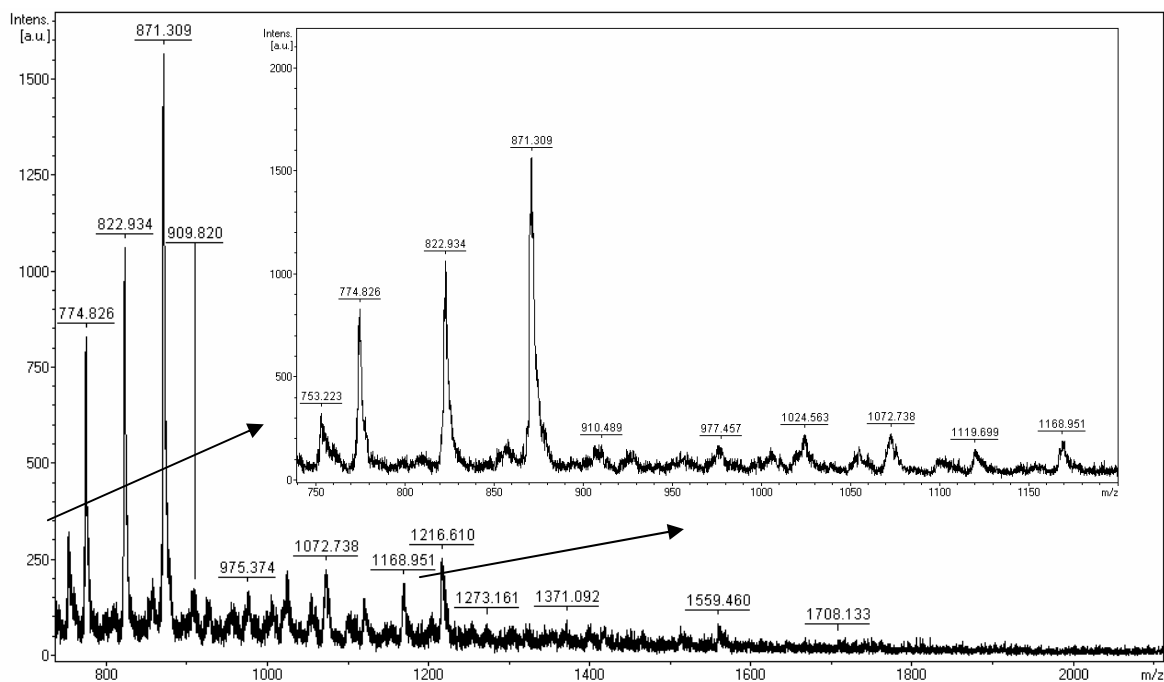


Figura A.7: Espectro de pectina hidrolizada y dializada usando *nor*-harmano en modo negativo.

Con fines comparativos, se realizó un espectro de C en modo negativo con 2,5-DHB. Estos resultados se muestran en la Figura A.8.

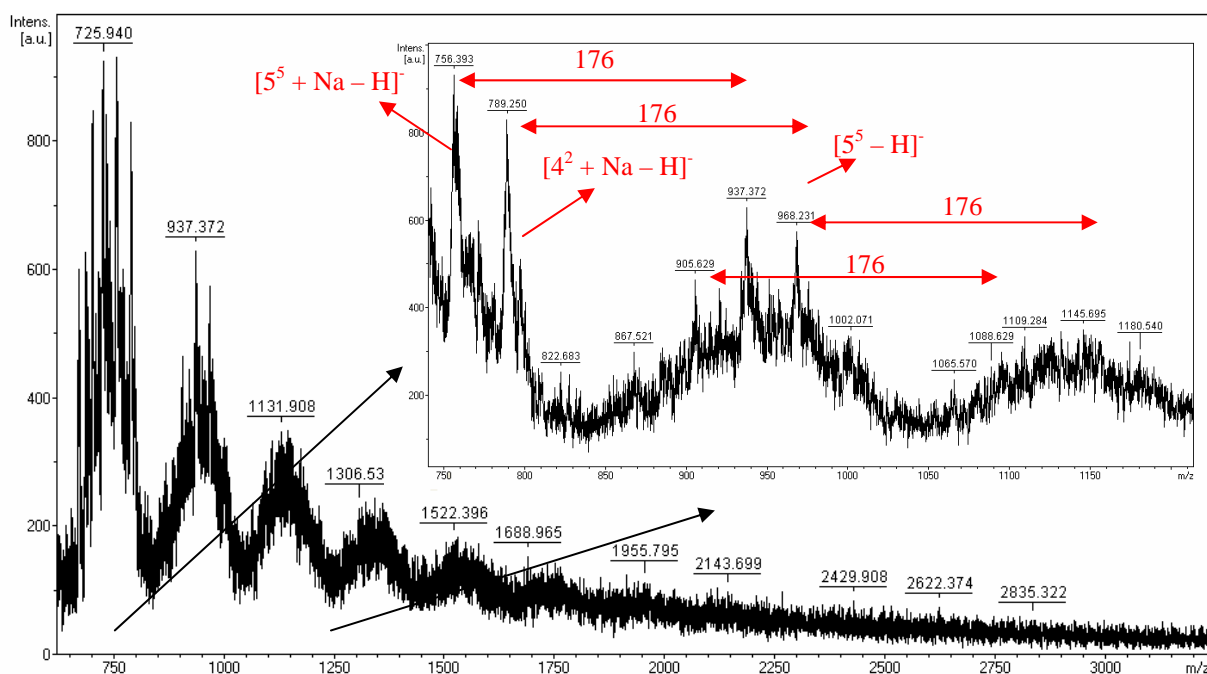


Figura A.8: Espectro de pectina hidrolizada usando 2,5-DHB en modo negativo.

En comparación con el espectro de C con *nor*-harmano en modo negativo, las señales del espectro con 2,5-DHB alcanzan un valor final menor de m/z cercano a 2100 y presentan menor resolución. Esto último se debe a que las señales correspondientes al analito están superpuestas con las señales de la matriz. Por otra parte, algunas señales también están presentes en el espectro de C con *nor*-harmano en modo negativo y su mayoría se observan también en el espectro de A con *nor*-harmano en modo negativo así como también se identifican muchas de estas señales en el espectro de A con 2,5-DHB en modo negativo y en modo positivo.

También se efectuó el espectro de la muestra hidrolizada de pectina utilizando nuevamente 2,5-DHB pero en modo lineal positivo. Como se puede apreciar en la Figura A.9, este espectro provee más información que el mismo en modo de detección negativo. Se obtienen m/z mayores, cercanas a 3000. Hay señales que también están presentes en los espectros de C con 2,5-DHB en modo negativo como $[M + Na - H]^-$ o $[M - H]^-$ y de A con 2,5-DHB en modo positivo como $[M + Na]^+$ o $[M + H]^+$.

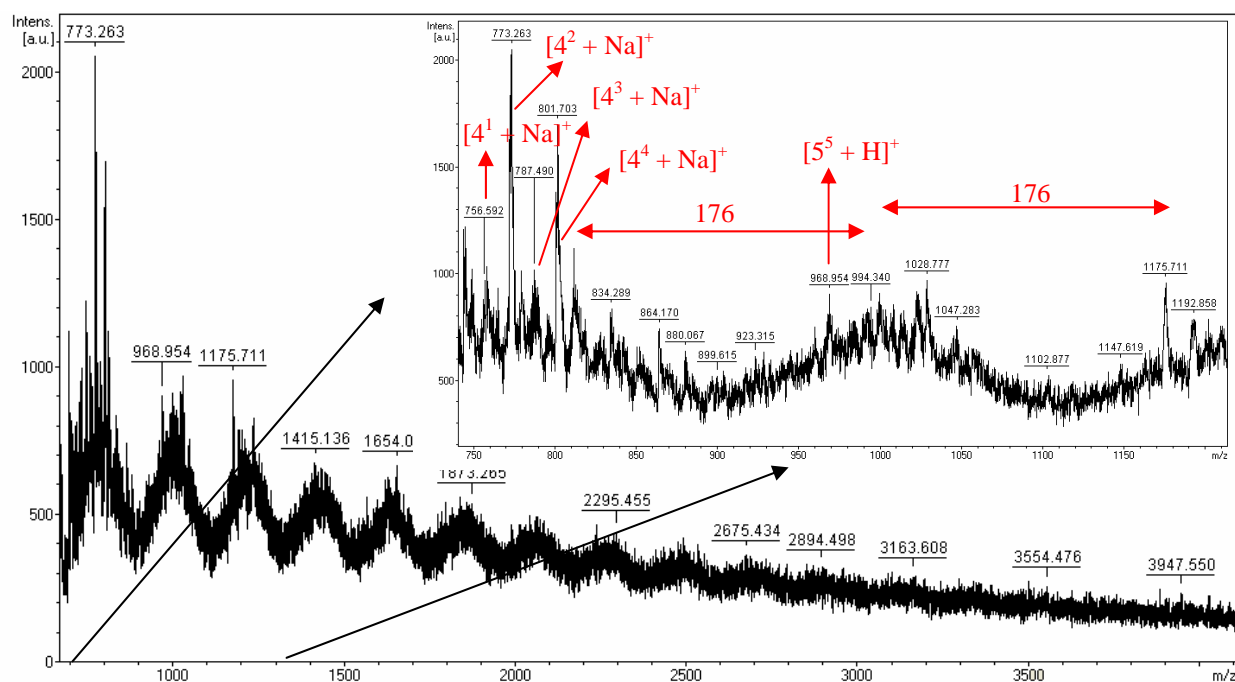


Figura A.9: Espectro de pectina hidrolizada usando 2,5-DHB en modo positivo.

Continuando con el análisis en modo positivo, se ensayó la muestra C con *nor*-harmano (Figura A.10).

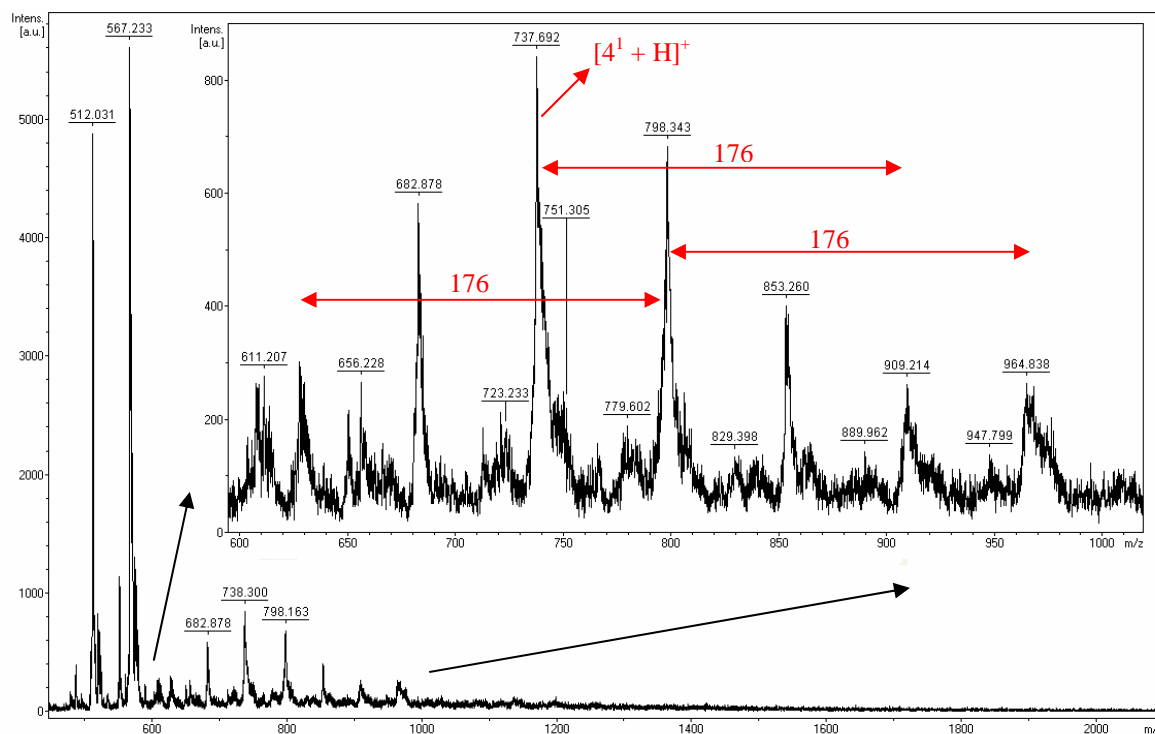


Figura A.10: Espectro de pectina hidrolizada usando *nor*-harmano en modo positivo.

La mayoría de las señales que aquí se observan, están presentes en el espectro de A con *nor*-harmano en modo negativo aunque también hay otras nuevas. Hay picos que en este espectro son importantes y que en el espectro equivalente de C en modo negativo son de poca intensidad. En el rango de m/z entre 600 y 1000 el espectro es más limpio que para la muestra C con 2,5-DHB en modo positivo y además provee información complementaria respecto de este último. Sin embargo, para masas mayores a 1000 Da el espectro de C con 2,5-DHB en modo positivo es mejor. Un porcentaje pequeño de las señales también están presentes en el espectro de C con *nor*-harmano en modo negativo. Se distinguen señales hasta m/z 1400.

Utilizando *nor*-harmano como matriz en modo positivo, se analizó la muestra D (Figura A.11). El espectro presenta la misma información que la Figura A.10, con la diferencia que en modo positivo, es mayor el

ruido del espectro y peor la resolución de las señales. Algunas de estas señales están presentes en el espectro de C con *nor*-harmano en modo positivo y su mayoría están presentes en el espectro de A con *nor*-harmano en modo negativo. Se distinguen señales hasta m/z cercanas a 1420.

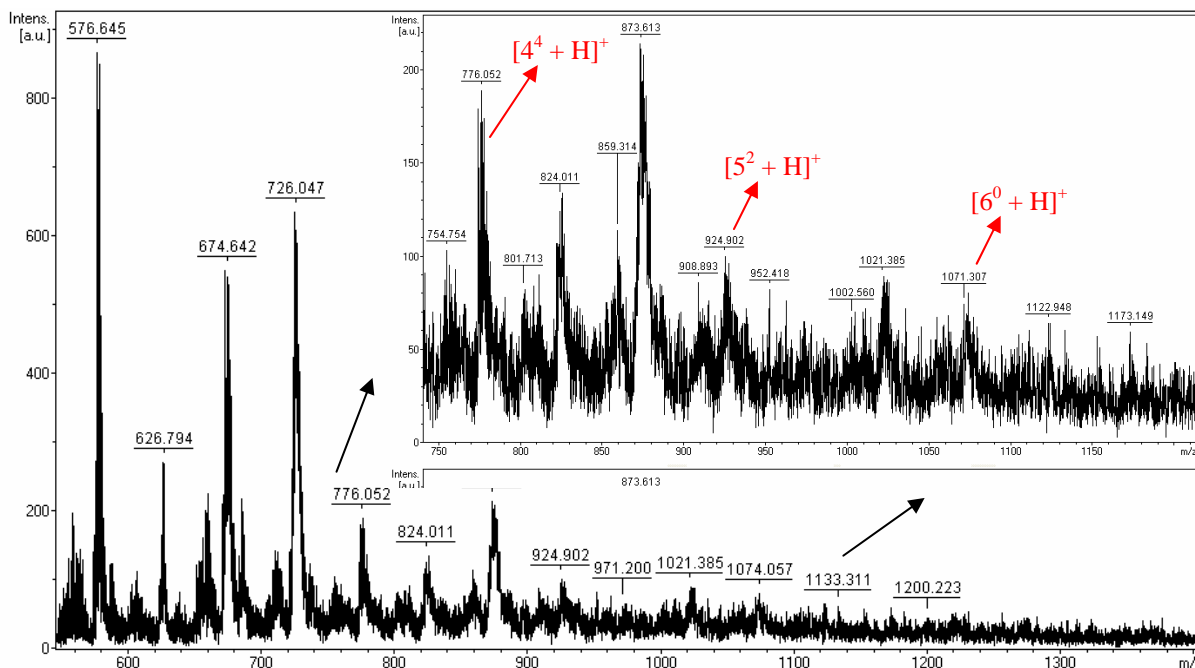


Figura A.11: Espectro de pectina hidrolizada y dializada usando *nor*-harmano en modo positivo.

Análisis de la pectina dopada con sales

En general, el análisis de hidratos de carbono por MALDI suele ser más susceptible a la presencia de sales que el análisis de proteínas. Algunos autores sugieren que en presencia de sales contaminantes, los polisacáridos dan espectros de calidad pobre por lo que incluyen en su análisis una etapa de desalado de la muestra.^{3,6} Sin embargo, otros autores consideran que el agregado de sales puede contribuir beneficiosamente en la dilucidación de las señales presentes en el espectro.²¹ Por ejemplo, Hao *et al.* realizaron experimentos sobre azúcares en presencia de iones potasio y sodio y también analizaron el comportamiento de las matrices en presencia de estas sales.²³ Utilizaron

como matrices el 2,5-DHB, el SA y el ácido α -ciano-4-hidroxil cinámico (CHCA). Ellos observaron la aparición de iones $[M+Na]^+$ y $[M+K]^+$ en el modo iónico positivo mientras que no obtuvieron señales apreciables en el modo negativo. Reportaron que en el modo positivo y utilizando 2,5-DHB, se obtenía la mejor reproducibilidad, mejor relación señal/ruido y un mejor efecto de supresión de matriz. Por lo tanto, continuando con la exploración de las condiciones para obtener la caracterización estructural de las pectinas y en base a la información bibliográfica, se ensayó la muestra nativa de pectina dopada con diversas sales inorgánicas y en diferentes condiciones. En primer lugar, se muestra en la Figura A.12, el espectro de A en presencia de NaCl y utilizando el ácido genticónico como matriz.

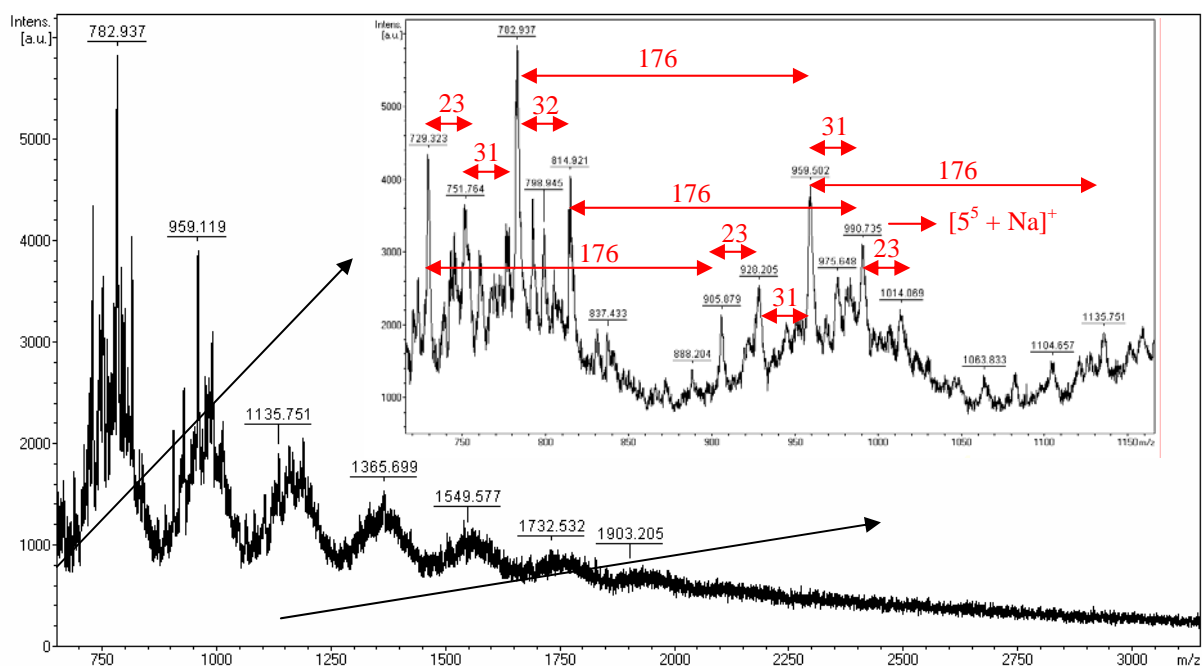


Figura A.12: Espectro de pectina nativa usando 2,5-DHB y NaCl en modo positivo.

Muchas de las señales están presentes en el espectro de A con *nor*-harmano en modo negativo pero en este caso el máximo valor m/z se halla en torno a 1900. Por otro lado, muchas de las señales están presentes en el espectro de A con 2,5-DHB en modo positivo pero con peor resolución para m/z menores a 900 y mejor resolución para m/z entre 900 y 1700. Por lo tanto, en estas condiciones no se mejora la

calidad del espectro resultante respecto del que se obtiene en las condiciones de la Figura A.2. Las señales que también aparecen en el espectro de A con 2,5-DHB, se identifican por su corrimiento en 23 Da correspondiente a iones $[M + Na]^+$ mientras que las diferencias de 31 y 32 se deben a iones $[M - CH_3O]^+$ y $[M - CH_3OH]^+$ provenientes del grupo éster de los ácidos galacturónicos. Estas condiciones habrían favorecido la fragmentación de moléculas con pérdida de metanol. Las señales que están separadas por 176 corresponderían a oligómeros que difieren en una unidad de ácido galacturónico.

Para comparar con el dopaje con sodio, se muestra en la Figura A.13 el efecto del dopaje con KCl sobre la muestra nativa de pectina y utilizando nuevamente 2,5-DHB como matriz en modo positivo.

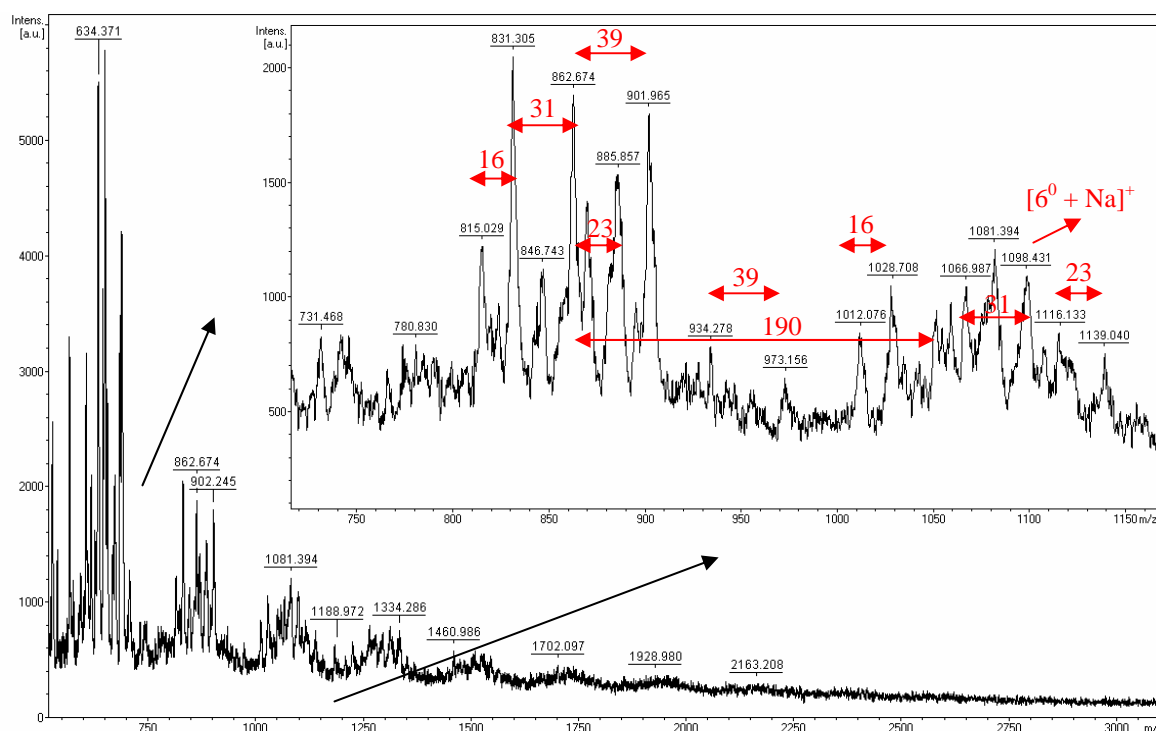


Figura A.13: Espectro de pectina nativa usando 2,5-DHB y KCl en modo positivo.

Si se compara con espectros anteriores, todas las señales están presentes en el espectro de A con 2,5-DHB en modo positivo y se identifican por una diferencia de 39 Da correspondiente a $[M + K]^+$. Aquellas presentes en el espectro de A con 2,5-DHB y dopado con NaCl en modo positivo se identifican por estar desplazadas en 16 Da, que es la

diferencia entre las masas de K y de Na. El corrimiento de las señales en 16 Da confirma que los picos observados en el espectro de A con 2,5-DHB y NaCl corresponden al analito. Como explican Hao *et al.*, el intervalo característico de 16 Da entre iones $[M+Na]^+$ y $[M+K]^+$, permite su reconocimiento, siendo los iones Na^+ y K^+ beneficiosos para la determinación de pesos moleculares en oligosacáridos. El espectro presenta buena resolución para masas entre 800 y 1600 y alcanza valores m/z hasta 2000.

Finalmente, se ensayó el uso de NH_4Cl en presencia tanto de *nor*-harmano en modo negativo como de 2,5-DHB en modo positivo. Se ensayaron sólo estas combinaciones matriz-modo de detección dado que una de las conclusiones obtenidas de los casos anteriores fue que: a) la resolución de las señales del analito en presencia del ácido genticico era mejor en modo positivo, mientras que b) utilizando *nor*-harmano como matriz, la calidad del espectro mejoraba en modo negativo. La Figura A.14 muestra el primer ensayo utilizando NH_4Cl .

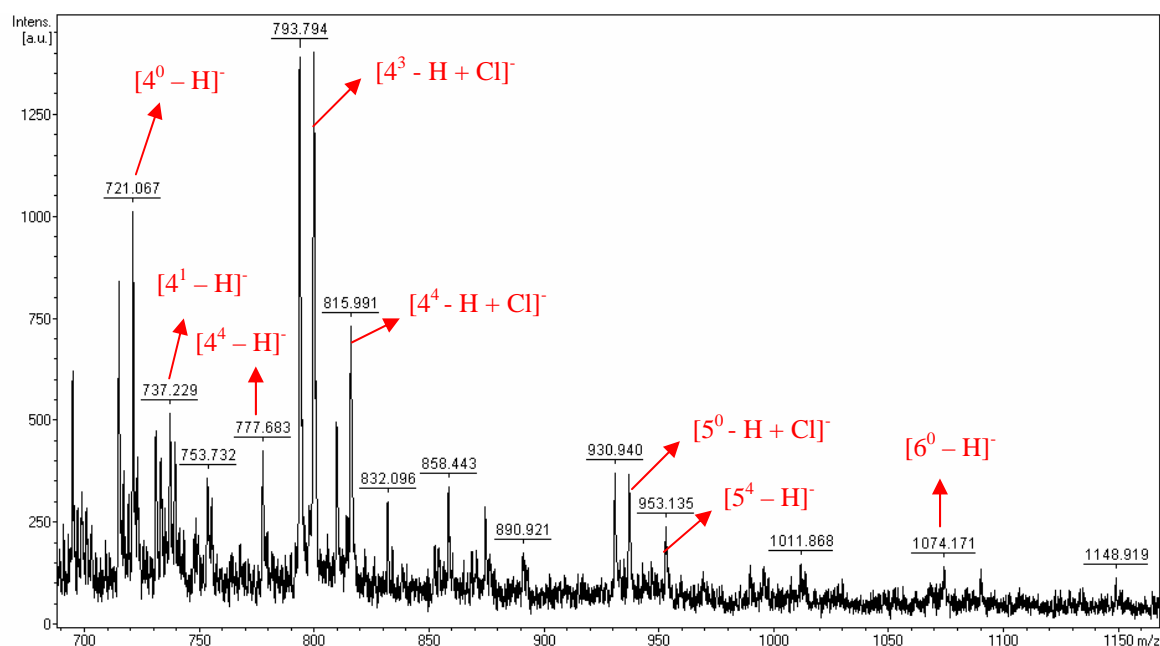


Figura A.14: Espectro de pectina nativa usando *nor*-harmano y NH_4Cl en modo negativo.

El espectro obtenido es más limpio que en ausencia de NH_4Cl pero presenta menor cantidad de señales. Muchas de las señales están contenidas en el espectro sin NH_4Cl . Se distinguen distancias de 175 y

132, así como también señales correspondientes a los iones $[M-H+Cl]^-$. Por otra parte, se pueden identificar claramente oligómeros de hasta 6 unidades ya que se alcanzan relaciones m/z cercanas a 1300. Teniendo en cuenta resultados previos descritos por Suzuki *et al.*, las señales presentes podrían estar asociadas a azúcares neutros.²⁴

En la Figura A.15 se muestra el espectro utilizando 2,5-DHB en modo positivo. Como puede observarse, algunas de estas señales también están presentes en el espectro de A con *nor*-harmano y NH_4Cl en modo negativo. Se observan diferencias de masa de 205 posiblemente correspondiente al éster metilado del ácido galacturónico. Sin embargo, no se observan diferencias de 132 como en el caso anterior. En este caso se obtienen señales hasta m/z 1745.

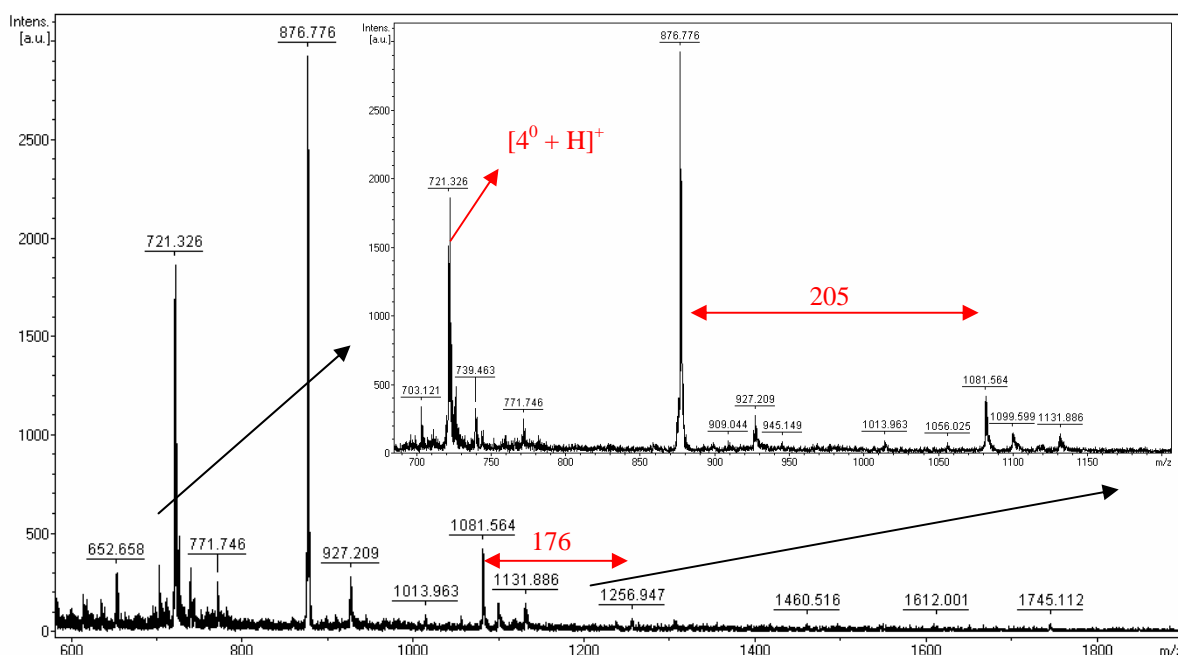


Figura A.15: Espectro de pectina nativa usando 2,5-DHB y NH_4Cl en modo positivo.

A.4. Bibliografía

¹ D. J. Harvey, Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates, *Mass Spectrom. Rev.* 18 (1999) 349-451.

² J. Zaia, Mass spectrometry of oligosaccharides, *Mass Spectrom. Rev.* 23 (2004) 161-227.

³ A. Jacobs and O. Dahlman, Enhancement of the quality of MALDI mass spectra of highly acidic oligosaccharides by using a nafion-coated probe, *Anal. Chem.* 73 (2001) 405-410.

⁴ R. Körner, G. Limberg, J. D. Mikkelsen and P. Roepstorff, Characterization of enzymatic pectin digests by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 33 (1998) 836-842.

⁵ R. Körner, G. Limberg, T. Christensen, J. D. Mikkelsen and P. Roepstorff, Sequencing of partially methyl-esterified oligogalacturonates by Tandem mass spectrometry and its use to determine pectinase specificities, *Anal. Chem.* 71 (1999) 1421-1427.

⁶ P. Daas, P. Arisz, H. Schols, G. De Ruiter and A. Voragen, Analysis of partially methyl-esterified galacturonic acid oligomers by high-performance anion-exchange chromatography and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 257 (1998) 195-202.

⁷ G. Limberg, R. Körner, H. C. Buchholt, T. Christensen, P. Roepstorff, J. Dalgaard Mikkelsen, Quantification of the amount of galacturonic acid residues in blocksequences in pectin homogalacturonan by enzymatic fingerprinting with exo- and endo-polygalacturonase II from *Aspergillus niger*, *Carbohydr. Res.* 327 (2000) 321-332.

⁸ B. Quémener, J.C. Cabrera Pino, M.-C. Ralet, E. Bonnin and J.F. Thibault, Assignment of acetyl groups to O-2 and/or O-3 of pectic oligogalacturonides using negative electrospray ionization ion trap mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 38 (2003) 641-648.

⁹ K. E. Mutenda, R. Körner, T. M. I. E. Christensen, J. Mikkelsen, P. Roepstorff, Application of mass spectrometry to determine the activity and specificity of pectin lyase A, *Carbohydr. Res.* 337 (2002) 1217-1227.

¹⁰ H. C. M. Kester, J. A. E. Benen, J. Visser, M. E. Warren, R. Orlando, C. Bergmann, D. Magaud, D. Anker and A. Doutheau, Tandem mass spectrometric analysis of *Aspergillus Niger* pectin methyl-esterase: mode of action on fully methyl-esterified oligogalacturonates, *Biochem. J.* 346 (2000) 469-474.

¹¹ C. Rosenbohm, I. Lundt, T. M. I. E. Christensen, N. W. G. Young, Chemically methylated and reduced pectins: preparation, characterisation by ¹H NMR spectroscopy, enzymatic degradation, and gelling properties, *Carbohydr. Res.* 338 (2003) 637-649.

¹² F. Guillaumie, J. D. Sterling, K. J. Jensen, O. R. T. Thomas, D. Mohnen, Solid-supported enzymatic síntesis of pectic oligogalacturonides and their analysis by MALDI-TOF mass spectrometry, *Carbohydr. Res.* 338 (2003) 1951-1960.

¹³ S. A. Mohamed, T. M. I. E. Christensen, J. D. Mikkelsen, New polygalacturonases from *Trichoderma reesei*: characterization and their specificities to partially methylated and acetylated pectins, *Carbohydr. Res.* 338 (2003) 515-524.

¹⁴ E. Bonnin, A. Le Goff, R. Körner, J. Vigouroux, P. Roepstorff, J.-F. Thibault, Hydrolysis of pectins with different degrees and patterns of methylation by the endopolygalacturonase of *Fusarium moniliforme*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1596 (2002) 83-94.

-
- ¹⁵ G.-J. W. M. van Alebeek, H. A. Schols, A. G. J. Voragen, Amidation of methyl-esterified oligogalacturonides: examination of the reaction products using MALDI-TOF MS, *Carbohydr. Polym.* **46** (2001) 311-321.
- ¹⁶ S. D. Simpson, D. A. Ashford, D. J. Harvey and D. J. Bowles, Short chain oligogalacturonides induce ethylene production and expression of the gene encoding aminocyclopropane 1-carboxylic acid oxidase in tomato plants, *Glycobiology* **8** (1998) 579-583.
- ¹⁷ A. Marie, F. Fournier and J. C. Tabet, Characterization of synthetic polymers by MALDI-TOF/MS: Investigation into new methods of sample target preparation and consequence on mass spectrum finger print, *Anal. Chem.* **72** (2000) 5106-5114.
- ¹⁸ A. M. Belu, J. M. DeSimone, R. W. Linton, G. W. Lange and R. M. Friedman, Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry for polymer characterization, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **7** (1996) 11-24.
- ¹⁹ A. I. Usov, Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups, *Food Hydrocolloids* **12** (1998) 301-308.
- ²⁰ H. Nonami, K. Tanaka, Y. Fukuyama and R. Erra-Balsells, β -Carboline alkaloids as matrices for UV-matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in positive and negative ion modes. Analysis of proteins of high molecular mass, and of cyclic and acyclic oligosaccharides, *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **12** (1998) 285-296.
- ²¹ R. Erra-Balsells, A. A. Kolender, M. C. Matulewicz, H. Nonami, A.S. Cerezo, "Matrix-assisted ultraviolet laser-desorption ionization time-of-flight mass spectrometry of sulfated mannans from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*" *Carbohydrate Research* **329** (2000) 157-167.

²² A. Kolender, "Polisacáridos de *Nothogenia fastigiata* y *Georgiella confluens* (*Rhodophyta*). Nuevos métodos de análisis para polisacáridos de algas." Tesis de doctorado presentada el 19/9/2003 en la Universidad de Buenos Aires, Argentina.

²³ C. Hao, X. Ma, S. Fang, Z. Liu, S. Liu, F. Song and J. Liu, Positive- and negative-ion matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of saccharides, *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **12** (1998) 345-348.

²⁴ H. Suzuki, T. Yamagaki, K.Tachibana, *J. Mass Spectrom. Sc. Jpn.* **53** (2005) 227.