

Tesis Doctoral

# Procesos de deterioro y mecanismos de protección y reparación involucrados en la pérdida diferencial de la viabilidad durante el almacenamiento en semillas de *Chenopodium quinoa* Willd

Castelli3n, Martina Laura

2008

Este documento forma parte de la colecci3n de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilizaci3n debe ser acompa3ada por la cita bibliogr3fica con reconocimiento de la fuente.

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

Cita tipo APA:

Castelli3n, Martina Laura. (2008). Procesos de deterioro y mecanismos de protecci3n y reparaci3n involucrados en la p3rdida diferencial de la viabilidad durante el almacenamiento en semillas de *Chenopodium quinoa* Willd. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Castelli3n, Martina Laura. "Procesos de deterioro y mecanismos de protecci3n y reparaci3n involucrados en la p3rdida diferencial de la viabilidad durante el almacenamiento en semillas de *Chenopodium quinoa* Willd". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2008.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE BIODIVERSIDAD Y BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Procesos de deterioro y mecanismos de protección y  
reparación involucrados en la pérdida diferencial de la  
viabilidad durante el almacenamiento en semillas de  
*Chenopodium quinoa* Willd.**

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la  
Universidad de Buenos Aires en el área: CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Martina Laura Castellión**

Directores de tesis: Dra. Sara Maldonado

Dra. Pilar Buera

Consejero de estudios: Dra. Sara Maldonado

Lugar de trabajo: Departamento de Industrias y Departamento de Biodiversidad y  
Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y  
Naturales, Universidad de Buenos Aires

Buenos Aires, 2008

## **Procesos de deterioro y mecanismos de protección y reparación involucrados en la pérdida diferencial de la viabilidad durante el almacenamiento en semillas de *Chenopodium quinoa* Willd.**

Se estudió el deterioro producido durante el almacenamiento en semillas de seis cultivares de quínoa, originarios de dos regiones altamente contrastantes. Se evaluó la longevidad de las semillas y se aplicó la ecuación de la viabilidad de Ellis y Roberts (1980a). Aunque el cv. Chadmo mostró mayor longevidad que los demás cultivares estudiados, no se detectó una clara asociación entre la longevidad y las características de las regiones de origen de los cultivares. Se determinaron tiempos de relajación transversal por resonancia magnética nuclear de baja resolución (TD-NMR) lo que permitió inferir que la cinética de las reacciones de deterioro que condujeron a la pérdida de viabilidad estaba determinada principalmente por el grado de movilidad de los protones del agua de multicapas. Al analizar la estabilidad de algunas macromoléculas luego del almacenamiento, se detectó la ocurrencia de insolubilización de proteínas por formación de agregados glicosilados de alto peso molecular, mediante cuantificación de proteínas y separación electroforética por SDS-PAGE seguido de reacción PAS. Sin embargo, este evento pudo ser revertido en todos los casos durante la imbibición pre-germinativa, aún en aquellos lotes de semillas que exhibían muy bajo poder germinativo, indicando que no se trataba de un evento determinante en la pérdida de viabilidad. El análisis por cromatografía gas-líquido, permitió confirmar la ausencia de auto-oxidación de ácidos grasos en el período de tiempo analizado, hecho atribuido al alto contenido de tocoferoles de las muestras.

### **Palabras claves:**

***auto-oxidación de ácidos grasos; calorimetría diferencial del barrido; Chenopodium quinoa; ecuación de viabilidad; estado vítreo; Maillard; movilidad molecular; resonancia magnética nuclear de baja resolución semillas; viabilidad***

## **Abstract**

Seed storage deterioration of six cultivars of quinoa from environmentally contrasting environments was studied. Seed longevity was evaluated and analyzed using the equation of viability (Ellis and Roberts, 1980a). Though cv.Chadmo showed the highest longevity, no correlation was detected between longevity and the origin of the cultivars. Transverse relaxation times, determined by time domain nuclear magnetic resonance (TD-NMR), demonstrated that the kinetics of deteriorative reactions leading to seed damage was mainly determined by proton mobility of multilayer water molecules. Protein insolubilization was detected due to protein glycosilation and aggregation by protein quantification and SDS-PAGE techniques. Nevertheless, this process could be overturned by pre-germinative humidification, indicating that it is not a determinant event associated to viability loss. As expected, high tocopherol contents prevented fatty-acids auto-oxidation as determined by gas-liquid chromatography.

## **Keywords:**

***Chenopodium quinoa; differential scanning calorimetry; fatty-acids auto-oxidation; glassy state; Maillard; molecular mobility; seeds; seed viability equation; time domain nuclear magnetic resonance; viability***

## *Agradecimientos*

*Después de los cuatro años y medio que ha llevado este trabajo, no puedo dejar de agradecer todo el apoyo y la valiosa cooperación de:*

*Mis directoras de tesis, Sara y Pilar, dos ejemplos de tenacidad, dedicación y capacidad para la investigación.*

*Mis compañeros de laboratorio de Biología y de Industrias, los que están y los que se fueron, Vero, Víctor, Pablo, Natalia, Paula, Fabio, Noemí, Gonzalo, Caro, Nuria, Patricio, Lidia y Florencia, por su colaboración en el día a día. Y una mención especial a Silvia, con quien he pasado noches, fines de semana y feriados haciendo trabajo experimental, preparando pósters, escribiendo manuscritos... Cómo olvidar los viajes a la Universidad de Luján, especialmente un 8 de mayo...*

*Daniel Bertero y Fabio Causin por sus donaciones de semillas y por acercarme al trabajo agronómico facilitándome el espacio y las instalaciones para el cultivo de quínoa.*

*El cuaderno de Víctor, toda una fuente de protocolos de experimentación.*

*El personal del laboratorio del INTA, Ester y Noemí, y especialmente el Lic. Horacio Maroder y la Ing Agr. Imelda Prego, por la infinidad de consejos valiosísimos sobre conservación de semillas.*

*Agradezco finalmente al CONICET por las becas otorgadas y a la UBA y la ANPCyT por la financiación de este trabajo mediante subsidios.*

## *Dedicatoria*

*Esta tesis está dedicada a mi familia. Gonzalo ha sido mi pilar fundamental para seguir adelante bajo cualquier circunstancia, y mi beba, quien ha resistido estoicamente, incómoda, pero sin patear, las horas y los días que estuve sentada frente al teclado.*

*El doctorado de la Universidad de Buenos Aires no habría sido nunca mi meta sin el deseo constante de superación que me legaron mis padres. A ellos está dedicada también esta tesis.*

# Índice

|  |            |
|--|------------|
| <b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b>  | <b>7</b>   |
| <b>CAPÍTULO 1 DIFERENCIAS EN LA CONSERVACIÓN DE DISTINTOS CULTIVARES DE QUÍNOA</b> | <b>14</b>  |
| <b>Introducción</b>  | <b>14</b>  |
| <b>Materiales y Métodos</b>  | <b>17</b>  |
| <i>Material biológico. Cultivares</i>  | 17         |
| <i>Envejecimiento</i>  | 18         |
| <i>Ensayos de germinación y germinación normal</i>                                 | 18         |
| <i>Conductividad (vigor)</i>   | 20         |
| <i>Predicción de la longevidad</i>   | 20         |
| <b>Resultados y Discusión</b>  | <b>22</b>  |
| <b>CAPÍTULO 2 MECANISMOS DE TOLERANCIA</b>   | <b>36</b>  |
| <b>Introducción</b>  | <b>36</b>  |
| <b>Materiales y Métodos</b>  | <b>51</b>  |
| <i>Material biológico. Cultivares</i>  | 51         |
| <i>Propiedades de sorción</i>  | 52         |
| <i>Propiedades térmicas</i>  | 55         |
| <i>Movilidad molecular</i>   | 56         |
| <b>Resultados y Discusión</b>  | <b>58</b>  |
| <b>CAPÍTULO 3 EVENTOS IMPLICADOS EN LA PÉRDIDA DE VIABILIDAD</b>                   | <b>72</b>  |
| <b>Introducción</b>  | <b>72</b>  |
| <b>Materiales y Métodos</b>  | <b>78</b>  |
| <i>Material biológico. Cultivares</i>  | 78         |
| <i>Tratamientos</i>  | 79         |
| <i>Extracción de proteínas</i>   | 80         |
| <i>Análisis de la estabilidad de las proteínas de almacenamiento</i>               | 81         |
| <i>Detección y cuantificación de compuestos de Maillard</i>                        | 82         |
| <i>Caracterización electroforética</i>   | 83         |
| <i>Extracción de lípidos</i>   | 83         |
| <i>Caracterización de ácidos grasos por cromatografía gas-líquido</i>              | 84         |
| <b>Resultados y discusión</b>  | <b>86</b>  |
| <b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b>   | <b>104</b> |
| <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>  | <b>107</b> |

## ***Introducción General***

La preservación de biomateriales en forma deshidratada ha adquirido nuevo interés en campos de tecnología, clínica, biología y farmacia, tanto en investigación como en aplicaciones tecnológicas (Pikal, 1999). La deshidratación tiene la ventaja, sobre otros métodos de preservación, como la congelación, de que no requiere mantener una estricta cadena de frío. Se ha comprobado, sin embargo, que durante el proceso de secado artificial ocurre algún grado de deterioro de ciertas biomoléculas. En los sistemas biológicos, estructuras subcelulares tales como proteínas y membranas resultan particularmente dañadas (Carpenter y col., 1999).

Algunos mecanismos de tolerancia a la deshidratación presentes en sistemas biológicos involucran la acumulación de ciertos metabolitos (como di/oligosacáridos, polifruktosas y proteínas específicas) y la capacidad de vitrificar la matriz citoplásmica; ambos mecanismos están relacionados en medida variable (Hoekstra y col., 2001). Otros mecanismos implicados en la tolerancia a la deshidratación incluyen la reducción del metabolismo y la remoción de especies reactivas de oxígeno (EROs).

Las semillas de la mayoría de las especies poseen la capacidad de tolerar la pérdida de agua en distintos grados y de mantener la viabilidad durante el período anhidro, recuperando las funciones vitales rápidamente al ser rehidratadas. En cuanto a su conservación, se han clasificado como ortodoxas aquellas semillas que naturalmente se deshidratan hasta un contenido de agua en equilibrio con el ambiente y toleran un posterior secado artificial hasta aproximadamente 5% de contenido de agua sin perder la viabilidad (Ellis y col., 1990). La capacidad de mantener la viabilidad depende de numerosos factores entre los cuales se destacan la temperatura de almacenamiento y el contenido de agua; asimismo, dicha



capacidad difiere marcadamente entre especies, abarcando desde unos pocos años hasta siglos. La estabilidad de las semillas ortodoxas ha sido un factor crucial en el desarrollo de la agricultura en nuestra civilización.

Dado que las semillas ortodoxas constituyen sistemas deshidratados, muchas herramientas para su estudio han sido aquellas con las que se condujeron los estudios relativos a la estabilidad de alimentos y otros biomateriales, especialmente en lo relativo a la conservación de las propiedades físicas, químicas y organolépticas (Levine y Slade, 1986). En el caso de las semillas ortodoxas, el almacenamiento en condiciones de baja humedad y temperatura contribuye a disminuir la tasa de producción de procesos deletéreos debido a la alta viscosidad y baja movilidad molecular del citoplasma (Sun y Leopold, 1995; Sun, 1997; Sun y Leopold, 1997; Leopold y col., 1994; Buitink y col., 2000). Con el aumento de la temperatura y la humedad por encima de ciertos valores críticos, el citoplasma pasa de un estado de muy baja movilidad molecular (estado vítreo) a uno menos viscoso, incrementándose dramáticamente la tasa de las reacciones de oxidación (Bernal-Lugo y Leopold, 1998 y sus referencias).

Las reacciones bioquímicas de deterioro han sido estudiadas en semillas ortodoxas bajo condiciones de envejecimiento lento (baja temperatura y bajo contenido de agua) y acelerado (alta temperatura y/o alto contenido de agua). En los últimos 20 años se han detectado las causas principales del envejecimiento de semillas: peroxidación lipídica iniciada por radicales libres, inactivación enzimática y degradación de proteínas, ruptura de membranas celulares y daño a la integridad genética (ADN) (Priestley, 1986; Smith y Berjak, 1995; Walters, 1998; Mc Donald, 1999). Las reacciones de oxidación posiblemente involucradas en estos procesos serían:

- la formación de radicales libres y EROs que lleva a la peroxidación lipídica y la oxidación de proteínas y ácidos nucleicos (Bewley y Black, 1994; Bailly, 2004);
- la modificación no enzimática de proteínas por glicosilación con azúcares reductores (reacciones de Amadori y Maillard)(Wettlaufer y Leopold, 1991; Sun y Leopold, 1995);
- la reacción de aldehídos insaturados (producto de la peroxidación lipídica) con proteínas. (Priestley y Leopold, 1983; Priestley y col., 1985; Stadtman, 1992); y
- la reacción no enzimática del acetaldehído (producto de la acción de hidrolasas y deshidrogenas que actúan aún a bajos contenidos de agua) con grupos amino de proteínas y ácidos nucleicos (Zhang y col., 1995).

Estas reacciones podrían estar acopladas entre sí (Murthy y Sun, 2000) y la participación de cada una de ellas dependería del grado de movilidad molecular del citoplasma, el cual está dado por las condiciones de almacenamiento conjuntamente con las características intrínsecas de las semillas.

Las células se hallan equipadas con una batería de mecanismos antioxidantes tanto enzimáticos como no enzimáticos que intervienen en la remoción de las EROs y participan en la supervivencia de la semilla (Senaratna y col., 1985, 1988; Bailly, 2004). Aquellos factores, ya sea constitutivos o exógenos, que contribuyan a elevar la eficiencia de tales mecanismos serán claves para reducir la pérdida de viabilidad de las semillas durante el almacenamiento.

*Chenopodium quinoa* Willd. es una planta nativa de la región andina que ha sido una fuente alimentaria de gran importancia desde el año 3000 a.c. (Tapia, 1982) en el imperio Inca hasta la conquista española en 1532. Las abundantes sequías

condujeron al fracaso de la incorporación de nuevos cultivos y promovieron la reincorporación de los cultivos nativos (Cusack, 1984). La distribución de la quínoa cubre una amplia región de Sudamérica, desde Ecuador hasta los salares del sur de Bolivia. El desierto de Atacama interrumpe su expansión, aunque continúa su distribución hasta el sur de Chile y Argentina.

Reconocido su grano como pseudocereal (Cusack, 1984; Koziol, 1993), consta del perianto y el pericarpo que recubren la semilla. Esta contiene sustancias de reserva distribuidas en el perisperma (almidón) y en el embrión y los restos del endosperma (proteínas y lípidos) (Prego y col., 1998). El contenido de almidón se ubica en el rango de 51% a 61% (Atwell y col., 1983). De Bruin (1964) reportó un contenido de fibra de 3,4% y, de acuerdo a Repo-Carrasco y colaboradores (2003), posee un alto contenido de minerales como Ca, Fe, Zn, Cu y Mn. El contenido de aceites promedio se ubica entre 5,0% y 7,2% (Bhargava y col., 2006 y sus referencias) siendo rico en los ácidos grasos insaturados linoleico y linolénico (Koziol, 1990). El grano de quínoa presenta alta concentración de antioxidantes naturales como tocoferoles (Ruales y Nair, 1992). El contenido de proteínas varía entre 7,5% y 22,1% (Cardozo y Tapia, 1979) presentándose mayoritariamente como albúminas y globulinas (Koziol, 1992). La calidad alimenticia de las proteínas de quínoa es superior a la de muchos cereales por su alto contenido de aminoácidos esenciales (Ruales y Nair, 1992; Wright y col., 2002). Posee un alto contenido de lisina, histidina y metionina (Van Etten y col., 1963; Koziol, 1992).

La quínoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) es una especie autóctona con posibilidades promisorias para la extensión de la frontera agrícola por su tolerancia a la sequía, salinidad y temperaturas extremas. La especie está bien adaptada a condiciones medioambientales extremas en relación a altitud, precipitaciones, salinidad del suelo y temperaturas mínimas (Tapia, 1999). Se han identificado

numerosos cultivares y han sido agrupados por sus patrones de interacción genotipo-ambiente (Bertero y col., 2004). Los cultivares del grupo de adaptación 3 (G3) fueron hallados en el altiplano boliviano a 3600-4000m s.n.m. y están adaptados a las condiciones características del Altiplano como son suelos salinos, precipitaciones anuales menores a 250 mm y temperaturas mínimas bajo cero. En cambio, los cultivares pertenecientes al grupo 4 (G4) crecen a nivel del mar en la región central-sur de Chile y están adaptados a condiciones más húmedas (800 a 1500 mm de precipitación anual) suelos fértiles y temperaturas mínimas cercanas a los 5°C. Debido a estas condiciones de origen contrastantes, se esperaría hallar diferencias constitutivas en la composición del grano y particularmente en aquellos componentes vinculados a la protección de la especie en relación a estreses salinos, hídricos o por frío.

La producción comercial de quínoa requiere de la conservación de semillas con máxima viabilidad, al menos durante el período comprendido entre la cosecha y la próxima siembra, y la conservación de las características de interés alimentario desde el momento de la cosecha hasta su consumo. La posibilidad de realizar cultivos comerciales de quínoa en la región pampeana implica exponer tanto a las plantas como a las semillas a ambientes de mayor humedad o temperatura que son diferentes de los ambientes de origen de la especie. Si bien las semillas de *C. quinoa* presentan un comportamiento de tipo ortodoxo, pueden perder viabilidad en muy poco tiempo, más aun en condiciones de mayor temperatura y humedad (Ellis y col., 1993). Estudios preliminares de distintos cultivares de quínoa procedentes de ambientes contrastantes muestran diferencias en el patrón de salida de la dormición (Bertero y col., 2001) y en la longevidad de las semillas (Bertero D., comunicación personal), sin embargo no se cuenta con información precisa referente a la

longevidad de los cultivares, los factores que reducen la longevidad y las principales variables fisiológicas que son afectadas.

En esta tesis se plantea el estudio de algunos mecanismos físicos de tolerancia a la deshidratación presentes en semillas de quínoa, y los eventos y reacciones implicados tanto en la pérdida de viabilidad de las semillas, como en las modificaciones de las características físicas, químicas y organolépticas de estos sistemas durante el almacenamiento.

**Objetivo general:**

Contribuir al conocimiento de los mecanismos relacionados con la tolerancia de las semillas a la deshidratación y el comportamiento durante el almacenamiento.

**Objetivos específicos:**

1. Establecer las variaciones en la longevidad de cultivares de *Chenopodium quinoa* Willd. y los factores que afectan la viabilidad durante el almacenamiento mediante ensayos de germinación, viabilidad y vigor en semillas almacenadas durante distintos períodos en distintas condiciones de humedad y temperatura.
2. Con el fin de detectar los factores involucrados en la tolerancia a la deshidratación y en el mantenimiento de la capacidad de recuperación de las funciones vitales durante el período anhidro en materiales con distinta longevidad, se estudiarán las propiedades térmicas y de sorción y la movilidad molecular de estos sistemas, como importantes determinantes de las cinéticas de las reacciones de deterioro.
3. Establecer los eventos implicados en la pérdida de viabilidad de las semillas y las alteraciones de sus características físicas, químicas y organolépticas. Con

este fin, se estudiará, a lo largo del almacenamiento, el estado de conservación de los principales componentes del embrión: proteínas y lípidos. Esto se llevará a cabo mediante el estudio de eventos tales como la insolubilización de proteínas y la acumulación de productos de Maillard y la peroxidación lipídica que han sido previamente reportados como reacciones de deterioro asociadas entre sí e implicadas en el envejecimiento de algunas semillas ortodoxas.

### ***Hipótesis***

1. Los cultivares de quínoa muestran diferencias en sus propiedades de conservación. Dichas diferencias se encuentran asociadas a su origen.
2. Las propiedades de los principales componentes del embrión de las semillas resultan afectadas durante el almacenamiento.
3. Los factores que actualmente se postulan como componentes de la tolerancia a la deshidratación: (i) son detectados en el material de estudio propuesto; (ii) resultan operativos para mantener la viabilidad de las semillas deshidratadas durante el almacenamiento.

# **Capítulo 1 Diferencias en la conservación de distintos cultivares de quínoa**

## **Introducción**

La quínoa es un cultivo sumamente versátil por su capacidad de crecer en los ambientes más adversos y diversos. La gran variabilidad presente en esta especie sugiere el estudio integral de las propiedades de conservación de las semillas en diferentes cultivares de quínoa provenientes de ambientes contrastantes. Consecuentemente, se planteó caracterizar la dinámica de la pérdida de viabilidad en cultivares de quínoa pertenecientes a dos grupos genotípicos reconocidos, conduciendo a un análisis profundo sobre el proceso de envejecimiento.

Existen tres factores de fundamental importancia en el control de la longevidad de las semillas: el agua, la temperatura y el oxígeno (Roberts y Ellis, 1989). La longevidad de las semillas ortodoxas aumenta con la disminución del contenido de agua y de la temperatura, dentro de cierto rango, en una forma cuantificable y predecible (Ellis y Roberts, 1980a). La predicción de la viabilidad de las semillas durante el almacenamiento es importante tanto para el manejo de colecciones de germoplasma, como para el manejo de producciones comerciales de semillas y su almacenamiento.

Las relaciones entre longevidad, contenido de agua y temperatura han sido combinadas en una única ecuación de viabilidad desarrollada originariamente para cebada (Ellis y Roberts, 1980a,b), pero que ha demostrado ser aplicable a otras especies ortodoxas analizadas.

$$v = Ki - \frac{p}{10^{K_E - C_W \log_{10} m - C_H t - C_Q t^2}}$$

**Ecuación 1.1**

Donde  $v$  es el porcentaje de viabilidad en probits luego de  $p$  días de almacenamiento a temperatura  $t$  y contenido de agua  $m$  (porcentaje en base fresca).  $K_i$  es una constante específica del lote de semillas que describe la calidad inicial de las semillas, previo al almacenamiento, y  $K_E$ ,  $C_W$ ,  $C_H$  y  $C_Q$  son las constantes de viabilidad de la especie (Ellis y Roberts, 1980a). Las constantes  $C_H$  y  $C_Q$  describen en forma combinada la respuesta de la longevidad a la temperatura y poseen valores altamente semejantes aún entre semillas de especies contrastantes (Dickie y col., 1990). La constante  $C_W$  describe el efecto del contenido de agua sobre la longevidad. Según los autores, este valor es invariable para una especie aunque difiere sensiblemente entre especies. Dicha variación estaría vinculada a las diferencias en la composición de las semillas y, en consecuencia, a las variaciones en los potenciales de agua de equilibrio a un contenido de agua dado (Roberts y Ellis, 1989).

Los límites para esta relación se ubican entre 2-5% y 15-25% de contenido de agua y un rango de temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  a  $90^{\circ}\text{C}$  (Roberts y Ellis, 1989). La disminución del contenido de agua por debajo del valor crítico no resulta en un aumento de la longevidad (Ellis y col., 1988). Este valor crítico estaría asociado negativamente al contenido de lípidos. Por encima del valor límite superior y en presencia de oxígeno, la relación entre la supervivencia y el contenido de agua se invierte (Roberts y Ellis, 1989).

De acuerdo a Roberts y Ellis (1989), la ecuación 1.1 combina dos ecuaciones diferentes. La primera, deriva de la observación de que bajo condiciones de almacenamiento constantes, dentro de los límites de humedad y temperatura de aplicación de la ecuación, la supervivencia de cada individuo está distribuida



normalmente de manera tal que las curvas de supervivencia son curvas de distribución normal acumulada negativas y pueden describirse como:

$$v = K_i - P/\sigma \quad \text{Ecuación 1.2}$$

Donde  $\sigma$  es el desvío estándar de la supervivencia de los individuos.

La segunda ecuación deriva de la observación de que, en idénticas condiciones de almacenamiento, el desvío estándar de la supervivencia de los individuos,  $\sigma$ , no difiere entre lotes de una misma especie y describe cómo el desvío estándar disminuye con el aumento del contenido de agua y la temperatura:

$$\sigma = 10^{K_E - C_w \log_{10} m - C_H t - C_Q t^2} \quad \text{Ecuación 1.3}$$

El análisis de  $\sigma$  permite identificar las diferencias en la longevidad de las semillas debidas a las condiciones de almacenamiento, independientemente del estado inicial de las semillas. Este análisis es de gran utilidad al trabajar con diferentes lotes de semillas que, indefectiblemente, tendrán diferentes estados iniciales.

## **Materiales y Métodos**

### ***Material biológico. Cultivares***

Se emplearon semillas de quínoa procedentes de cultivares en los que preliminarmente se había detectado comportamiento contrastante en lo referente a longevidad y tolerancia a la conservación en condiciones naturales. El material fue cultivado en el campo experimental y viveros de la Cátedra de Cultivos de la Facultad de Agronomía o del campo experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. Los cultivares utilizados, clasificados según su interacción genotipo-ambiente (Bertero y col., 2004), son:

#### ***1. Grupo de adaptación de nivel del mar:***

##### ***‘Chadmo’***

‘Chadmo’ es una raza local de la localidad del mismo nombre en la Isla de Chiloé. Chadmo se encuentra sobre planicies bajas al sur de Castro, la capital de la isla, en la X Región de Los Lagos, Chile. Las precipitaciones rondan los de 2500 mm anuales.

##### ***‘NL-6’***

‘NL-6’ es una variedad seleccionada en la Universidad de Wageningen, Holanda, a partir de materiales chilenos de nivel del mar.

#### ***2. grupo de adaptación de altiplano chileno-boliviano:***

##### ***‘Sajama’***

'Sajama' es una variedad del altiplano central de Bolivia, seleccionada en la estación experimental Patacamaya por su bajo contenido de saponinas. Patacamaya está localizada entre La Paz y Oruro. La región se encuentra a 3600-4000m s.n.m. y las precipitaciones oscilan en los 300-600mm anuales durante el verano, presentándose 6 a 7 meses de extrema aridez durante el invierno.

### ***'2-Want'***

'2-Want' es originaria del altiplano boliviano aunque se desconoce la localización exacta.

### ***Envejecimiento***

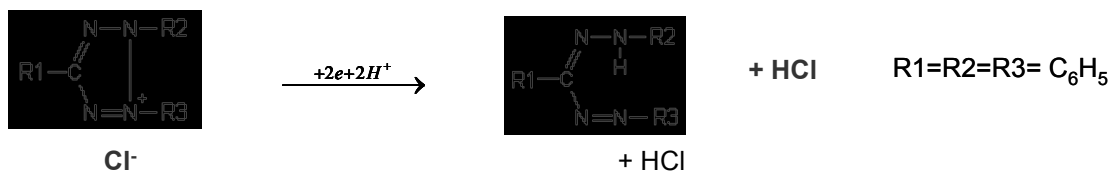
Las semillas de los distintos cultivares se almacenaron en tubos viales de 5 ml en distintas condiciones de humedad relativa a temperatura constante. Se incubaron en cámaras con 43% ,75% u 83% de humedad relativa (HR) mediante soluciones salinas saturadas de  $K_2CO_3$ , NaCl y KCl, respectivamente, en estufa a  $32^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$  o  $37^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ . Se extrajeron muestras a intervalos regulares para las diferentes pruebas y determinaciones. Las muestras fueron utilizadas inmediatamente para las pruebas de germinación y viabilidad o conservadas en freezer ( $-20^{\circ}C$ ) para los ensayos posteriores.

### ***Ensayos de germinación y germinación normal***

Se ensayaron pruebas de germinación, germinación normal, tiempo medio de germinación y viabilidad mediante la prueba de cloruro de tetrazolio.

Cuando se presenta dormición o se requiere de pruebas rápidas, la viabilidad de semillas puede ser fácilmente detectada al emplear la prueba de

viabilidad con el tetrazolio (TZ). Esta prueba involucra la imbibición de una semilla en un solución incolora al 1% de 2,3-5 cloruro de trifeniltetrazolio. Esta prueba de viabilidad está basada en el cambio de color representativo de la actividad enzimática. La sal de tetrazolio es un indicador de oxidación-reducción y ha sido establecido que el desarrollo del color rojo-rosado, no difusivo en el tejido, es el resultado de la reducción del reactivo por la acción enzimática. Uno o más de los sistemas de deshidrogenasas, enzimas ligadas con la actividad respiratoria de los sistemas biológicos, están involucradas en la reacción. Durante el proceso respiratorio se producen intermediarios que sirven como sustratos de estas enzimas. Brevemente, los iones hidrógeno se transfieren al tetrazolio y éste actúa como receptor de hidrógeno. El tetrazolio se reduce a una formazana insoluble y colorida



(roja).

Puesto que la reacción ocurre dentro de las células y el pigmento no es difusivo, existe una delineación perfectamente nítida entre los tejidos con respiración activa (viables) y aquellos que no presentan actividad metabólica (no viables). El primero adquiere un color característico (rojo) mientras el segundo mantiene su color natural. Los resultados pueden ser obtenidos en 24 horas.

Las semillas se preincubaron durante 3 horas a  $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  y 100% HR en oscuridad para evitar el daño por imbibición. Luego se desinfectaron mediante un lavado de 10 minutos en solución de hipoclorito 5,5 g/l y se enjuagaron con abundante agua destilada.

La siembra fue realizada en cajas plásticas de 22 x 14 x 5 cm sobre papel de germinación humedecido con agua destilada. Se sembraron en cada caso 4 réplicas de 50 o 100 semillas y se pusieron a germinar en cámara a  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  con un fotoperíodo de 16:8 (luz:oscuridad) bajo tubos de luz fluorescente. Se registró el número de semillas germinadas a las 24, 48 y 72 horas. A las 72 horas se registró también el número de semillas germinadas (germinación) y de plántulas normales (germinación normal).

### ***Conductividad (vigor)***

Se buscó determinar el deterioro de membranas, como indicador de vigor, mediante conductividad en el medio de imbibición de las semillas. Se utilizó un termoconductivímetro CTX-II Altronix con celda de placas platinizadas y constante de 1 cm. Se emplearon semillas de los diferentes cultivares con distinto grado de envejecimiento i.e. diferentes condiciones y tiempo de almacenamiento. De cada muestra se pesaron por duplicado 50 semillas con contenidos de humedad de 10-15% y se colocaron en 10 ml de agua destilada. La conductividad en el agua de imbibición se midió durante las primeras 3,5 horas de imbibición. Los valores obtenidos están normalizados a  $25^{\circ}\text{C}$ .

### ***Predicción de la longevidad***

Se reprodujo el envejecimiento a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  a 75% y 83% HR hasta alcanzar valores nulos de germinación en todos los cultivares. Se utilizó la ecuación de la viabilidad desarrollada por Ellis y Roberts (1980a) para estimar la longevidad potencial y la pendiente correspondiente ( $1/\sigma$ ) a partir de las curvas de decaimiento de la germinación o la germinación normal de semillas. Los datos fueron analizados

con el programa Origin Pro 7.0. El análisis consistió en la linearización de las curvas mencionadas utilizando la transformación probit. Las medias de los triplicados para cada valor p ( $\bar{G}_p$ ) son utilizadas para obtener el desvío estándar (SD) de la curva. Este valor de desvío es empleado en la transformación a probit de los valores de germinación de manera tal que la viabilidad a cada tiempo p está determinada por:

$$v_p = \frac{(\bar{G}_p - \bar{G})}{SD} + 5$$

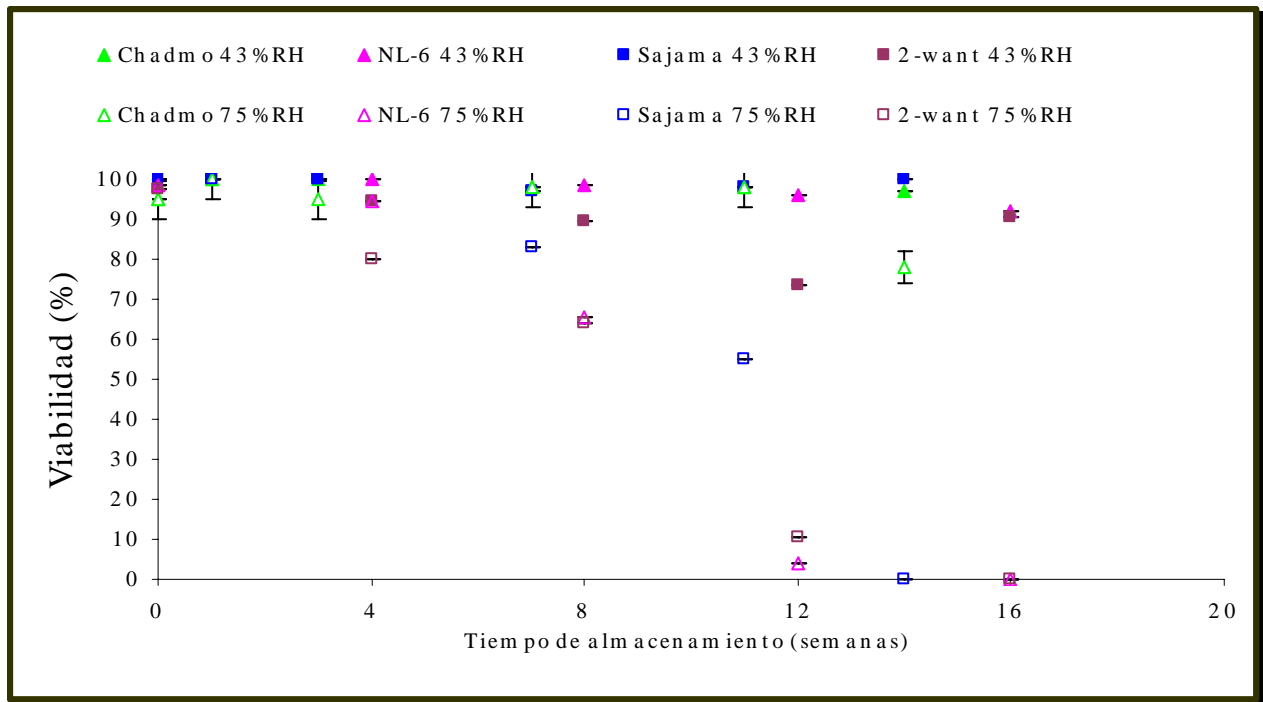
La distribución de datos obtenida es aproximadamente lineal y puede ser sometida a un análisis de regresión lineal. Se obtienen así los valores correspondientes a la pendiente y ordenada al origen que representan el inverso del valor  $\sigma$  y la longevidad potencial  $K_i$ .

## **Resultados y Discusión**

Las semillas almacenadas a 43% HR (8,6–9,6% de contenido de agua) mantuvieron altos valores de germinación normal, germinación y viabilidad (figuras 1.1, 1.2 y 1.3). Las semillas de cv.Chadmo mantuvieron valores más o menos constantes de germinación normal en ambas condiciones de envejecimiento durante el período estudiado, indicando una buena tolerancia al almacenamiento aun en condiciones de humedad relativa poco propicias. Luego de 14 semanas de almacenamiento a 75%HR (12,6–14,3% de contenido de agua), las semillas de cv. Chadmo mostraron altos valores de viabilidad y germinación (78% y 67%, respectivamente), mientras que las semillas de cv. Sajama, cv. NL-6 y cv. 2-want cayeron a valores de viabilidad, germinación y germinación normal entre 0 y 30% en las mismas condiciones.

Las semillas de cv. Chadmo mostraron valores iniciales de germinación y germinación normal menores que otros cultivares, a pesar de presentar valores altos de viabilidad según la prueba de tetrazolio. Este comportamiento es atribuible a la presencia de dormición en las semillas de este cultivar, ya reportada por D. Bertero (comunicación personal).

De acuerdo a los resultados obtenidos, las semillas de cv.Chadmo resultaron ser más longevas que las de los otros cultivares empleados en este ensayo.



**Figura 1.1. Porcentaje de viabilidad de semillas de cuatro genotipos de quínoa mediante la prueba de cloruro de tetrazolio. Las semillas de cv.Chadmo mantuvieron valores altos de viabilidad luego de ser almacenadas a alta humedad relativa (75%HR).**



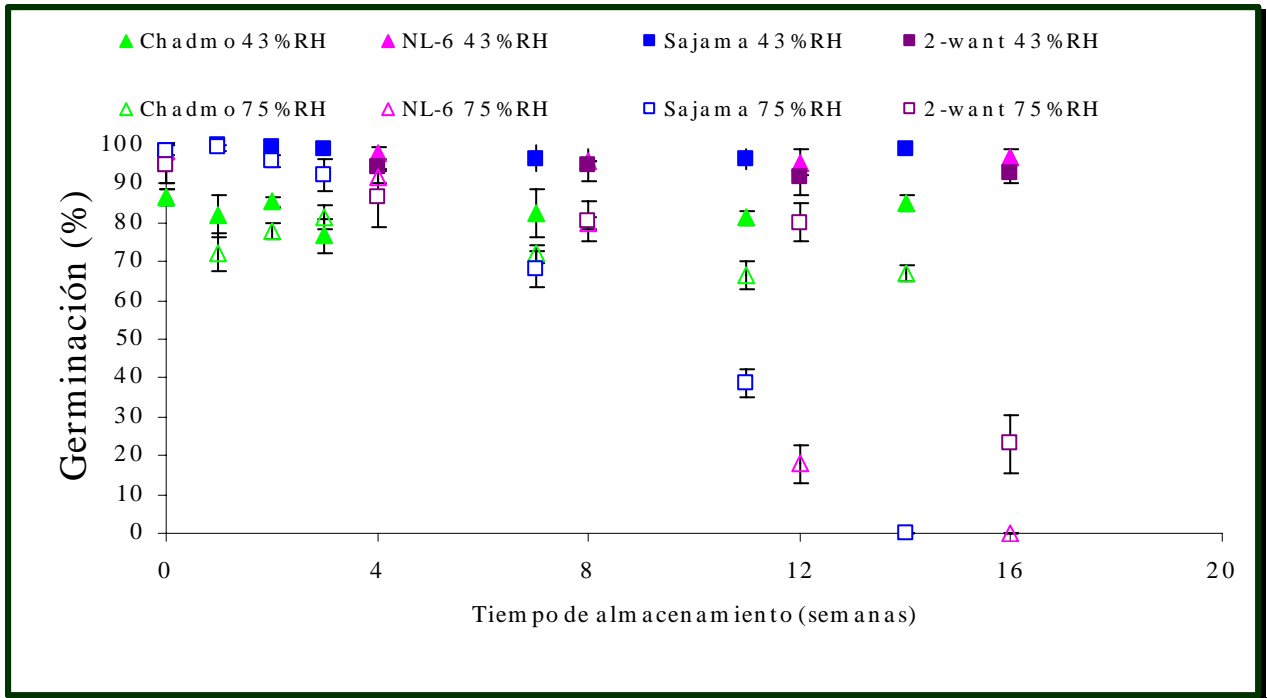
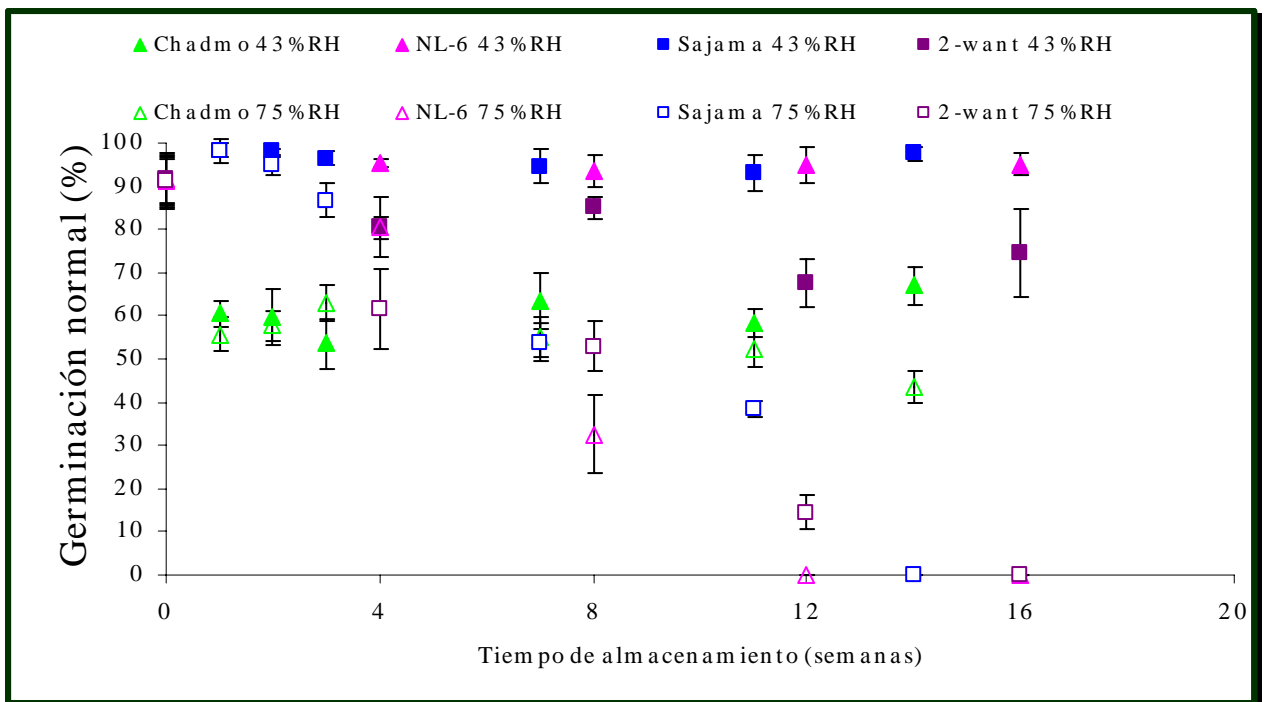


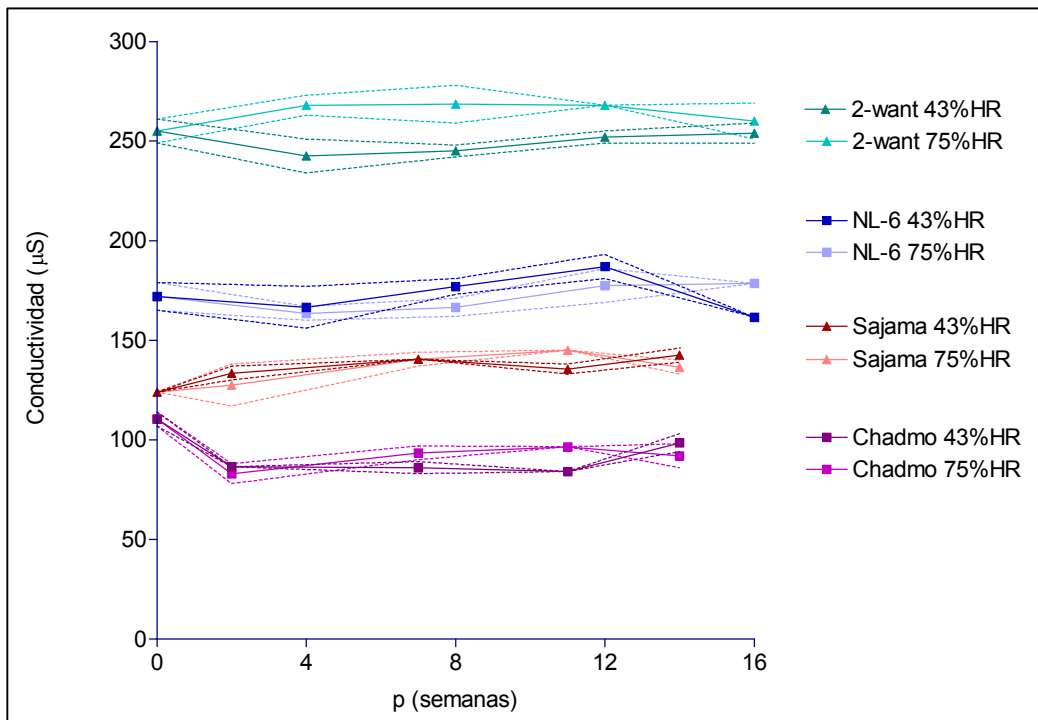
Figura 1.2. Porcentaje de germinación de cuatro genotipos de quínoa durante el almacenamiento a 32°C y 43% o 75%HR. Las semillas de cv.Chadmo mantuvieron valores altos de germinación luego de ser almacenadas a alta humedad relativa (75%HR).



**Figura 1.3. Porcentaje de germinación normal de cuatro genotipos de quínoa durante el almacenamiento a 32°C y 43% o 75%HR. Las semillas de cv.Chadmo mantuvieron valores constantes y similares en ambos tratamientos durante todo el ensayo. Cv.Sajama, cv.2-want y cv.NL-6 presentaron bajos valores de germinación normal luego de ser almacenadas a alta humedad relativa (75%HR).**

El análisis de la conductividad del agua de imbibición fue conducido con el objetivo de determinar si dicho procedimiento es indicador de pérdida de permeabilidad selectiva del tejido por daño a membranas y en consecuencia puede ser empleado como índice de vigor de las semillas. Los valores iniciales de conductividad fueron diferentes en cada cultivar (datos no mostrados) y atribuibles a diferencias en las características intrínsecas de las semillas, como diferencias en la integridad de las cubiertas seminales, o bien, a la presencia sobre la superficie de los granos de partículas de polvo, polen, etc. remanentes del proceso de secado artificial de los granos. Durante los primeros minutos de imbibición se produce la difusión de solutos al medio. Este proceso se ve representado como un incremento más o menos lineal en la conductividad en función del tiempo de imbibición (datos no mostrados). Este proceso fue seguido por otra fase más lenta de aumento de la conductividad que se inicia aproximadamente luego de 5 horas de imbibición y sería atribuible a un intercambio activo de solutos asociado a la iniciación del metabolismo germinativo (Senaratna y McKersie, 1983). La figura 1.4 representa los valores de conductividad medidos luego de 3,5 horas de imbibición en función del tiempo de almacenamiento de las semillas para cada cultivar utilizado. De acuerdo a este análisis, no se evidencian una tendencia significativa a mayores valores de

conductividad en el tiempo o valores más altos de conductividad en semillas almacenadas a humedades relativas más altas frente a aquellas almacenadas a humedades relativas más bajas, como se esperaría de un indicador de vigor. La pérdida de solutos en este periodo resultó ser más o menos constante e independiente del tiempo o condiciones de almacenamiento de las semillas. En consecuencia, puede afirmarse que la conductividad en estos cultivares, y bajo las condiciones de almacenamiento empleadas, no es un parámetro adecuado para medir envejecimiento.



**Figura 1.4. Conductividad luego de 3,5 horas en el medio de imbibición de granos de cuatro cultivares de quínoa almacenados a 32°C.**

Con el objetivo de detectar los efectos del almacenamiento sobre la pérdida de la viabilidad en semillas provenientes de diferentes lotes y discernir entre

sensibilidad al almacenamiento y estado inicial de las semillas, los resultados del almacenamiento fueron analizados mediante la ecuación de la viabilidad. Este análisis permite caracterizar la susceptibilidad al almacenamiento y el estado inicial de las semillas mediante la determinación de los parámetros  $\sigma$  y  $K_i$ , respectivamente.

Las curvas de decaimiento de la germinación y germinación normal de semillas almacenadas a 37°C y 83%HR o 75%HR (figuras 1.5 y 1.6) fueron transformadas a probits y se representan en las figuras 1.7 y 1.8. La tabla 1.1 muestra los valores de  $\sigma$ ,  $K_i$  y los coeficientes de regresión obtenidos para los cuatro cultivares en estudio.

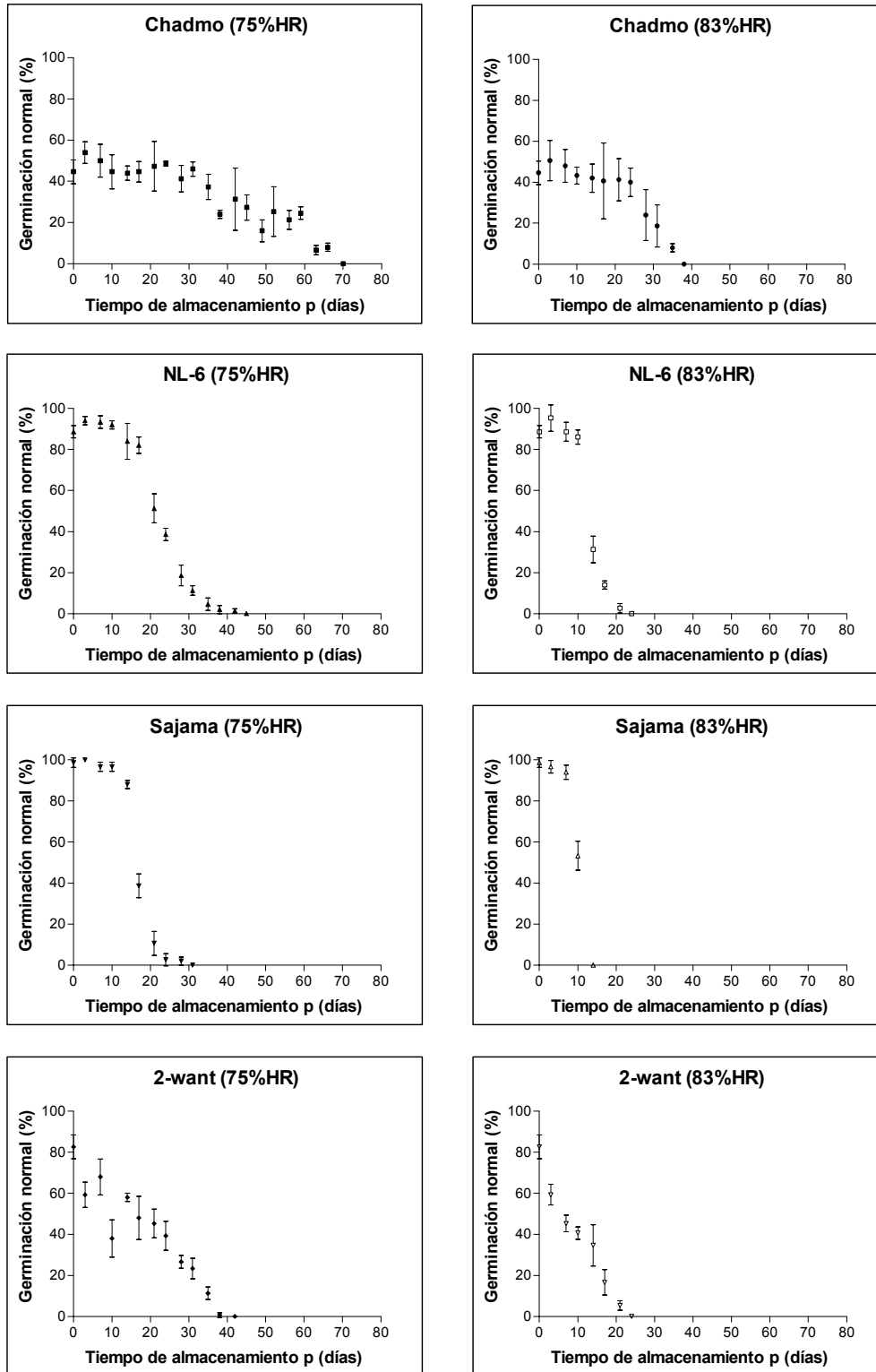


Figura 1.5. Curvas de decaimiento de la germinación normal en semillas de quínoa sometidas a almacenamiento en dos condiciones de humedad relativa diferentes. Las barras de error representan los desvíos estándar.

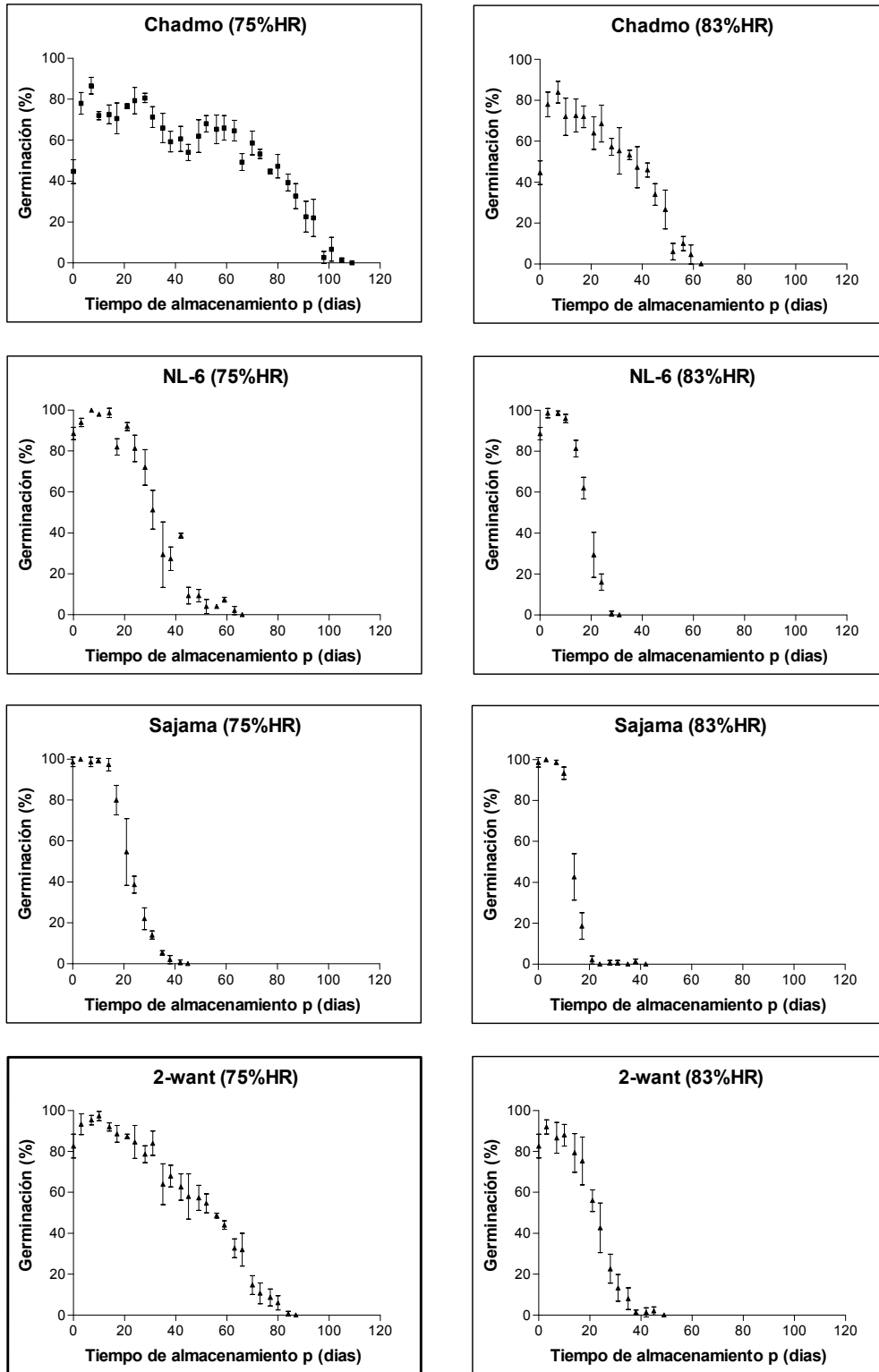
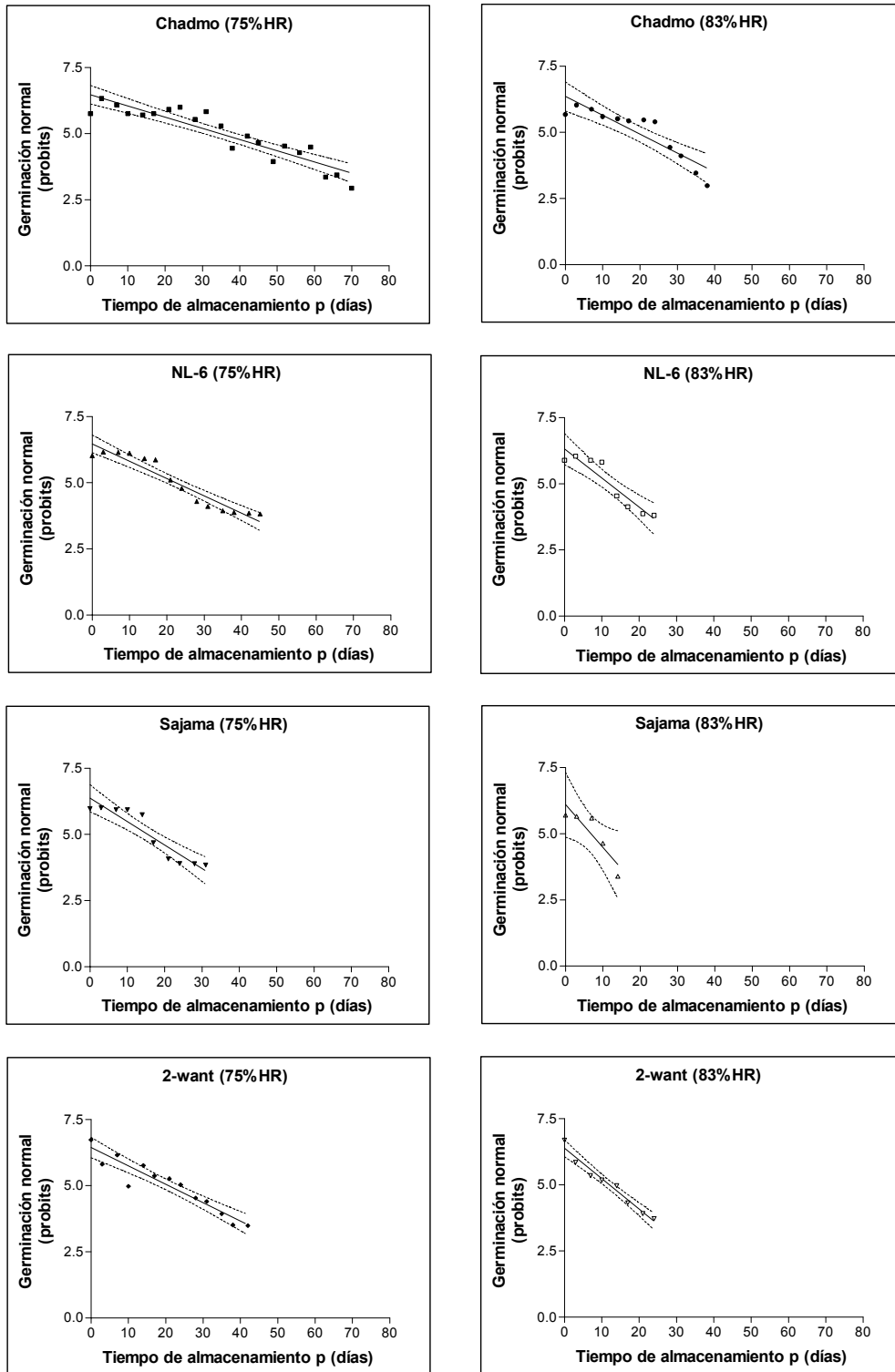
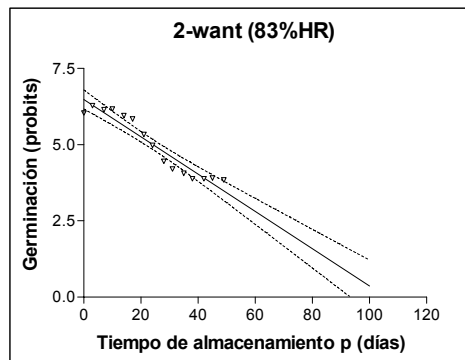
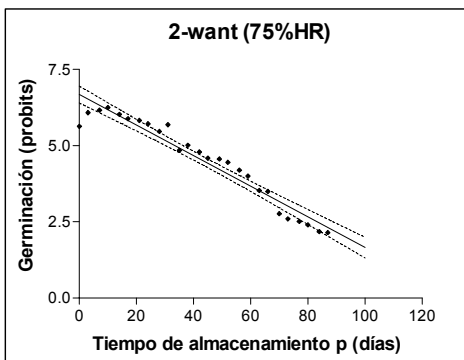
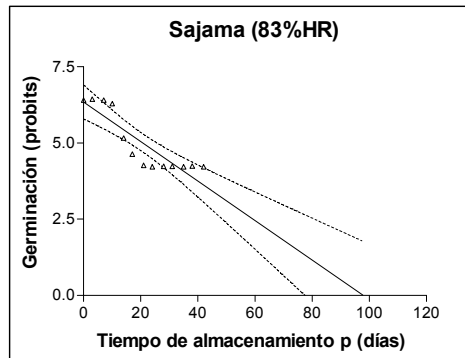
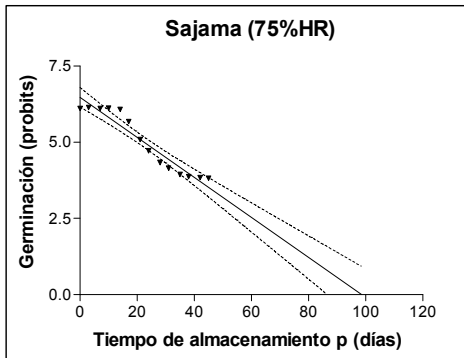
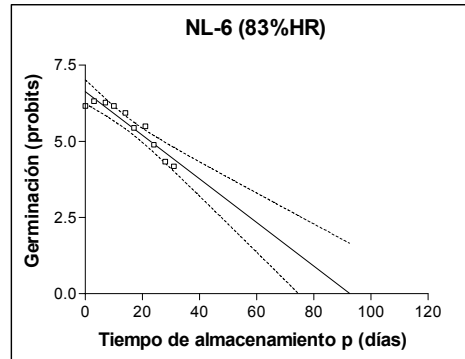
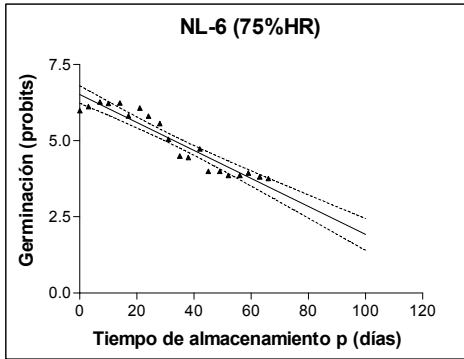
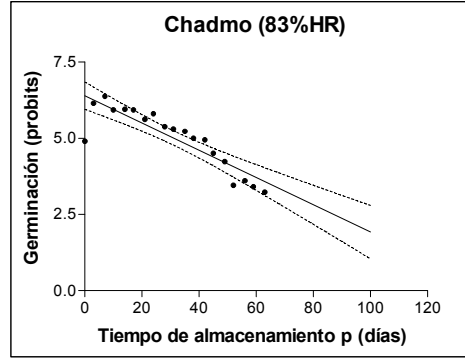
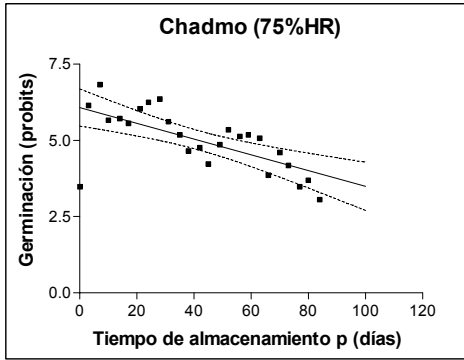


Figura 1.6. Curvas de decaimiento de la germinación en semillas de quínoa sometidas a almacenamiento en dos condiciones de humedad relativa diferentes. Las barras de error representan los desvíos estándar.



**Figura 1.7.** Representación en valores probit de las curvas de decaimiento de la germinación normal y resultado de la regresión lineal. Las líneas punteadas representan el intervalo de confianza del 95%.

Diferencias en la Conservación de Distintos Cultivares de Quínoa





**Figura 1.8. Representación en valores probit de las curvas de decaimiento de la germinación y resultado de la regresión lineal. Las líneas punteadas representan el intervalo de confianza del 95%.**

| HR  | Cultivar | Contenido de agua<br>(% base seca) | Germinación Normal |           |        |         | Germinación |           |        |         |
|-----|----------|------------------------------------|--------------------|-----------|--------|---------|-------------|-----------|--------|---------|
|     |          |                                    | $\sigma$           | $K_i$     | $r^2$  | p       | $\sigma$    | $K_i$     | $r^2$  | p       |
| 75% | Chadmo   | 11,0 ± 0,03                        | 24 ± 2             | 6,5 ± 0,2 | 0,8475 | <0,0001 | 29 ± 4      | 6,5 ± 0,2 | 0,7481 | <0,0001 |
|     | NL-6     | 10,3 ± 0,03                        | 15 ± 1             | 6,5 ± 0,2 | 0,9136 | <0,0001 | 22 ± 2      | 6,5 ± 0,1 | 0,9030 | <0,0001 |
|     | Sajama   | 10,4 ± 0,03                        | 11 ± 2             | 6,4 ± 0,2 | 0,8702 | <0,0001 | 15 ± 1      | 6,5 ± 0,1 | 0,9224 | <0,0001 |
|     | 2-want   | 9,8 ± 0,07                         | 14 ± 1             | 6,4 ± 0,2 | 0,8968 | <0,0001 | 20 ± 1      | 6,7 ± 0,1 | 0,9376 | <0,0001 |
| 83% | Chadmo   | 13,2 ± 0,01                        | 14 ± 2             | 6,4 ± 0,2 | 0,8070 | <0,0001 | 19 ± 1      | 6,7 ± 0,1 | 0,9313 | <0,0001 |
|     | NL-6     | 12,1 ± 0,01                        | 9 ± 1              | 6,3 ± 0,2 | 0,8770 | 0,0006  | 14 ± 2      | 6,6 ± 0,2 | 0,8827 | <0,0001 |
|     | Sajama   | 12,8 ± 0,06                        | 6 ± 2              | 6,1 ± 0,4 | 0,8064 | 0,0385  | 15 ± 2      | 6,3 ± 0,3 | 0,7824 | <0,0001 |
|     | 2-want   | 12,2 ± 0,01                        | 8 ± 1              | 6,4 ± 0,1 | 0,9650 | <0,0001 | 16 ± 1      | 6,5 ± 0,1 | 0,9176 | <0,0001 |

**Tabla 1.1. Valores de  $\sigma$  y  $K_i$  obtenidos mediante linearización probit de los valores de germinación normal de semillas de quínoa de cuatro cultivares almacenadas a 37°C y 75% u 83% HR.**

La tabla 1.1 resume los resultados obtenidos a partir de los datos de germinación normal y germinación. Como se esperaba,  $K_i$ , que representa el estado inicial de las semillas, presenta valores equivalentes cuando se obtiene a partir semillas almacenadas en diferentes condiciones de humedad ambiente ya que alude al estado de las semillas previo al almacenamiento. Los valores de  $K_i$  también resultaron ser semejantes entre los diferentes cultivares (lotes), indicando que el estado inicial de conservación de los diferentes cultivares es similar y, principalmente, comparable. Este resultado permite el empleo de modo comparativo de estos lotes de semillas para realizar estudios sobre los procesos de deterioro o

de reparación utilizando análisis directos de germinación sin necesidad de emplear la ecuación de la viabilidad para el análisis de los datos. Por otra parte, los valores de  $\sigma$  obtenidos de la germinación normal de los cuatro cultivares analizados resultaron ser significativamente diferentes entre cultivares en semillas almacenadas tanto a 75%HR ( $p < 0,0001$ ) como a 83%HR ( $p < 0,025$ ). Debe observarse, sin embargo, que el contenido de agua de equilibrio entre los cultivares es diferente en cada una de las condiciones de humedad relativa empleadas en estos ensayos (tabla 1.1), por lo que los valores  $\sigma$  obtenidos no serían comparables entre cultivares. Sin embargo, la ecuación de la viabilidad afirma que las constantes de viabilidad son propias de la especie e invariables frente a diferencias genotípicas infraespecíficas (diferentes lotes o cultivares) (Ellis y Roberts, 1980a,b). Esto es afirmar que el valor  $\sigma$  se mantiene invariable frente a diferencias genotípicas infraespecíficas (diferentes lotes o cultivares) cuando se almacenan a igual temperatura y contenido de agua constantes. Es decir que, a igual temperatura de almacenamiento,  $\sigma$  será función del contenido de agua únicamente. Esto puede deducirse también a partir de la ecuación 1.3:

$$\sigma = 10^{K_E - C_w \log_{10} m - C_H t - C_Q t^2}$$

$$\sigma = 10^{(K_E - C_H t - C_Q t^2) - C_w \log_{10} m}$$

$$\sigma = \frac{10^{(K_E - C_H t - C_Q t^2)}}{10^{(C_w \log m)}}$$

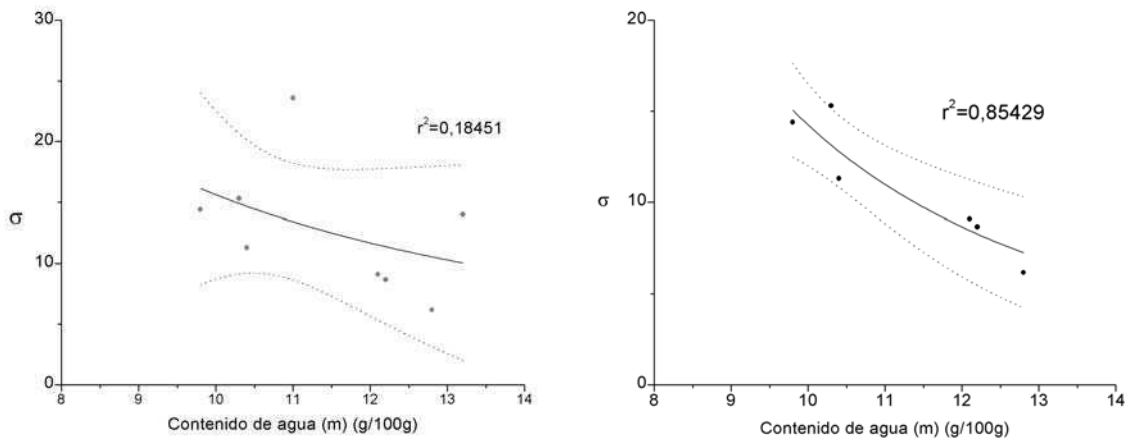
$$\sigma = \frac{10^{(K_E - C_H t - C_Q t^2)}}{(10^{\log m})^{C_w}}$$

Se obtiene finalmente una ecuación alométrica que relaciona el parámetro  $\sigma$  con el contenido de agua (m).

$$\sigma = \frac{10^{(K_E - C_H t - C_Q t^2)}}{m^{C_W}}$$

**Ecuación 1.4**

Con el fin de vincular los diferentes valores  $\sigma$  obtenidos para los cuatro cultivares, se representó la relación entre  $\sigma$  y el contenido de agua ( $m$ ) (figura 1.9). Los valores de cv.Chadmo se alejan significativamente de la función alométrica de la ecuación 1.4 demostrando que los valores de  $\sigma$  obtenidos para este cultivar no están determinados por las mismas constantes de viabilidad que definen a los otros cultivares aquí estudiados. Consecuentemente, no se cumple la afirmación de la ecuación de la viabilidad con respecto a las diferencias genotípicas intraespecíficas y, en consecuencia, las constantes de viabilidad no serían únicas para toda la especie. Dickie y colaboradores (1990) han probado en semillas de 8 especies contrastantes que las diferencias interespecíficas en el comportamiento durante el almacenamiento serían principalmente debidas al efecto del contenido de agua, encontrando diferencias significativas en los valores  $K_E$  y  $C_W$ , y a la vez establecieron valores más o menos universales para los coeficientes de temperatura  $C_H$  y  $C_Q$ . Extrapolando sus conclusiones, las diferencias intraespecíficas halladas entre cultivares serían atribuibles a las diferencias en los coeficientes  $K_E$  y  $C_W$ .



**Figura 1.9. Representación gráfica de  $\sigma$  en función del contenido de agua de los cuatro cultivares de quínoa almacenados a diferentes humedades relativas. Los coeficientes de determinación ( $r^2$ ) representan la bondad de ajuste de la ecuación 1.4 a los datos presentados con y sin la inclusión de cv.Chadmo.**

Los resultados presentados en este capítulo demuestran una marcada diferencia en el comportamiento durante el almacenamiento en el cultivar Chadmo frente a los otros cultivares analizados. Sin embargo, los resultados obtenidos a partir de los cuatro cultivares empleados no han demostrado una relación entre la tolerancia al almacenamiento y el origen de los cultivares. A este respecto, este estudio puede extenderse a otros grupos genotípicos de *Chenopodium quinoa* con el fin de detectar una posible dependencia entre la tolerancia al almacenamiento y el origen en otros cultivares.

En los siguientes capítulos se estudiarán los procesos de deterioro y mecanismos de tolerancia que pudieran ser causales de las diferencias observadas.

## **Capítulo 2 Mecanismos de tolerancia**

### **Introducción**

El concepto de actividad de agua fue desarrollado con la intención de proveer una medida confiable de la “disponibilidad” del agua en alimentos (Scott, 1957). La actividad de agua ( $a_w$ ), es una medida indirecta del agua que está disponible en un dado material para participar en diferentes reacciones de deterioro y en el crecimiento microbiano. Estudios de la influencia de la actividad de agua en la velocidad de las reacciones químicas indican que, a bajas actividades, el agua no está disponible para actuar en reacciones químicas debido a que esta se encuentra fuertemente ligada a la superficie de sitios polares. A más altas actividades, el agua existe en multicapas o dentro de capilares como fase condensada y la movilidad del sistema se incrementa. Esta situación es atribuible a las diferencias de intensidad con la que el agua se asocia con los constituyentes no acuosos. El agua unida fuertemente está menos disponible para las reacciones degradativas, tales como el crecimiento de microorganismos y las reacciones químicas hidrolíticas, que el agua que tiene asociaciones débiles. El término actividad de agua se desarrolló para considerar la intensidad con la cual el agua se asocia con los distintos constituyentes no acuosos (Fennema, 1996). En el equilibrio, la relación entre la  $a_w$  y la humedad relativa (HR) está dada por la ecuación siguiente:

$$a_w = \frac{HR}{100}$$

En el equilibrio, a temperatura constante, las actividades de agua de los componentes de una mezcla son iguales, mientras que los contenidos de agua pueden no serlo. Cuando las semillas se almacenan a temperatura constante en atmósferas con diferentes humedades relativas, su contenido de agua gradualmente llega a un equilibrio de manera tal que el contenido de agua final será función de la humedad relativa, y puede ser representado en curvas de equilibrio o isotermas de sorción. De acuerdo con dichas curvas y estudios calorimétricos, se han clasificado al menos 5 etapas de agua o niveles de hidratación en los tejidos de semillas ortodoxas y recalcitrantes (Vertucci, 1989, 1990; Berjak y col., 1990, 1992; Pammenter y col., 1991). En la región 1 (aproximadamente de 0 a 8 g agua/ 100g de masa seca), las moléculas de agua están asociadas fuertemente a superficies macromoleculares por enlaces iónicos y se comportan como un ligando antes que como un solvente. La energía de atracción es estimada como  $-50\text{kJ mol}^{-1}$ . En la región 2 (8-22%), el agua forma parte de vidrios generados por los sólidos (William y Leopold, 1989) y la energía de atracción disminuye a cerca de  $-2\text{kJ mol}^{-1}$  sugiriendo una interacción débil con la superficie macromolecular (Vertucci, 1989). Cuando su concentración está cerca del 22%, el agua recupera sus propiedades de solvente y aparecen algunas actividades metabólicas. Las moléculas de agua correspondientes a las regiones de hidratación 1 y 2 se conocen tradicionalmente como “agua ligada”, que da cuenta de la gran interacción de estas moléculas con los sólidos. En una semilla seca, toda el agua está presente como agua “ligada” y esta agua unida parece ser un componente crucial de tolerancia a la desecación (Vertucci y Leopold, 1987). Las propiedades térmicas del tercer nivel de hidratación (22-33%) aparentan ser de una solución concentrada. El agua congela entre  $-18^{\circ}\text{C}$  y  $-38^{\circ}\text{C}$ , tiene energía de atracción despreciable y se produce la iniciación de puentes sobre sitios hidrofóbicos. A este nivel de hidratación, se puede medir la respiración (Leopold y

Vertucci, 1989). En la región 4 (33-55%) y 5 (encima del 55%), el agua exhibe propiedades térmicas similares a una solución diluida. Encima del 55 % de contenido de humedad, los tejidos de las semillas están completamente hidratados, permitiendo que se lleve a cabo el proceso de germinación.

Las isotermas de sorción de semillas ortodoxas poseen generalmente una forma sigmoidea que resulta indicativa de las tres regiones de interacción del agua (Vertucci y Roos, 1993; Walters, 1998). Varían entre diferentes especies debido a las diferencias en la composición de las semillas (Vertucci y Leopold, 1987). La intensidad y naturaleza de la interacción del agua con los sólidos de la semilla incide sobre la velocidad de las reacciones de deterioro (Vertucci y Roos, 1990; Leopold y Vertucci, 1989) Por lo tanto, las características de sorción de las semillas pueden tener influencia sobre la variación de la longevidad de las semillas entre diferentes especies (Eira y col., 1999) o, incluso entre distintos cultivares, aunque la relación entre la capacidad de unión del agua y el comportamiento en el almacenamiento no ha sido confirmada aún.

Se han propuesto diferentes ecuaciones para la correlación entre contenido de agua de equilibrio y actividad de agua ( $a_w$ ) en alimentos. Una de las más ampliamente aplicadas es la llamada ecuación GAB (Guggenheim-Anderson-deBoer) :

$$\frac{m}{m_0} = \frac{C \cdot a_w}{(1 - k \cdot a_w)[1 + (C - k)a_w]} \quad \text{Ecuación 2.1}$$

Donde  $m$  es el contenido de agua,  $m_0$  es el contenido de agua de monocapa o contenido de agua teóricamente requerido para cubrir los sitios polares de la superficie del sólido con una capa unimolecular de agua,  $C$  es la constante de Guggenheim relacionada con el calor de sorción de la monocapa y es característico del material, y  $k$  es un factor de corrección relacionado con el calor de sorción de la

multicapa frente al agua libre. C y k están relacionados con la energía de la interacción entre moléculas de agua de mono- y multicapa y reflejan el efecto de la temperatura sobre las propiedades de sorción. K alcanza generalmente valores cercanos y menores a uno. El modelo GAB ha sido considerado el de mejor ajuste para muchos alimentos en un amplio rango de actividades de agua (Lomauro y col., 1985). Sin embargo, existe una limitación importante en el empleo de la actividad de agua en sistemas complejos como algunos alimentos o sistemas biológicos. Su determinación supone el equilibrio del material con el medio, es decir que la presión parcial de vapor del entorno sea la misma que la del agua del material. Este supuesto no siempre se cumple, particularmente en los sistemas en los cuales la difusión de agua es muy baja y que se encuentran en estados termodinámicamente no estables. Levine y Slade (1986; Slade y Levine, 1991) introdujeron entonces el estudio de la movilidad molecular que considera tanto al factor termodinámico como al cinético para explicar la estabilidad de estos productos.

La estructura física de un biomaterial está definida por el estado físico de sus principales constituyentes: lípidos, hidratos de carbono, proteínas y agua, así como también por el tipo de procesamiento y almacenamiento al que fue sometido, es decir por su historia térmica. Estos materiales pueden encontrarse en estado cristalino o amorfo. Este último no es un estado de equilibrio verdadero. Las transiciones de fase son cambios en el estado de los materiales, que tienen efectos significativos en sus propiedades físicas. Los biomateriales se presentan en la naturaleza en un estado que no siempre corresponde a su condición de estabilidad termodinámica y exhiben muchos cambios dependientes del tiempo que no son típicos de compuestos puros simples y que afectan significativamente la estabilidad. En estos casos, el estado físico es extremadamente sensible a la humedad, la temperatura y el tiempo de observación, y las transiciones de fase o estado ocurren



en función del tiempo como consecuencia de cambios en la composición o en alguna de las variables mencionadas. Los sólidos amorfos se obtienen cuando las moléculas del soluto son inmovilizadas mediante un rápido congelamiento o una rápida deshidratación. De este modo no pueden alcanzar configuraciones de equilibrio y por lo tanto no pueden organizarse para formar un cristal sino que permanecen en forma desordenada o amorfa. Raramente se alcanza el equilibrio físico-químico en estos sistemas en una escala de tiempo mensurable (Sun y Leopold, 1997).

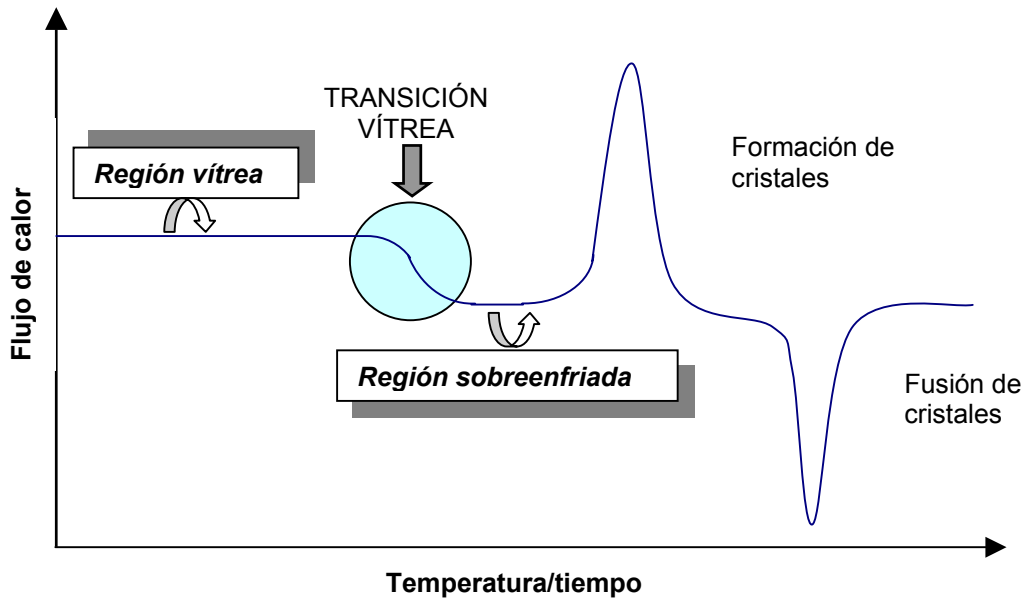
En condiciones de almacenamiento apropiadas de baja temperatura y bajo contenido de agua, las semillas pueden encontrarse en estado vítreo. La alta viscosidad y baja movilidad molecular de los sistemas vítreos prevendría o inhibiría muchos procesos deletéreos (Williams y Leopold, 1989; Buitink y col., 1998). Debido a la alta viscosidad y baja movilidad molecular en este estado, la formación de vidrios ofrecería, aparentemente, varias ventajas para prolongar la tolerancia al almacenamiento en semillas secas: limitaría la tendencia de las células a la cristalización del contenido, inmovilizaría los componentes celulares e interferiría con su reactividad, limitaría la pérdida de las últimas trazas de agua durante el secado de la semilla y, por su calidad hidrofílica, prevendría los daños estructurales a macromoléculas y membranas que ocurrirían durante el proceso de secado. En consecuencia, las transiciones de los componentes citoplásmicos podrían afectar la viabilidad, y se ha propuesto que su vitrificación sería ventajosa para la estabilidad de germoplasma (Vertucci y Roos, 1990). Con el aumento de la temperatura o del contenido de agua, las semillas atraviesan una transición de estado vítreo a líquido sobreenfriado a la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) resultando en un aumento de la movilidad molecular.  $T_g$  es una función del contenido de agua, y si la semilla se encuentra o no en estado vítreo, dependerá de su contenido de agua y de la

temperatura de almacenamiento (Buitink y col., 1998; Murthy y col., 2003). Se han detectado vidrios intracelulares en semillas de numerosas especies (Sun, 1997; y sus referencias).

Los organismos tolerantes a la desecación contienen altos contenidos de azúcares solubles (Leopold, 1990). Una alta proporción de sólidos (azúcares y otros biopolímeros), en relación al contenido de agua, promueven un rápido aumento de la viscosidad del citoplasma durante el proceso de secado. En esporas fúngicas, levadura, musgos y helechos, la tolerancia a la desecación está asociada con grandes acumulaciones del disacárido trehalosa. Mientras que en la mayoría de las semillas de angiospermas y polen, la tolerancia a la desecación esta asociada con grandes acumulaciones de sacarosa, usualmente acompañada por oligosacáridos tales como rafinosa y estaquiosa (Amuti y Pollard, 1977). Estos hidratos de carbono satisfacen dos criterios necesarios para proteger membranas durante la desecación y durante el almacenaje en estado seco:

1. depresión de la temperatura de la fase de transición de gel a líquido cristalino ( $T_m$ ), a una temperatura cercana a la del lípido hidratado, requiriendo una interacción directa entre los hidratos de carbono y las moléculas lipídicas de la membrana; y
2. formación de un estado vítreo, por acumulación de hidratos de carbono con una temperatura de transición vítrea relativamente alta, conduciendo a inhibición de fusión entre las vesículas.

Experimentos con sistemas modelos de membranas indican que la mejor protección contra los daños por desecación es alcanzado con trehalosa y sacarosa (Leopold,1990). Los hidratos de carbono sirven también para proteger la integridad de las proteínas en la desecación (Carpenter y col., 1987).



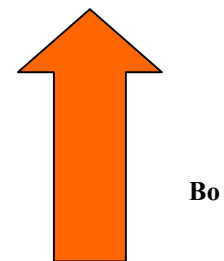
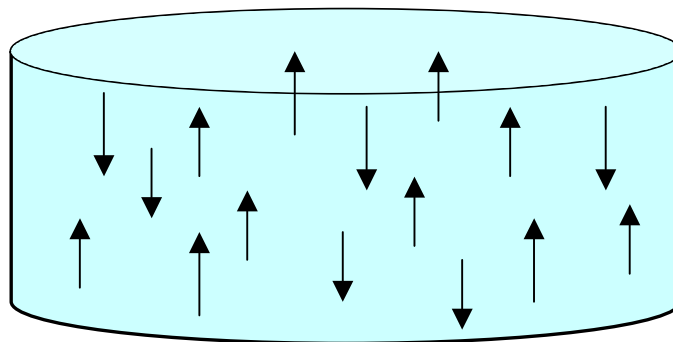
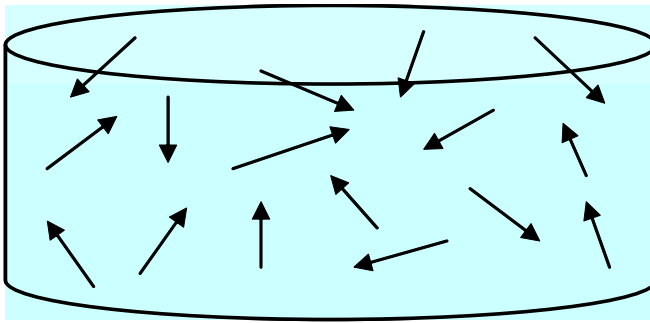
**Figura 2.1. Termograma típico de un azúcar liofilizado obtenido mediante DSC. (Adaptado de Roos, 1992).**

La transición vítrea puede ser detectada y estudiada por distintos métodos. El método de calorimetría de barrido diferencial (DSC) es el más utilizado, y es capaz de detectar la transición vítrea en base al cambio en el calor específico cuando el material pasa del estado sólido amorfo a líquido sobreenfriado. La Figura 2.1 es un esquema de un termograma típico (obtenido por DSC) de un azúcar liofilizado que muestra sus transiciones de fase y cambios de estado. El calor específico es otra de las propiedades que cambian en las cercanías de la transición vítrea. Se produce un cambio escalonado en el calor específico a medida que un sistema es calentado y atraviesa la transición vítrea. En el termograma se representa el flujo calórico en función de la temperatura o bien del tiempo de calentamiento de la muestra. La muestra se calienta a una velocidad constante en una cápsula sellada, y en general se utiliza una cápsula vacía como referencia.

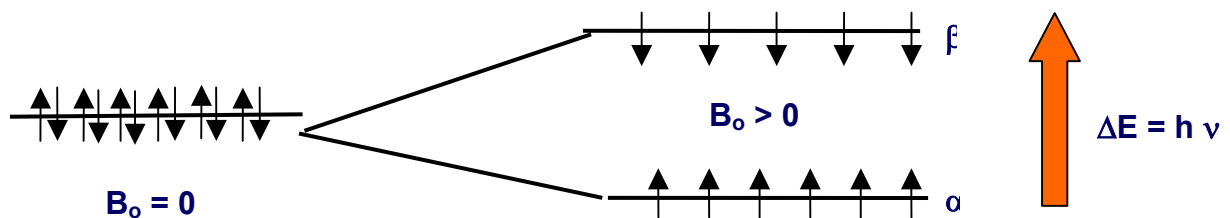
El flujo diferencial de calor se monitorea durante el calentamiento de la muestra y de la referencia. El cambio en el calor específico del sólido que ocurre a la

temperatura de transición vítrea de la muestra, se evidencia como un cambio en la línea de base del termograma a medida que la muestra es calentada a una velocidad constante desde una temperatura inicial menor que  $T_g$  hasta temperaturas mayores. A temperaturas más altas que  $T_g$ , el azúcar se transforma en un líquido sobreenfriado. A medida que la temperatura y la movilidad aumentan, y la viscosidad disminuye, las moléculas de azúcar pueden reorientarse hasta alcanzar un estado termodinámicamente más estable como lo es la estructura cristalina. La cristalización se manifiesta como un pico exotérmico en el termograma. Al aumentar aun más la temperatura, el azúcar funde produciendo un pico endotérmico. Un termograma como el descrito demuestra el efecto de la temperatura sobre el estado físico de un alimento liofilizado que contiene azúcares.

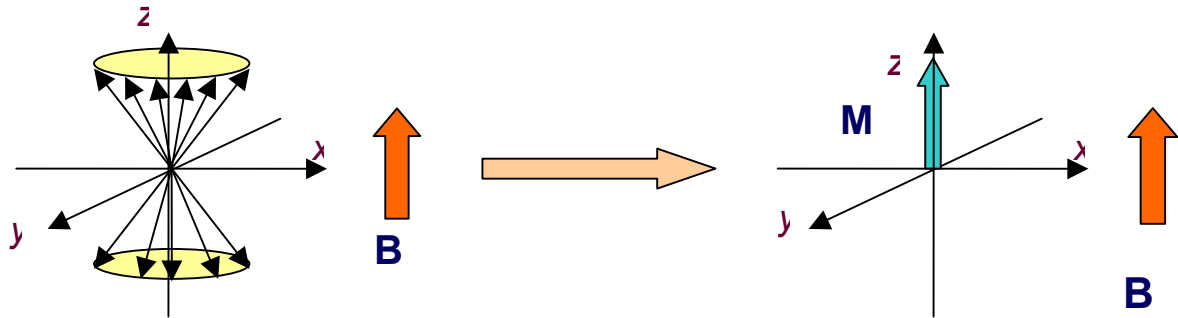
Cuando se coloca cualquier núcleo atómico con un número cuántico de espín distinto de cero ( $I \neq 0$ ) en un campo magnético, puede absorber y emitir energía a través de radiación electromagnética, la cual se detecta por espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN). El núcleo  $^1\text{H}$ , es el más utilizado en la espectroscopía RMN, debido a la facilidad de observación, a su alta abundancia natural y al hecho que se encuentra presente invariablemente en la mayoría de las muestras biológicas. En el nivel fundamental todos los núcleos están desordenados, no hay diferencia de energía entre ellos. Son estados degenerados. Si se aplica un campo magnético externo ( $B_0$ ), se orientan:



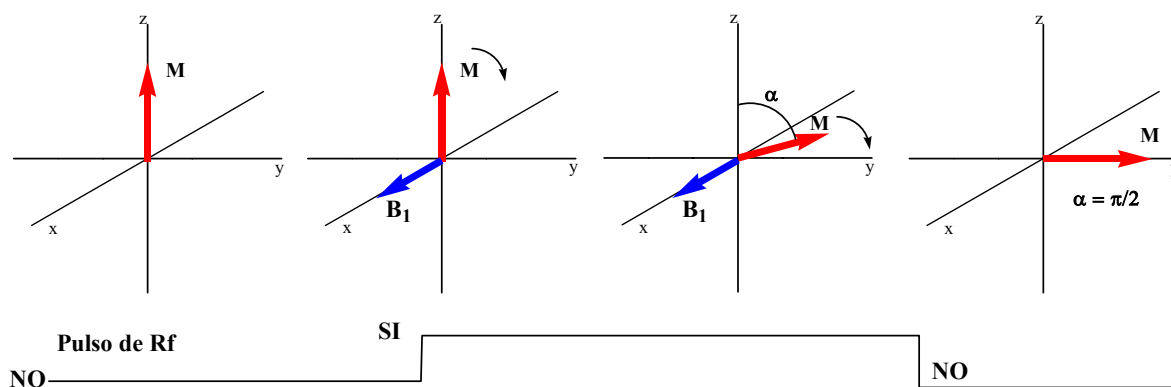
Al aplicar un campo magnético externo se crea una diferencia de energía entre los dos estados  $\downarrow \uparrow B_0$ :



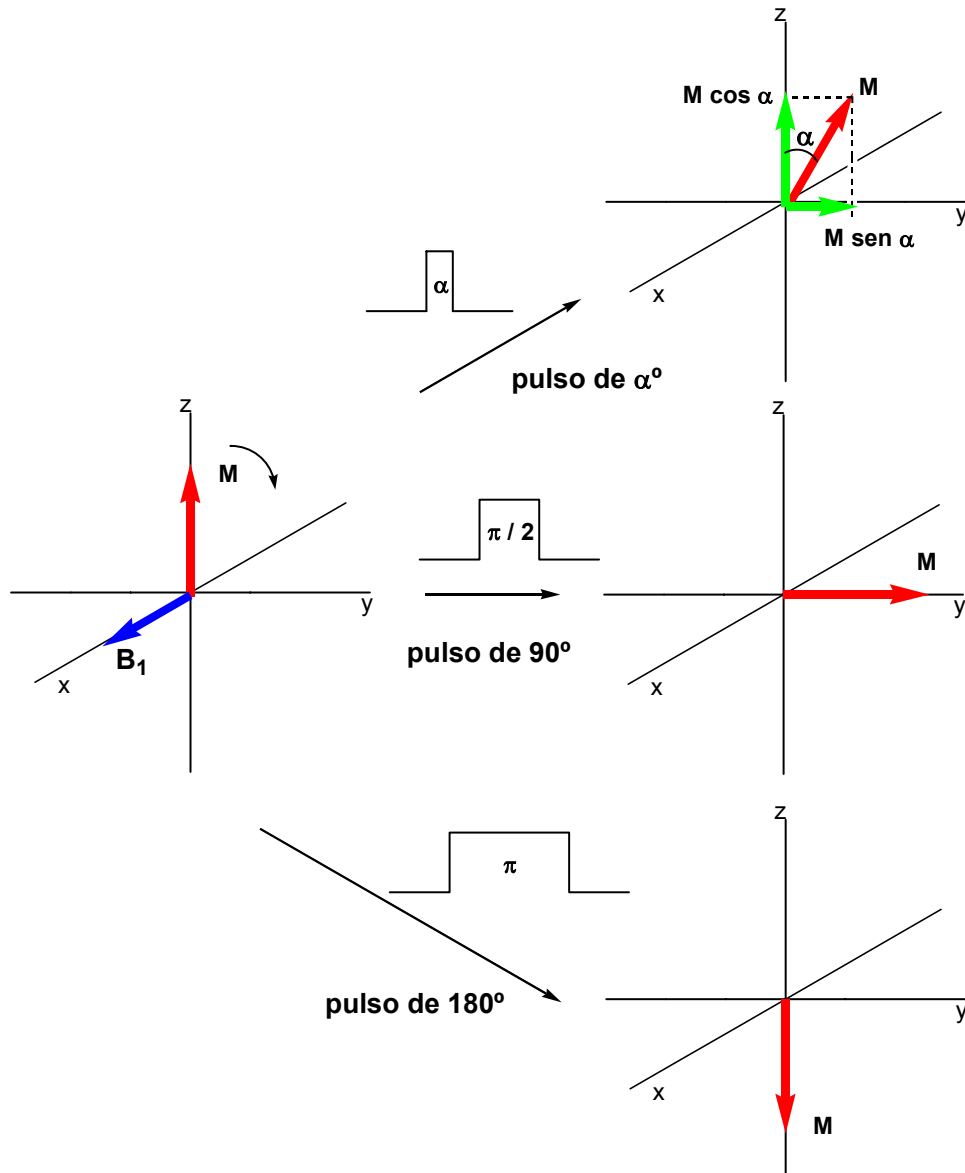
La magnetización macroscópica  $M_0$  es directamente proporcional a la diferencia de las poblaciones ( $\alpha - \beta$ ), en la cual se promedian las contribuciones de los diferentes momentos magnéticos ( $m$ ). Si se descompone la contribución de los  $m$  en contribución sobre  $z$  y en el plano  $\langle xy \rangle$ , los componentes en el plano  $\langle xy \rangle$  están distribuidos al azar y se cancelan. Para los del eje  $z$ , se tiene una magnetización proporcional a la diferencia de poblaciones.



El experimento de RMN consiste en inducir la transición entre la energía de los niveles vecinos por absorción o emisión de un fotón con una energía determinada. Esta energía se aplica en la forma de un campo magnético rotatorio o por pulsos de radio frecuencia (RF), cuya frecuencia exactamente coincide con la frecuencia de Larmor, y cuya energía es igual a  $\Delta E$  ( $\Delta E=h\nu$ ) y causa la absorción o emisión resonante de energía por el núcleo. Este efecto de resonancia es llamado resonancia magnética nuclear. El campo neto que experimentará la muestra es  $B_1$  perpendicular al eje z, y por lo tanto M efectuará un proceso de precesión alrededor de  $B_1$ .



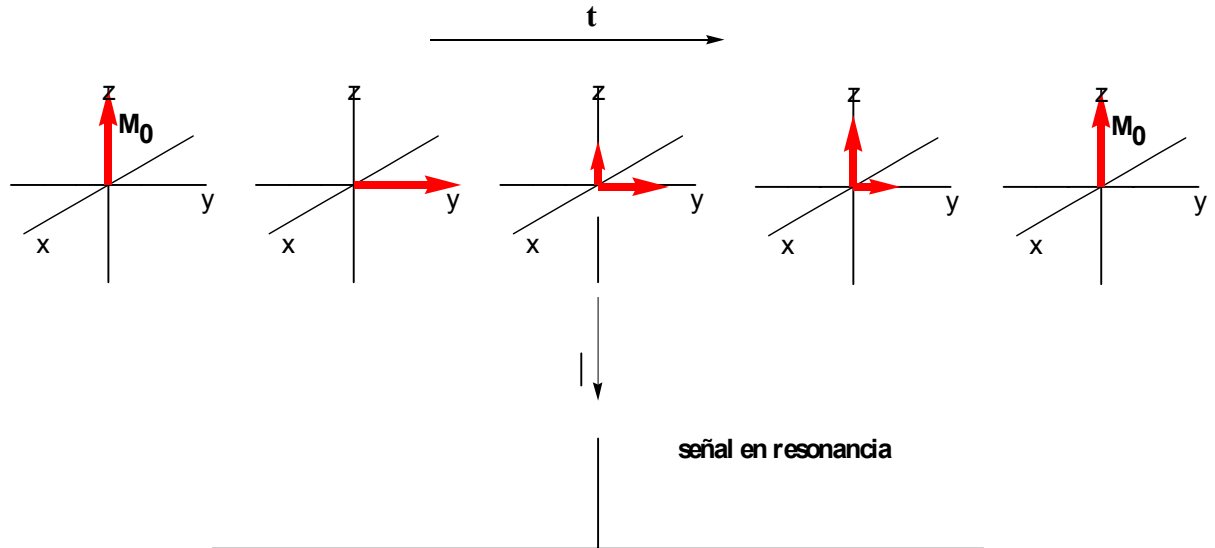
La duración de los pulsos de radiofrecuencia variará en cada equipo. A los pulsos de radiofrecuencia se los denomina por el ángulo que hacen describir a M.



En el tiempo siguiente de la absorción resonante causada por el pulso RF, los espines de los núcleos retornan a la distribución de la población correspondiente al estado de equilibrio. La mayoría de la población originalmente en el nivel menor, retorna a su equilibrio por pérdida de energía en la forma de una onda de radio frecuencia de procesos de transiciones no radiativas, llamados procesos de relajación.

Los procesos de relajación ocurren simultáneamente pero los podemos separar en relajación longitudinal (espín-red) y relajación transversal (espín-espín). La vuelta al equilibrio sin emisión de radiación electromagnética es llamada

relajación espín-red porque el exceso de energía pasa del sistema (espín) a los alrededores (red), generalmente en forma de calor.

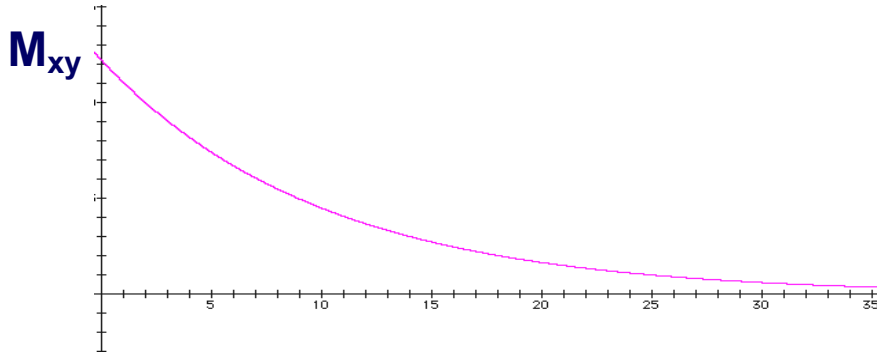


Al mismo tiempo que se recobra la magnetización según el eje z, también se va perdiendo en el plano  $\langle xy \rangle$ . La relajación espín-espín es un proceso de disminución exponencial de primer orden que se caracteriza con un tiempo de relajación  $T_2$ . Para sólidos cristalinos o líquidos muy viscosos estos tiempos son muy pequeños ( $10^{-4}$  s). El proceso de relajación transversal o espín-espín ocurre sin cambio de energía del sistema. Obviamente, si se recuperó totalmente la magnetización según z, ya no puede existir magnetización transversal. Por lo tanto  $T_2$  es siempre menor o igual a  $T_1$  (tiempo de relajación que caracteriza a una relajación espín-red).

El análisis de  $T_1$  y  $T_2$  de una muestra permite el estudio de propiedades químicas y físicas de una muestra. Un tiempo largo de  $T_1$  o  $T_2$  indica relajaciones lentas y tiempos cortos indican relajaciones rápidas. El tiempo de relajación  $T_2$  describe el decaimiento en el plano  $\langle xy \rangle$  ( $M_{xy}$ ) y es fácilmente detectable. Un pulso de frecuencia a  $90^\circ$  impulsa la magnetización sobre el eje y con una magnitud de



$M_{xy} = M_0$ .  $M_{xy}$  comienza a decaer en forma exponencial luego de la aplicación del pulso. La curva de decaimiento es normalmente llamada decaimiento de inducción libre o FID.



Sin embargo, frecuentemente se obtienen resultados inesperados cuando se realiza el experimento de un único pulso a  $90^\circ$ . Después de la aplicación del pulso, la magnetización neta decae más rápidamente que la predicha. Esto puede suceder debido a inhomogeneidad del campo, difusión, etc., Sólo en el caso de muestras sólidas, el efecto de dicha inhomogeneidad es despreciable y el método es aplicable para determinar  $T_2$ . (Fullerton y Cameron, 1988).

La secuencia de pulsos llamada Car-Purcell-Meiboom-Gill o CPMG, es el método más comúnmente utilizado para la determinación de  $T_2$ . Este método involucra un pulso de  $90^\circ$  seguido por una serie de pulsos a  $180^\circ$  aplicados a lo largo del eje positivo y, a tiempos  $\tau$ ,  $3\tau$ ,  $5\tau$ , etc, los cuales se reenfocan en espines individuales para formar ecos a tiempos  $2\tau$ ,  $4\tau$ ,  $6\tau$  etc. a lo largo del eje y, siendo todos los ecos positivos. La limitación principal del método radica en la incapacidad de detectar relajaciones muy cortas cuyas señales desaparecen antes de que se inicie la adquisición de datos.



los datos experimentales obtenidos, con el menor número posible de términos (componentes). Esta aproximación ha probado ser aplicable en sistemas con tres componentes o menos. De esta forma se pueden distinguir moléculas de agua más o menos móviles a través de la cinética de relajación y se pueden calcular sus cantidades relativas (Krishnan y col., 2003; 2004). En comparación con los métodos gravimétricos, las técnicas de RMN pueden proveer información más detallada sobre el contenido y el estado del agua, como así también la presencia de poblaciones con distinta movilidad, en las semillas con diferentes contenidos de agua durante el almacenamiento (Krishnan, 2004).

Visto que la quínoa es una especie bien adaptada a condiciones ambientales extremas, las diferencias genóticas entre sus cultivares pueden constituir un material apropiado para estudiar el rol del estado del agua y los consecuentes cambios en el metabolismo sobre la longevidad de las semillas. El objetivo de este capítulo fue analizar la relación entre la movilidad el agua y la longevidad de las semillas en cultivares de quínoa de orígenes contrastantes.

## **Materiales y Métodos**

### ***Material biológico. Cultivares***

Se emplearon semillas de quínoa procedentes de cultivares en las que preliminarmente se habían notado comportamientos contrastantes en lo referente a longevidad potencial y tolerancia a la conservación en condiciones naturales. El material fue cultivado en el campo experimental y viveros de la Cátedra de Cultivos de la Facultad de Agronomía o del campo experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. Los cultivares utilizados, clasificados según su interacción genotipo-ambiente (Bertero y col. 2004), son:

#### ***1. Grupo de adaptación de nivel del mar:***

##### ***‘Baer II’***

‘Baer II’ es una mezcla de líneas avanzadas de mejoramiento de semillas de ‘Baer’, originaria de las afueras de Temuco, Chile, a aproximadamente 100 m s.n.m. Es un material precoz, y procede de la misma línea de mejoramiento que sirvió de base para la mayor parte de las variedades de quinoa actualmente en cultivo en Europa. La precipitación promedio de Temuco es de 1200 mm al año, concentrados principalmente en el invierno.

##### ***‘Chadmo’***

‘Chadmo’ es una raza local de la localidad del mismo nombre en la Isla de Chiloé. Chadmo se encuentra sobre planicies bajas al sur de Castro, la capital de la isla, en la X Región de Los Lagos. Las precipitaciones rondan los de 2500 mm anuales.

##### ***‘NL-6’***

'NL-6' es una variedad seleccionada en la Universidad de Wageningen, Holanda, a partir de materiales chilenos de nivel del mar.

## ***2. Grupo de adaptación de altiplano chileno-boliviano:***

### **'Sajama'**

'Sajama' es una variedad del altiplano central de Bolivia, seleccionada en la estación experimental Patacamaya por su bajo contenido de saponinas. Patacamaya está localizada entre La Paz y Oruro. La región se encuentra a 3600-4000m s.n.m y las precipitaciones oscilan en los 300-600mm anuales durante el verano, presentándose 6 a 7 meses de extrema aridez durante el invierno.

### **'2-Want'**

'2-Want' es originaria del altiplano boliviano aunque se desconoce la localización exacta.

## ***Propiedades de sorción***

### ***Acondicionamiento del material***

Para la confección de las isotermas de sorción, las semillas se equilibraron a diferentes condiciones de humedad relativa incubándolas en cámaras con diferentes soluciones salinas saturadas y a temperatura constante de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 4 semanas. Las soluciones utilizadas, para este y otros ensayos, y sus correspondientes humedades relativas de equilibrio fueron las expresadas en la tabla 2.1.

Luego se midió la actividad de agua ( $a_w$ ) de las semillas en cada caso y se determinó el contenido de agua por método gravimétrico. Las semillas se secaron en estufa de vacío a  $95^{\circ}\text{C}$  por 72 hs.

|                                |                      | Humedad relativa de equilibrio |      |
|--------------------------------|----------------------|--------------------------------|------|
|                                |                      | (% )                           |      |
|                                |                      | 6°C                            | 25°C |
| LiCl                           | Cloruro de litio     | 11,3                           | 11,3 |
| CH <sub>3</sub> COOK           | Acetato de potasio   | 23,4                           | 22,5 |
| MgCl <sub>2</sub>              | Cloruro de magnesio  | 33,                            | 32,7 |
| K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | Carbonato de potasio | 43,1                           | 43,2 |
| NaBr                           | Bromuro de sodio     | 63,5                           | 57,6 |
| MgNO <sub>3</sub>              | Nitrato de magnesio  | 58,9                           | 52,9 |
| NaCl                           | Cloruro de sodio     | 75,7                           | 75,3 |
| KCl                            | Cloruro de potasio   | 87,7                           | 84,3 |
| KBr                            | Bromuro de potasio   | 85,1                           | 80,9 |
| KNO <sub>3</sub>               | Nitrato de potasio   | 96,3                           | 93,6 |

**Tabla 2.1. Humedades relativas de equilibrios de las sales empleadas para el acondicionamiento de las semillas según Greenspan (1977).**

### ***Confección de isotermas de sorción***

Las isotermas de sorción fueron elaboradas mediante el ajuste de los datos a la ecuación GAB (ecuación 2.1) mediante el método de cuadrados mínimos, minimizando las diferencias absolutas entre contenidos de agua medidos y calculados. Valores estimados para las constantes GAB fueron obtenidos mediante la transformación de la ecuación 2.1 a su forma cuadrática:

$$\frac{a_w}{m} = \left(\frac{1}{m_0 C k}\right) + \left(1 - \frac{2}{C}\right) a_w + \left(\frac{1}{C} - 1\right) \frac{k}{m_0} a_w^2 \quad \text{Ecuación 2.2}$$

La calidad del ajuste del modelo GAB es evaluado a partir del valor del módulo de desviación porcentual relativo (% E):

$$\%E = \frac{100}{n} \sum \frac{|m - m_i^*|}{m} \quad \text{Ecuación 2.3}$$

Donde n es el número de puntos experimentados, m es el contenido de agua determinado y  $m_i^*$  es el contenido de agua calculado. De acuerdo a Lomauro y colaboradores (1985), un buen ajuste es obtenido cuando  $\%E < 5\%$ .

### ***Determinación del contenido de lípidos por RMN***

Se pesaron en una balanza analítica aproximadamente 450mg de semillas y luego fueron colocadas en tubos de vidrio de 10 mm de diámetro de manera de no superar los 2,5 cm de altura. Los tubos se colocaron en un espectrómetro Bruker NMS 120 (20 MHz). Mediante una aplicación absoluta de resonancia magnética nuclear protónica resuelta en el tiempo, provista por el software, se determinaron los contenidos de lípidos de semillas de cuatro cultivares de quínoa (Chadmo, NL-6, Sajama, 2-Want). Dicha aplicación se basa en la cuantificación de la señal de relajación de los átomos de hidrógeno presentes en la fase aceite a los 7 ms de la aplicación de pulsos cortos de radiofrecuencia. Para la realización de la curva de calibración se optó por emplear aceite de soja debido a la gran similitud observada entre su composición relativa de lípidos (tabla 2.2) y la de las semillas de quínoa descritas en el capítulo 3 (tabla 3.3), y por el bajo contenido de aceites de quínoa y la consecuente dificultad de obtener el aceite natural.

| <b>Perfil de ácidos grasos del aceite de soja</b> |                        |
|---|------------------------|
| <b>Ácido graso</b>                                | <b>Composición (%)</b> |
| <b>Saturados</b>                                  |                        |
| C12 (ácido láurico)                               | Trazas                 |
| C14 (ácido mirístico)                             | Trazas                 |
| C16 (ácido palmítico)                             | 11                     |
| C18 (ácido esteárico)                             | 4,1                    |
| C20 (ácido araquidónico)                          | Trazas                 |
| <b>Insaturados</b>                                |                        |
| 16:1 (ácido palmitoléico)                         | Trazas                 |
| 18:1 (ácido oléico)                               | 22                     |
| 18:2 (ácido linoléico)                            | 54                     |
| 18:3 (ácido linolénico)                           | 7,5                    |

**Tabla 2.2. Composición relativa de ácidos grasos del aceite de soja (*Glycine max*)** Según ARGENBIO. 2003. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología.

### ***Propiedades térmicas***

### ***Preparación del material vegetal***

Para el estudio del comportamiento térmico del material se emplearon semillas enteras de quínoa cv.BaerII, se extrajeron embriones y perisperma y se procesaron separadamente. Sobre semillas molidas se condujo una extracción de lípidos con una mezcla de cloroformo-metanol 2:1 (3ml/g semilla) durante 2 horas (Williams y Leopold, 1989). El material fue acondicionado a diferentes humedades relativas en el rango 11%-98% para su posterior estudio (tabla 2.1).



### ***Determinación de entalpías y temperaturas de transición***

Muestras de aproximadamente 15 mg se colocaron en cápsulas de aluminio selladas herméticamente para su estudio en un calorímetro diferencial de barrido (DSC Mettler Toledo 822). Los termogramas fueron obtenidos mediante calentamiento desde -140°C hasta 100°C a una velocidad de 10°C/min. Se calcularon las entalpías ( $\Delta H$ ) de fusión de agua o de desnaturalización de proteínas a partir de las áreas bajo los picos. Las transiciones vítreas fueron determinadas a partir del inicio (*onset*) del rango del cambio en el calor específico. Todos los termogramas fueron analizados con el software STARe v6.1 (Mettler Thermal Analysis).

### ***Movilidad molecular***

#### ***Acondicionamiento del material***

Las semillas se equilibraron a diferentes condiciones de humedad relativa incubándolas en cámaras con diferentes soluciones salinas saturadas (tabla 2.1) y a temperatura constante de 25°C  $\pm$  2°C durante 4 semanas. Se determinó la actividad de agua de las muestras mediante un analizador de actividad de agua por punto de rocío Aqualab (Decagon)

#### ***Determinación del tiempo de relajación transversal o spin-spin ( $T_2$ )***

Se determinaron los tiempos de relajación transversal ( $T_2$ ) de semillas de cuatro genotipos de quínoa equilibrados a diferentes humedades relativas mediante Resonancia Magnética Nuclear protónica resuelta en el tiempo (TD-NMR) mediante el método de Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG).

Las semillas a analizar se colocaron en tubos de vidrio de 10 mm de diámetro hasta una altura de 4 cm y luego sellados y dispuestos en un espectrómetro Bruker

NMS 120 (20 MHz). Se midió la relajación transversal de los protones por el método CPMG. Se fijaron los parámetros de número de puntos (256), separación entre pulsos (0,3ms), falsos ecos (1) y barridos (16) según una modificación de Krishnan y colaboradores (2004) y se mantuvieron constantes para todas las determinaciones. La ganancia fue ajustada para maximizar la relación señal/interferencia. Las curvas de relajación obtenidas fueron analizadas utilizando el software ORIGINPRO 7.0 para determinar los parámetros de las ecuaciones de ajuste: caída mono-exponencial y bi-exponencial (ecuaciones 2.4 y 2.5, respectivamente) y se representaron estos parámetros como función de la actividad de agua de las muestras.

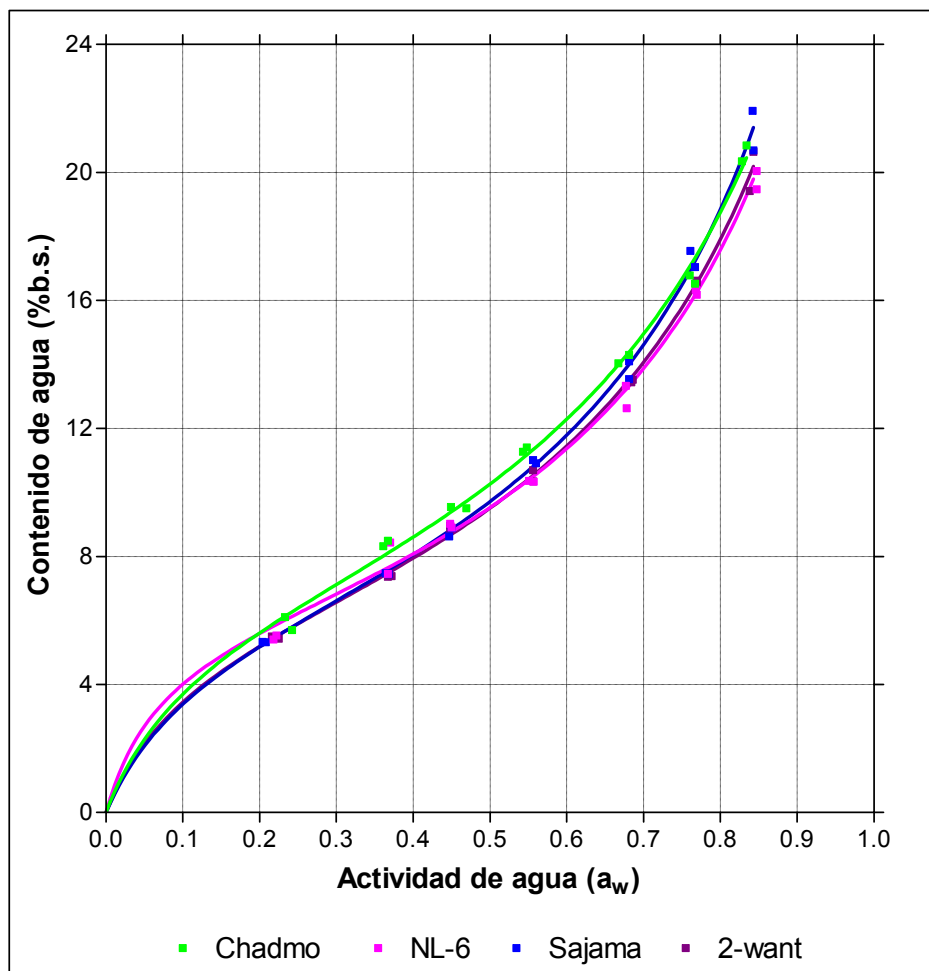
$$M_{(t)} = A \cdot e^{\frac{-t}{T_2}} \quad \text{Ecuación 2.4}$$

$$M_{(t)} = A_a \cdot e^{\frac{-t}{T_{2a}}} + A_b \cdot e^{\frac{-t}{T_{2b}}} \quad \text{Ecuación 2.5}$$

Donde  $M(t)$  es la señal de magnetización de la muestra detectada a cada tiempo  $t$ ,  $A$  es la amplitud de la señal y  $T_2$  es la constante de relajación transversal.

## Resultados y Discusión

Las isotermas de sorción obtenidas para los cuatro cultivares empleados en el capítulo 1 (Chadmo, NL-6, 2-Want y Sajama) fueron similares (figura 2.1). Los parámetros de la ecuación GAB para cada cultivar resultaron ser comparables, incluso entre aquellos provenientes de ambientes contrastantes (tabla 2.3). Los contenidos de agua de monocapa resultaron en el rango 6,23%-6,93% b.s. Los valores de  $k$  y  $C$  también fueron similares a aquellos reportados previamente (Matiacevich y col., 2006).



**Figura 2.1** Isotermas de sorción a 25°C de semillas de cuatro cultivares de quínoa.

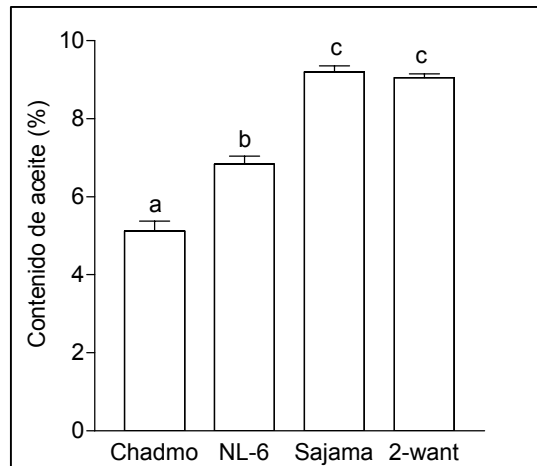
Los valores de %E fueron menores a 5 en todos los casos, reflejando una

buena concordancia entre los datos experimentales y los calculados. La constante  $k$  resultó menor a la unidad en todos los casos, como se observa en muchos alimentos (Weisser y col., 1986).

| Cultivares | $m_o(\%db)$       | $C$        | $K$             | $\%E$  |
|------------|-------------------|------------|-----------------|--------|
| 'Chadmo'   | $6,9 \pm 0,9$     | $11 \pm 7$ | $0,81 \pm 0,05$ | 2,6069 |
| 'NL-6'     | $6,3 \pm 0,7$     | $13 \pm 8$ | $0,82 \pm 0,04$ | 2,7987 |
| 'Sajama'   | $6,329 \pm 0,684$ | $10 \pm 5$ | $0,85 \pm 0,03$ | 1,8618 |
| '2-want'   | $6,234 \pm 0,511$ | $11 \pm 5$ | $0,83 \pm 0,03$ | 2,1571 |

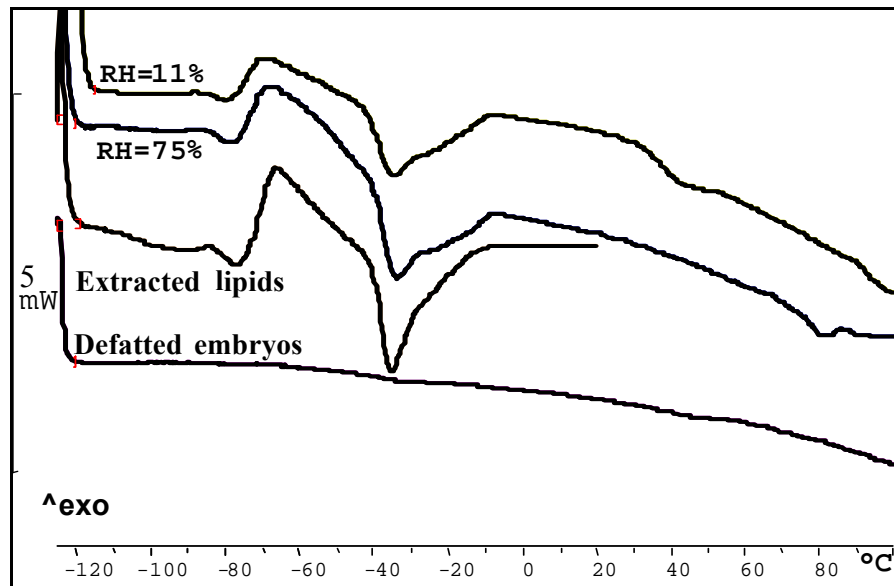
**Tabla 2.3 Constantes de las ecuaciones de ajuste GAB de las isoterms de sorción a 25°C de semillas de cuatro cultivares de quínoa.**

El contenido de agua de una semilla a una humedad relativa dada disminuye con el contenido de lípidos (Vertucci y Roos, 1990) debido a que los lípidos son inaccesibles al agua, pero contribuyen al peso seco. Por ende, se espera un contenido de lípidos similar en las semillas de los diferentes cultivares de quínoa aquí empleados. Sin embargo, según los resultados presentados en la figura 2.2, obtenidos mediante resonancia magnética nuclear protónica de baja resolución, los contenidos de lípidos en las semillas resultaron ser significativamente diferentes ( $p < 0,0001$ ). Las variaciones en el contenido de lípidos entre los cultivares estudiados no se ven reflejados en el contenido de agua para cada humedad relativa dada.



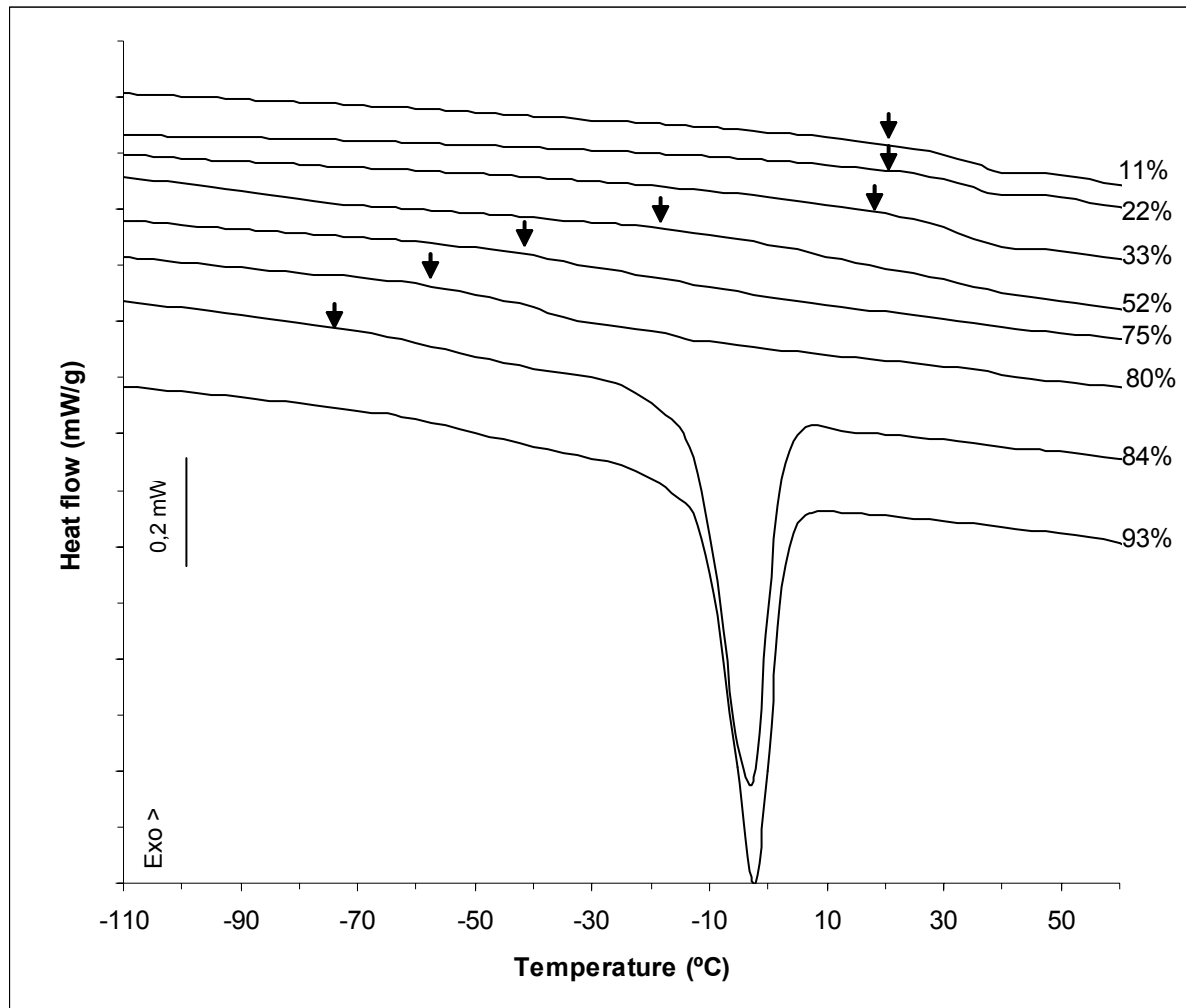
**Figura 2.2. Contenido de aceites de cuatro cultivares de quínoa. Las barras de error representan el desvío estándar.**

Se observaron transiciones térmicas en el rango de  $-80^{\circ}\text{C}$  a  $-10^{\circ}\text{C}$ , las cuales resultaron ser independientes del contenido de agua de las semillas. Transiciones de características similares han sido previamente atribuidas principalmente a la componente lipídica de embriones de maíz (Williams y Leopold, 1989) y semillas del género *Cuphea* (Crane y col., 2003). Con el objetivo de determinar si estas transiciones eran debidas a los compuestos lipídicos presentes en las semillas de quínoa, se analizaron embriones, embriones deslipidados y sus correspondientes fracciones lipídicas. Los termogramas representados en la figura 2.3 muestran que los picos endotérmicos y exotérmicos obtenidos se mantienen invariables con la modificación de la humedad relativa de equilibrio de las muestras (HR=11% y HR=75%). Asimismo, la ausencia de estas transiciones en los embriones deslipidados (*defatted embryos*) y la aparición de las mismas en la fracción lipídica (*extracted lipids*) confirman la hipótesis planteada. En consecuencia, estas transiciones endotérmicas y exotérmicas observadas pueden ser atribuidas a la fusión y cristalización respectivamente, de los lípidos presentes en los embriones de quínoa.



**Figura 2.3. Termogramas de embriones, extracto lipídico de embriones y embriones deslipidados de quínoa.**

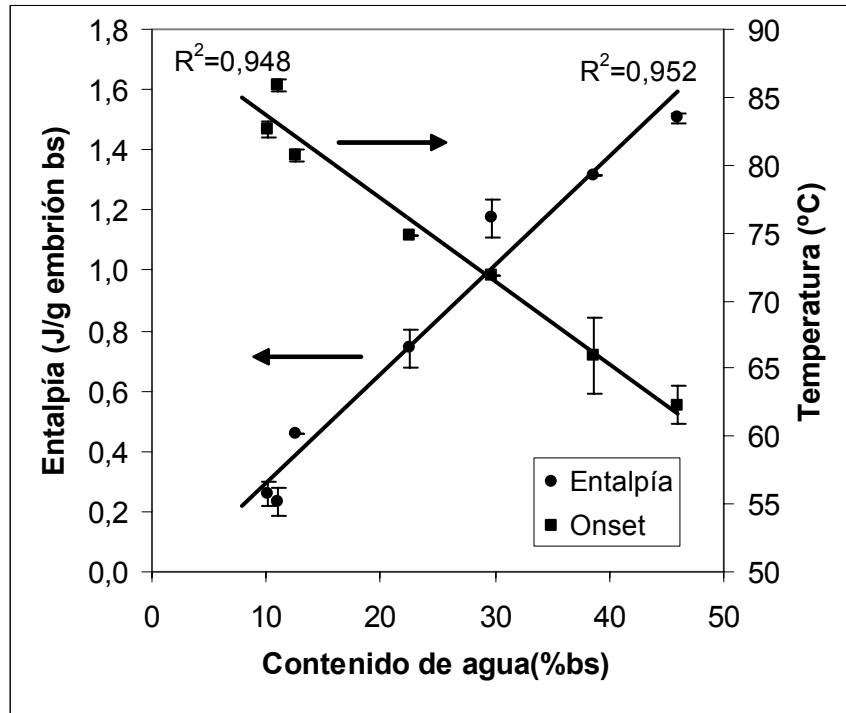
La presencia de lípidos en los embriones impidió la detección de las temperaturas de transición vítrea. Cuando los embriones se deslipidaron, los eventos endotérmicos atribuidos a la fusión de lípidos desaparecieron o se redujeron notoriamente y las transiciones vítreas pudieron ser analizadas (figura 2.4). El aumento en el contenido de agua de las muestras condujo a una menor temperatura de transición vítrea debido al efecto plastificante del agua. La movilidad molecular por debajo de  $T_g$  podría ser un factor clave en la estabilidad de tejidos biológicos durante el almacenamiento debido a que controlaría la tasa de reacciones de deterioro que reducen su longevidad a (Sun, 1997; Buitink y col., 1998; Murthy y col., 2003). Los embriones deslipidados de quínoa se encontraban cercanos a su  $T_g$  a 25°C al ser equilibrados a humedades relativas de hasta 33%, pero sus bajos valores de  $T_g$  por encima de 59% indicarían alta movilidad molecular a temperatura ambiente.



**Figura 2.4. Termogramas de embriones deslipidados de quínoa equilibrados a diferentes humedades relativas. Las flechas indican el onset de la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ).**

Otro evento endotérmico, que desapareció en siguientes escaneos, fue observado entre  $60^{\circ}\text{C}$  y  $90^{\circ}\text{C}$ . Leprince y Walters-Vertucci (1995), Sun y colaboradores (1998) y Sánchez del Angel y colaboradores (2003) han reportado transiciones similares en poroto, poroto mung y maíz, respectivamente. Estas transiciones fueron consideradas por estos autores como típicas de la desnaturalización de proteínas. Las variaciones de entalpía debidas a la desnaturalización de proteínas estarían asociadas con las alteraciones de la estructura molecular producto del desplegamiento de las proteínas y son consecuencia de una combinación de reacciones endotérmicas y exotérmicas como la disrupción de puentes hidrógeno y la disrupción de interacciones hidrofóbicas, respectivamente (Sánchez del

Angel y colaboradores, 2003). La figura 2.5 representa las variaciones del área de esta transición ( $\Delta H$ ) y de la temperatura de transición ( $T_m$ ) frente a las variaciones en el contenido de agua. Con el aumento del contenido de agua, la variación de entalpía aumenta y la temperatura disminuye.



**Figura 2.5. Entalpía y temperatura de la desnaturalización de proteínas de embriones deslipidados de quínoa con diferentes contenidos de agua.**

Aunque los cambios en el contenido de agua ayudarían a la identificación de transiciones vítreas, estos eventos fueron difíciles de observar y se solaparon con otros fenómenos térmicos. La inhibición de la movilidad molecular a bajo contenido de agua se reflejó mejor en las restricciones para la cristalización del agua y la desnaturalización de proteínas. El aumento en el contenido de agua se reflejó en la magnitud de la desnaturalización de proteínas y en la disminución de la temperatura a la cual ocurre esta transición. La presencia de agua congelable y la desnaturalización de proteínas indicarían que las reacciones de deterioro no están siendo restringidas por restricciones en el contenido de agua.

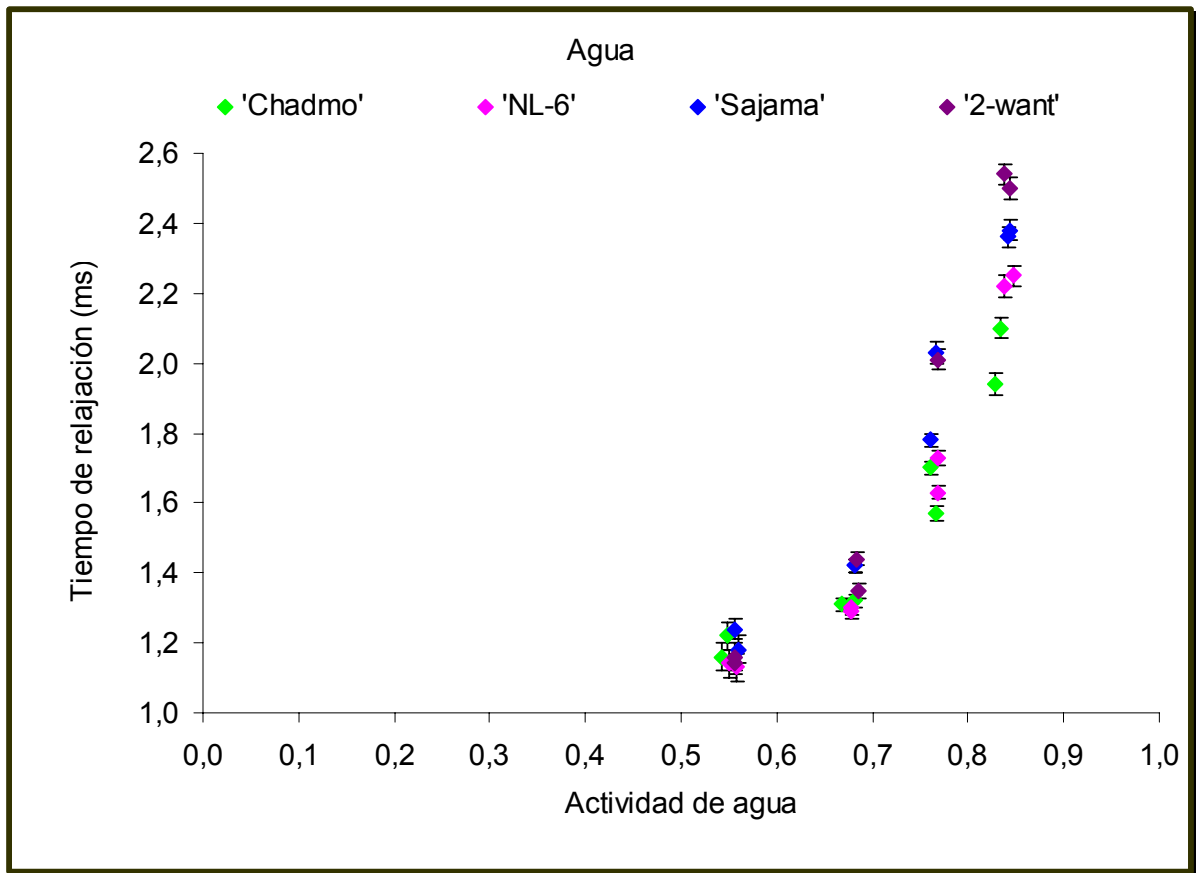


Por todo lo discutido en esta sección, el contenido de agua congelable y la temperatura de desnaturalización de proteínas podrían ser mejores indicadores del grado de tolerancia al envejecimiento que la temperatura de transición vítrea, ya que no se requiere la remoción de lípidos.

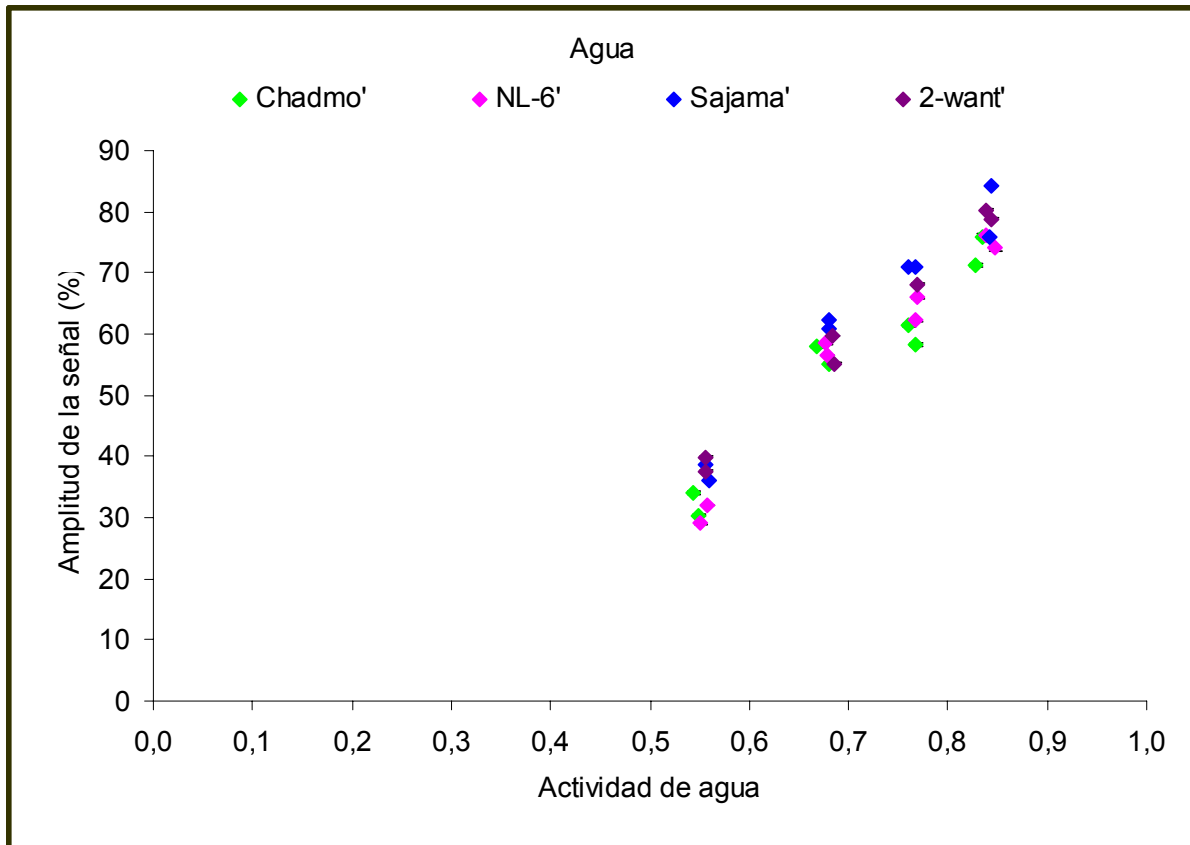
Se analizó la movilidad molecular del agua en semillas enteras de los cultivares BaerII, NL-6, Sajama y 2-want. Mediante TD-NMR. Los datos experimentales pudieron describirse mediante curvas de decaimiento mono- y bi-exponenciales, ajustadas por correlación no lineal. Las curvas obtenidas de semillas equilibradas a bajas humedades relativas ajustaron mejor con curvas mono-exponenciales con valores de  $T_2$  de 100-130 ms (figura 2.8). La amplitud de la señal tomó valores de 11,5-14,6 (cv.Chadmo), 16,3-21,6 (cv.NL-6), 22,1-30,5 (cv.Sajama) y 24,5-30,1 (cv.2-want) (figura 2.9). Estos parámetros se relacionaron con el contenido relativo de lípidos y no se vieron afectados por la HR. El método de eco de spín empleado no permitió la detección de protones de moléculas con menor movilidad. Las curvas bi-exponenciales comenzaron a proveer mejor ajuste en humedades relativas de aproximadamente 50%. Los parámetros obtenidos de curvas mono-exponenciales volvieron a hacerse presentes y se mantuvieron constantes en las curvas bi-exponenciales a humedades relativas entre 50% y 83% (figuras 2.8 y 2.9). El segundo término de las curvas bi-exponenciales mostró valores de  $T_2$  en el rango 1,13-2,54ms, aumentando con el incremento de la humedad relativa (figura 2.6). Las amplitudes se ubicaron en valores de 15,6-76,0 (cv.Chadmo), 12,2-76,1(cv.NL-6), 11,4-84,1(cv.Sajama) y 11,3-80,1 (cv.2-want) (figura 2.7).

En relación a las diferencias entre cultivares, cv.Chadmo mostró los valores de relajación transversal asociada a los protones del agua más bajos indicando una

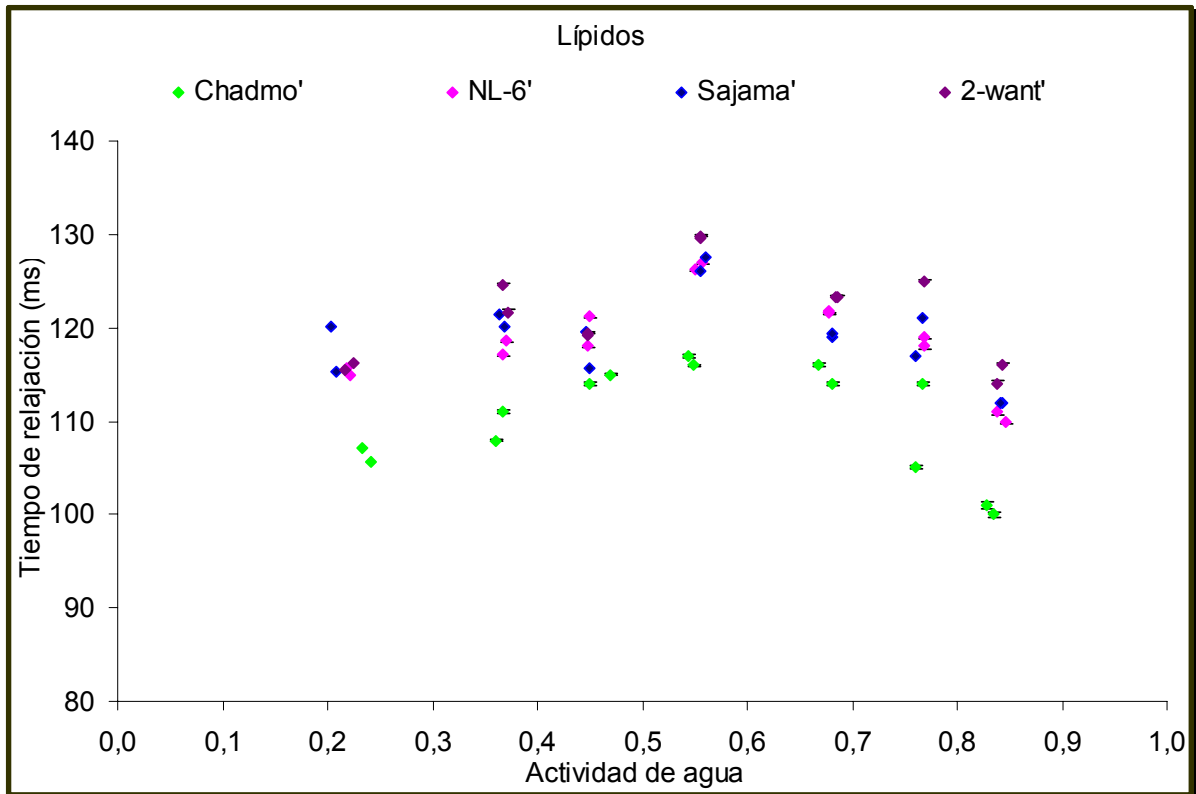
menor movilidad molecular en relación a otros cultivares en estudio.



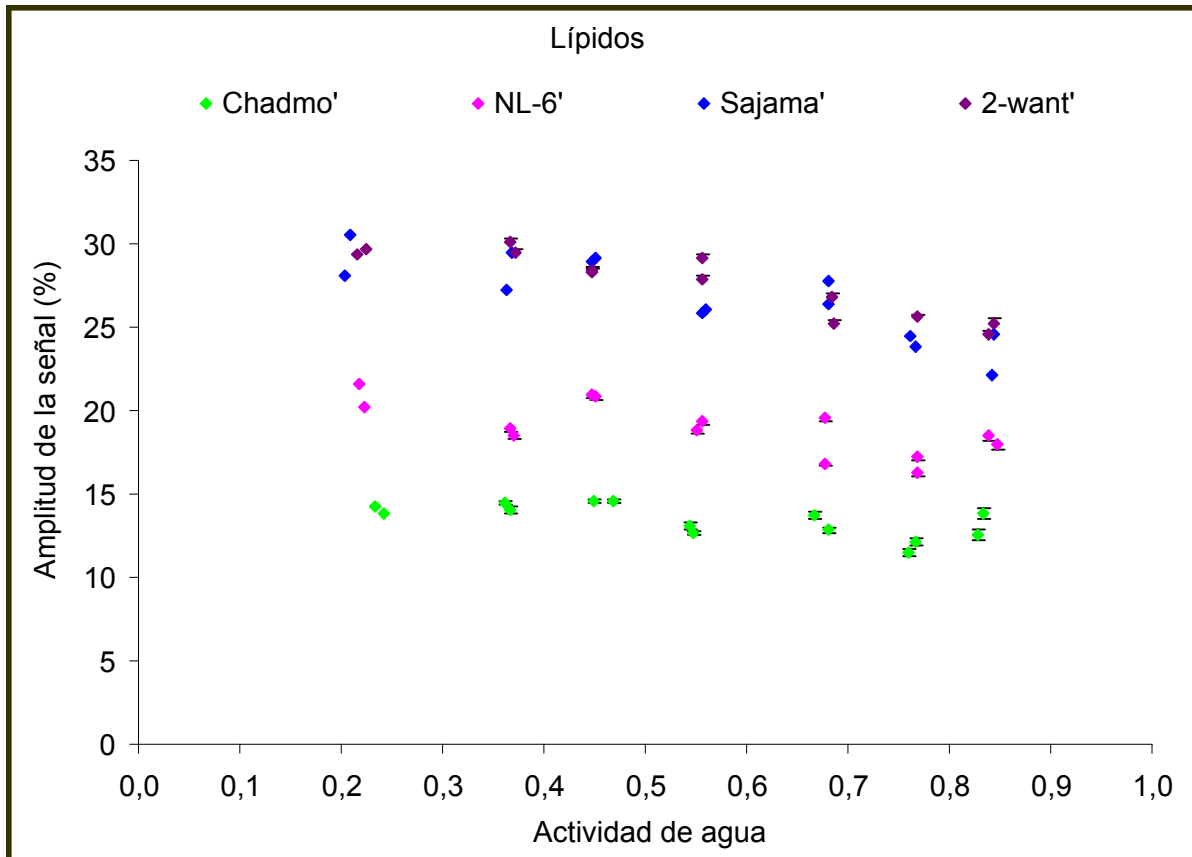
**Figura 2.6. Tiempos de relajación (T2) de la componente del agua de semillas de quínoa de cuatro cultivares con diferentes actividades de agua. Los valores de T2 aumentaron con el aumento de la actividad de agua indicando alta movilidad molecular de los protones del agua.**



**Figura 2.7. Amplitud de la señal de la componente del agua de semillas de quínoa de cuatro cultivares con diferentes actividades de agua. Los valores aumentaron debido al aumento del contenido relativo de agua.**



**Figura 2.8. Tiempos de relajación ( $T_2$ ) de la componente lipídica de semillas de quínoa de cuatro cultivares con diferentes actividades de agua. Los valores de  $T_2$  no resultaron asociados a la actividad de agua.**



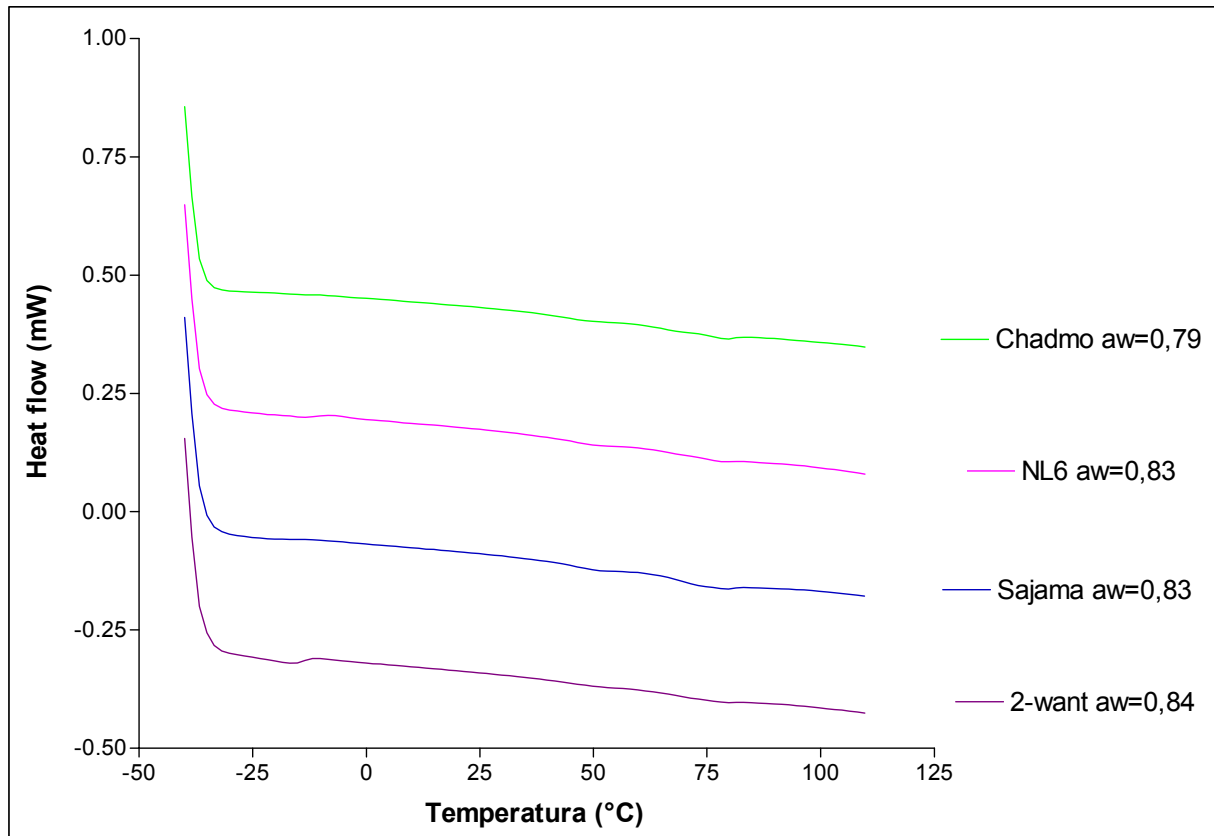
**Figura 2.9. Amplitud de la señal de la componente lipídica de semillas de quínoa de cuatro cultivares almacenadas a diferentes actividades de agua. Los valores no resultaron afectados por el aumento de la actividad de agua sugiriendo que esta componente estaría asociada a lípidos.**

Se detectó agua en multicapas en semillas de quínoa a partir de 10% de contenido de agua a actividades de agua de aproximadamente 0,50. El aumento en los valores de  $T_2$  y la amplitud indican una mayor movilidad de los protones del agua y un mayor contenido de estas moléculas, respectivamente. A actividades de agua menores, esta componente no está presente, o bien, deja de detectarse por este método. Debido a que los datos no pudieron ser ajustados a ecuaciones de caída tri-exponencial y no aparece una tercera población móvil, se propone que no hay agua congelable en las muestras analizadas.

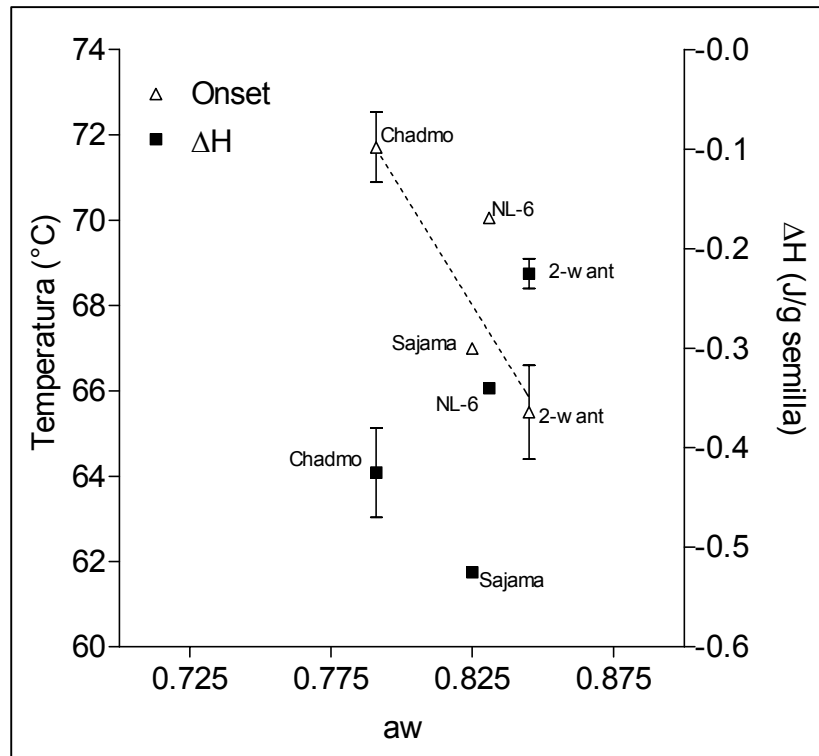
Con el objetivo de corroborar esta hipótesis, las semillas de los cuatro

cultivares fueron analizadas mediante DSC (figura 2.10). Los termogramas muestran la ausencia de picos de fusión de agua, característico de la ausencia de agua congelable en el material, confirmando lo determinado mediante TD-NMR. Se realizó un control positivo para presencia de agua congelable en semillas con altos contenidos de agua alcanzados por imbibición, secado superficial y posterior equilibrado. Las semillas alcanzaron contenidos de agua de 37,1%, 35,9%, 50,9% y 45,4% para los cultivares Chadmo, NL-6, Sajama y 2-want, respectivamente. Se detectaron picos de fusión de agua a  $-1,6^{\circ}\text{C}$ ,  $-4,1^{\circ}\text{C}$ ,  $-0,7^{\circ}\text{C}$  y  $-5,4^{\circ}\text{C}$ , en cada caso.

Los termogramas de la figura 2.10 muestran también la desnaturalización de proteínas a temperaturas de *onset* de  $64,5-72,5^{\circ}\text{C}$  para las  $a_w$  representadas. Al ser comparadas entre los cuatro cultivares, estas temperaturas mostraron estar algo asociadas a la actividad de agua ( $r^2=0,6724$   $p=0,09$ ) (figura 2.11). La entalpía de la desnaturalización, sin embargo, no mostró asociación alguna con la actividad de agua de las semillas ni con su tolerancia al almacenamiento.



**Figura 2.10. Termogramas de semillas de cuatro cultivares de quínoa obtenidos mediante DSC. Las actividades de agua representadas corresponden a las de mayor valor de  $T_2$  obtenido por TD-NMR.**



**Figura 2.11. Representación de la temperatura de desnaturalización de proteínas y la entalpía de dicho evento en semillas de cuatro cultivares de quínoa.**

Los cultivares que mostraron mayores valores de  $T_2$  mostraron ser más sensibles al alto contenido de agua durante el almacenamiento. Estos resultados son consistentes con aquellos obtenidos por Krishnan y col (2003) en semillas de trigo y soja.

En consecuencia, la información provista por relajación de espín magnético de protones de moléculas de agua puede ser útil para la predicción de la longevidad de semillas de quínoa. Una vez más, los resultados obtenidos no mostraron estar asociados al origen contrastante de los cultivares.



## ***Capítulo 3 Eventos implicados en la pérdida de viabilidad***

### **Introducción**

El contenido de agua es un factor importante sobre la cinética de las reacciones de deterioro que ocurren en las semillas y el envejecimiento (Justice y Bass, 1978; Priestley, 1986). En semillas ortodoxas maduras, las reacciones enzimáticas no tendrían un rol importante en el envejecimiento debido a que el metabolismo enzimático requiere contenidos más altos de agua. Sin embargo, algunas reacciones espontáneas no-enzimáticas pueden ocurrir aún a muy bajos contenidos de agua (Priestley, 1986, Wettlaufer y Leopold, 1991; Sun y Leopold, 1995). Estas reacciones pueden ocurrir mediante glicosilación no-enzimática con azúcares reductores, como las reacciones de Maillard y Amadori, o con aldehídos producto de la peroxidación lipídica mediada por radicales libres (Priestley y Leopold, 1983; Priestley, 1986, Wettlaufer y Leopold, 1991; Sun y Leopold, 1995; Murthy y Sun, 2000) .

La reacción de Maillard puede contribuir al envejecimiento de las semillas mediante la alteración química de proteínas funcionales, reduciendo entonces la capacidad metabólica y la capacidad del sistema metabólico de limitar el daño mediado por radicales libres y de reparar el daño durante la germinación (Murthy y col., 2002). Las reacciones de Amadori y Maillard se refieren a una serie de complejas reacciones en las cuales las proteínas se agregan y pierden solubilidad.

El análisis de fluorescencia de proteínas ha sido utilizado tradicionalmente para estudiar la modificación de proteínas debida a las reacciones de Maillard durante el almacenamiento de semillas. Este método se basa en la detección de un

pico de fluorescencia atribuible a la presencia de productos de glicosilación avanzada (AGEs) en soluciones acuosas de proteínas. Al respecto, el espectro de fluorescencia de los AGEs varía entre especies (Wettlaufer y Leopold, 1991; Murthy y Sun, 2000; Murthy y col., 2002; Baker y Bradford, 1994; Murthy y col., 2003).

Por otra parte, Baker y Bradford (1994) no han encontrado correlación entre el ensayo de fluorescencia y el deterioro de semillas de cebolla, repollo, tomate, zanahoria, brócoli y lechuga, atribuyendo esto a la interferencia con otros compuestos fluorescentes presentes en las semillas. En este sentido, este trabajo propone la determinación de la solubilidad de las proteínas como método complementario para detectar la acumulación de productos de Maillard.

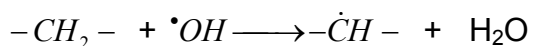
Otros eventos no-enzimáticos capaces de ocurrir a bajos contenidos de agua incluyen la auto-oxidación de ácidos grasos que generaría especies reactivas de oxígeno que se acumularían en las células (Priestley, 1986; Wilson y McDonald, 1986; McDonald, 1999). Al considerar los procesos oxidativos involucrados en el envejecimiento de las semillas deben tenerse en cuenta dos fases bien diferenciadas. En primer término, las semillas ortodoxas poseen un bajo contenido de humedad durante el almacenamiento, sin embargo, pueden producirse reacciones de auto-oxidación de ácidos grasos que llevan a la generación de radicales libres (McDonald, 1999), particularmente durante el período de deshidratación debido a la generación de intermediarios inestables en plástidos y mitocondrias (Puntarulo y col., 1988, 1991; Foyer y col., 1994; Vertucci y Farrant, 1995). En estas condiciones de muy bajo contenido de agua, no hay actividad enzimática reparadora y las especies reactivas de oxígeno no pueden ser removidas. Esto podría conllevar a un efecto deletéreo directo sobre los componentes celulares, o bien, dichos compuestos pueden ser capturados en estructuras intracelulares (Smirnoff, 1993). Estos procesos resultan aumentados

cuando el almacenamiento es prolongado u ocurre en condiciones inapropiadas de conservación.

En segundo término, la imbibición y la germinación de semillas previamente almacenadas deberían considerarse como etapas críticas del daño oxidativo relacionado al almacenamiento ya que es aquí cuando se expresan las disfunciones celulares que resultan de la acumulación de especies reactivas de oxígeno. La imbibición resulta en la liberación de radicales libres generados durante el almacenamiento y la formación de nuevas especies reactivas de oxígeno debidas al aumento del metabolismo. Las células, entonces, deben lidiar con un estrés oxidativo cuya intensidad dependerá de las condiciones del almacenamiento. El retardo en el tiempo de inicio de la germinación de semillas envejecidas se debería entonces al tiempo necesario para la activación de la maquinaria antioxidante necesaria para superar este estrés (Bailly y col., 1998, 2002; Bailly, 2004).

La composición de los lípidos de reserva en la semilla está determinada por condiciones genéticas (Knowles, 1988) y ambientales como la luz y la temperatura durante el desarrollo (Tremolières y col., 1982). Sin embargo, a causa del envejecimiento que ocurre en las semillas durante el almacenamiento, los ácidos grasos insaturados son susceptibles de ser peroxidados, siendo aquellos poliinsaturados más susceptibles que los monoinsaturados. En consecuencia, la variación de la composición lipídica durante el almacenamiento puede ser empleada como indicadora del envejecimiento.

El proceso de auto-oxidación es una cadena de reacciones iniciada por radicales libres, particularmente por el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) mediante una adición nucleofílica (Afanas'ev, 1985). La reacción se inicia con la abstracción de un átomo de hidrógeno de alta movilidad de un grupo metileno próximo a un doble enlace (insaturación).



El radical generado tiende a ser estabilizado mediante un rearrreglo molecular en el cual se forman dienos conjugados. En presencia de O<sub>2</sub>, los dienos conjugados son capaces de generar radicales peroxilos, ROO<sup>•</sup>. Los radicales peroxilo son a su vez capaces de abstraer nuevos átomos de hidrógeno y propagar la cadena de peroxidación modificando entonces la abundancia de ácidos grasos insaturados y poliinsaturados frente a los ácidos grasos saturados (Hess, 1993). Los ácidos grasos pueden ser auto-oxidados en su forma libre o combinados en glicerolípidos o glicolípidos de modo tal que los productos de oxidación incluyen moléculas conteniendo diferentes grupos oxigenados, i.e. hidroxilo, ceto y epoxi, así como cadenas alílicas o n-oxo alílicas cortas (Chang y col., 1978; Velasco y col., 2004). La identificación de productos de auto-oxidación provee valiosa información sobre la extensión del daño.

El proceso de peroxidación es inhibido o terminado por tocoferoles dado que la reacción del radical peroxilo con cualquier radical alquilo genera un hidroperóxido estable (Fryer, 1992). Se han reportado en granos de quínoa niveles altos de α-tocoferol (5,3mg/100g) y γ-tocoferol (2,6mg/100g) (Ruales y Nair, 1992). Recientemente, Ng y colaboradores (2007) han estudiado la estabilidad oxidativa de los lípidos en semillas de quínoa mediante la cuantificación de ácidos grasos libres, hidroperóxidos de dienos conjugados y hexanal. Sus resultados han demostrado una alta estabilidad de los componentes lípidicos de las semillas de quínoa.

La peroxidación de lípidos involucra la degradación de ácidos grasos poliinsaturados presentes en membranas o en lípidos de reserva. Los ácidos nucleicos y las proteínas son también blancos posibles de las especies reactivas de oxígeno (Beckman y Ames, 1997). El radical hidroxilo es capaz de dañar el ADN tanto nuclear como plasmídico o mitocondrial dado que ataca a desoxirribosas,

purinas o pirimidinas, mientras que el superóxido o el  $H_2O_2$  no poseen dicho efecto deletéreo (Breen y Murphy, 1995). Las enzimas son fácilmente inactivadas por especies reactivas de oxígeno cuando son degradados los aminoácidos relacionados a los sitios activos.

Según Koziol (1992) la composición de ácidos grasos del grano de quínoa consta principalmente de ácido linoleico ( $18:2\omega6$ ), seguido de ácido oleico ( $18:1\omega9$ ) y ácido palmítico ( $16:0$ ). Este perfil es similar al de los aceites de maíz y soja. El aceite de quínoa posee altos niveles ácido  $\alpha$ -linolénico ( $18:3\omega3$ ) al igual que el aceite de soja, siendo, en consecuencia, muy rico en ácidos grasos insaturados.

El daño que ocurre en las semillas ortodoxas durante el almacenamiento puede ser revertido por el metabolismo pre-germinativo durante la imbibición (Bray, 1995; Parera y Cantliffe, 1994). Los eventos pre-germinativos incluyen la reparación y síntesis de-novo de ácidos nucleicos y proteínas (Osborne y col, 1980, Elder y col, 1987; Osborne y Boubriak, 1994, Boubriak y col, 1997, Bewley, 1997 y sus referencias; McDonald, 1999 y sus referencias) así como la reparación de membranas. Sin embargo, los procesos moleculares que resultan operativos en las semillas son especie-específicos.

Los resultados del capítulo 2 muestran que aproximadamente por debajo de 20% de contenido de agua no se detecta agua libre en semillas de quínoa debido a la baja movilidad molecular y sería, en consecuencia, un punto crítico para definir las condiciones de almacenamiento.

En este capítulo, se estudió la modificación de proteínas y de ácidos grasos asociados al almacenamiento en semillas de quínoa procedentes de ambientes contrastantes. Se analizó la correlación entre la insolubilización de las proteínas y el deterioro de las semillas o el tiempo de almacenamiento. Para distinguir los efectos del grado de deterioro frente al tiempo de almacenamiento se utilizaron

condiciones de almacenamiento contrastantes y se analizó en cada caso el estado de conservación de las semillas y la estabilidad de las proteínas. También se analizaron las diferencias en la composición lipídica durante el almacenamiento de semillas de dos variedades de quínoa con comportamiento contrastante en el almacenamiento.

## **Materiales y Métodos**

### ***Material biológico. Cultivares***

Se emplearon semillas de quínoa procedentes de cultivares en las que preliminarmente se han notado comportamientos contrastantes en lo referente a longevidad potencial y tolerancia a la conservación en condiciones naturales. El material fue cultivado en el campo experimental y viveros de la Cátedra de Cultivos de la Facultad de Agronomía o del campo experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. Los cultivares utilizados, clasificados según su interacción genotipo-ambiente (Bertero y col., 2004), son:

#### ***1. Grupo de adaptación de nivel del mar:***

##### ***‘Baer II’***

‘Baer II’ es una mezcla de líneas avanzadas de mejoramiento de semillas de ‘Baer’, originaria de las afueras de Temuco, Chile, a aproximadamente 100 m s.n.m. Es un material precoz, y procede de la misma línea de mejoramiento que sirvió de base para la mayor parte de las variedades de quinoa actualmente en cultivo en Europa. La precipitación promedio de Temuco es de 1200 mm al año, concentrados principalmente en el invierno.

##### ***‘Chadmo’***

‘Chadmo’ es una raza local de la localidad del mismo nombre en la Isla de Chiloé. Chadmo se encuentra sobre planicies bajas al sur de Castro, la capital de la isla, en la X Región de Los Lagos. Las precipitaciones rondan los de 2500 mm anuales.

##### ***‘NL-6’***

'NL-6' es una variedad seleccionada en la Universidad de Wageningen, Holanda, a partir de materiales chilenos de nivel del mar.

## ***2. Grupo de adaptación de altiplano chileno-boliviano:***

### ***'Sajama'***

'Sajama' es una variedad del altiplano central de Bolivia, seleccionada en la estación experimental Patacamaya por su bajo contenido de saponinas. Patacamaya está localizada entre La Paz y Oruro. La región se encuentra a 3600-4000m s.n.m y las precipitaciones oscilan en los 300-600mm anuales durante el verano, presentándose 6 a 7 meses de extrema aridez durante el invierno.

### ***'Ollagüe'***

'Ollagüe' es una variedad originaria de la localidad del mismo nombre en el altiplano norte de Chile en la II Región de Antofagasta, en la frontera con Bolivia a 4000m s.n.m. Las precipitaciones acumuladas anuales no alcanzan los 100mm y se presentan principalmente en forma de nieve.

### ***'2-Want'***

'2-Want' es originaria del altiplano boliviano aunque se desconoce la localización exacta.

## ***Tratamientos***

Semillas de cv.BaerII y cv.Ollagüe fueron almacenadas a temperatura ambiente de laboratorio y humedad ambiente controlada de 14%HR durante 3 o 6 meses, o mantenidas en banco de germoplasma a -20°C y 6% de contenido de



agua. Se evaluó el estado de las semillas mediante ensayos de germinación y viabilidad. Brevemente, tres réplicas de 50 semillas fueron pre-incubadas a 100%HR y 5°C por 3 horas de manera de evitar daños por imbibición. Se desinfectaron superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio (5.5 g Cl.I-1) por 10 minutos, se lavaron con abundante agua destilada y se pusieron a germinar sobre papel en placas de Petri a 24±1 °C por 72 hs. La germinación fue evaluada de acuerdo a las normas ISTA (ISTA 2005). Para el ensayo de viabilidad se cortaron las semillas longitudinalmente a la mitad y fueron embebidas en una solución al 1% de cloruro de 2,3,5-trifenil-2H-tetrazolio e incubadas a 25°C por 24 horas en oscuridad.

En una instancia siguiente, se emplearon las semillas de cv.Chadmo, cv.Sajama, cv.NL-6 y cv.2-want obtenidas de los ensayos de envejecimiento detallados en el capítulo 1.

### ***Extracción de proteínas***

Las proteínas fueron extraídas a partir de semillas almacenadas y de semillas almacenadas y posteriormente incubadas a 4°C y 100%HR durante 20 horas con el objetivo de inducir la ocurrencia de eventos pre-germinativos. El contenido de humedad alcanzado fue de 21.5 % para cv. Baer II y 31.0 % para cv. Ollagüe. Se realizó la extracción y fraccionamiento de proteínas en grupos de solubilidad (fracciones de Osborne): solubles en agua o solución salina diluída, solubles en solución salina, solubles en álcali y solubles en etanol (Osborne, 1924). Para cada cultivar y tratamiento, aproximadamente 50 semillas fueron molidas en un mortero. Se tomó una alícuota de 30 mg y se la incubó en 1,5ml de una serie de soluciones de extracción: buffer 50 mM Tris-HCl 50 mM + 200 mM NaCl (pH 8.3) (baja salinidad, LS) por 20 minutos sobre hielo (x2); buffer Tris-HCl 50mM + 1 M NaCl (pH

8.3) (alta salinidad, HS) por 20 minutos sobre hielo; Alcohol etílico 70 % por 30 minutos a 65 °C (Etanol, E); y solución de NaOH 0.1 M (álcali, H) por 30 minutos sobre hielo. Se agregaron 0,6µl de coctel inhibidor de proteasas de uso general (Sigma) en cada paso de la extracción. Los sobrenadantes se obtuvieron por centrifugación a 15000g durante 10 minutos y 4°C y se almacenaron en freezer a -20°C para análisis posteriores. Las fracciones obtenidas fueron cuantificadas mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) y conservadas en freezer a -20°C .

### ***Análisis de la estabilidad de las proteínas de almacenamiento***

Las fracciones solubles e insolubles fueron cuantificadas por la técnica de cuantificación de nitrógeno orgánico total micro-Kjeldahl con un analizador Kjeltex Auto 1030 (Tecator) de manera de identificar diferencias en la solubilidad y la agregación de las proteínas durante el almacenamiento. Brevemente, la muestra es calentada en ácido sulfúrico concentrado y diferida hasta que la materia orgánica se oxida y el nitrógeno proteico es reducido y retenido en forma amoniacal. Luego se agrega hidróxido de sodio concentrado y se calienta para liberar el amoníaco que es retenido en un volumen dosable de una solución de ácido clorhídrico estándar. Este método no dosa azocompuestos o hidrazinas que se descomponen liberando hidrógeno, ni tampoco nitratos o nitritos que en las condiciones del ensayo se volatilizan en forma de ácido nítrico y nitroso (Gomez y col., 2001). Las fracciones solubles fueron obtenidas como se describe previamente, a excepción del uso del coctel inhibidor de proteasas, y se combinaron los extractos por cuadruplicado. Las fracciones insolubles corresponden a los precipitados obtenidos al final del proceso de extracción.

El contenido de proteínas fue estimado utilizando la ecuación 3.1.

$$P = \frac{(V_{HCl} - V_{HCl-blank}) \times f \times N_{HCl} \times 10^{-3} \frac{l}{ml} \times 14g \times 6,25}{m} \times 100 \quad \text{Ecuación 3.1}$$

Donde P es el contenido de proteínas (g/100g semillas), m es la masa de muestra inicial (g),  $V_{HCl}$  es el volumen de ácido clorhídrico estándar (ml),  $V_{HCl-blank}$  es el volumen de ácido requerido para titular el reactivo blanco (ml),  $N_{HCl}$  es la normalidad del ácido y f es el factor de dilución del estándar. El valor 6,25 es el factor empleado para transformar el valor de nitrógeno orgánico total en contenido de proteínas. 14g representa la masa molecular del nitrógeno.

### ***Detección y cuantificación de compuestos de Maillard***

Se detectarán compuestos de Maillard en fracciones solubles mediante el método de fluorescencia (Sun y Leopold, 1995; Matiacevich y Buera, 2006). Las fracciones solubles fueron diluídas hasta alcanzar una absorbancia a 380nm menor a 0,1 (Matiacevich y Buera, 2006). El espectro de fluorescencia fue analizado en un espectrofluorofotómetro Shimadzu RF-540 equipado con una lámpara de xenon de 150W. Se registraron los espectros de excitación y emisión y los máximos de fluorescencia fueron calculados siguiendo la ecuación 3.2.

$$UF = \frac{UF_x \cdot f \cdot d - b}{m \cdot g} \quad \text{Ecuación 3.2}$$

Donde  $UF_x$  es la fluorescencia medida en cada extracto, f es el factor de sensibilidad del instrumento, d es el factor de dilución, b es la ordenada al origen de la curva de calibración de sulfato de quinina 0.1 N  $H_2SO_4$  (BDH), m es la pendiente de la misma curva y g es la masa de semillas empleada expresada en gramos.

### **Caracterización electroforética**

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE) de acuerdo a Laemmli (1970) usando un gel separador de 15% y un gel concentrador de 4% (30%T, 2,67%C) de 0,75 mm de espesor. Las muestras fueron obtenidas a partir de la precipitación con ácido tricloroacético (TCA)-acetona de los extractos de proteínas solubles previamente obtenidos. A cada muestra se agregaron 3 volúmenes de una solución de 13,3% de TCA y 0,093% de  $\beta$ -mercaptoetanol en acetona a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se incubaron *overnight* a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Luego se centrifugaron por 15 minutos a 4000g a  $0^{\circ}\text{C}$  y los precipitados fueron resuspendidos en una solución de 0,07% de  $\beta$ -mercaptoetanol en acetona. Las muestras se centrifugaron nuevamente por 15 minutos a 4000g a  $0^{\circ}\text{C}$ , los precipitados se pusieron a secar y se resuspendieron en una solución buffer conteniendo 2% de SDS, 10% de glicerol, 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol y 0,01 mg/ml de azul de bromofenol en 62,5 mM Tris- HCl (pH 6,8). En la misma solución se prepararon un marcador de peso molecular e invertasa, como indicador positivo para glicoproteínas. Las muestras fueron calentadas a  $99^{\circ}\text{C}$  por 6 minutos y se sembraron 20 $\mu\text{l}$  por calle. La electroforesis se corrió a 20mA por 75 minutos en un equipo mini-Protean 3 de Bio-Rad. Finalizada la separación electroforética, los geles fueron teñidos con una solución de 0,125% de azul de Coomassie R-250 en una solución de metanol-ácido acético-agua (5:1:4 v/v/v) y decolorada en una solución de metanol-ácido acético-agua (2:1:7 v/v/v). Para la detección de glicoproteínas, los geles fueron teñidos con ácido periódico-Schiff (Segrest y Jackson, 1972).

### **Extracción de lípidos**

Aproximadamente 45 mg de semillas de las variedades Chadmo y Sajama, obtenidas durante el envejecimiento descrito en el capítulo 1, fueron molidas en un

mortero e incubadas en 1,5ml de una solución de cloroformo-metanol (2:1) durante 10 minutos con agitación. Las muestras fueron luego centrifugadas a 10000g durante 15 minutos a 4°C. Este procedimiento se realizó tres veces y los sobrenadantes obtenidos fueron conservados en oscuridad en heladera a 4°C para su posterior procesamiento.

### ***Caracterización de ácidos grasos por cromatografía gas-líquido***

Los extractos lipídicos fueron procesados según Crane y col. (2003) para la obtención de los metilésteres de los ácidos grasos. A cada muestra se agregó una solución 10% de NaCl en una relación de extracto lipídico-solución salina de 5:1 y se agitó vigorosamente durante 1 minuto, se dejó reposar 60 minutos hasta finalizada la partición (separación de fases) y se descartó cuidadosamente la fase acuosa. Luego se evaporó todo el solvente empleando nitrógeno gaseoso. A continuación, se agregaron 2ml de una solución fresca de 10% de KOH en etanol 96°, se gaseó con N<sub>2</sub> para eliminar el O<sub>2</sub> del entorno y se calentó a 80°C durante 1 hora. Para eliminar los lípidos insaponificables, se dejó enfriar a temperatura ambiente, se agregaron 2ml de hexano y se agitó vigorosamente durante 1 minuto. Al separarse ambas fases, se descartó la fase superior (hexano). La acidificación se llevó a cabo con el agregado de 1,5ml de HCl concentrado. Se agregó luego 1,5ml de hexano para permitir la solubilización de los ácidos grasos. La fase superior orgánica se recuperó y se evaporó la totalidad del hexano con N<sub>2</sub>. A continuación se realizó la metilación de los ácidos grasos. Para ello se agregaron 1,5ml de una solución 10% de trifluoruro de boro en metanol y luego 1,5ml de benceno. Se gaseó con N<sub>2</sub> y se calentó a 100°C con agitación durante 1 hora. Luego de enfriarse a temperatura ambiente, se agregaron 1ml de hexano y 2 ml de agua, se agitó vigorosamente durante 1 minuto y se dejaron separar las fases de manera de permitir la

solubilización de los metil-ésteres en hexano y la eliminación de residuos en la fase acuosa. Se descartó la fase acuosa y se repitió el agregado de agua y la agitación dos veces más para asegurar la pureza del extracto final. Finalmente, se evaporó el hexano y se almacenaron las muestras en oscuridad a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta realizar la cromatografía gas-líquido.

Los metil ésteres de ácidos grasos fueron redisueltos en hexano y se analizaron por cromatografía gaseosa (GLC) utilizando un equipo Hewlett Packard HP - 6890, con una columna Omegawax X250 programado para un incremento lineal de la temperatura de  $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  desde  $175$  hasta  $230^{\circ}\text{C}$ . Los picos de los metilésteres de ácidos grasos fueron identificados por comparación con el tiempo de retención de estándares analizados en las mismas condiciones.

Los datos fueron analizados utilizando el paquete de estadística no paramétrica del programa STATISTICA 6.0. o el programa GRAPHPAD PRISM 3.0.

## Resultados y discusión

El estado de preservación de las semillas de los cultivares cv.BaerII y cv.Ollagüe fue testeado antes del almacenamiento y después de 6 meses de almacenamiento a 14%HR y temperatura ambiente. Los resultados se muestran en la tabla 3.1. La germinación y viabilidad se vieron afectadas significativamente por el almacenamiento en las semillas de cv.Ollagüe siendo el efecto sobre la germinación más notable que sobre la viabilidad. Las semillas de cv.BaerII resultaron mejor preservadas que las de cv.Ollagüe luego de 6 meses de almacenamiento en las mismas condiciones. Las diferencias en los valores de viabilidad entre cultivares resultaron ser significativas aunque mínimas. Las semillas conservadas en banco de germoplasma mantuvieron invariables sus porcentajes de germinación y viabilidad (datos no mostrados).

|   | <i>cv.Baer II</i> |                | <i>cv.Ollagüe</i> |                |
|---|-------------------|----------------|-------------------|----------------|
| <i>Contenido de humedad (% base seca)</i> | 4.6 ± 0.1         |                | 4.8 ± 0.1         |                |
|   | <i>Control</i>    | <i>6 meses</i> | <i>Control</i>    | <i>6 meses</i> |
| <i>Viabilidad (%)</i>                     | 100               | 100            | 95 ± 5            | 85 ± 5         |
| <i>Germinación (%)</i>                    | 100               | 95 ± 3         | 63 ± 10           | 33 ± 6         |

**Tabla 3.1. Preservación de semillas de dos cultivares de quínoa luego de 6 meses de almacenamiento**

El análisis del estado de preservación de estas semillas evidencia que aún cuando la viabilidad no se encuentra severamente alterada, la germinación puede verse notoriamente afectada, particularmente en semillas de cv.Ollagüe. Estos

resultados muestran que el daño acumulado en los tejidos embrionarios durante el almacenamiento no condujo a la muerte del embrión, sin embargo fue suficiente para comprometer el proceso de germinación.

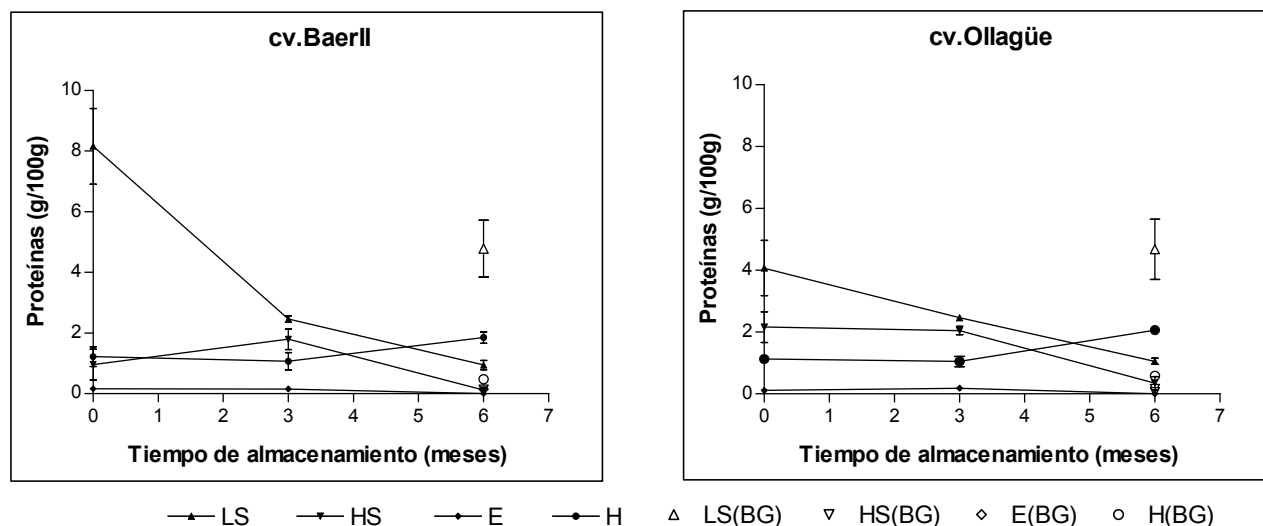
Al analizar el efecto del almacenamiento sobre las proteínas, la cuantificación muestra que, luego del almacenamiento a 14%HR y temperatura ambiente, el contenido de proteínas solubles disminuye. En particular, las fracciones solubles en solución salina (LS y HS) se redujeron y aumentó ligeramente la fracción soluble en álcali (H). Se observaron diferencias entre cultivares antes del tratamiento, siendo las proteínas solubles más abundantes en cv.BaerII que en cv.Ollagüe. Luego de 6 meses de almacenamiento, las diferencias entre cultivares tendieron a desaparecer (figura 3.1).

Estos resultados estarían indicando una marcada asociación entre estabilidad de proteínas y sobrevivencia de las semillas. Al realizar el análisis de correlación entre viabilidad y los contenidos de proteínas en las fracciones LS y H se observó una correlación positiva para la fracción LS ( $r=0,455$ ,  $p=0,0289$ ) y una correlación negativa para la fracción H ( $r=-0,4855$ ,  $p=0,0206$ ). A su vez, la correlación entre el porcentaje de germinación y los contenidos proteicos resultó significativa y positiva en el caso de la fracción LS ( $r=0,4205$ ,  $p=0,0411$ ) mientras la fracción H muestra una correlación negativa ( $r=-0,3833$ ), aunque estadísticamente no significativa al  $p=0,0582$ .

Se analizó la estabilidad de proteínas conservadas en el banco de germoplasma a 6% de contenido de agua y  $-20^{\circ}\text{C}$  con el objetivo de discernir si la alteración de las concentraciones de proteínas solubles se encuentra asociada a la preservación de las semillas o sólo al tiempo de almacenamiento, independientemente de la viabilidad que presentara el material. Las semillas conservadas en banco de germoplasma mantuvieron valores invariables de

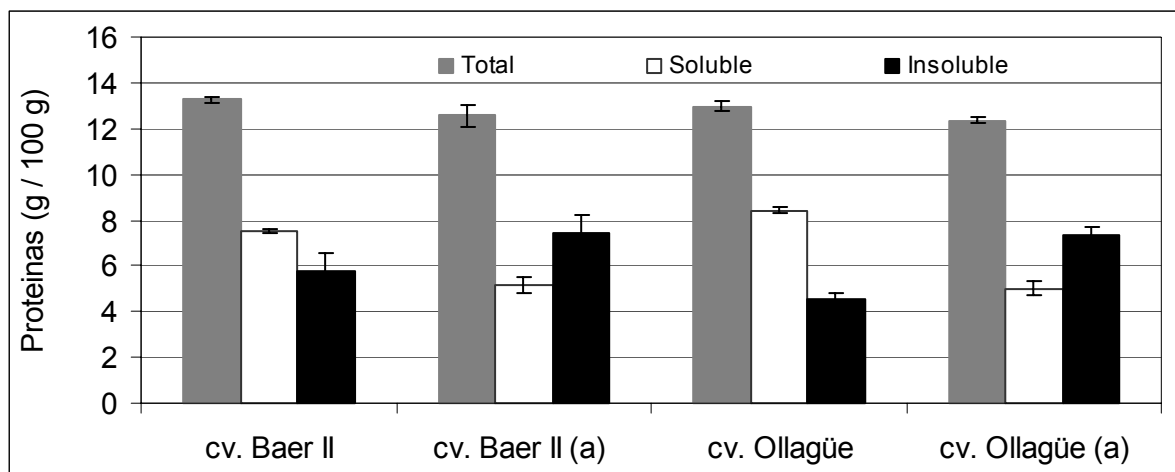


germinación y viabilidad tanto en cv.Baerll como en cv.Ollagüe, y sus niveles de proteínas solubles se mantuvieron más o menos estables durante el almacenamiento. Al analizar en detalle la fracción soluble en solución alcalina (H) y la fracción soluble en solución salina diluida (LS) no se observa una significativa alteración en los contenidos de proteínas de semillas almacenadas en banco de germoplasma en relación al control previo al almacenamiento en ambos cultivares ( $p>0,05$ ). Este resultado indicaría que las variaciones en los niveles de proteínas solubles observadas en el material almacenado a temperatura de laboratorio podrían estar, en principio, asociadas a la pérdida de viabilidad. En ambas condiciones de almacenamiento, el contenido de agua se ubicó en 5-6% por lo cual la ocurrencia de este evento estaría mayormente asociado al factor temperatura o bien a una interacción temperatura-contenido de agua.



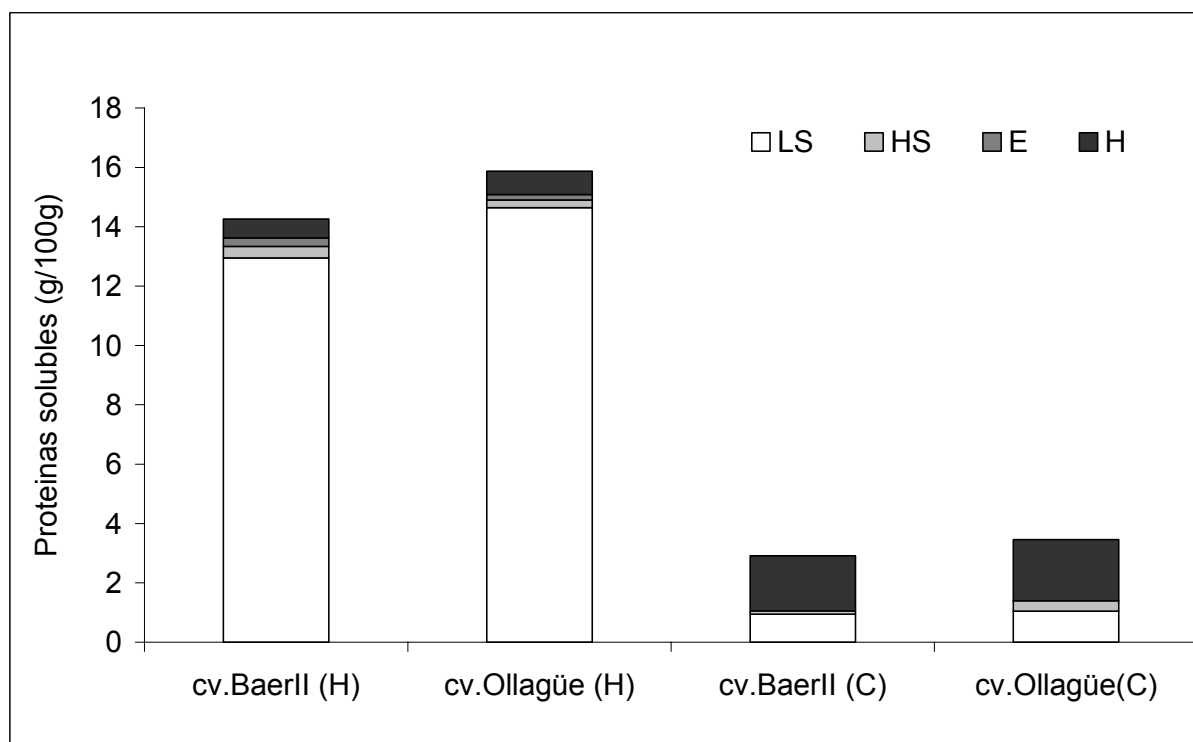
**Figura 3.1. Contenido de proteínas solubles de semillas de dos cultivares de quínoa almacenadas a 14%HR y temperatura ambiente de laboratorio durante 6 meses o almacenados 6 meses en banco de germoplasma (BG). Las barras de error representan el desvío estándar.**

A continuación se procedió a estudiar las causas probables de las variaciones halladas en los contenidos relativos de proteínas solubles. Se cuantificó el contenido total de proteínas en semillas enteras y el contenido de proteínas de las fracciones solubles e insolubles (precipitado) luego de 3 meses de almacenamiento a 14%HR y temperatura ambiente de laboratorio mediante la técnica de determinación de nitrógeno total de micro-Kjeldahl (figura 3.2). No se encontraron diferencias significativas entre cultivares. Con el objetivo de probar la ocurrencia de insolubilización de proteínas por agregación durante el almacenamiento, en oposición a un proceso de desnaturalización por hidrólisis, se realizó un almacenamiento paralelo de los granos en condiciones de envejecimiento “acelerado” a 75%HR y 37°C. Finalizado el período de envejecimiento, los valores de germinación y viabilidad obtenidos indicaron la muerte de toda la población (datos no mostrados). El análisis comparativo de las proteínas totales y las fracciones soluble e insoluble en ambos cultivares y entre ambas condiciones de almacenamiento resultó ser concluyente con respecto a la disminución del contenido de proteínas solubles por insolubilización (figura 3.2). Las semillas de ambos cultivares sometidas a envejecimiento acelerado (a) demostraron un desplazamiento significativamente mayor de proteínas hacia la fracción insoluble que aquellas semillas almacenadas en condiciones de laboratorio.



**Figura 3.2. Análisis de proteínas totales, solubles e insolubles mediante micro-Kjeldahl en semillas de quínoa de dos cultivares almacenadas por 3 meses en diferentes condiciones. Las barras representan los valores extremos.**

Otra aproximación para corroborar la ocurrencia de insolubilización de proteínas se efectuó induciendo los eventos pre-germinativos por humidificación en semillas almacenadas. En ambos cultivares se observó un aumento importante en los niveles de proteínas solubles, especialmente en LS, junto a una reducción en la fracción soluble en álcali (H) (figura 3.3).



**Figura 3.3. Contenido de proteínas solubles de semillas de dos cultivares de quínoa luego de 6 meses de almacenamiento a 14%HR y temperatura ambiente de laboratorio, control (C) y posteriormente sometidas a una humidificación para inducir la ocurrencia de eventos pre-germinativos (H).**

Estos resultados fueron consistentes con una disgregación de los complejos proteicos de alto peso molecular, insolubles en solución salina y ligeramente solubles en álcali. Se propone que estos agregados desaparecieron durante la humidificación pre-germinativa probablemente debido a la acción de mecanismos de reparación (Leopold y Vertucci, 1989).

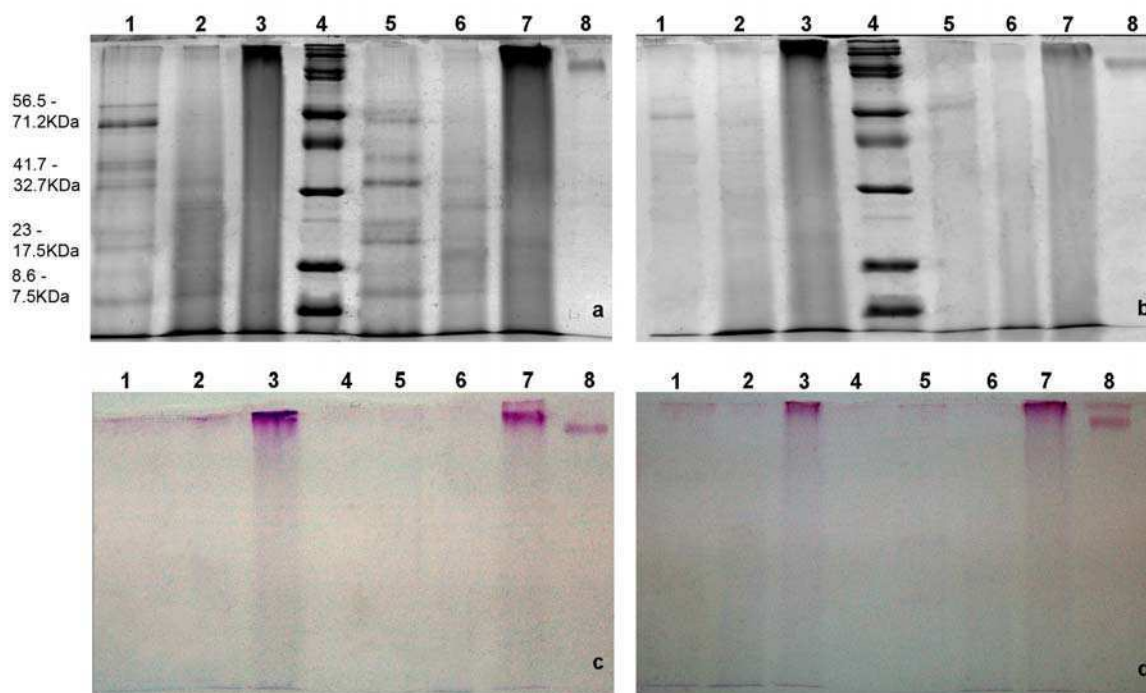
El perfil electroforético, presentado en la figura 3.4, apoya esta última hipótesis. Al analizar el patrón electroforético de las fracciones proteicas obtenidas de semillas almacenadas por 6 meses a 14%HR y temperatura ambiente de laboratorio, todo el rango de pesos moleculares fue teñido con azul de Coomasie como un “chorreado”. Este patrón es consistente con el clivaje inespecífico y la agregación de proteínas característica del deterioro no-enzimático. Se observa

también un alto contenido de material de muy alto peso molecular situado en la zona de transición entre los geles concentrador y separador en las calles sembradas con las fracciones H. Cuando los geles fueron teñidos con PAS, se detectó presencia de glicoproteínas, indicadores de la formación de AGEs, en las fracciones proteicas de semillas almacenadas por 6 meses, principalmente en la fracción alcalina (H). Sobre esta fracción se observó el mismo patrón luego del teñido con azul de Coomasie indicando que se compone principalmente de proteínas glicosiladas. Este resultado, junto al aumento en la concentración de proteínas en esta fracción a lo largo del almacenamiento, sugiere que estos compuestos glicosilados se encuentran asociados al envejecimiento.

Al analizar las fracciones proteicas de semillas pre-germinadas, se observaron varias bandas bien definidas. Ambos cultivares exhibieron diferentes patrones electroforéticos al ser revelados con azul de Coomasie (A). La fracción soluble en solución salina (LS+HS) de cv.Baerll mostró 9 bandas diferentes de 7.5, 17.5, 21.2, 32.7, 34.8, 38.1, 40.4, 56.5 y 68.7 kDa mientras que la misma fracción de cv.Ollagüe mostró 8 bandas de 8.6, 18.2, 20.5, 22.8, 33.7, 41.7, 58.3 y 71.2 kDa (una banda menos próxima a los 40KDa). En el caso de las fracciones solubles en etanol (E), cv.Baerll mostró 4 bandas de 8.2, 15.1, 26.9 y 32.7 kDa y cv.ollagüe, 5 bandas de of 8.2, 14.5, 26.0, 34.8 y 40.7 kDa. Un estudio previo describe la composición proteica de los granos de quínoa (Brinegar y Goundan, 1993) y reporta la existencia de una globulina de tipo 11S a la cual llaman *quenopodina*. Las globulinas se caracterizan por ser dímeros heterogéneos compuestos por polipéptidos en el rango de 30-40 kDa y 20-25 kDa unidos por uniones disulfuro en la proteína nativa. De acuerdo al patrón electroforético de las fracciones solubles en solución salina provenientes de semillas pre-germinadas estudiadas en el presente trabajo, estas fracciones podrían estar conteniendo diferentes isoformas de estos

monómeros de quenopodinas, ya que las bandas observadas se encuentran en los rangos de peso molecular mencionados. Asimismo, las bandas de 7,5 y 8,6 KDa obtenidas de las fracciones solubles en solución salina de cv.BaerII y cv.Ollagüe, respectivamente podrían corresponderse con otra proteína de almacenamiento abundante, la globulina 2S rica en cisteína de 8-9 kDa descrita por Brinegar y colaboradores (1996) en semillas de quínoa. Estos resultados apoyan la hipótesis de la reparación de proteínas de almacenamiento frente a la síntesis de novo de proteínas relacionadas con la germinación.

En el presente trabajo se encontraron diferencias en la composición proteica entre cultivares. Dado que las condiciones de crecimiento de las plantas fueron idénticas para ambos cultivares, la heterogeneidad hallada estaría relacionada con diferencias genéticas entre cultivares. De este modo los resultados son consistentes con la posibilidad de utilizar la heterogeneidad de estos polipéptidos como marcadores moleculares para la identificación y clasificación de germoplasma de quínoa como había sido sugerido por Fairbanks y colaboradores (1990). Por otra parte, estos resultados también apoyan la presunción de la insolubilización de proteínas durante el almacenamiento y su posterior reparación durante las primeras etapas de la germinación.



**Figura 3.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante de diferentes fracciones proteicas de semillas de dos cultivares de quínoa almacenadas 6 meses a 14%HR y temperatura ambiente de laboratorio. a-d) calles 1-3:cv.BaerII, 1:LS+HS, 2:E, 3:H; calle 4: marcador de peso molecular; calles 5-7:cv.Ollagüe, 5:LS+HS, 6:E, 7:H; 8:invertasa (control positivo para PAS). a) y c) semillas pre-humidificadas para inducir eventos pre-germinativos; b) y d) semillas control; a) y b) revelado con Azul de Coomasie; c) y d)revelado con PAS para compuestos glicosilados.**

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la insolubilización de proteínas correlaciona con el tiempo almacenamiento. Sin embargo, la capacidad de revertir la insolubilización de proteínas durante la imbibición en los primeros estadios de la germinación presente en ambos cultivares, no necesariamente llevaron a valores más altos de germinación, tal como se evidencia en los bajos porcentajes

de germinación de semillas de cv.Ollagüe. Más aún, las semillas de cv.Baerll almacenadas en el laboratorio y en el banco de germoplasma mostraron una buena tolerancia al almacenamiento según los valores de germinación y viabilidad, aún cuando la insolubilización de proteínas ocurrió en ambos casos. En conclusión, si bien se ha demostrado una clara asociación entre el estado de conservación de las semillas y su contenido de proteínas solubles, esto no sería un factor determinante de la pérdida de viabilidad de estas semillas ya que ésta persiste aún cuando por procedimientos de humidificación se recupera la solubilidad de las proteínas.

Se utilizó el análisis de fluorescencia para estudiar la modificación de proteínas por reacciones de Maillard durante el almacenamiento. Longitudes de onda de excitación/emisión de 380/450nm se utilizaron como medida cuantitativa de productos de Maillard dado que análisis previos revelaron la presencia de compuestos fluorescentes con estas características en todas las fracciones de ambos cultivares y condiciones de almacenamiento (Castellón y col., en preparación). Según este antecedente, el espectro de excitación de las diferentes fracciones de ambos cultivares mostraron varios picos a diferentes longitudes de onda indicando la presencia de diferentes componentes emitiendo aproximadamente a 450nm. Los espectros variaron de acuerdo a la fracción proteica. El pico de fluorescencia atribuido a la presencia de productos AGE fue observado al excitar a 320-380nm. Fracciones proteicas obtenidas de semillas almacenadas 3 y 6 meses fueron excitadas a 380 nm y se recogieron los espectros de emisión entre 400 y 600 nm. Se registraron picos de fluorescencia cercanos a 450 nm y se calculó la intensidad de fluorescencia (tabla 3.2). Los valores altos y medios de fluorescencia detectados en fracciones con baja concentración de proteínas, según lo determinado por el método de Bradford, sugerirían la formación de complejos fuertemente



asociados a los residuos básicos de argininas y lisinas que conducen a una subestimación en la cuantificación de proteínas por el método de Bradford, o bien la presencia de otros compuestos fluorescentes no relacionados con las proteínas. Al comparar entre cultivares, semillas de cv.Baerll mostraron intensidades de fluorescencia más altas que las de cv.Ollagüe. A su vez, semillas almacenadas por 6 meses mostraron intensidades de fluorescencia similares o incluso menores que las de aquellas semillas almacenadas por 3 meses. Estos resultados podrían deberse a los bajos valores de proteínas solubles detectados en los extractos proteicos de semillas almacenadas por 6 meses que conllevan a altos valores de fluorescencia normalizada. Las semillas de ambos cultivares almacenadas por 6 meses y posteriormente humidificadas para inducir los eventos pre-germinativos mostraron valores de fluorescencia similares a los de aquellas semillas no humidificadas a pesar de presentar contenidos de proteínas solubles más altos. Estos resultados sugieren que los fluoróforos no estarían relacionados con el tiempo de almacenamiento o el deterioro de las semillas o, de estarlo, no serían degradados durante las primeras etapas de la germinación.

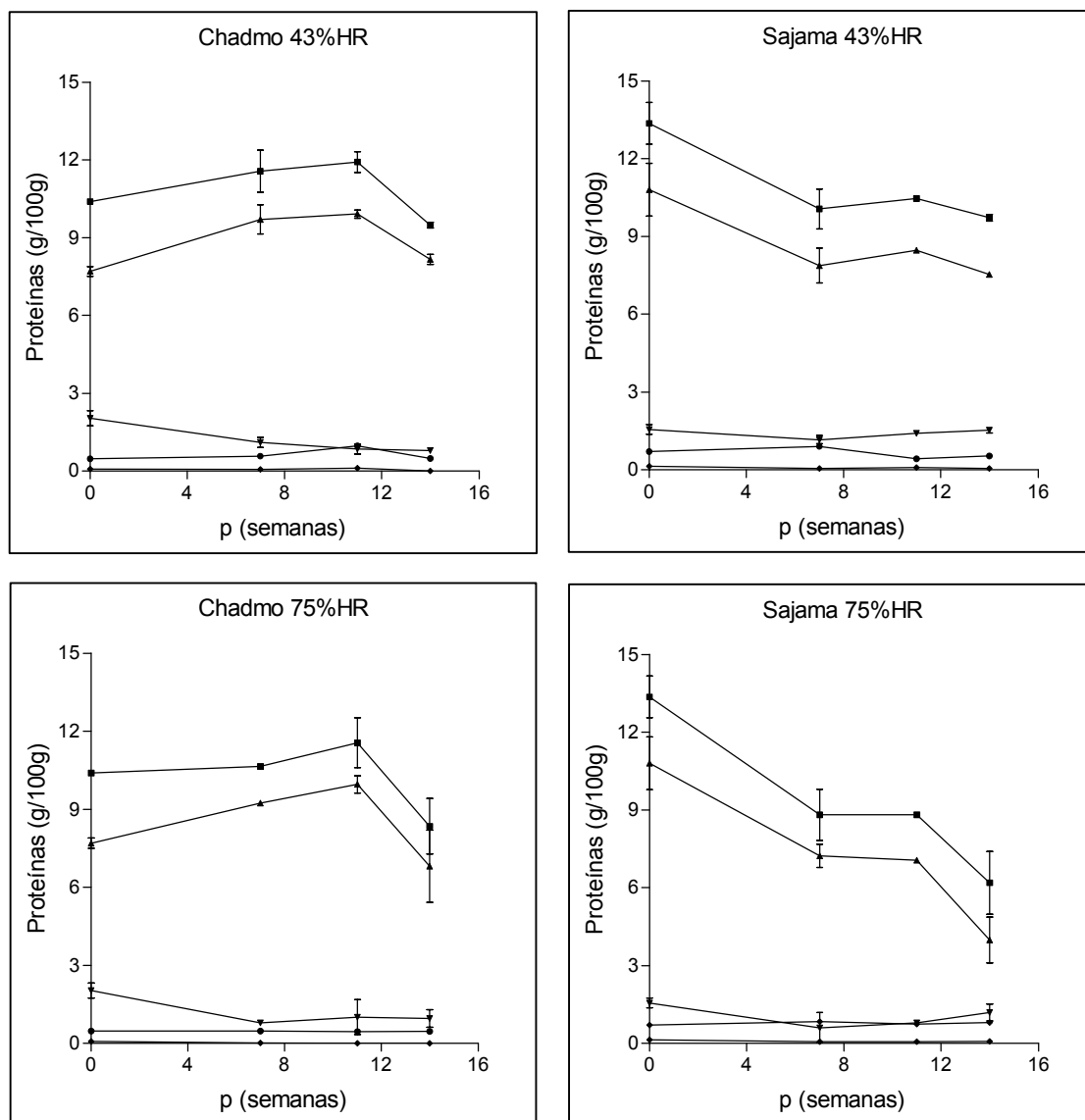
|                                 |              | <i>cv.Baerli</i>       |                              | <i>cv.Ollagüe</i>      |                              |
|---------------------------------|--------------|------------------------|------------------------------|------------------------|------------------------------|
|                                 |              | <i>Intensidad (UF)</i> | <i>Longitud de onda (nm)</i> | <i>Intensidad (UF)</i> | <i>Longitud de onda (nm)</i> |
| <b>3 meses</b>                  | LS           | 30.1 ± 0.4             | 440-450                      | 12.2 ± 0.4             | 440-450                      |
|                                 | HS           | 12.6 ± 0.4             | 440-450                      | 7.7 ± 0.4              | 440-445                      |
|                                 | E            | 10.1 ± 0.4             | 437-442                      | 7.2 ± 0.4              | 440-445                      |
|                                 | H            | 13.1 ± 0.4             | 440-455                      | 8.2 ± 0.4              | 445-450                      |
|                                 | <b>Total</b> | <b>65.9</b>            |                              | <b>35.3</b>            |                              |
| <b>6 meses</b>                  | LS           | 16 ± 3                 | 450                          | 16.6 ± 0.2             | 450                          |
|                                 | HS           | 3.4 ± 0.2              | 440-445                      | 3.2 ± 0.2              | 440-445                      |
|                                 | E            | 8 ± 1                  | 440-450                      | 4.7 ± 0.5              | 440-450                      |
|                                 | H            | 5 ± 1                  | 470                          | 3.8 ± 0.4              | 470                          |
|                                 | <b>Total</b> | <b>32.5</b>            |                              | <b>28.3</b>            |                              |
| <b>6 meses + HUMIDIFICACIÓN</b> | LS           | 25 ± 8                 | 450                          | 27 ± 6                 | 450                          |
|                                 | HS           | 6 ± 1                  | 440-445                      | 4.3 ± 0.2              | 440-445                      |
|                                 | E            | 6.1 ± 0.7              | 440-450                      | 4.1 ± 0.4              | 440-450                      |
|                                 | H            | 2.1 ± 0.4              | 470                          | 1.9 ± 0.2              | 470                          |
|                                 | <b>Total</b> | <b>39.4</b>            |                              | <b>37.2</b>            |                              |

**Tabla 3.2 Cuantificación de fluorescencia como indicativa de la reacción de Maillard.**

Los resultados obtenidos en semillas de quínoa son consistentes con los resultados obtenidos por Baker y Bradford (1994) dado que el ensayo de fluorescencia no demostró ser un método apropiado para determinar la acumulación de productos de fluorescencia asociados a la reacción de Maillard. Esto podría ser debido a la interferencia de otras moléculas fluorescentes como polifenoles presentes en los tegumentos seminales o en tejidos remanentes del pericarpio, o bien deberse a la formación de agregados fluorescentes de muy alto peso molecular cuya insolubilización impide que sean detectados mediante este ensayo.

Dados los anteriores resultados, se optó por determinar las variaciones en la

solubilidad de las fracciones proteicas como indicador del deterioro de las proteínas durante el almacenamiento en las semillas envejecidas en condiciones controladas en la primera parte de este trabajo (capítulo 1). La figura 3.5 muestra los contenidos de proteínas de las diferentes fracciones proteicas obtenidas de semillas de los cultivares Chadmo y Sajama a lo largo del almacenamiento. La fracción soluble en solución salina diluida (LS) resulta ser la más abundante en todos los casos y se observa que el contenido total de proteínas solubles acompaña las variaciones de esta fracción. Las fracciones LS obtenidas de semillas de cv.Chadmo conservan valores constantes y similares entre ambas condiciones de almacenamiento durante el almacenamiento. Las fracciones obtenidas de semillas de cv.Sajama en cambio, muestran una reducción en los valores de proteínas durante el almacenamiento siendo éste más pronunciado en el caso del almacenamiento a 75%HR.



**Figura 3.5. Contenido proteínas solubles en granos de dos cultivares de quínoa durante el almacenamiento a 32°C y 43%HR o 75%HR. Las barras de error representan el desvío estándar.**

Una vez más, el análisis de los datos muestra una fuerte correlación positiva entre la viabilidad y los contenidos de proteínas solubles totales ( $r=0,7563$ ,  $p=0,0003$ ) y de la fracción LS ( $r=0,7874$ ,  $p=0,0001$ ). Si bien las semillas de cv.Chadmo mostraron una respuesta errática al principio del almacenamiento, debido probablemente a la existencia de dormición, los resultados de la correlación entre germinación y contenidos de proteínas solubles también resultaron ser

significativos (para la fracción LS,  $r=0,6886$   $p=0,0016$ , y para las proteínas totales solubles  $r=0,7196$   $p=0,0008$ ). Los contenidos de proteínas determinados en las fracciones H resultaron substancialmente bajos, lo que explicaría la ausencia de correlación negativa entre estos valores y la germinación y viabilidad.

Como complemento al estudio del deterioro observado en las proteínas presentes en las semillas, se estudió paralelamente el estado de conservación de los ácidos grasos. La tabla 3.3 muestra las proporciones de ácidos grasos detectados y calculados a partir de los cromatogramas de las semillas de los cultivares Chadmo y Sajama utilizadas en el capítulo 1.

| Ácidos grasos                         |                | Chadmo | Sajama | Quínoa <sup>a</sup> | Apelawa <sup>b</sup> |
|---------------------------------------|----------------|--------|--------|---------------------|----------------------|
| <b>Palmítico</b>                      | <b>16:00</b>   | 11,2   | 10,4   | 8,9                 | 8,25                 |
| <b>Oleico</b>                         | <b>18:1 w9</b> | 12,3   | 27,9   | 28,3                | 23,15                |
| <b>Linoleico</b>                      | <b>18:2 w6</b> | 63,9   | 48,7   | 45,5                | 51,88                |
| <b><math>\alpha</math>-Linolénico</b> | <b>18:3 w3</b> | 7,5    | 9,2    | 0,8                 | 8,35                 |
| <b>Gondoico</b>                       | <b>20:1w9</b>  | 2,2    | 3,0    | 1,7                 | 1,75                 |
| <b>Behenico</b>                       | <b>22:00</b>   | 1,3    | 0,0    | 0,8                 | 0,98                 |
| <b>Erucico</b>                        | <b>22:1 w9</b> | 1,5    | 0,7    | 1,6                 | 1,93                 |

**Tabla 3.3. Composición relativa de ácidos grasos de semillas de quínoa de los cultivares Chadmo y Sajama. Para efectos comparativos, se presentan referencias halladas en la bibliografía. <sup>a</sup> Aitzetmüller, 1993; <sup>b</sup> Wood y col., 1993.**

La diferencia más evidente entre los cultivares analizados en este trabajo es, sin dudas, la abundancia relativa de los ácidos grasos oleico y linoleico. Sorprendentemente, el cultivar que resultó más rico en ácidos grasos

poliinsaturados susceptibles a la oxidación fue cv.Chadmo, aquel que mejor tolerancia ha mostrado al almacenamiento.

A continuación, se analizó el estado de preservación de estos ácidos grasos durante el almacenamiento en las condiciones descritas en el capítulo 1. Se propuso que de existir daño debido al envejecimiento sobre los ácidos grasos, los efectos de la peroxidación lipídica se evidenciarían como una disminución en la composición relativa de ácidos grasos poliinsaturados (ácido linoleico y linolénico) y la formación de ácidos grasos de cadena más corta. La figura 3.6 muestra la composición relativa de ácidos grasos de granos de cv.Chadmo y cv.Sajama durante el almacenamiento a 43%HR y 75%HR a 32°C. Se observó la disminución del ácido gondoico en ambos cultivares durante el envejecimiento. Se observaron pequeñas variaciones en las composiciones de los ácidos grasos de la serie del ácido esteárico siendo evidenciables desde las 7 semanas de almacenamiento.

En las muestras analizadas, no se detectaron indicadores de ocurrencia de peroxidación lipídica. No se evidenciaron ácidos grasos de cadenas cortas, normalmente detectables por este método. Por otra parte, las composiciones relativas de ácidos grasos poliinsaturados se mantuvieron más o menos constantes durante el almacenamiento. La figura 3.7 destaca la composición relativa de ácidos grasos poliinsaturados en los dos cultivares analizados durante el almacenamiento. El análisis de la composición relativa de ácidos grasos poliinsaturados como la sumatoria de los contenidos relativos de ácidos linoleico y linolénico no muestra correlación con la germinación y viabilidad ( $p=0,34$  y  $p=0,10$ , respectivamente).

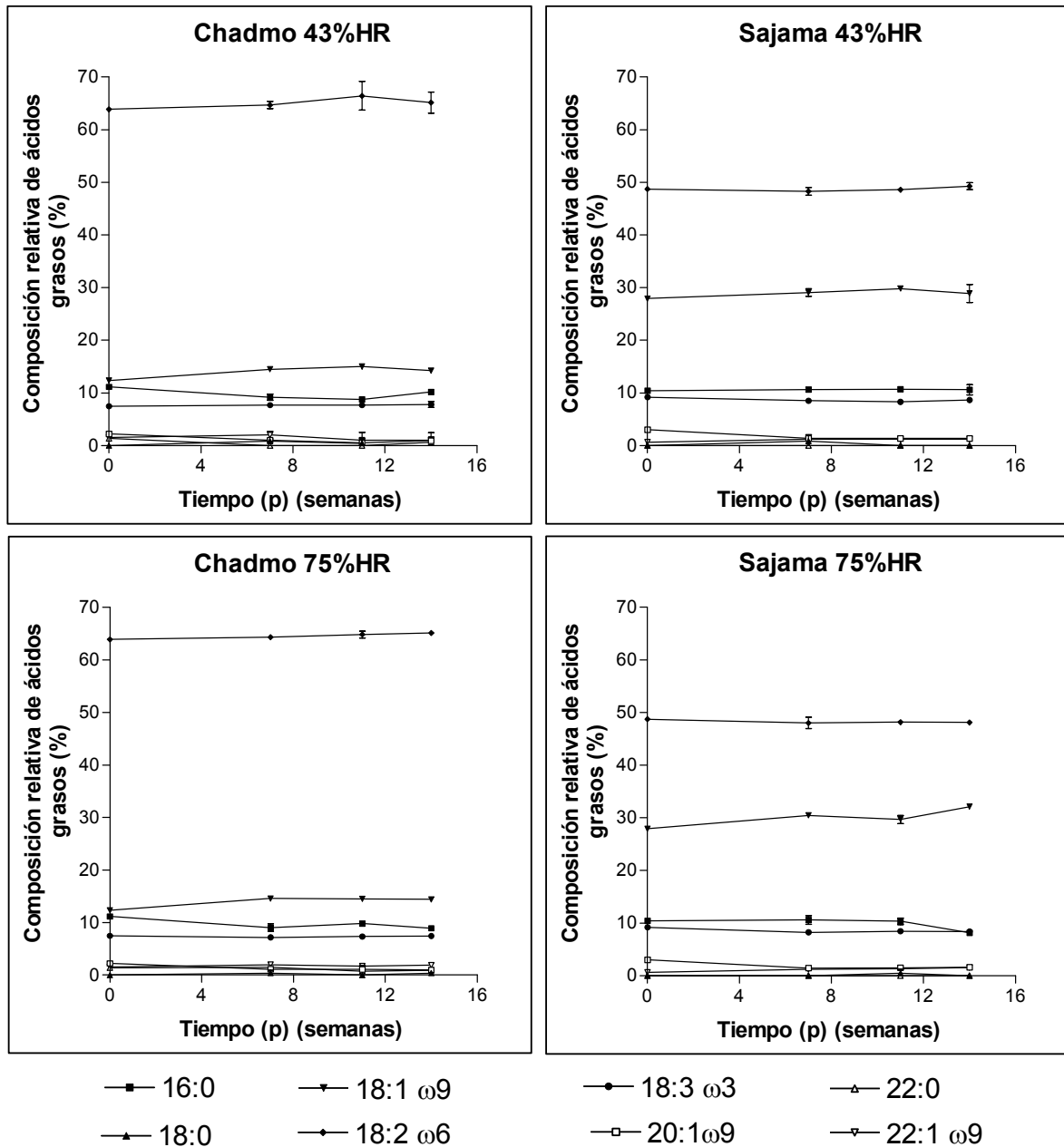
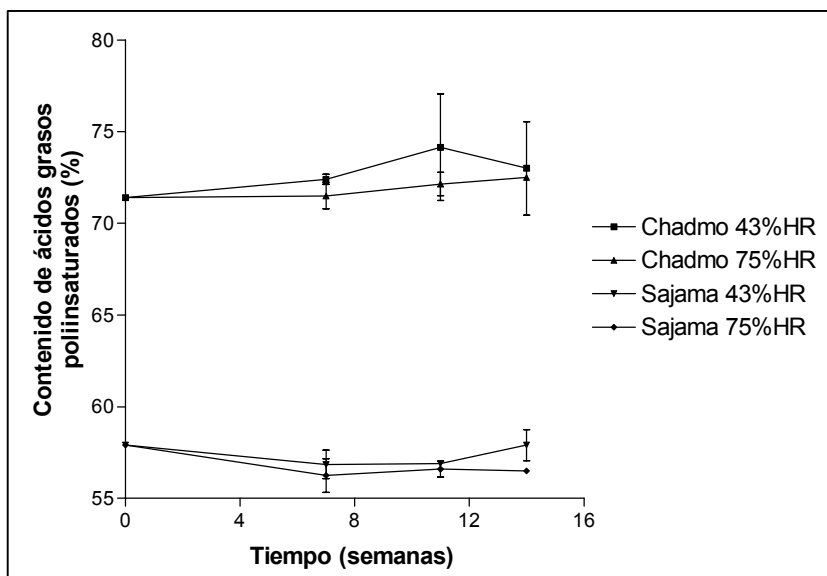


Figura 3.6. Composición relativa de ácidos grasos en granos de dos cultivares de quínoa durante el almacenamiento a 32°C y 43%HR o 75%HR. Las barras de error representan el desvío estándar.



**Figura 3.7** Contenido de ácidos grasos poliinsaturados en granos de dos cultivares de quínoa durante el almacenamiento a 32°C y 43%HR o 75%HR. Las barras de error representan el desvío estándar.



## ***Conclusiones y perspectivas***

En esta tesis se estudia el deterioro producido durante el almacenamiento en semillas de diferentes cultivares de quínoa originarios de dos regiones altamente contrastantes. Las principales conclusiones son las siguientes:

- Los distintos cultivares de quínoa presentan diferentes comportamientos durante el almacenamiento. Los estudios realizados demuestran que el cultivar Chadmo posee una mejor tolerancia al almacenamiento que los otros cultivares estudiados.
- Las diferencias en la longevidad no están asociadas al origen geográfico de los cultivares en los casos estudiados en este trabajo. Es probable que el estudio de un número mayor de cultivares de quínoa permita determinar el efecto del origen de los cultivares sobre la longevidad de las semillas.
- El análisis de la conductividad durante el almacenamiento no mostró correlación con la viabilidad por lo cual la conductividad no resultó ser indicador de vigor en estas semillas. Por ello es posible inferir que la estabilidad de las membranas está asociada a la ausencia de auto-oxidación de ácidos grasos. Esto último es consistente con el alto contenido de tocoferoles previamente reportado en semillas de esta especie dado que los mismos impedirían la propagación de la reacción. La detección y cuantificación de tocoferoles en cada uno de estos cultivares permitirá el desarrollo de esta hipótesis.
- El contenido de aceite de los diferentes cultivares estuvo inversamente asociado a la longevidad.
- La temperatura de desnaturalización de proteínas está asociada a la actividad

de agua de las semillas y puede ser un indicador de inestabilidad de estas moléculas durante el almacenamiento. Se propone continuar esta investigación ampliando este estudio a mayor número de cultivares así como el análisis de la entalpía de esta reacción.

- En los distintos cultivares, mientras que las isotermas de sorción de agua fueron muy similares, su susceptibilidad al deterioro fue distinta. De esta manera, la falta de correlación entre la longevidad y los parámetros GAB de las isotermas de sorción en los diferentes cultivares indica que en la región de multicapa el contenido de agua no es *per se* un factor limitante en el deterioro de las semillas. Sin embargo, el grado de movilidad del agua de multicapa ( $T_2$ ) correlaciona con la pérdida de viabilidad y puede ser considerado como un factor determinante de la cinética de las reacciones de deterioro involucradas en la pérdida de viabilidad de estas semillas. La información provista por el tiempo de relajación transversal del agua ( $T_2$ ) permitiría predecir la longevidad. Así, para el estudio de la conservación de estas semillas, la técnica de determinación de movilidad molecular por TD-NMR resulta ser más ventajosa que la determinación de la temperatura de vitrificación ( $T_g$ ) por DSC.
- La detección de agua libre (o congelable, por DSC) no contribuye a determinar la susceptibilidad de las semillas, ya que se verificó que el deterioro se produce aún en la zona de agua no congelable, en las condiciones de almacenamiento estudiadas.
- Las proteínas de almacenamiento se deterioran durante el envejecimiento a causa de una glicosilación no enzimática seguida de la formación de agregados insolubles de alto peso molecular. Sin embargo, este daño puede ser revertido: en las condiciones estudiadas de envejecimiento, durante la

imbibición pre-germinativa se observó la resolubilización de proteínas aún en semillas con bajo poder germinativo. En consecuencia, el grado de glicosilación alcanzado en el envejecimiento no resultó determinante de la pérdida de viabilidad.

Los resultados derivados del estudio de las características del agua del sistema permiten postular la ocurrencia de reacciones no enzimáticas, ya que el deterioro ocurre a humedades relativas en que la actividad enzimática es despreciable o nula. Estas reacciones no-enzimáticas de deterioro involucran a biomoléculas distintas de los lípidos y proteínas ya que estas no mostraron alteraciones, o bien fueron reversibles por la imbibición. Dado que las membranas han probado mantener su integridad, como fuera ya mencionado, se propone como alternativas para la identificación de las causas de la pérdida de viabilidad durante el almacenamiento, el análisis de la estabilidad del ADN y la observación de la integridad de las organelas mediante el estudio de la ultraestructura de la matriz celular. A este respecto, se proyecta la detección de moléculas del grupo de las proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (LEAs) cuyo efecto estérico restrinja la movilidad molecular en estos sistemas.

Hasta el momento las ecuaciones aplicadas para predecir la viabilidad de semillas son las de Ellis y Roberts (1980a) y Roberts y Ellis (1989) que involucran las variables contenido acuoso o humedad relativa, respectivamente, y temperatura además de ciertos coeficientes fijos (especie-específicos) que se determinan empíricamente. Según los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis, una aproximación más precisa debería involucrar además las variables derivadas de los estudios de relajación de espín magnético nuclear y el contenido de aceite, que se detectaron como indicadoras de longevidad. Alternativamente, estas podrían aplicarse para definir los coeficientes mencionados.

## ***Referencias bibliográficas***

- Afanas'ev, IB. 1985. Superoxide Ion: Chemistry and Biological Implications Volume 1. CRC Press, Boca Raton.
- Aitzetmüller K. 1993. Capillary GLC fatty acid fingerprints of seed lipids - a tool in plant chemotaxonomy. *Journal of High Resolution Chromatography* 16(8): 488–490.
- Amuti KS, Pollard CJ. 1977. Soluble carbohydrates of dry and developing seeds. *Phytochemistry* 16: 529-532.
- Atwell WA, Patrick BM, Johnson LA, Glass RW. 1983. Characterization of quinoa starch. *Cereal Chemistry* 60:9-11.
- Bailly C. 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research* 14, 93-107.
- Bailly C, Bogatek-Leszczynska R, Côme D, Corbineau F. 2002. Change in activities of antioxidant enzymes and lipoxygenase during growth of sunflower seedlings from seeds of different vigour. *Seed Science research* 12:47-55.
- Bailly C, Benamar A, Corbineau F, Côme D. 1998. free radical scavenging as affected by accelerated ageing and subsequent priming in sunflower seeds. *Physiologia Plantarum* 104:646-652.
- Baker EH, Bradford KJ. 1994. The fluorescence assay for Maillard product accumulation does not correlate with seed viability, *Seed Sci. Res.* 4: 103-106.
- Beckman KB, Ames BN. 1997. Oxidants, antioxidants and aging. Pp 201-246. En: Scandalios JG (Ed) *oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Berjak P, Farrant J, Mycock D, Pammenter N. 1990. Recalcitrant seeds: the enigma of their desiccation sensitivity. *Seed Science and Technology* 18(2): 297-310.
- Berjak P, Pammenter NW, Vertucci C. 1992. Homiohydrous (recalcitrant)

seeds: Developmental status, desiccation sensitivity and the state of water in axes of *Landolphia kirkii* Dyer. *Planta* 186(2): 249-261.

- Bernal-Lugo, I y Leopold AC. 1998. The dynamics of seed mortality. *J. Expt. Bot.* 49: 1455-1461.
- Bertero HD, 2001. Effects of photoperiod, temperature and radiation on the rate of leaf appearance in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) under field conditions, *Ann. Bot.* 87 (4), pp. 495–502.
- Bertero HD, De la Vega AJ, Correa G, Jacobsen SE, Mujica A. 2004. Genotype and genotype-by-environment interaction effects for grain yield and grain size of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) as revealed by pattern analysis of international multi-environment trials. *Field Crops Research* 89 (2-3): 299-318.
- Bewley JD y Black M. 1994. *Seed Physiology of Development and Germination*. Plenum Press, New York.
- Bewley JD. 1997. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell.* 9:1055-1066.
- Bhargava A, , Shukla S, Ohri D. 2006. *Chenopodium quinoa* - An Indian perspective. *Ind. Crop. Prod.* 23: 73-87.
- Boubriak I, Kargiolaki H, Lyne L y Osborne DJ. 1997. The requirement for DNA repair in desiccation tolerance of germinating embryos. *seed Sci. Res.* 7:97-105.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Annal Biochem.* 72:248-254.
- Bray CM. 1995. Biochemical processes during the osmopriming of seeds. En Kigel J, Galili G. (Eds.), *Seed Development and Germination*, Marcel Dekker, New York, pp. 767-789.
- Breen AP, Murphy JA. 1995. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free radical biology and medicine* 18:1033-1077.

- Brinegar C, Goundan S. 1993. Isolation and characterization of chenopodin, the 11S seed storage protein of Quinoa (*Chenopodium quinoa*), *J. Agric. Food Chem.* 41: 182-185.
- Brinegar C, Sine B, Nwokocha L. 1996. High-Cysteine 2S seed storage proteins from Quinoa (*Chenopodium quinoa*), *J. Agric. Food Chem.* 44:1621-1623.
- Buitink J, Claessens MMAE, Hemminga MA, Hoekstra FA. 1998. Influence of water content and temperature on molecular mobility and intracellular glasses in seeds and pollen. *Plant Physiology* 118: 531-541.
- Buitink J, Leprince O, Hemminga MA, Hoekstra FA. 2000b. Molecular mobility in the cytoplasm: a new approach to describe and predict lifespan of dry germplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 97: 2385–2390.
- Cardozo A, Tapia ME. 1979. Valor nutritivo. Qunua y Kaniwa. *Cultivos Andinos*. En: Tapia ME (Ed). *Serie libros y materiales educativos*, vol 49. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, Bogotá, Colombia, pp: 149-192.
- Carpenter JF, Crowe LM, Crowe JH. 1987. Stabilization of phosphofructokinase with sugars during freeze-drying: characterization of enhanced protection in the presence of divalent cations. *Biochimica et Biophysica Acta* 923:109-115.
- Carpenter JF, Izutsu K, Randolph TW. 1999. Freezing and drying-induced perturbations of protein structure and mechanisms of protein protection by stabilization additives. Chap 5 ,pp:123-160. En: *Freeze-drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products*. Marcel Dekker,Inc. New York.
- Chang SS, Peterson RJ, Ho CT. 1978. Chemical reactions involved in the deep fat frying of foods. *JOACS* 55: 718-727.
- Crane J, Miller A, Roekel J, Walters C. 2003. Triacylglycerols determine the unusual storage physiology of *Cuphea* seed. *Versión internet*, Springer Verlag 2003.
- Cusack D.1984. Quinoa: grain of the Incas. *Ecologist* 14: 21-31.

- De Bruin A. 1964. Investigation of the food value of quinoa and canihua seeds. *Journal of Food science* 29: 872-876.
- Dickie JB, Ellis RH, Kraak HL, Ryder K, Tompsett PB. 1990. Temperature and seed storage longevity. *Annals of Botany* 65: 197-204.
- Eira MTS, Walters C, Caldas LS, Fazuoli LC, Sampaio JB, Dias MCLL. 1999. Tolerance of *Coffea* spp. seeds to desiccation and low temperature. *Rev Bras Fisiol Veg* 11: 97-105.
- Elder RH, Aquila AD, Mezzina M, Sarasin A, Osborne DJ. 1987. DNA ligase in repair and replication in the embryos of rye, *Secale cereale*. *Mutation Res.* 181:61-71.
- Ellis RH, Roberts, EH. 1980a. Improved equations for prediction of seed longevity. *Annals of Botany* 45:13-30.
- Ellis RH, Roberts, EH. 1980b. The influence of temperature and moisture on seed viability period in barley (*Hordeum distichum* L.) *Ann Botany* 45 :31-37.
- Ellis RH, Hong TD, Roberts EH. 1988. A low moisture content limit to logarithmic relations between seed moisture content and longevity, *Annals Bot.* 61: 405-408.
- Ellis RH, Hong TD, Roberts EH, Tao KL. 1990. Low moisture content limits to relations between seed longevity and moisture. *Annals of Botany* 65: 493-504.
- Ellis RH, Hong TD, Martin MC, Pérez-García F, Gómez-Campo C. 1993. The long term storage of seeds of seventeen crucifers at very low moisture contents. *Plant Varieties and Seeds* 6, 75-81.
- Fairbanks , Burgener KW, Robinson LR, Andersen WR, Balln E. 1990. Electrophoretic characterization of quinoa seed proteins. *Plant Breed.* 104:190-195.
- Fennema, O. 1996. Water and ice. En: O. Fennema (Ed.), *Food chemistry* (3rd ed., New York: Marcel Dekker. pp. 17–94.
- Fryer MJ. 1992. The antioxidant effects of thylakoid Vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol)

Plant, Cell & Environment 15 (4): 381–392.

- Fullerton GD, Cameron IL. 1988. Relaxation of biological tissues. En: Biomedical magnetic resonance imaging. Principles, methodology and applications. Wehrli FW, Shaw D, Kneeland JB. Ed. Nueva York, VCH Publishers, Inc. pp. 115.
- Gómez RG, Malec LS, Vigo MS, Buera MP. 2001. Fundamentos De Métodos Para Análisis De Alimentos. Ed.CCC Educando, Buenos Aires.
- Greenspan L. 1977. National Bureau of Standards. J. Res. 81(A, 7): 1.
- Hoekstra FA, Golovina EA, Buitink, J. 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance. Trends in Plant Science. 6:431-438.
- ISTA. 2005. International rules for seed testing. ISTA, Switzerland.
- Justice OL, Bass LN. 1978. Principles and practices of seed storage. US Government printing office, Washington, D.C.
- Knowles PF. 1988. Recent advances in oil crop breeding. En: E.H. Applewhite (Ed.) , Proceedings of the World Conference on Biotechnology for the Fats and Oils Industry, 35-38. American Oil Chemists' Society.
- Koziol MJ. 1990. Composición química. En: Wahli C(Ed). Quinoa, hacia su cultivo comercial. Latinreco SA, Quito, Ecuador, pp:137-159.
- Koziol MJ. 1992. Chemical composition and nutritional value of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) J.Food Comp. Anal. 5:35-68.
- Koziol MJ. 1993. En: Janick J, Simon JE (Eds). Quinoa: A potential new oil crop. New Crops Wiley. Nueva York, pp:328-336.
- Krishnan P, Nagarajan S, Dadlani M, Moharir AV. Characterization of wheat (*Triticum aestivum*) and soybean (*Glycine max*) seeds under accelerated ageing conditions by proton nuclear magnetic spectroscopy. Seed Science and technology 31: 541-550.
- Krishnan P, Joshi DK, Nagarajan S y Moharir AV. 2004. Characterization of



germinating and non-viable soybean seeds by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. *Seed Science Research* 14, 355–362.

- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Leopold AC, Sun WQ, Bernal-Lugo I. 1994. The glassy state in seeds: analysis and function. *Seed Science Research* 4(3): 267-274.
- Leopold AC. 1990. Coping with desiccation. En: Alscher RG, Cumming JR, eds. *Stress response in plants: adaptation and acclimation mechanisms*. New York: Wiley-Liss, pp 37–56.
- Leopold AC, Vertucci CW. 1989. Moisture as a regulator of physiological reaction in seeds. En: Stanwood PC, McDonald MB, eds. *Seed Moisture*. CSSA Special Publication N° 14. Crop Science Society of America, Madison. 51-67.
- Leprince O, Walters-Vertucci C. 1995. A calorimetric study of the glass transition behaviors in axes of bean seeds with relevance to storage stability. *Plant Physiology* 109: 1471-1481.
- Levine H, Slade L. 1986. Polymer physico-chemical approach to the study of commercial starch hydrolysis products. *Carbohydrate Polymers* 6:213-244.
- Lomauro CJ, Bakshi AS, Labuza TP. 1985. Evaluation of food sorption isotherms equations, I: Fruit, vegetable and meat products. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie* 18: 111-117.
- Matiacevich SB, Buera MP. 2006. A critical evaluation of fluorescence as a potential marker for the Maillard reaction, *Food Chem.* 95:423-430.
- Matiacevich SB, Castellión ML, Maldonado SB, Buera MP. 2006. Water-dependent thermal transitions in quinoa embryos. *Termochimica Acta* 448(2):117-122.
- McDonald MB. 1999. Seed deterioration: physiology, repair and assessment.

Seed Science and Technology 27, 177–237.

- Murthy UMN, Sun WQ. 2000. Protein modification by the Amadori and Maillard reactions during seed storage: roles of sugar hydrolysis and lipid peroxidation. *Journal of Experimental Botany* 51, 1221–1228.
- Murthy UMN, Liang Y, Kumar PP, Sun WQ. 2002. Non-enzymatic protein modification by the Maillard reaction reduces the activities of scavenging enzymes in *Vigna radiata*, *Physiol. Plant.* 115 213-220.
- Murthy UMN, Kumar PP, Sun WQ. 2003. Mechanisms of seed ageing under different storage conditions for *Vigna radiata* (L.) Wilczek: lipid peroxidation, sugar hydrolysis, Maillard reactions and their relationship to glass state transition, *J. Exp. Bot.* 54: 1057-1067.
- Ng SC, Anderson A, Coker J, Ondrus M. 2007. Characterization of lipid oxidation products in quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Food Chemistry* 101(1):185-192.
- Osborne TB. 1924. *The vegetable proteins*. Longmans, Green. London.
- Osborne DJ, Boubriak I. 1994. DNA and desiccation tolerance. *Seed Sci. Res.* 4:175-185.
- Osborne BI, Sharon R, Ben-Ishai R. 1980. Studies of DNA integrity and DNA repair in germinating embryos of rye. *ISR. J. Bot.* 259-272.
- Pammenter NW, Vertucci CW, Berjak P. 1991. Homeohydrous (Recalcitrant) Seeds: Dehydration, the State of Water and Viability Characteristics in *Landolphia kirkii*. *Plant Physiol.* 96(4): 1093–1098.
- Pammenter NW, Farrant JM, Berjak P. 1984. Recalcitrant seeds: short-term storage effects in *Avicennia marina* (Forsk.) may be germination-associated. *Annals of Botany* 54:843-846.
- Parera CA, Cantliffe DJ. 1994. Presowing seed priming, *Horticulture Reviews*, 16:109-141.

- Pikal M. 1999. Mechanisms of protein stabilization during freeze-drying and storage: the relative importance of thermodynamic stabilization and glassy state relaxation dynamics. Chap.6, pp: 161-198. En: Freeze-drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Prego I, Maldonado S, Otegui M. 1998. seed structure and localization of reserves in *Chenopodium quinoa*. Ann. Bot. 82(4):481-488.
- Priestley DA, Leopold AC. 1983. Lipid changes during natural ageing of soybean seeds. Physiologia Plantarum 59, 467–470.
- Priestley DA, Werner BG y Leopold AC. 1985. The susceptibility of soybean seed lipids to artificially-enhanced atmospheric oxidation. J. exp. Bot. 36: 1653–1659.
- Priestley, DA. 1986. Seed Aging: Implications for Seed Storage and Persistence in the Soil. University Press, Comstock, Cornell.
- Puntarulo S, Galleano M, Sanchez RA, Boveris A. 1991. superoxide anion and hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes during germination. Biochimica et Biophysica Acta 1074: 277-283.
- Puntarulo S, Sanchez RA, Boveris A. 1988. Hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes at the onset of germination. Plant physiology 86:626-630.
- Ratcliffe RG. 1994. In vivo NMR studies of higher plants and algae. Advances in botanical research 20: 43-123.
- Repo-Carrasco R, Espinosa C, Jacobsen SE. 2003. Nutritional value and use of the andean crops quinoa (*Chenopodium quinoa*) and kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*). Food Rev Int 19(1-2)
- Rice-Evans CA, Diplock AT, Symons MCR. 1991. Techniques in free radical research. En: Burdon RH, Van Knippenberg P.H. (eds). Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Elsevier. Amsterdam.
- Roberts EH, Ellis RH. 1989. Water and seed survival. Annals of Botany 63:39-52.

- Ruales J, Nair BM. 1992. Nutritional quality of the protein in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seeds. *Plant Foods Hum Nutr*, 42: 1-12.
- Sanchez del Angel S, Moreno Martínez E, Valdivia López MA. 2003. Study of denaturation of corn proteins during storage using differential scanning calorimetry. *Food Chemistry* 83: 531-540.
- Scott WJ. 1957. Water relations of food spoilage microorganisms. *Advance in Food Research* 7:83.
- Segrest JP, Jackson RL. 1972. Molecular weight determination of glycoproteins by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulphate, *Methods of Enzymology* 28:54-63.
- Senaratna T, Mc Kersie BD, Stinson RH. 1985. Antioxidants levels in germinating soybean seed axes in relation to free radical and dehydration tolerance *Plant Physiol.* 78: 168-171.
- Senaratna T, Cosse JF, McKersie BD. 1988. Age induced changes in cellular membranes of imbibed soybean seed axes. *Physiologia Plantarum.* 73: 8-91.
- Slade L, Levine H. 1991. Beyond water activity: recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety. *Critical Review in Food Science and Nutrition* 30: 115-360.
- Smirnoff N. 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist* 125: 27-58.
- Smith MT, Berjak P. 1995. Deteriorative changes associate with the loss of viability of stored desiccation-tolerant and desiccation-sensitive seeds. En: Kigel JD, Galili G. (Eds) *Seed development and germination*. New York: Marcel Dekker, pp. 701-746.
- Stadtman ER. 1992. Protein oxidation and aging. *Science* 257, 1220-1224.
- Sun WQ, Leopold AC. 1995. The Maillard reaction and oxidative stress during

ageing of soybean seed. *Physiologia Plantarum* 94: 94-104.

- Sun WQ. 1997. Glassy state and seed storage stability: The WLF kinetics of seed viability loss at  $T > T_g$  and plasticization effect of water on storage stability. *Annals of Botany* 79: 291-297.
- Sun WQ, Leopold AC. 1997. Cytoplasmic vitrification and survival of anhydrobiotic organisms. *Comparative biochemistry and physiology* 117 A: 327-333.
- Sun WQ, Davidson P, Chan HS. 1998. Protein stability in the amorphous carbohydrate matrix: relevance to anhydrobiosis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1425: 245-254.
- Tapia M. 1999. *Agrobiodiversidad en los Andes*. Stiftung FE (Ed), 116 p. Lima.
- Tapia M. 1982. *The Environment, crops and agricultural systems in the Andes of Southern Peru*. IICA.
- Tremolieres A, Dubacq JP, Drapier D. 1982. Unsaturated fatty acids in maturing seeds of sunflower and rape: Regulation by temperature and light intensity. *Phytochemistry* 21 (1): 41-45.
- Van Etten CH, Miller RW, Wolff IA, Jones Q. 1963. Aminoacid composition of seeds from 200 angiosperm plants. *J Agric Food Chem*, 11: 399-410.
- Velasco J, Marmesat S, Marquez-Ruiz G, Dobarganes MC. 2004. Formation of short-chain glycerol bound oxidation compounds and oxidized monomeric triacylglycerols during deep-frying and occurrence in udes frying fats. *Eur J Lipid Sci Technol* 106: 728-735.
- Vertucci CW, Farrant JM. 1995. Acquisition and loss of desiccation tolerance. Pp237-271. En : Kigel J, Galilli G /eds) *Seed development and germination*. New York, Marcel Dekker.
- Vertucci CW. 1990. Calorimetric studies of the state of water in seed tissues. *Biophysical Journal* 58: 1463-1471.

- Vertucci CW. 1989. The effects of low water contents on physiological activities of seeds . *Physiologia Plantarum* 77 (1) : 172–176.
- Vertucci CW, Leopold AC. 1987. Water binding in legume seeds. *Plant Physiology* 85: 224-231.
- Vertucci CW, Roos EE. 1993. Theoretical basis of protocols for seeds storage: II. The influence of temperature on optimal moisture levels. *Seed Science Research* 3: 201-213.
- Vertucci CW, Roos EE. 1990. Theoretical basis of protocols for seeds storage. *Plant Physiology* 64: 1019-1023.
- Walters C. 1998. Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. *Seed Sci Res* 8:223-244.
- Weisser H. 1986. Influence of temperature on sorption isotherms. En: Le Maguer M, Jelen P. *Food engineering and process application, vol. 1. Transport phenomena.* Elsevier Applied Science Publishers, New York.
- Wettlaufer SH, Leopold AC. 1991. Relevance of Amadori and Maillard products to seed deterioration. *Plant Physiology* 97, 165–169.
- Williams RJ, Leopold AC. 1989. The glassy state in corn embryos. *Plant Physiology* 89: 977-981.
- Wilson DO, McDonald MB. 1986. The lipid peroxidation model of seed aging. *Seed Science and technology* 14:260-300.
- Wood SG, Lawson LD, Fairbanks DJ, Robison LR, Andersen WR. 1993. Seed lipid content and fatty acid composition of three quinoa cultivars. *Journal of food composition and analysis* 6: 41-44.
- Wright KH, Pike OA, Fairbanks DJ, Huber CS. 2002. Composition of *Atriplex hortensis*, Sweet and Bitter *Chenopodium quinoa* Seeds. *Journal of Food Science* 67 (4): 1383–1385.

- Zhang HB, Zhao Z, Ding X, Paterson AH and Wing RA. 1995. Preparation of megabase-size DNA from plant nuclei. *Plant J.* 7:175-184.