

Tesis de Maestría

Encapsulación y estabilidad de componentes naturales para el reemplazo de antioxidantes sintéticos

Rincón Cardona, Jaime Alberto

2011

Tesis presentada para obtener el grado de Magíster de la
Universidad de Buenos Aires en Bromatología y Tecnología
de la Industrialización de los Alimentos de la Universidad de
Buenos Aires

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

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Rincón Cardona, Jaime Alberto. (2011). Encapsulación y estabilidad de componentes naturales para el reemplazo de antioxidantes sintéticos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n4988_RinconCardona

Cita tipo Chicago:

Rincón Cardona, Jaime Alberto. "Encapsulación y estabilidad de componentes naturales para el reemplazo de antioxidantes sintéticos". Tesis de Magíster. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n4988_RinconCardona

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

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



ENCAPSULACIÓN Y ESTABILIDAD DE COMPONENTES
NATURALES PARA EL REEMPLAZO DE ANTIOXIDANTES
SINTÉTICOS

Autor: Qco. Jaime Alberto Rincón Cardona

Tesis para optar al título de Magíster en "Bromatología y Tecnología de la
Industrialización de los Alimentos"

8 1 537

Directora:

Dra. María del Pilar Buera

2011

Esta tesis está dedicada quienes han sido la luz de mis
ojos, mi enano, mi mamá, mi hermanita y Marce.

Agradecimientos

A la Dra. María del Pilar Buera, por dirigir mi trabajo de tesis, por su gran apoyo, tiempo y esfuerzo en el desarrollo de este trabajo y permitirme crecer en educación científica y personal.

A la Dra. María Lidia Herrera, por su apoyo, confianza y permitirme concluir esta etapa de mi educación.

A los Doctores Marcela Tolaba y Constantino Suárez por haberme impulsado a continuar en momentos de duda.

Al Departamento de Industrias y Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires por permitirme la utilización de las instalaciones.

A Marce que sin su apoyo y comprensión hubiera sido imposible.

A Anali, Naty, Peggy, Lore, Mario, Vero, Cristian, Helena, Eliana, Sole, Cris, Abel, Pato, Flor, Caro, Betty, mis compañeros de laboratorio quienes me han acompañado tantos momentos.

A Lina, Diego, María, Víctor, Fernando, Angelita, Moni, Marce Reynoso y a todos los que compartieron conmigo largas jornadas de estudio y buenos momentos.

A Andrea Patriarca, Luli, Pauli, Andre, Stella, Gra, Gustavo, Marianela, Gabriela, Nilda y Betty por toda su colaboración y buena onda durante todo el tiempo compartido.

A todas las personas que han hecho de mi vida en Buenos Aires una grata experiencia John, Alejo, Juli, Víctor, Pablo, Paula, Ariel, Cami, Ana y Ele.

A todos mis compañeros de Higiene y Seguridad, a Cata por haberme apoyado en momentos difíciles, a Ángel, Ana, Omar, Jorgelina, Alejo, Lito, Mirtha, Roxana, Hugo y Paula.

A mis amigos Jorge Mario, Carlos Andrés, Mario Andrés, Andrés Felipe, Andrés Mauricio y Alejandro quienes nunca dejaron de creer en mi y me brindaron apoyo y amistad a pesar de la distancia.

A mi hermanita por su apoyo, confianza y darle vida al motor de mi vida (Nicolás).

A mi madre que con su esfuerzo y amor supo guiarme y es la persona a quien le debo todos mis logros.

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Pardeamiento enzimático.....	2
1.1.1 Características de la polifenoloxidasas.....	5
1.1.2 Efecto del pH sobre la polifenoloxidasas.....	9
1.1.3 Efecto de la temperatura sobre la polifenoloxidasas.....	10
1.2 Pardeamiento no enzimático.....	10
1.2.1 Reacción de Maillard.....	12
1.2.2 Etapas de la reacción de Maillard.....	13
1.2.3 Generación de compuestos fluorescentes en la reacción de Maillard.....	16
1.2.4 Evaluación de la fluorescencia.....	18
1.2.5 Evaluación del color.....	20
1.2.6 Factores que afectan la reacción de Maillard.....	23
1.3 Los sulfitos como inhibidores del pardeo enzimático y no enzimático.....	23
1.3.1 La legislación mundial y los sulfitos.....	28
1.4 Potenciales alternativas para la inhibición de pardeo	30
2. OBJETIVOS.....	37
2.1 Objetivo general	37
2.2 Objetivos específicos.....	37
3. MATERIALES Y METODOS.....	38
3.1 Materiales.....	38
3.1.1 Obtención de un extracto purificado con acción de polifenoloxidasas.....	38
3.1.2 Selección de los extractos vegetales con potencial acción inhibitoria.....	38
3.1.3 Preparación de discos de manzana para evaluación de la inhibición del pardeamiento enzimático.....	39
3.1.4 Preparación de la solución para el desarrollo de la reacción de Maillard.....	39
3.1.5 Preparación de discos de manzana para evaluación de la inhibición del pardeamiento no enzimático.....	39
3.2 Métodos.....	40
3.2.1 Estudios de inhibición del pardeamiento enzimático.....	40
3.2.1.1. Preparación del extracto enzimático de polifenoloxidasas.....	40
3.2.1.2. Caracterización del extracto enzimático.....	42
3.2.1.3. Ensayo estándar para evaluar la actividad enzimática y su inhibición.....	43
3.2.1.4. Preparación de los extractos con potencial acción inhibitoria del pardeamiento.....	44
3.2.1.5. Evaluación de la inhibición de PFO en rodajas de manzana mediante análisis de imagen.....	45
3.2.1.6. Medición del grado de pardeamiento.....	47
3.2.2 Pardeamiento no enzimático.....	48
3.2.2.1. Manzana como fuente de PFO, de polifenoles y como medio de pardeo no enzimático.....	48
3.2.2.2. Extractos inhibitorios.....	49
3.2.2.3. Tratamiento térmico.....	49
3.2.2.4. Medición del grado de pardeamiento.....	49
3.2.2.5. Determinación de fluorescencia.....	50
3.2.2.6. Estudio de la inhibición del pardeamiento no enzimático en discos de manzana a través de análisis de imágenes.....	52

3.2.2.7. Evaluación de las constantes cinéticas de pardeamiento.....	52
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	54
4.1 Pardeamiento enzimático.....	54
4.1.1 Inhibición de la actividad polifenoloxidasa (PFO) de un extracto crudo de manzana.....	54
4.1.1.1 <i>Ensayo de la actividad enzimática polifenoloxidasa PFO</i>	54
4.1.1.2 <i>Efecto del pH sobre la actividad de PFO</i>	57
4.1.1.3 <i>Efecto de la temperatura sobre la actividad de PFO</i>	57
4.1.1.4 <i>Inhibición de la PFO de manzana por los extractos de cebolla, coliflor y repollo</i>	58
4.1.1.5 <i>Efecto de la concentración de los extractos vegetales sobre la inhibición enzimática</i>	59
4.1.1.6 <i>Porcentaje de inhibición causada por los extractos vegetales</i>	64
4.1.1.6.a. <i>Porcentaje de inhibición analizando las absorbancias máximas</i>	64
4.1.1.6.b. <i>Porcentaje de inhibición analizando las constantes de la cinética enzimática</i>	67
4.1.1.7 <i>Comparación de la efectividad de los extractos inhibidores con la del sulfito</i>	71
4.1.2 Evaluación de la inhibición del PFO en rodajas de manzana mediante análisis de imagen.....	72
4.1.2.1 <i>Evaluación de la inhibición de la PFO en muestras liofilizadas y posteriormente embebidas en extractos inhibitorios</i>	72
4.1.2.2 <i>Evaluación de la inhibición del PFO en muestras frescas embebidas en extractos inhibitorios y posteriormente liofilizadas</i>	79
4.2 Pardeamiento no enzimático.....	92
4.2.1 Efectos de los extractos vegetales sobre la inhibición del pardeamiento no enzimático.....	92
4.2.1.1 <i>Efectos de los extractos de cebolla, coliflor y repollo sobre la inhibición del pardeamiento no enzimático en sistemas glucosa/glicina</i>	92
4.2.1.2 <i>Pardeo no enzimático en rodajas de manzana frescas embebidas en los extractos inhibitorios, escaldadas al vapor, y tratadas a 70°C</i>	97
Resumen de resultados.....	101
5. CONCLUSIONES.....	104
6. BIBLIOGRAFÍA.....	107

1. Introducción

La industria alimentaria es un importante consumidor de productos químicos de diferente funcionalidad, ya sea como ingredientes específicos o aditivos. Sin embargo, desde hace unas décadas, existe un aumento en la demanda de alimentos de calidad limitando el agregado de ingredientes sintéticos, lo que impulsa al desarrollo de nuevos métodos de producción que a su vez utilicen aditivos naturales y mantengan las características originales de los alimentos.

Una de las principales manifestaciones de deterioro químico de los alimentos es el oscurecimiento con tinte castaño. Según el tipo y composición de un alimento y las condiciones a las que esté expuesto (contenido acuoso, pH, temperatura), la causa del oscurecimiento puede deberse a reacciones enzimáticas o no enzimáticas. Las reacciones enzimáticas ocurren por acción enzimática, en vegetales frescos, a alto contenido de agua y a temperatura ambiente, mientras que las no enzimáticas se producen fundamentalmente a alta temperatura en alimentos azucarados.

En muchos procesos industriales es importante lograr la inhibición de ambos tipos de reacciones y los agentes inhibidores universales para ambas son los bisulfitos, derivados del dióxido de azufre gaseoso. Estos agentes tienen además propiedades de provocar la inhibición del crecimiento de hongos y también efecto bacteriostático. Es debido a todos estos efectos benéficos que durante el siglo XX se han empleado abundantemente. Sin embargo, en estudios previos se ha demostrado que pueden generar reacciones muy violentas en personas sensibles, y en las últimas décadas se ha tendido a limitar su empleo. Las nuevas condiciones en el empleo de sulfitos como inhibidores de las reacciones de oscurecimiento (enzimático y no enzimático)

condujeron a la búsqueda de fuentes naturales y hay un gran interés en probar el desempeño de extractos vegetales para este fin (Wen y Wrolstad, 2005).

En esta tesis se ha investigado la posibilidad de emplear extractos naturales que tengan propiedades que les permitan actuar inhibiendo reacciones de pardeo enzimático y/o no enzimático en reemplazo de los aditivos no naturalmente presentes en alimentos, como los sulfitos.

1.1 PARDEAMIENTO ENZIMÁTICO

Los compuestos fenólicos y polifenólicos naturales se oxidan a quinonas a través de reacciones enzimáticas (mediante la enzima polifenoloxidasas, PFO). Luego estas quinonas están sometidas a reacciones posteriores, catalizadas enzimáticamente o no, que por condensación generan pigmentos pardos, por lo que se conoce como pardeamiento enzimático. El pardeamiento enzimático, si bien en algunos casos específicos es deseable (por ejemplo.: en la fermentación de té y cacao), en otros resulta en una pérdida de valor nutricional y funcional y además en una alteración de las características organolépticas de los alimentos (Friedman y col., 1996; Ding y col., 2004).

Los agentes más usados para controlar el oscurecimiento provocado por enzimas son los agentes que contienen sulfito. Dado los efectos adversos para la salud que pueden generar, varias investigaciones se han dedicado estudiar agentes antipardeamiento que no contengan sulfitos, como los agentes reductores (ácido ascórbico y análogos, glutationato, L-cisteína), inhibidores enzimáticos (ácidos carboxílicos aromáticos, resorcinolos sustituidos, aniones,

péptidos), agentes quelantes (fosfatos, EDTA, ácidos orgánicos), acidulantes (ácido cítrico, ácido fosfórico, agentes complejantes (ciclodextrinas) y enzimas (Labuza y col., 1992; Lambrecht, 1995; Martinez y Whitaker, 1995; McEvily y col., 1992; Molner-Perl y Friendman, 1990a y b; Friedman y col., 1992; Monsalve-Gonzalez y col., 1993; Moon y col., 1999; Nicolas y col., 1994; Vamos-Vigyazo, 1995; Walker, 1995). De acuerdo con la literatura, el control de pardeamiento enzimático por agentes puede ser clasificado en tres categorías, dependiendo de si afectan principalmente productos de reacción, los sustratos o la enzima polifenoloxidasas. Las ortoquinonas son productos de reactivos primarios y pueden ser reducidos a ortodifenoles o atrapados como componentes incoloros. Sin embargo, los productos secundarios resultantes, principalmente de la polimerización oxidativa de o-quinonas generan compuestos altamente coloreados que son reactivos en reacciones no enzimáticas posteriores. Diferentes fenómenos físicos y fisiológicos tales como el pardeamiento de los alimentos, el cambio de color de los vegetales durante el procesado, la alteración de la solubilidad y la digestibilidad, la formación de sustancias húmicas, actividad germicida, citotoxicidad y otros, ocurren cuando las quinonas de las células desintegradas reaccionan con aminoácidos (Hidalgo y col., 2005; Bittner, 2006). Si bien las PFO tienen efecto favorable en los mecanismos de detoxificación de aguas naturales, los mecanismos de toxicidad y las vías por las cuales los bifenilos policlorados (PCBs) pueden activarse y actuar como inductores de cáncer incluyen la oxidación a sus correspondientes quinonas y reacción con aminoácidos o péptidos (Moeder y col., 2004). La esclerotización de la cutícula de los insectos es un proceso bioquímico que involucra la reacción entre quinonas y aminoácidos (Andersen y

col., 1996). Por lo tanto, se investigaron muchos de los compuestos que actúan sobre las o-quinonas.

El ácido ascórbico es el agente más frecuentemente usado para el control de pardeamiento de productos alimenticios. Los ácidos carboxílicos aromáticos son inhibidores de la polifenoloxidasas debido a su similitud con el sustrato fenólico y han sido reportados como agentes efectivos para la inhibición de pardeamiento a largo plazo (McEvily y col., 1992; Nicolas y col., 1994; Sapers y col., 1989). Entre los agentes que contienen azufre, la L-cisteína es un componente efectivo para prevenir el pardeamiento enzimático.

Estas diferencias en el mecanismo de inhibición pueden permitir el uso de agentes antipardeamiento combinados que puede resultar en la mejora de la inhibición. Las combinaciones de agentes más citadas en la literatura y/o más disponibles comercialmente son las combinaciones basadas en ácido ascórbico (Pizzocarno y col., 1993). En trabajos previos, se ha reportado la efectividad de las mezclas de ascórbico y ciclodextrinas en la inhibición de pardeamiento en jugo de manzana (Hicks y col., 1990). Por otra parte, se ha reportado que el cinamato y el benzoato mejoran la efectividad del ácido ascórbico y de sus derivados como inhibidores del pardeamiento en jugos de manzana. En este mismo producto se estudiaron combinaciones de ácido ascórbico con polifosfato ácido (ácido ascórbico-2-fosfato y trifosfato), las cuales fueron altamente efectivas en la inhibición de pardeamiento (Sapers y col., 1989).

Como dijimos, la reacción de oscurecimiento se acelera en presencia de grupos amino provenientes de aminoácidos libres o de proteínas (Friedman, 1996; Ding y col., 2004; Bittner, 2006). Los compuestos pardos polifenólicos

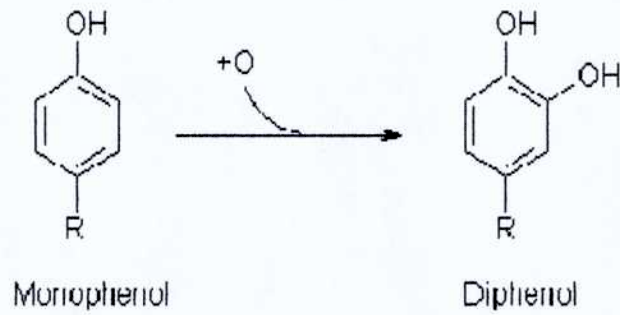
oxidados que se generan a través de reacciones de pardeamiento enzimático reaccionan con grupos amino como lo hacen los azúcares reductores. Como resultado de esa interacción se pueden observar cambios en la polimerización de polifenoles, en la astringencia, en la estabilidad de las proteínas y en su grado de glicosilación (Vidal y col., 2003; Song Jung y col., 2002; da Silva y col., 1991). Además, la unión de flavonoides o antocianinas oxidados a proteínas puede cambiar las características de fluorescencia de la proteína (Ding y col., 2004).

1.1.1 Características de la polifenoloxidasa (PFO)

Como se mencionó anteriormente, las principales enzimas responsables del pardeamiento enzimático (PFO) componen un sistema enzimático que cataliza reacciones de oxidación de compuestos polifenólicos. El primer paso incluye la incorporación de un grupo fenol a otro ya existente, o sea la formación de un polifenol, generando intermediarios inestables que posteriormente se oxidan en presencia de oxígeno molecular (O_2), y se polimerizan para dar melaninas. Estas son las responsables del color marrón indeseable que se produce por ejemplo en bananas, manzanas, papas y champiñones. Estos pasos están esquematizados en la Figura 1.1 (Fennema, 1996).

Primer paso:

Adición de un grupo fenol



2do. paso:

Oxidación del polifenol

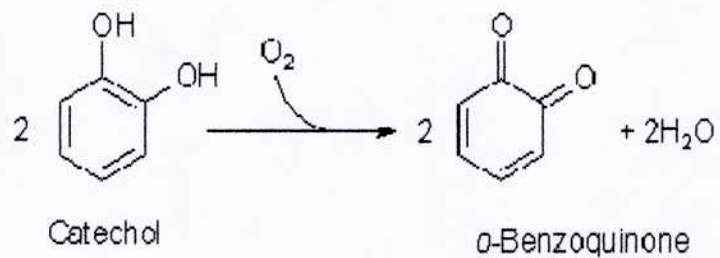


Figura 1.1 Esquema de los pasos involucrados en la oxidación de polifenoles

En los alimentos existen diversos tipos de compuestos polifenólicos: flavonoides, antocianinas, derivados de ligninas, etc., algunos de los cuales se muestran en la Figura 1.2.

Además de contribuir a las características sensoriales de diversos alimentos, tales como aroma, astringencia y color, los compuestos polifenólicos poseen efectos benéficos para la salud asociados a sus propiedades antioxidantes (Manzocco y col., 2001).

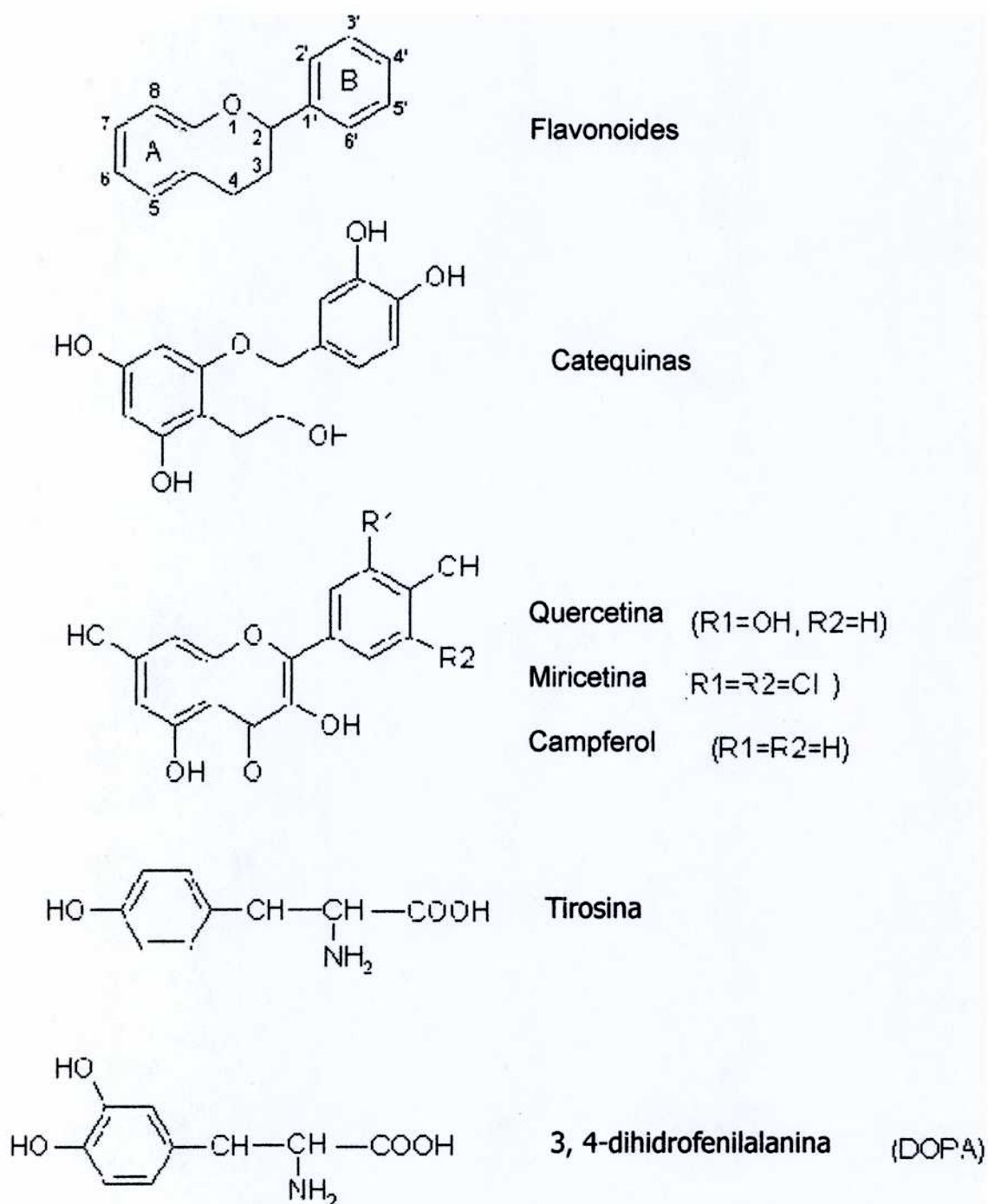


Figura 1.2. Algunos sustratos del sistema de las polifenoloxidasas

En los tejidos vegetales, los polifenoles se encuentran localizados principalmente en las vacuolas y la enzima PFO se encuentra en los cloroplastos (Figura 1.3) (Hammer, 1993; Ono y col., 2006). Por lo tanto, en

circunstancias normales en los tejidos vegetales los polifenoles no tienen contacto con las PFO y la reacción no se produce a velocidad apreciable. Sin embargo, si por un impacto, cortes u otro procedimiento similar (al pelar con un cuchillo) se produce la ruptura de los compartimientos en que ambos productos se alojan, éstos se ponen en contacto y la producción de quinonas comienza.

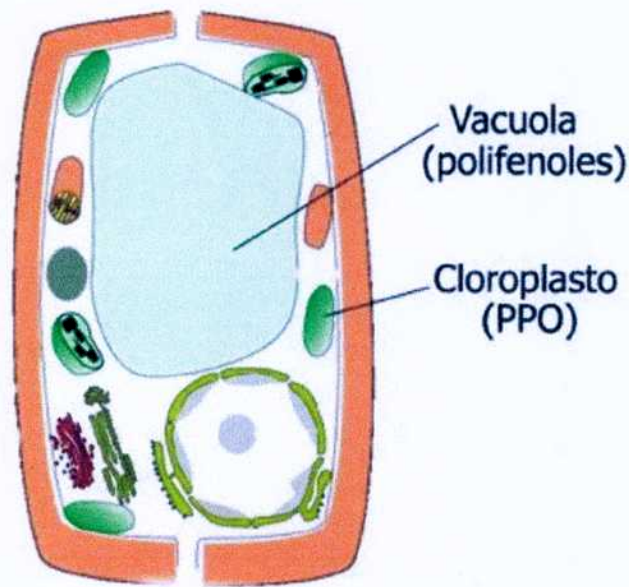


Figura 1.3. Esquema de la compartimentalización enzima – sustrato en una célula vegetal.

Dada la localización de la enzima, los procesos de extracción de la PFO del tejido vegetal presentan algunos aspectos a considerar, como por ejemplo, la resistencia de la pared celular, debido a la presencia de celulosa. Dado que las vacuolas ocupan gran parte del volumen total de la célula, cuando estas son destruidas, liberan proteasas al medio, lo cual hace que el pH del medio disminuya y la enzima se inactive. Adicionalmente, los compuestos fenólicos en la célula reaccionan con el oxígeno en presencia de la PFO formando pigmentos poliméricos. Para minimizar estos efectos es usual adicionar

agentes reductores como el 2-mercaptoetanol para inhibir las PFO o adicionar polímeros como la polivinilpirrolidona para adsorber los compuestos fenólicos (Price y Stevens, 2001). También se produce insolubilización de proteínas, y pérdida del valor nutricional por interacción de los polifenoles oxidados con aminoácidos. Entre los sustratos de esta reacción se incluyen fenoles simples, derivados del ácido cinámico y flavonoides.

Los tejidos tienen distinta predisposición al pardeo enzimático, y estas variaciones se deben al contenido de enzimas y al tipo y cantidad de sustratos fenólicos presentes. Otra enzima que participa indirectamente del pardeamiento enzimático es la lipoxigenasa, la cual produce la destrucción de clorofila y carotenos, y las reacciones oxidativas generan carbonilos que son precursores en las reacciones de pardeamiento no enzimático (Pourcel y col., 2007).

1.1.2 Efecto del pH sobre la PFO

Las enzimas generalmente presentan su actividad máxima en estrechos intervalos de pH, la exposición a valores de pH por fuera del intervalo, puede conducir a la pérdida irreversible de actividad. Algunos factores importantes a tener en cuenta al momento de escoger la solución amortiguadora para la extracción de una enzima son los siguientes:

- El intervalo de pH en donde la enzima tendrá su mayor actividad.
- La fuerza iónica y la temperatura que pueden afectar la solución *buffer*.
- La solución no debe afectar la actividad de la enzima ya sea por efectos quelantes o por interferencias en etapas posteriores de purificación.

- La solución *buffer* no debe interferir con el método de cuantificación. Por ejemplo no debe absorber a la longitud de onda del ensayo (Price y Stevens, 2001).

1.1.3 Efecto de la temperatura sobre la PFO

Durante la extracción de la enzima, los procesos de rompimiento celular pueden provocar un aumento considerable de la temperatura. Para evitar esto, es necesario utilizar soluciones refrigerantes o instrumentos que ayuden a disiparla. Lo usual es llevar a cabo los procesos de extracción a 4°C para minimizar los procesos de desnaturalización de la enzima y reducir la actividad de las proteasas (Lowe, 1996). Cabe acotar que en algunos casos, la exposición de la enzima a bajas temperaturas (a temperaturas por debajo de 0°C) puede dar lugar a la inactivación debido a la cristalización del solvente (Price y Stevens, 2001), lo que provoca cambios de fuerza iónica y de pH que afectan su estabilidad.

1.2 PARDEAMIENTO NO ENZIMÁTICO

El pardeamiento no enzimático (PNE) es una de las principales reacciones de deterioro de alimentos; por lo tanto es importante el conocimiento de cuáles son los mecanismos involucrados y los factores determinantes del progreso de esta reacción. Las reacciones de PNE incluyen los fenómenos de caramelización, degradación de ácido ascórbico o la interacción de proteínas o aminoácidos con hidratos de carbono esta última es denominada reacción de Maillard (Fennema, 1996) y/o las ya mencionadas provocadas por polifenoles

oxidados y su interacción con grupos amino. Lo que caracteriza a estas reacciones, es que en todas ellas intervienen grupos carbonilo llamados "activos" provenientes principalmente de azúcares reductores, como así también de polifenoles o compuestos lipídicos oxidados (Gardner, 1979).

Los efectos del pardeamiento no enzimático sobre los alimentos son múltiples, en algunos casos deseables y en otros indeseables. Se producen modificaciones en la calidad y valor nutritivo a causa de:

- Producción de aromas y sabores.
- Cambios de color debidos a la producción de sustancias pardas y destrucción de pigmentos del alimento.
- Pérdida de solubilidad de proteínas, con los consiguientes cambios en la textura y alteración en el poder de reconstitución de los alimentos deshidratados.
- Pérdida del valor nutritivo al dañarse aminoácidos esenciales como la L-lisina, o vitaminas como el ácido ascórbico.
- Producción de metabolitos de acción potencialmente tóxica.
- Liberación de gas (CO_2).
- Disminución del pH.

1.2.1 Reacción de Maillard

Los alimentos que contienen azúcares reductores y proteínas, son especialmente sensibles a las reacciones de pardeamiento; siendo la disminución de la solubilidad, la coloración y pérdida del valor nutricional las causas principales de deterioro asociadas al pardeamiento.

Los primeros estudios sobre la reacción de pardeamiento no enzimático fueron iniciados por Louis Camille Maillard, quien calentó aminoácidos en una solución con altos niveles de glucosa mientras investigaba la biosíntesis de proteínas en tejido cerebral (Maillard y Gautier, 1912). Años más tarde en 1951 se publicó la revisión general de la reacción de Maillard, donde se relacionaron los problemas de los alimentos con las reacciones entre azúcares y compuestos aminos (Danehy y Pigman, 1951). La reacción de Maillard continua siendo un área activa de investigación debido a su importante rol en color, flavor y calidad nutricional, además algunos de los compuestos producidos en esta reacción pueden tener importancia toxicológica (Reyes y col., 1982), y causar la pérdida de valores nutricionales y funcionales (Kawai y col., 2004).

Esta reacción produce una variedad de compuestos intermediarios y finalmente son formados pigmentos pardos (melanoidinas) (van Boekel, 1998). Los productos de la reacción de Maillard pueden influenciar la estabilidad oxidativa y la vida útil de muchos alimentos (Morales y Jiménez, 2001).

La formación de pigmentos pardos es deseada para algunos tipos de alimentos procesados (panadería, chocolate, tostado de café, cocinado de carne), mientras es absolutamente indeseable en otras tecnologías (secado de leche, tratamiento térmico para la estabilización de leche, jugos de fruta y tomates) (Carabasa y Ibarz, 2000).

1.2.2 Etapas de la reacción de Maillard

La reacción de Maillard se dividió en tres grandes etapas (Mauron, 1981; Labuza, 1994; van Boekel, 2001):

1. La primera etapa involucra la condensación entre un azúcar y un grupo amino y la consiguiente isomerización (rearreglos de Amadori/Heinz). Este paso de reacción fue muy bien descrito y en él no hay formación de pigmentos ni desarrollo de absorbancia en el ultravioleta cercano, pero los compuestos que se forman poseen un marcado poder reductor y se puede monitorear la desaparición de los reactivos (azúcar reductor o aminoácido), o la formación de productos del re-ordenamiento de Amadori (Yaylayan y Huyghues-Despointes, 1994; Ge y Lee, 1996; Blanka y col., 2002).
2. La segunda etapa incluye la reacción de los compuestos de Amadori para formar productos de deshidratación y fragmentación, y degradación de aminoácidos vía la reacción de Strecker (especialmente a altas temperaturas). Generalmente los compuestos intermediarios se determinan por medición de densidad óptica en el rango ultravioleta (280 nm para furfurales), ya que en esta fase aparece un color amarillento y aumenta la absorción en la región ultravioleta cercana debido a la deshidratación del azúcar y a la formación de compuestos α -carbonílicos. Se puede medir también el desarrollo de fluorescencia, la determinación de volátiles por cromatografía gaseosa, y además la determinación de la disminución de pH que ocurre por bloqueo de los grupos aminos y por la generación de compuestos ácidos. El

desarrollo de fluorescencia durante la reacción de Maillard ha sido ampliamente comprobado en numerosos sistemas azúcar-amino (Burton y col., 1962; Adhikari, 1973; Leclere y Birlouéz-Aragon, 2001).

3. Por último, en la etapa final, los productos de Amadori se degradan en compuestos dicarbonílicos, que rápidamente reaccionan con grupos amino formando un entrecruzamiento intra e inter molecular estable (Brownlee y col., 1988), que es responsable de la formación de los cromóforos. La solución o producto obtenido posee un color desde pardo-rojizo a pardo muy oscuro que no se decolora por la presencia de sulfitos. En este estadio, el aroma a tostado es muy evidente, y se encuentran presentes melanoidinas coloidales e insolubles como resultado de complejas condensaciones aldólicas y polimerizaciones. Los productos de glicosilación avanzada (AGEs, por su sigla en inglés *advanced glycosilation end products*) son muy estudiados en medicina porque se generan en los organismos vivos a causa de las reacciones complejas involucradas cuando se desata la reacción de Maillard. Los AGEs pueden ser solubles o insolubles y generalmente involucran la pérdida de funcionalidad de las proteínas. En tecnología de alimentos, un alto grado de glicosilación causa pérdida de solubilidad de las proteínas, aumento de la dureza y otros cambios de propiedades texturales.

La Figura 1.4 muestra un esquema simplificado de los principales reactivos y productos de las potenciales reacciones químicas en alimentos. Los azúcares

reductores, lípidos insaturados, ácido ascórbico y compuestos polifenólicos oxidables pueden considerarse como los reactivos primarios. Estos compuestos pueden reaccionar directamente o luego de su oxidación con grupos amino de proteínas o aminoácidos (Sikorski y col., 2007).

Aunque los azúcares reductores han sido considerados tradicionalmente como los principales reactivos en la reacción de Maillard, los lípidos o compuestos polifenólicos oxidados (como las o-quinonas) reaccionan con aminas, aminoácidos y proteínas. Estas reacciones han recibido considerable atención porque promueven importantes cambios deteriorativos en las propiedades funcionales, valor nutritivo, flavor y color de los alimentos (Ericksson, 1987; Friedman, 1996). Como se observa en el esquema de la Figura 1.4, los lípidos y productos de oxidación de polifenoles compiten con azúcares reductores en la generación de grupos carbonilo reactivos que son capaces de modificar macromoléculas a través de la reacción de Maillard (Hidalgo y col., 2005). De esta manera, la reacción de Maillard tiene un papel significativo en la modulación de los caminos de reacción de los compuestos lipídicos y fenólicos en alimentos durante el tratamiento térmico, y un análisis integrado de los posibles reactivos y productos es útil para analizar el esquema completo de productos potenciales cuando un alimento se procesa o almacena.

Los compuestos causantes de la generación de pigmentos pardos en todos los casos contienen un grupo carbonilo o éste es potencialmente generado. Los compuestos polihidroxílicos y azúcares en los que la función carbonilo tiene un bloqueo permanente no producen pardeo (Schwimmer y Olcott, 1953). Por lo tanto, un azúcar no reductor como sacarosa, primero debe hidrolizarse para dar compuestos reactivos y poder participar en las reacciones de pardeamiento.



Figura 1.4. Esquema simplificado de los principales reactivos y productos de las potenciales reacciones químicas en alimentos. AGEs: productos de glicosilación avanzada.

1.2.3 Generación de compuestos fluorescentes en la reacción de Maillard

Productos e intermediarios de la reacción de Maillard se caracterizan por su fluorescencia y se han realizado una serie de avances sobre las aplicaciones de la determinación de fluorescencia para el seguimiento de las etapas tempranas de la reacción de Maillard (Matiacevich y col., 2005; 2006a y b).

El desarrollo de productos fluorescentes durante el almacenamiento de diferentes tipos de productos alimenticios y sistemas modelos ha sido previamente descrito. Las longitudes de onda correspondientes a los máximos de excitación y de emisión son propiedades importantes para caracterizar los productos fluorescentes provenientes de la reacción de Maillard, y sus intensidades son consideradas como índices del grado de modificación de proteínas. La Tabla 1.1 muestra la longitud de onda de excitación (340-370 nm)

y de emisión (420-470 nm) de compuestos provenientes de la reacción de Maillard obtenidos en alimentos en trabajos previamente publicados.

Tabla 1.1. Longitudes de onda máximas de excitación y emisión de fluorescencia para compuestos fluorescentes presentes en alimentos provenientes de la reacción de Maillard. ND: no descripto.

Sistema	Exc. (nm)	Em. (nm)	Referencia
Albúmina de huevo	365	ND	Olcott y Dutton, 1945
Extractos de pan blanco tostado y café	350	430	Adhikari, 1973
Aceite de soja (extractos etanólicos)	367	430	Park y Kim, 1983
Proteínas solubles de soja	350/395	440/450	Sun y Leopold, 1995
Glucosa-ISP (proteínas aisladas de soja)	365	475	Davies y col., 1998
Formulas enteras para bebés	345	415	Rufian-Henares y col., 2002
Leche	347	415	Morales y col., 1996
Leche	330	420	Birlouez-Aragón y col., 2002

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

1.2.4 Evaluación de la fluorescencia

El proceso de fluorescencia involucra dos etapas: absorción de energía a los niveles de energía electrónica y la subsiguiente emisión de luz a longitudes de onda mayores debida a la pérdida de energía vibracional o térmica al medio. El proceso que ocurre entre la absorción y la emisión de luz es usualmente ilustrado por el diagrama de Jablonski (Figura 1.5), el cual es un diagrama de niveles de energía parcial para una molécula fotoluminiscente característica.

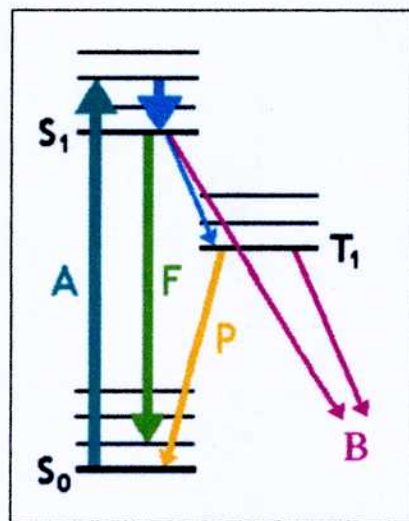


Figura 1.5. Diagrama de Jablonski

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

líneas horizontales finas, con cada uno de los estados electrónicos están asociados numerosos niveles de energía vibracionales.

Como muestra la Figura 1.5, la excitación de la molécula da como resultado la conversión de la molécula a cualquiera de los diversos estados excitados vibracionales. Obsérvese que no se muestra la excitación directa a un estado triplete porque ésta transición no tiene lugar de manera significativa.

Una molécula excitada puede volver a su estado fundamental mediante la combinación de varias etapas mecánísticas. Como muestran las flechas, dos de estas etapas son la fluorescencia (Flecha F) o la fosforescencia (Flecha P), que conllevan la emisión de un fotón de radiación. Las otras etapas de desactivación, son procesos no radiantes, como la relajación vibracional y el cambio irreversible a especies no-fluorescentes muestran en la figura como B. La sensibilidad del método de fluorescencia es alta y específica, debido a que la detección de la longitud de onda de emisión es diferente de la incidente y no hay un ruido de fondo de la fuente de excitación.

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

1.2.5 Evaluación del color

En las fases finales de las reacciones de pardeo (tanto enzimático como no enzimático) se observa la aparición de pigmentos con absorbancia en el espectro visible, de color pardo - rojizo intenso, que no se decoloran por la presencia de agentes decolorantes como los sulfitos.

El color es una importante cualidad de los materiales y en el caso de los alimentos, su percepción aporta datos sobre su calidad y estado de conservación, además es el primer parámetro evaluado por el consumidor y es crítico en la aceptación o rechazo de los productos (León y col., 2006).

La variable más frecuentemente empleada para medir el desarrollo de reacciones de pardeamiento no enzimático en alimentos o sistemas modelo es la densidad óptica del sistema pardeado a una longitud de onda particular (generalmente entre 390-500 nm) (Ellis, 1959; Lee y col., 1984). Sin embargo, para lograr una caracterización del color se debe realizar una medición a través de análisis de todo su espectro visible (transmisión o reflexión).

La determinación de color puede ser llevada a cabo por inspección visual humana, sin embargo, esta es muy subjetiva y extremadamente variable de un observador a otro, por lo tanto, para realizar un análisis de color objetivo, se requiere el uso de estándares de color como material de referencia.

La medida objetiva del color se desarrolló a partir de sistemas de medida que permiten la especificación completa en un espacio tridimensional.

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

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

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

Para lograr una adecuada caracterización de los colores se desarrollaron sistemas de medida que emplean "espacios de color" y "coordenadas de color" y permiten la especificación completa en el espacio tridimensional. Usualmente el color de los alimentos ha sido medido con las coordenadas L^* , a^* , b^* del espacio de color CIELAB. Este espacio es perceptualmente uniforme, es decir, la distancia euclidiana entre dos colores diferentes corresponde aproximadamente a la diferencia de color percibida por el ojo humano. En el espacio de color CIELAB la coordenada L^* representa la luminosidad del material y su valor varía en un rango de 0 que corresponde al negro y 100 blanco, y las coordenadas cromáticas de este espacio se representan por a^* (varía de verde a rojo) y b^* (varía de azul a amarillo) con valores cuyo rango está entre -120 y 120 para ambos casos.

Existen diferentes métodos para la determinación del color, entre ellos está el empleo de fotocolorímetros triestímulo con esfera integradora que pueden realizar mediciones sobre áreas relativamente amplias, que corresponden a las superficies que abarcan los sensores de los colorímetros. Estos sensores toman datos de toda la superficie que abarcan y registran y proveen los valores promedio de dicha superficie. Esto limita las aplicaciones de estos equipos a

productos homogéneos, sin embargo se obtienen datos en forma directa de las coordenadas de color (Lozano, 1978).

En los últimos años se ha puesto énfasis en nuevas técnicas basadas en sistemas de visión computarizada y análisis de imágenes para la evaluación del grado de pardeamiento y de otras propiedades relacionadas con la calidad del alimento (Aguilera y Stanley, 1999; Aguilera y Briones, 2005). Los sistemas de visión computarizada utilizan dispositivos para la adquisición de imágenes, computadoras y programas de procesamiento de las imágenes para simular el rol de los ojos y el cerebro. La visión computarizada ofrece una gran resolución espacial ya que cubre todo el objeto de interés, lo cual no es posible con los colorímetros triestímulo que requieren mediciones del objeto punto a punto y proporcionan, por lo tanto, valores de color promedios de zonas muy pequeñas. Las cámaras digitales capturan los colores mientras que las computadoras los almacenan usando el sistema RGB. En el sistema RGB cada color está representado por tres valores independientes: rojo (R), verde (G) y azul (B), ubicados a lo largo de los ejes de un sistema de coordenadas ortogonales, formando un cubo. La línea diagonal desde negro (0,0,0) hasta blanco (1,1,1), que une esquinas opuestas del cubo, representa el rango de valores de la escala de grises. Existen programas de computación que permiten determinar los valores promedio (y las desviaciones estándar) de R, G y B para el objeto de interés. El sistema RGB se puede transformar mediante fórmulas matemáticas en el sistema CIELAB (Gonzalez y Woods, 1992) el cual se utiliza comúnmente para análisis de color superficial.

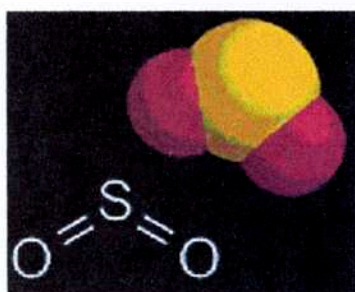
La toma de imágenes mediante una cámara fotográfica y su procesamiento por medio de programas adecuados se presenta como una alternativa interesante

para sistemas heterogéneos, debido a que proporcionan gran cantidad de información en forma práctica (Jayas y col., 2000).

1.2.6 Factores que afectan a la reacción de Maillard

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

1.3 LOS SULFITOS COMO INHIBIDORES DEL PARDEO ENZIMÁTICO Y NO ENZIMÁTICO.



Los sulfitos son compuestos ampliamente empleados como aditivos en la industria alimentaria, especialmente en procesos de elaboración de vinos y conservación de mariscos, frutas y productos cárnicos (Ruiz-Capillas Pérez y

Jiménez-Colmenero, 2009). El término “sulfito” en líneas generales se aplica tecnológicamente al dióxido de azufre y varias sales de sulfito inorgánico que liberan SO_2 en las condiciones de uso. En la Tabla 1.2 se muestran las diversas formas en las que se los encuentra, con sus números característicos según la codificación europea.

Tabla 1.2 Distintos compuestos sulfitados empleados en tecnología de alimentos, y su codificación europea (número E).

Nº E	Denominación
E-220	Dióxido de azufre
E-221	Sulfito sódico
E-222	Sulfito ácido de sodio
E-223	Metabisulfito sódico
E-224	Metabisulfito potásico
E-226	Sulfito cálcico
E-227	Sulfito ácido de calcio
E-228	Sulfito ácido de potasio

Los sulfitos pueden desempeñar diversas funciones. Ejercen una potente actividad antimicrobiana, especialmente en medio ácido y en condiciones aerobias, inhibiendo, principalmente, bacterias y mohos y en menor grado, levaduras. Actúan como antioxidantes, presentando una poderosa capacidad inhibidora de las reacciones de pardeo enzimático y no enzimático. Por esta razón se emplean principalmente en vegetales, frutas, crustáceos y cefalópodos. Además, los sulfitos se utilizan por otro efecto tecnológico, ya que ayudan a estabilizar el color de los productos, inhibir la decoloración, con el fin

de mejorar la apariencia de los productos, además de contribuir al *flavor* de muchos productos durante su preparación, almacenamiento y distribución.

Generalmente, la utilización de los sulfitos en condiciones y dosis permitidas no presenta problemas para el consumidor, sin embargo, pueden causar reacciones adversas en individuos sensibles (como los deficientes de la enzima sulfito oxidasa y asmáticos) cuando se consumen alimentos con niveles elevados de estos aditivos (Fennema, 1996). La Figura 1.6 muestra uno de los mecanismos propuestos para explicar el efecto del sulfito inhibitorio del pardeamiento enzimático

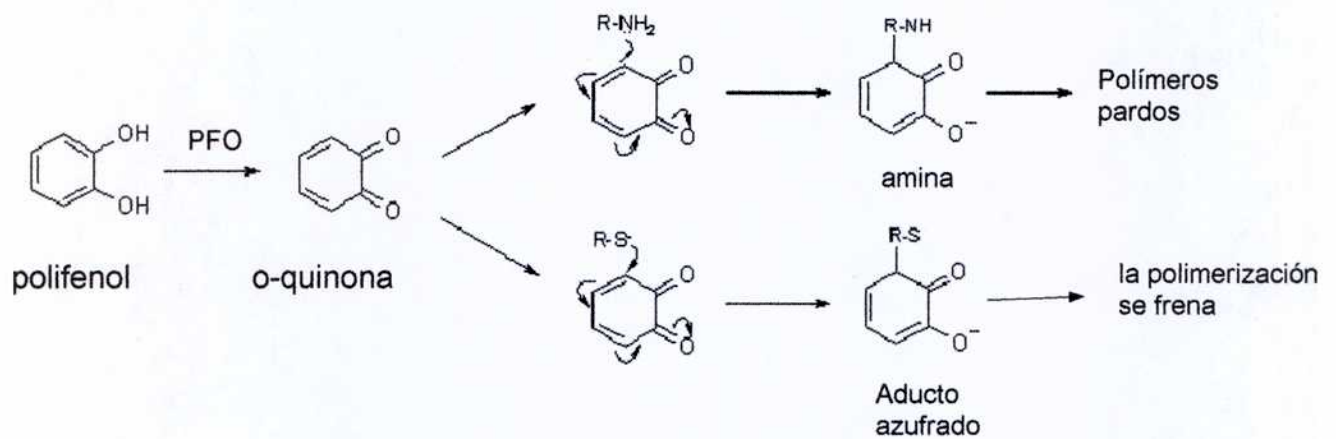


Figura 1.6 Esquema que explica la inhibición de la formación de polímeros pardos a partir de los polifenoles oxidados en presencia de sulfito. PFO: polifenoloxidasas

Además del sulfito, otros compuestos azufrados pueden tener acción inhibitoria sobre la formación de pigmentos pardos. En la Figura 1.7 se representa la inhibición por cisteína ($Cy-SH$). En este caso se propone la formación de un aducto que además de frenar la polimerización que genera los pigmentos pardos, actúa inhibiendo competitivamente a la polifenoloxidasas (PFO).

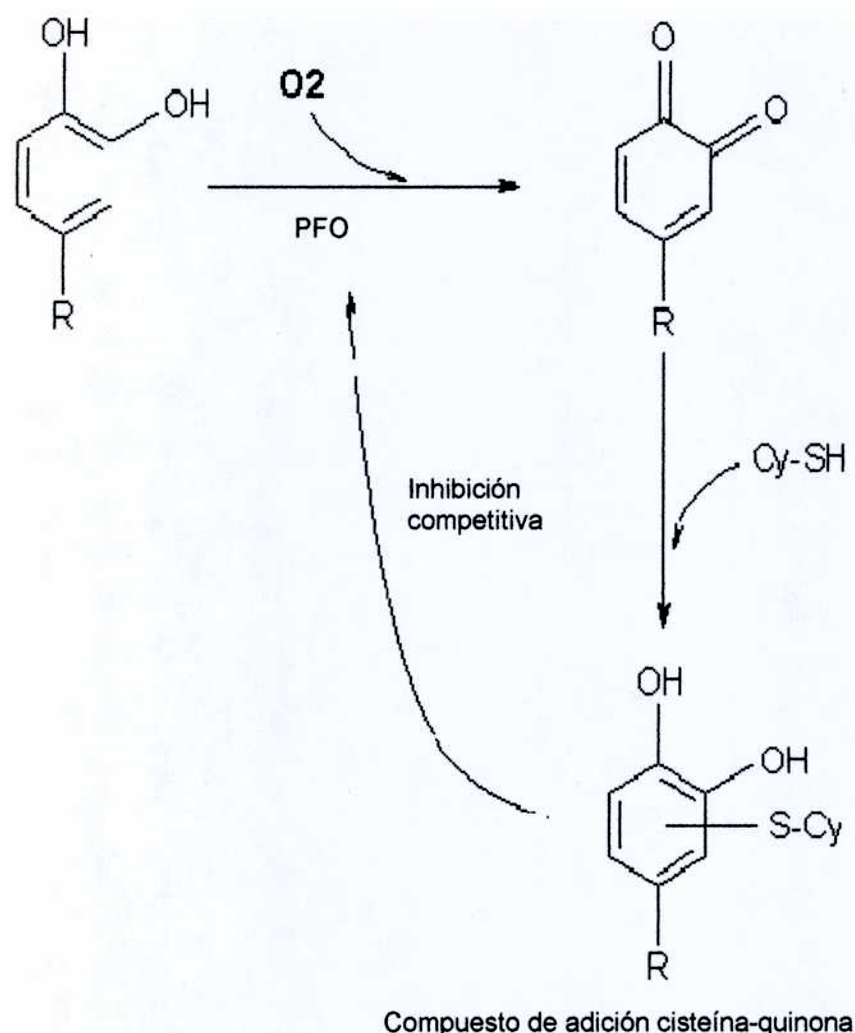


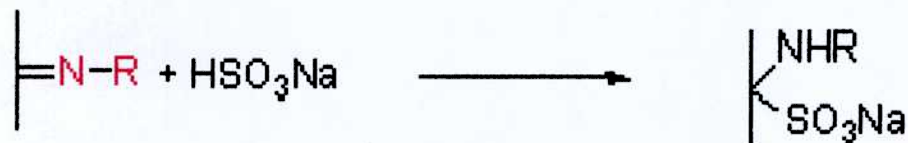
Figura 1.7 En el esquema se muestra el efecto inhibitorio de la cisteína sobre la formación de pigmentos pardos a partir de polifenoles.

El mecanismo propuesto para explicar la acción inhibitoria del sulfito sobre la reacción de Maillard implica la adición de sulfito al carbonilo de los azúcares reductores (Figura 1.8 a), o a las bases de Schiff que se forman en el primer paso de la reacción de Maillard (Figura 1.8 b) o a las formas enólicas que provienen de las reacciones de isomerización (Figura 1.8 c).

a.



b.



c.

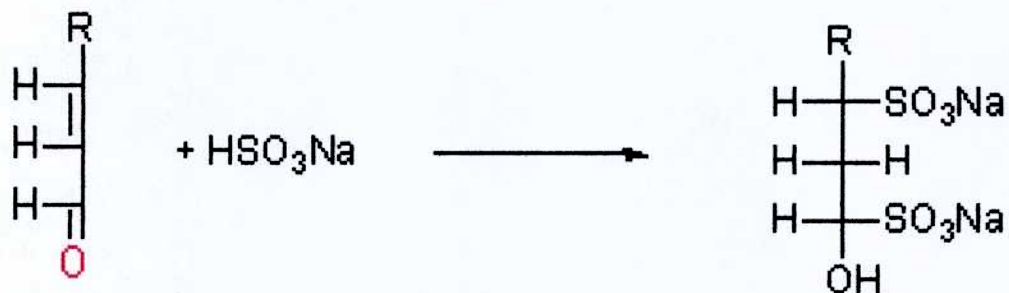


Figura 1.8 Esquemas de las diferentes formas de acción del sulfito para la inhibición del pardeo no enzimático: a) acción sobre los azúcares reductores; b) acción sobre los aductos; c) acción sobre las formas enólicas provenientes de las isomerizaciones.

La versatilidad del sulfito como agente micostático y bacteriostático, antioxidante e inhibidor de la formación de pigmentos pardos (ya sea por reacciones enzimáticas o por la reacción de Maillard) (Figura 1.9) explican la persistencia de su utilización a pesar de diversos casos de reacciones desfavorables por presencia de sulfitos, que provocan principalmente reacciones anafilácticas, respiratorias, dérmicas, gastrointestinales, siendo las más frecuentes las crisis de broncoespasmos (Prieto, 1989). En trabajos previos se ha encontrado que los sulfitos, además de ser causantes de *off flavors*, pueden generar un riesgo en la salud de consumidores alérgicos, como consecuencia de esto, el uso de sulfitos ha sido prohibido en productos frescos

y mínimamente procesados (Lu y col., 2006, US FDA 1986). Otro aspecto a tener en consideración que hace necesario su control, es la pérdida del valor nutricional de algunos alimentos debido a la capacidad que tienen los sulfitos para descomponer la tiamina o vitamina B₁ en sus componentes, tiazol y pirimidina. Por este motivo el uso de sulfitos debe permanecer restringido al mínimo nivel necesario tecnológicamente, sobre todo en alimentos ricos en tiamina como la carne.

Es decir, los sulfitos constituyen una gran ventaja desde el punto de vista tecnológico pero un peligro en cuanto al efecto potencial sobre individuos sensibles.



Figura 1.9. Algunos alimentos en los que se emplean sulfitos.

1.3.1 La legislación mundial y los sulfitos

La normativa sobre el uso de conservantes, antioxidantes y otros aditivos y sus condiciones de uso en los alimentos es muy variable de acuerdo con la legislación que se consulte. Dado que el objetivo primordial de cualquier norma relativa a estos aditivos alimentarios y sus condiciones de uso debe ser la necesidad de proteger al consumidor; se hace necesario establecer normas

estrictas para el uso de estos aditivos en los productos dirigidos a poblaciones susceptibles. En documento sobre la comparación de la legislación mundial sobre alérgenos de la *Cereal Partners Worldwide*, Louise Lennard, nutricionista de dicha sociedad presenta datos de cantidades máximas permisibles de sulfito en alimentos para las diferentes legislaciones. El Codex Stan 1-1985 Rev. 1-1991, enmendada en 2001 para inclusión de alérgenos indica que valores de 10 miligramos por kilogramo (ppm) o mayores deberán reportarse como alérgeno en el rotulo, valores idénticos están incluidos en las legislaciones de Australia y Nueva Zelanda, Unión Europea. Sin embargo, en el Código Alimentario Argentino y en las normas MERCOSUR se indica que ciertos alimentos podrán contener diferentes cantidades mínimas indispensables de anhídrido sulfuroso o sulfitos alcalinos, provenientes de sus tratamientos previos o de los diferentes procesos tecnológicos a los que son sometidos, y se establecen los máximos residuales permitidos. De acuerdo con la combinación de alimentos de la ingesta podrían llegarse cantidades de sulfito que podrían generar efectos adversos en la salud de los consumidores sensibles. Estudios a nivel europeo están sugiriendo que la IDA (Ingesta Diaria Aceptable) para los sulfitos, establecida en 0-0,7 mg/kg de peso corporal, se está sobrepasado en ciertos grupos de la población debido principalmente a la existencia de niveles de sulfitos mayores que los permitidos, en los alimentos que consumen. A su vez, en enero de 2009, el comité FAO/OMS propuso investigar si la ingesta en algunos grupos de la población excede la IDA.

1.4 POTENCIALES ALTERNATIVAS PARA LA INHIBICIÓN DE LAS REACCIONES DE PARDEO

Como se discutió previamente, el control de la acción de la polifenoloxidasa es crítico en la minimización del pardeo en frutas, vegetales y productos de mar (Mayer, 2006). Por otro lado, el oscurecimiento provocado por reacciones no enzimáticas, también es una causa importante de pérdida de Calidad. Se busca por lo tanto, agentes naturales potenciales para su uso en la industria de los alimentos que mejoren la seguridad alimentaria, la viabilidad económica, y la eficacia de la inhibición. Los inhibidores más usados en la industria incluyen ácido ascórbico y diversos compuestos que contienen sulfitos. Dado los posibles factores de riesgo que representa el uso de aditivos alimentarios sintéticos y de sulfitos en particular, el desarrollo y uso de inhibidores de origen natural podrían presentar algunas ventajas. En estudios recientes se ha demostrado que los compuestos con grupo sulfhidrilo (SH o tiol) son buenos inhibidores de la enzima PFO (Ding y col., 2002) y podrían además tener efecto sobre la reacción de Maillard.

Ciertos compuestos azufrados provenientes de vegetales tienen importancia por sus propiedades biológicas. Entre ellos debemos mencionar los glucosinolatos de las *Brassicaceas* y los compuestos azufrados de las *Alliaceas*, que aparte de ser responsables de su aroma y sabor característicos, poseen actividades fisiológicas muy relevantes.

Las plantas del orden *Brassicaceas* y de la familia *Crucifera* *Brassicaceae* comprenden alrededor de 350 géneros y más de 2000 especies, entre ellas se

incluyen algunas plantas de interés comercial como la col (repollo), coliflor, coles de Bruselas y brócoli. Una característica de las plantas crucíferas es la síntesis de compuestos ricos en azufre, como los glucosinolatos. Estos vegetales y algunas plantas comestibles del orden *Caparrales* son la fuente de todos los glucosinolatos de la dieta humana. Se han identificado más de 100 compuestos diferentes, los cuales se encuentran distribuidos en toda la planta, aunque su concentración depende del tipo de tejido. Los glucosinolatos se clasifican como S-glucósidos, ya que son el resultado del enlace de un azúcar reductor y el azufre de una molécula que no tiene carácter de hidrato de carbono (conocida como aglucona), estos compuestos son no volátiles y carecen de fragancia. Los glucosinolatos se sintetizan y almacenan en las plantas como precursores relativamente estables de los isotiocianatos.

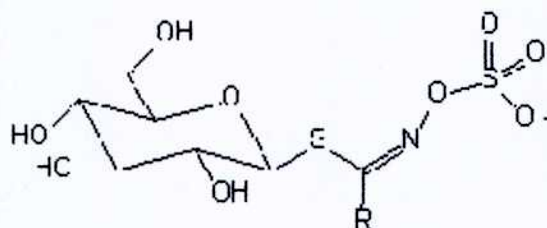


Figura 1.10. Estructura de los glucosinolatos. R es el residuo aglicona (grupo que no forma parte del azúcar).

Los glucosinolatos son inocuos para las plantas, pero éstas se encuentran amenazadas por algún estrés (si son devoradas o digeridas por un rumiante por ejemplo), enzimas como la mirosinasa (que se encuentra separada físicamente de los glucosinolatos) entra en contacto con estos compuestos, generando glucosa, ácido sulfúrico y compuestos volátiles como isotiocianatos que irritan las mucosas (Figura 1.11) y que además tienen efectos antitiroideos.

Los glucosinolatos son solubles en agua debido a que la molécula de glucosa imparte características hidrofílicas a diferencia de los isotiocianatos que presentan propiedades hidrofóbicas (Moreno y col, 2006).

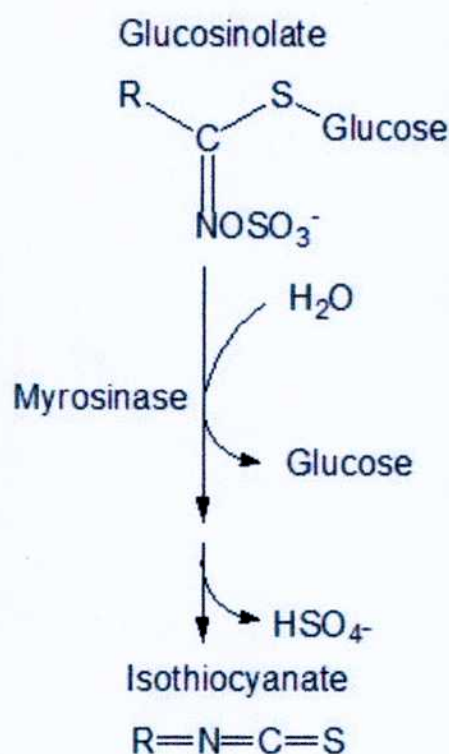


Figura 1.11 Reacción de hidrólisis de los glucosinolatos y estructura general de los isotiocianatos

En las especies del género *Allium*, entre las que se encuentran las cebollas, han sido caracterizados compuestos volátiles azufrados incluyendo grupos tioles (Griffiths y col., 2002; Negishi y col., 2002).

Por tanto, se ha postulado que estos compuestos organoazufrados de bajo peso molecular presentes en la cebolla o el ajo podrían tener efecto sobre la inhibición de la actividad de la PFO (Kim y col., 2005). En particular, el bulbo de cebolla (*Allium cepa*) posee cepaenos, principalmente sulfóxido de S-(1-propenil)-L-cisteína (que es isómero de la aliína, propia del ajo). Al cortar la

cebolla se produce este compuesto, según la reacción que se esquematiza en la Figura 1.12 (Fennema, 1996).

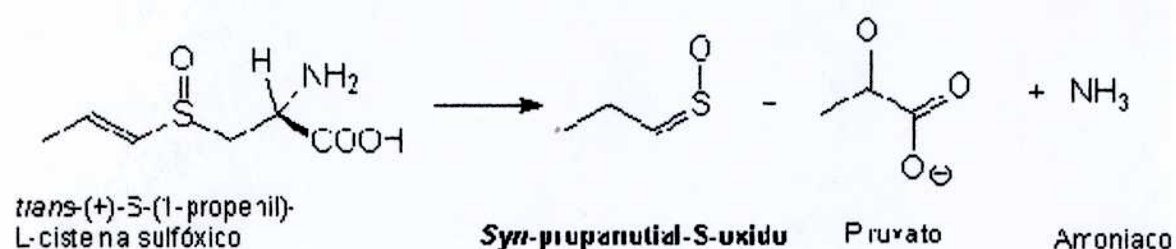


Figura 1.12. Esquema de la generación de piruvato, amoníaco y *syn*-propanotial-S-óxido, compuesto lacrimógeno, por acción de la enzima alinasa, a partir del precursor *trans*-(+)-S-(1-propenil)-L-cisteina sulfóxido en cebolla (inodoro). Esta reacción ocurre al cortar la cebolla.

Existen una cantidad de compuestos con capacidad potencial de reducir el pardeamiento enzimático y/o con actividad de oxidorreducción (Eissa y col., 2006), y así podrían emplearse para el desarrollo de ingredientes naturales en los alimentos para la prevención del pardeamiento causado por PFO (Kim y col., 2005). Por otra parte, se ha demostrado que el agua resultante del procesamiento de algunos vegetales de los mencionados, puede ser usada como un agente antipardeamiento dado que no presenta toxicidad ni efectos secundarios adversos conocidos. Existen además numerosos estudios sobre la efectividad de un incremento de la temperatura en extractos de cebolla sobre la inhibición de la actividad de PFO en pera y patata entre otros (Ding y col., 2002; Kim y col., 2005). Así mismo, se ha postulado que existe un efecto sinérgico entre los compuestos de Maillard formados durante el calentamiento y

los compuestos azufrados de la cebolla responsable de la inhibición de la PFO (Billaud y col., 2004; Kim y col., 2005).

Se ha observado que los subproductos y las aguas provenientes de la cocción de vegetales de la familia *Brassicaceae* (brócoli, repollo) o *Alliaceae* (cebolla, ajo) tienen propiedades inhibitorias de tirosinasa (una PFO), además de ser fuentes efectivas de antioxidantes fenólicos (Balasundram y col., 2006; Peschel y col., 2006; Zocca y col., 2010). El mecanismo de acción para inhibición de PFO no ha sido determinado aún, pero podría ser de interés para industrias farmacéuticas, cosméticas o de alimentos (Zocca y col., 2010). En adición a lo anterior, el uso de inhibidores de tirosina han empezado a tener importancia para productos médicos y cosméticos, los cuales pueden ser usados para la prevención o tratamiento de desórdenes de pigmentación (Kim y Uyama, 2005).

Debido al impacto del pardeamiento causado por la PFO en la industria de alimentos y su gran importancia en melanogénesis, las investigaciones sobre compuestos potencialmente inhibidores continúa (Kim y col., 2005).

De igual manera, (aunque menos estudiado) los compuestos azufrados de las especies mencionadas podrían tener impacto sobre la inhibición de la reacción de Maillard.

En las tablas 1.3 y 1.4 se presentan algunos de los compuestos azufrados de *Allinaceae* y *Brassicaceae* respectivamente. Estos compuestos son responsables además de los aromas característicos, efectos antioxidantes y otros relacionados con la prevención de enfermedades, inclusive cáncer (Tian y col., 2004).

Tabla 1.3 Algunos de los principales componentes azufrados de las plantas de la familia *Allinaceae* (Jones y col., 2004).

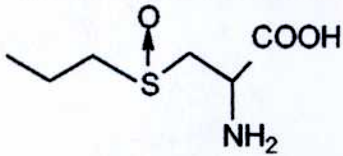
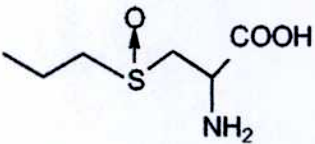
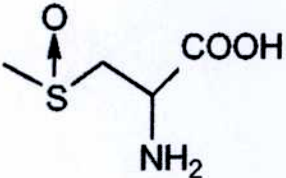
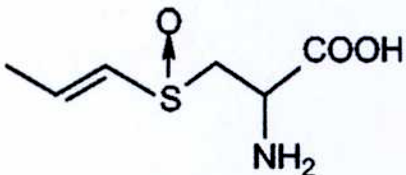
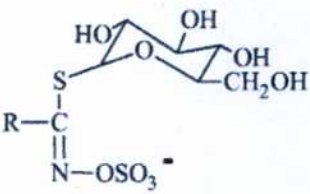
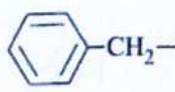
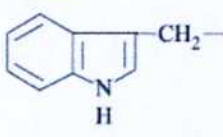
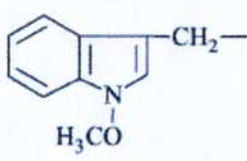
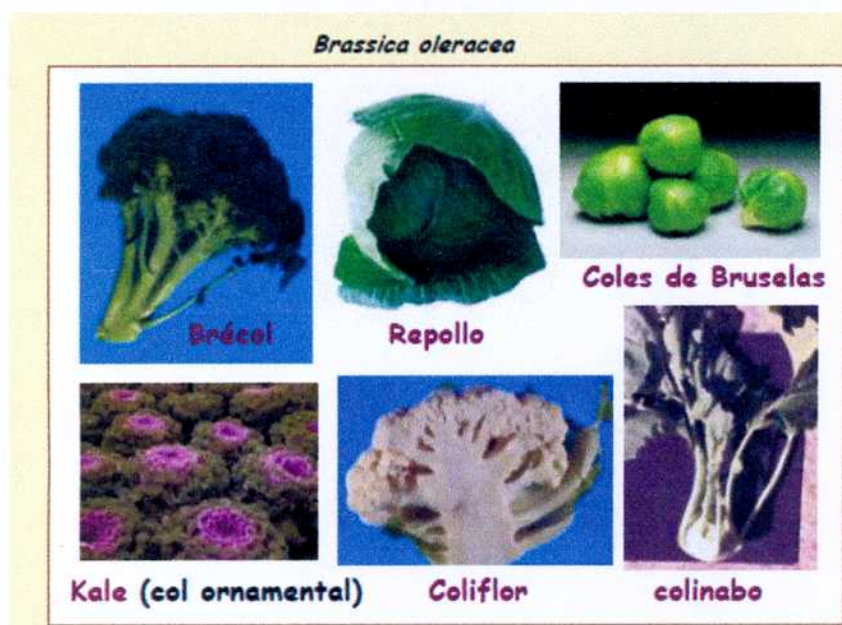
Fórmula	Nombre	Nombre alternativo	Fuente
	S-propyl cysteine sulfoxide	Propiin	Cebolla
	Sulfóxido de <i>trans</i> -S-1-propenil cisteína (PeCSO)	Isoaliina	Cebolla
	Sulfóxido de S-metil cisteína (MCSO)	Metiina	Brasicáceas, <i>Allium</i>
	Sulfóxido de S-alil cisteína (ACSO)	S-2-propenyl cysteine sulfoxide, Alliin	Ajo



Tabla 1.4 Algunos de los principales componentes azufrados de las plantas de la familia *Brassicaceae* (Tian y col., 2005).

Estructura básica	R	Compuesto y nombre Alternativo
	$H_2C=CH-CH_2-$	2 propenilglucosinolato (sinigrina)
	$H_2C=CH-\underset{\substack{ \\ OH}}{CH}-CH_2-$	2-Hidroxibut-3-enil glucosinolato (progoitrina)
	$H_3C-S-(CH_2)_4-$	4-Metiltiobutil glucosinolato (glucoerucina)
		Benzil glucosinolato (glucotropaeolina)
		Indol-3-ylmethyl glucosinolato (glucobrassicina)
		1-Metoxi-indol-3-ilmetil glucosinolato (neoglucobrassicina)



2. Objetivos

2.1 OBJETIVO GENERAL:

Analizar la efectividad de componentes naturales para su aplicación en reemplazo de aditivos sintéticos. Específicamente se analizará la capacidad antioxidante e inhibidora del pardeo enzimático de extractos vegetales.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Investigar la capacidad de extractos vegetales seleccionados para inhibir el pardeamiento enzimático.

Investigar la capacidad de los extractos vegetales analizados para inhibir la formación de intermediarios y pigmentos de la reacción de Maillard.

3. Materiales y Métodos

3.1 MATERIALES

3.1.1 Obtención de un extracto purificado con acción de polifenoloxidasa

La enzima utilizada en este trabajo para estudiar su inhibición fue la polifenoloxidasa (PFO) extraída de manzana, dicha PFO ha sido la más estudiada de todas las existentes en la naturaleza, el interés de su estudio está basado en la diversidad de productos comerciales alrededor del mundo que tienen a la manzana como materia prima (Oms-Oliu y col., 2010; García-Molina y col., 2007; Billaud y col., 2003; Luo y col., 1997; Goupy y col., 1995; Janovitz-Klapp y col., 1990).

3.1.2 Selección de los extractos vegetales con potencial acción inhibitoria

Con el objetivo de analizar el efecto inhibidor de reacciones de pardeamiento enzimático y no enzimático se eligió trabajar con extractos acuosos vegetales de cebolla, coliflor y repollo. Los vegetales empleados se eligieron como ejemplos de sistemas ricos en compuestos azufrados, conteniendo glucosinolatos, en el caso de repollo y coliflor y compuestos organosulfurados tales como sulfóxidos de metilcisteína y de propenilcisteína, encontrados en la cebolla. Previas investigaciones indicaron que además del sulfito, la cisteína y otros compuestos azufrados tuvieron capacidad inhibitoria del pardeamiento en alimentos (Mayer, 2006; Tian y col., 2005; Fahey y col., 2001; Rosa y Heaney, 1993; Kim y Uyama, 2005).

3.1.3 Preparación de discos de manzana para evaluación de la inhibición del pardeamiento enzimático

Se emplearon manzanas verdes (Variedad *Granny Smith*). Las manzanas empleadas se obtuvieron en el mercado local y se almacenaron a 4°C hasta el momento de su procesamiento. Las frutas utilizadas fueron seleccionadas, descartando aquellas que presentaron golpes o defectos en la superficie. Como paso inicial para la preparación de las rodajas de manzana las frutas fueron lavadas y cortadas en rodajas de 0,5 cm de espesor aproximadamente, luego, empleando un sacabocado se cortaron cilindros de 2 cm de diámetro.

3.1.4 Preparación de la solución para el desarrollo de la reacción de Maillard

Las solución para generar pardeamiento no enzimático a través de la reacción de Maillard se preparó mezclando iguales cantidades de una solución glucosa (p.a., Merck) al 10% (m/m) con una solución de glicina (p.a., Merck) al 0,5% (m/m). Ambas soluciones fueron preparadas previamente en *buffer* fosfato 0,2M de pH 6,0

3.1.5 Preparación de discos de manzana para evaluación de la inhibición del pardeamiento no enzimático

Además del estudio de inhibición de pardeamiento no enzimático en soluciones que contenían los reactivos para la solución de Maillard, se evaluó la inhibición de pardeamiento no enzimático en rodajas de manzana liofilizadas previamente escaldadas, y tratadas térmicamente a 70°C.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Estudios de inhibición del pardeamiento enzimático

En este trabajo se empleó tejido de manzana para el análisis de los diversos tipos de pardeamiento:

- a) Como fuente de actividad polifenoloxidasa. Con la obtención de un extracto líquido crudo con actividad de polifenoloxidasa.
- b) Como fuente de enzima PFO y sustratos: el tejido de manzana contiene compuestos polifenólicos como el ácido clorogénico, catecol, taninos y sorbital. Por ello, se emplearon rodajas de manzana para evaluar la capacidad inhibitoria de los extractos vegetales directamente sobre el tejido liofilizado.

3.2.1.1 Preparación del extracto enzimático de polifenoloxidasa

Para la preparación del extracto enzimático, se emplearon manzanas verdes (Variedad *Granny Smith*). Las frutas utilizadas fueron seleccionadas de igual forma a la descrita en la sección 3.1.3. La extracción de la PFO se llevó a cabo a 4°C, partiendo de manzana fresca, las cuales fueron lavadas, peladas y cortadas rápidamente, posteriormente 150 gramos de fruta fueron macerados en 150 mL de *buffer* fosfato 0,2M pH 6,0 con el agregado de 1% de polivinilpolipirrolidona (PVPP) empleando una procesadora de alimentos HR 1372 de 700 watt (Philips Electronics, Eslovenia) hasta su homogeneización en baño de hielo. Luego, la mezcla fue centrifugada a 4°C por 30 minutos a 15000 RPM. Para ello se utilizó una centrífuga Sorvall RC5C (Sorvall instrument, DuPont Estados Unidos). El sobrenadante fue filtrado empleando

3. Materiales y Métodos

papel de filtro con un tamaño de poro de 90mm recibiendo el filtrado en baño de hielo.

Para poder disponer de la enzima en ensayos posteriores, el extracto enzimático crudo obtenido fue fraccionado en alícuotas de 2 mL en viales. Las muestras destinadas a liofilizar para su conservación fueron congeladas durante 24 horas en un freezer convencional (-25°C) y por inmersión en nitrógeno líquido (-196°C) inmediatamente antes de ser colocadas en el liofilizador por 48 horas, posteriormente los viales fueron sellados, precintados y almacenados en un freezer convencional (-25°C) para conservarlo hasta su utilización. Este procedimiento se realizó en un liofilizador ALPHA 1-4 LD2 (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GMBH Alemania), el cual opera a una temperatura de placa condensadora de -55°C y una presión de 0,04 mbar (Figura 3.1).

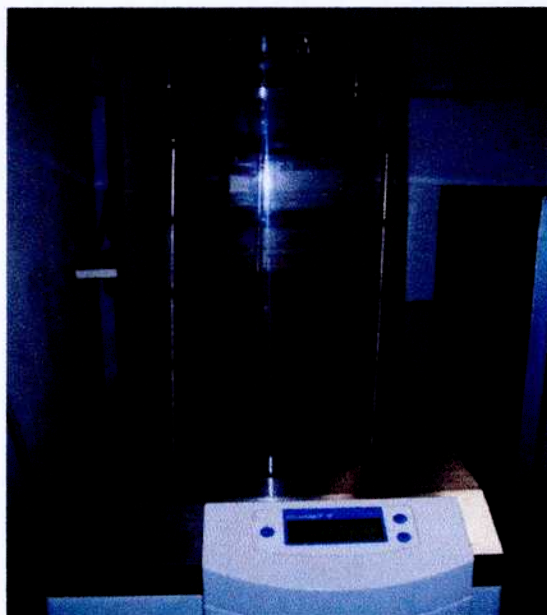


Figura 3.1 Fotografía del equipo Liofilizador ALPHA 1-4 LD2.

3.2.1.2 Caracterización del extracto enzimático

- a. **pH óptimo:** La actividad enzimática de PFO de manzana, fue evaluada en función del pH. Para ello se prepararon soluciones *buffer* de citrato de sodio para obtener valores de pH 4,0 y 5,0 y de fosfato de sodio para obtener valores de pH 6,0 y 7,0. Todos los sistemas *buffer* se emplearon en diversas concentraciones entre 0,05 y 0,5M. Las mediciones se realizaron por triplicado y los resultados se presentaron como el promedio $\pm$ el desvío estándar.
- b. **Temperatura óptima:** Se determinó la actividad de enzimática de la PFO a diferentes temperaturas entre 10 y 70°C a intervalos de 10°C, para establecer la temperatura óptima de actividad. Las mediciones se realizaron por triplicado y los resultados se presentaron como el promedio $\pm$ el desvío estándar.
- c. **Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática:** Se emplearon soluciones de catecol de concentraciones entre 30 y 140mM. Las soluciones de sustrato se prepararon en *buffer* fosfato 0,2M de pH 6,0 y se almacenaron en viales color caramelo en baño de hielo durante su utilización. Para evaluar el pardeamiento resultante de la acción de la PFO se midió la absorbancia a 420 nm a temperatura controlada de

una mezcla de 950 μL de *buffer*, 50 μL de extracto enzimático y 500 μL de la solución sustrato.

3.2.1.3 Ensayo estándar para evaluar la actividad enzimática y su inhibición

Luego de realizar la caracterización enzimática, el ensayo estándar para evaluar la actividad enzimática de la PFO consistió en mezclar 950 μL de *buffer* fosfato 0,2M de pH 6,0 con 50 μL de la solución enzimática y 500 μL de catecol 50mM para un volumen final en cubeta de 1,5 mL y medir la absorbancia de la mezcla a 420 nm durante 600 segundos, a una temperatura constante de 30°C. Para evaluar la inhibición de la actividad enzimática causada por los extractos se mezclaron 450 μL de *buffer* fosfato 0,2M de pH 6,0 más 500 μL de la solución conteniendo los extractos con actividad inhibitoria con 50 μL de la solución enzimática y 500 μL de catecol 50mM para un volumen final en cubeta de 1,5 mL. Se utilizó un espectrofotómetro UV/Vis con control de temperatura Jasco V630 (Jasco Corporation Japón). Para evaluar el efecto inhibitorio de los extractos de cebolla, coliflor y repollo se prepararon dos diluciones en *buffer* fosfato 0,2M de pH 6,0. La primera, llamada solución de “alta concentración” se preparó diluyendo 2,0 g de cada uno de los extractos liofilizados en 100 mL de *buffer* y la segunda, llamada solución de “baja concentración” se preparó diluyendo 0,2 g de cada uno de los extractos liofilizados en 100 mL de *buffer* anteriormente mencionado.

3.2.1.4 Preparación de los extractos con potencial acción inhibitoria del pardeamiento

Se prepararon extractos acuosos de cebolla, coliflor y repollo para estudiar su capacidad de inhibir las reacciones de pardeamiento enzimático, para ello se partió de 30 gramos de cada vegetal y 60 mL de *buffer* fosfato 0,2M, de pH 6,0 mezclados hasta su homogeneización. La mezcla fue tratada térmicamente por 1 hora a 50°C para mejorar el proceso de extracción. Para inhibir cualquier actividad enzimática de los extractos, fueron autoclavados durante 5 minutos a 121°C. Posteriormente los extractos fueron centrifugados a 4°C en el equipo antes descrito a 11000 RPM por 30 minutos, y filtrados en papel de filtro con un tamaño de poro de 90mm. Para poder disponer de los extractos durante la ejecución de los experimentos de la tesis, se procedió a liofilizarlos para su conservación. Para generar una matriz fácilmente manejable, se decidió incorporar una maltodextrina (DE15 Marca Corn products Brasil) al sobrenadante, en una proporción 20% (m/vol), empleando un agitador magnético hasta su total disolución. Finalmente la mezcla fue fraccionada y liofilizada por 48 horas. Para el seguimiento de las reacciones de pardeamiento los extractos vegetales potencialmente inhibidores se resuspendieron en diversas proporciones, logrando porcentajes de sólidos de 2, 5, 10, 20 y 33% con la finalidad de encontrar la mínima concentración inhibitoria de la reacción.

3.2.1.5 Evaluación de la inhibición de PFO en rodajas de manzana mediante análisis de imagen

Además de evaluar la inhibición de la PFO extraída de manzana, se realizaron estudios de inhibición del pardeamiento enzimático directamente sobre rodajas de manzanas crudas.

La evaluación de inhibición del pardeamiento enzimático se realizó a través de análisis de imágenes de dos maneras:

- a. Sobre muestras liofilizadas y posteriormente embebidas en extractos inhibitorios:* las rodajas fueron rápidamente congelados con nitrógeno líquido (-196°C) y almacenados a -20°C hasta el momento de su tratamiento. Posteriormente el material se sometió a un proceso de liofilización por 48 horas, de manera similar al descrito en la sección 3.2.1.1. Luego de su liofilización las muestras se embebieron en una solución de extracto vegetal al 5%, y dispuestos en placas de vidrio de 15 cm de largo, 10 cm de ancho y 0,5 cm de alto, dentro de aros de goma de 2 cm de diámetro interno (**Figura 3.2**).
- b. Sobre muestras frescas embebidas en los extractos inhibitorios y posteriormente liofilizadas:* las rodajas de manzana fresca fueron sumergidos en la soluciones de los extractos acuosos de cebolla, coliflor y repollo al 5%, y congelados rápidamente con nitrógeno líquido (-196°C). Posteriormente las muestras se liofilizaron de manera similar al descrito en la sección 3.2.1.1. Las rodajas de manzana conteniendo el

3. Materiales y Métodos

extracto y liofilizados se ubicaron en placas de vidrio similares a las descritas anteriormente. Luego se almacenaron en desecadores de vacío, a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ por un período de 14 días a diversas actividades de agua empleando soluciones saturadas de las siguientes sales: cloruro de litio, carbonato de potasio, cloruro de potasio y nitrato de potasio, logrando actividades de agua de 0,11, 0,43, 0,84 y 0,93 respectivamente (Greenspan, 1977).

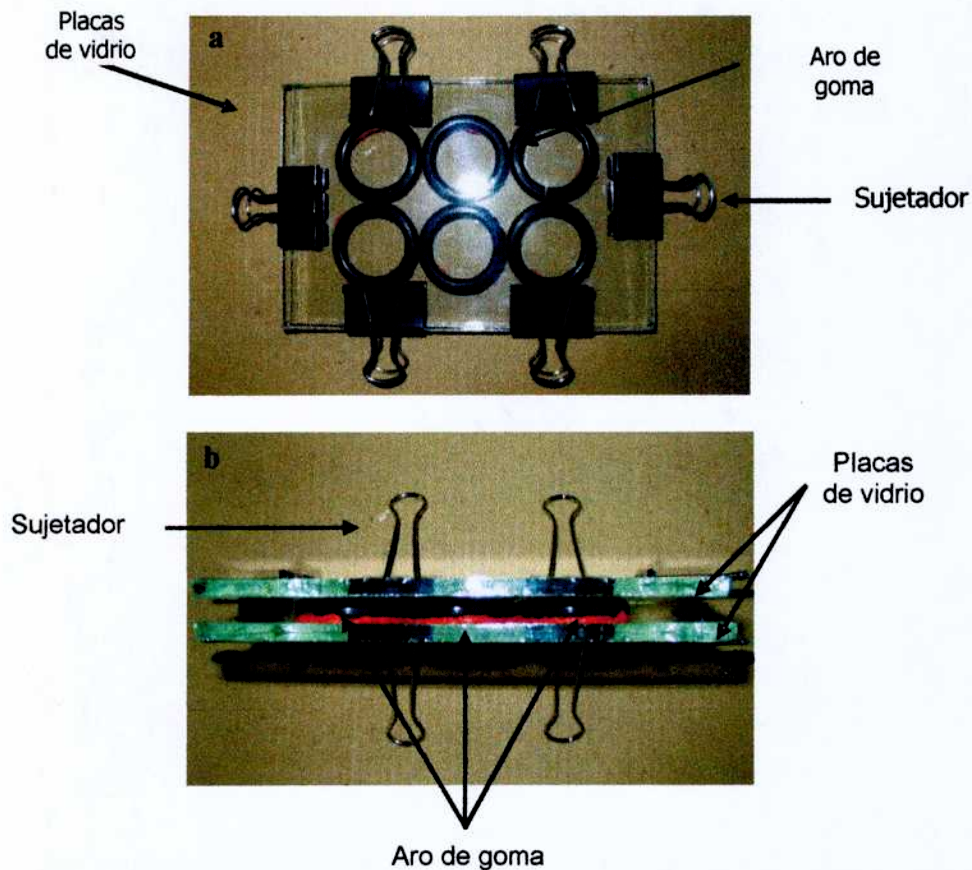


Figura 3.2 Fotografía de los dispositivos para el tratamiento térmico de los sistemas, vista superior (a) y vista lateral (b).

3.2.1.6 Medición del grado de pardeamiento

La determinación de pardeamiento de las muestras se realizó a través de la toma de imágenes usando un sistema de visión computarizada (Figura 3.3). Este sistema consta de una caja color gris estándar (N7 en escala Munsell) de dimensiones internas de 48 cm de ancho, 62 cm de largo y 48 cm de alto. El interior de la caja cuenta con un sistema patrón de iluminación (iluminante D₆₅) ubicado en la parte superior de la misma, y una cámara digital de alta resolución (EOS 40D Canon, USA) ubicada de manera de formar un ángulo de 45° con el plano de la muestra a una distancia de lente de 60 cm. Se fijaron los siguientes parámetros: velocidad de obturación 1/5.6 segundos (sin *zoom*, ni *flash*), modo macro enfocado, apertura de $f=10$ y sensibilidad ISO 100. Las imágenes fueron obtenidas con una resolución de 3888 x 2592 píxeles, y guardadas en formato JPEG. El sistema de adquisición de imágenes se encuentra conectado a una computadora el cual emplea un programa de captura remota de imágenes (EOS Utility, Canon Inc., USA).

Se tomaron imágenes de las muestras sobre fondo blanco (Agudelo Laverde y col., 2011). Las fotografías fueron analizadas en el espacio de color Lab usando el programa Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA) y los datos obtenidos fueron convertidos al espacio CIELAB (1974) (L^* , a^* y b^*) a través de fórmulas matemáticas descritas por Papadakis (2000).



Figura 3.3 Sistema de visión computarizada para la adquisición de imágenes.

Para evaluar las reacciones de pardeamiento enzimático en las rodajas de manzana embebidos en los diferentes extractos se utilizaron las funciones L^* , a^* y b^* .

3.2.2 Pardeamiento no enzimático

3.2.2.1 Manzana como fuente de PFO, de polifenoles y como medio de pardeo no enzimático

En este trabajo se empleó tejido de manzana para el análisis del pardemiento no enzimático:

- a) Como medio para estudiar la reacción de Maillard las rodajas de manzana previamente escaldadas se sometieron a tratamiento térmico para evaluar el efecto inhibitorio de los extractos vegetales obtenidos sobre el pardeamiento no enzimático.

3.2.2.2 Extractos inhibitorios

Los extractos para estudiar la capacidad de inhibir las reacciones de pardeamiento no enzimático fueron los mismos que los descritos en la sección 3.2.1.4. Para el estudio del pardeamiento no enzimático se resuspendieron 2 gramos de extracto inhibidor liofilizado en 100 mL de la solución de glucosa y glicina descrita anteriormente para el desarrollo de la reacción de Maillard. Se prepararon además controles sin agregado de extracto inhibidor y otros con el extracto en *buffer* sin la solución de reactivos de Maillard.

3.2.2.3 Tratamiento térmico

Se distribuyeron alícuotas de 3 mL de las suspensiones descritas en la sección anterior en viales que se sellaron herméticamente y se almacenaron en una estufa Fisher Isotemp Incubator (300 Series Model 350D, Fisher Scientific) de circulación de aire forzada, a $50 \pm 1^\circ\text{C}$. A determinados intervalos de tiempo se retiraron muestras de la estufa para realizar las distintas determinaciones.

3.2.2.4 Medición del grado de pardeamiento

El desarrollo de pardeamiento no enzimático fue determinado por método espectrofotométrico en el equipo descrito previamente, por la medición directa de la mezcla una longitud de onda 420 nm.

3.2.2.5 Determinación de fluorescencia

La reacción de Maillard genera intermediarios y productos fluorescentes, cuya longitud de onda de excitación es de 340 nm, y emiten a 450 nm (Matiacevich y Buera, 2006). Previo a la medición de fluorescencia los extractos se diluyeron con *buffer* fosfato 0,2M a pH 6,0 en forma tal que la absorbancia fuera menor que 0,1 a la longitud de onda (λ) de excitación utilizada (340 nm). Esto es para evitar el efecto de filtro interno, ya que algunos pigmentos absorben a la λ de excitación de los compuestos fluorescentes (Skoog y col, 2008).

Las mediciones de los espectros de emisión de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorímetro Ocean Optics con filtro de banda a 340 nm (Edmund) como filtro de excitación, y fibras ópticas de reflectancia (R400-7-VIS/NIR, Ocean Optics). Las mediciones se realizaron en celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Para cuantificar los compuestos fluorescentes se los expresó en equivalentes de quinina.

El sulfato de quinina disuelto en medio H_2SO_4 0,1 N (P. A. Merck) presenta un máximo de emisión a 540 nm cuando se lo irradia entre 280 y 380 nm (Matiacevich, 2008). En la Figura 3.4 se muestra la curva de calibración obtenida.

La intensidad máxima obtenida del espectro de emisión fue calculada aplicando la ecuación 1 (Matiacevich y Buera, 2006).

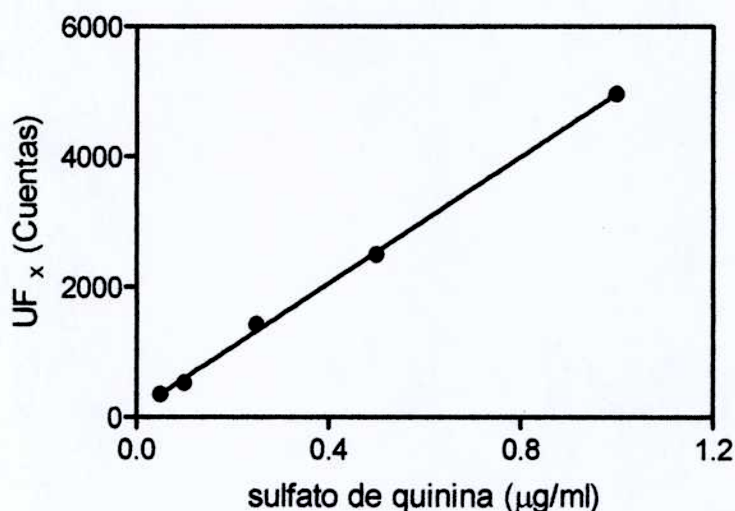


Figura 3.4 Curva de calibración para la cuantificación de fluorescencia como concentración de quinona. El estándar de quinona se preparó en H₂SO₄ 0,1N y se realizaron diluciones adecuadas para obtener intensidades de fluorescencia en el mismo rango de las muestras. R²:0,9999

$$UF = \frac{UF_x \cdot f \cdot d - b}{m \cdot g} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

UF: es la intensidad de fluorescencia medida en µg de quinina/gMS,

UF_x: es la medida de intensidad de fluorescencia obtenida para cada fracción soluble, corregida por el factor de sensibilidad del instrumento a la λ de medición,

d: es el factor de dilución,

b: es ordenada al origen de la curva de calibración realizada con sulfato de quinina,

m: es la pendiente de dicha la curva de calibración,

v: es el volumen de extracción

g: es la masa seca de la muestra utilizada en la extracción.

3.2.2.6 Estudio de la inhibición del pardeamiento no enzimático en discos de manzana a través de análisis de imágenes.

Para los estudios de pardeamiento no enzimático las rodajas de manzana preparadas según se describió en la sección 3.1.3 y posteriormente se escaldaron en vapor de agua a 90°C por 90 minutos. Luego de la inactivación enzimática por escaldado, las rodajas se embebieron en soluciones de los diferentes extractos vegetales al 5% y ubicados en las placas de vidrio (**Figura 3.2**). Como muestras control se emplearon rodajas escaldados embebidos en agua.

Se realizó un tratamiento térmico de las placas conteniendo las rodajas de manzana a 70°C, y se obtuvieron muestras a distintos intervalos de tiempo. El estudio de cambio de color en las rodajas se realizó por análisis de imágenes según lo descripto en la sección 3.2.1.6.

3.2.2.7 Evaluación de las constantes cinéticas de pardeamiento

En este trabajo se emplearon diversas ecuaciones para calcular las velocidades de pardeamiento en función del tiempo para todos los sistemas analizados como se describe a continuación.

a) Pardeamiento enzimático en sistemas líquidos

$$A = A_{M\acute{a}x} * (1 - \exp^{-K*t}) \quad \text{Ecuación 2}$$

- Donde $A_{M\acute{a}x}$ corresponde al valor de la absorbancia de saturación (a 420 nm)
- K es la constante cinética del ajuste y t el tiempo.

b) Pardeamiento enzimático en rodajas de manzana

$$L = (L_0 - Plateau) * \exp^{(-K*t)} + Plateau \quad \text{Ecuación 3}$$

- Donde L_0 corresponde al valor de la luminosidad al tiempo cero
- K es la constante cinética del ajuste y t el tiempo.

c) Pardeamiento no enzimático en sistemas líquidos

$$A = A_0 * \exp^{(k*t)} \quad \text{Ecuación 4}$$

- Donde A_0 corresponde al valor de la absorbancia a tiempo cero (a 420 nm)
- K es la constante cinética del ajuste y t el tiempo.

El modelado de los datos experimentales y las regresiones presentadas en este trabajo se realizaron mediante el empleo del programa GraphPad Prism V 5,03.

4. Resultados y Discusión

4.1 PARDEAMIENTO ENZIMÁTICO

4.1.1 Inhibición de la actividad polifenoloxidasas (PFO) de un extracto crudo de manzana

4.1.1.1 Ensayo de la actividad enzimática polifenoloxidasas PFO

En este trabajo se evaluó la actividad enzimática del extracto de manzana conteniendo polifenoloxidasas. Empleando catecol como sustrato, la enzima mostró una cinética micaliana. En la figura 4.1 se representa el valor de absorbancia a 420nm, que indica el grado de pardeo debido a la acción enzimática, en función del tiempo, luego de poner en contacto el extracto enzimático con catecol.

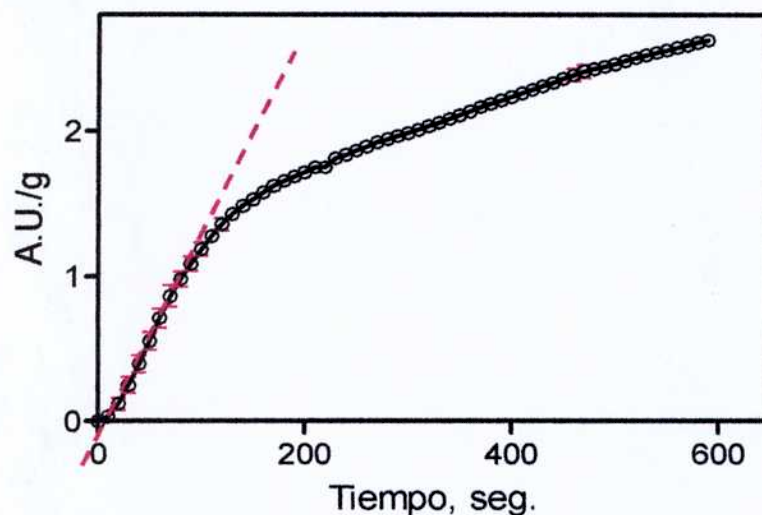


Figure. 4.1 Actividad del extracto de manzana conteniendo PFO utilizando como sustrato una solución de catecol 50mM. U.A./g: unidades de absorbancia a 420 nm por gramo de extracto de manzana.

Para obtener los valores de K_M (constante de Michaelis-Menten) y $V_{m\acute{a}x}$ (velocidad máxima) se emplearon diversas concentraciones de catecol y se calculó la velocidad inicial de la reacción para cada concentración de catecol empleada. La velocidad inicial está representada en la Fig. 4.1 como una línea punteada.

4. Resultados y Discusión

Según se observa en la Fig. 4.2, al graficar la velocidad inicial en función de la concentración de sustrato se obtiene una curva característica de la cinética de Michaelis-Menten.

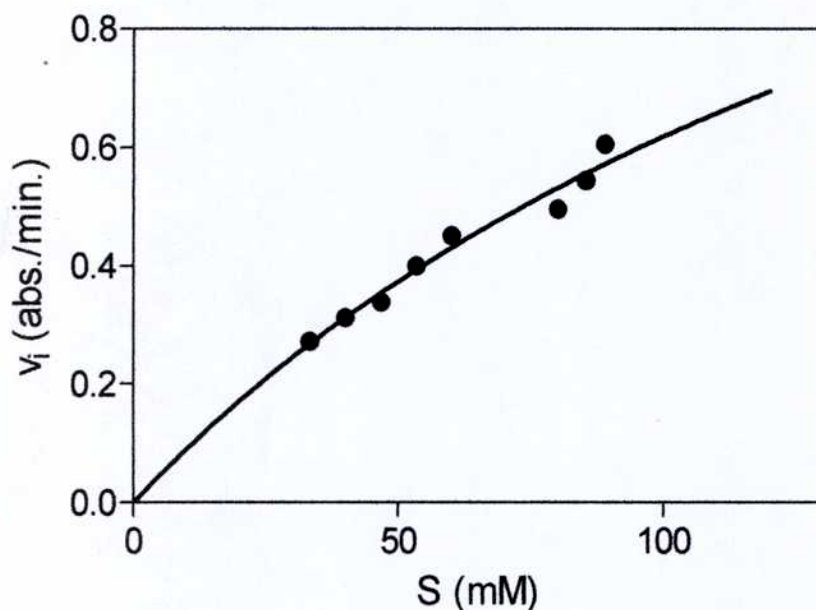


Figure 4.2. Curva de velocidad inicial (V_i) en función de la concentración de catecol (sustrato, S).

Se utilizó el modelo lineal de Lineweaver-Burk (Lineweaver y Burk, 1934), que permite obtener los parámetros cinéticos para la enzima a estudiar en la reacción con el sustrato catecol, tal como se observa en la Figura 4.3.

Se determinó que la polifenoloxidasasa (PFO) de manzana estudiada presenta valores de K_M 176,82mM y una $V_{Máx}$ 0,042 unidades de absorbancia por minuto (U.A./min) empleando catecol como sustrato.

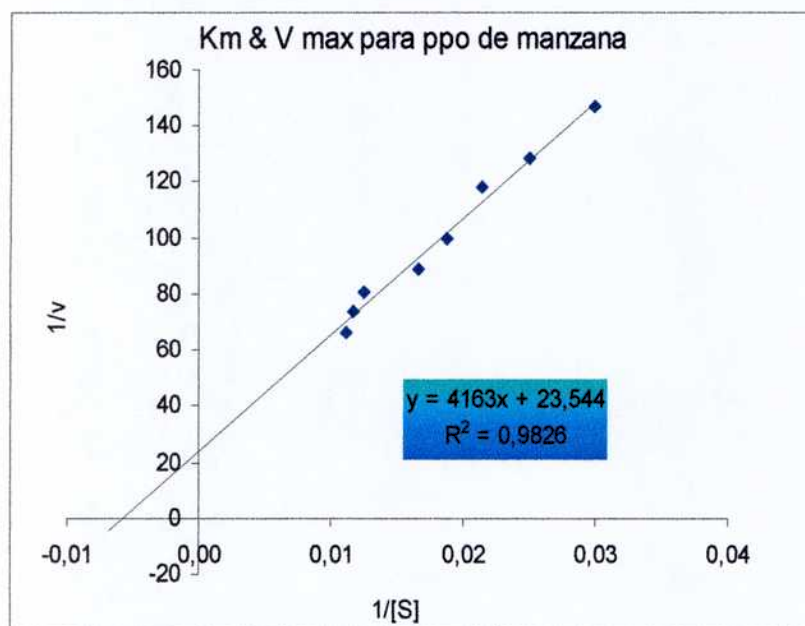


Figura 4.3. Representación doble inversas del modo lineal de Lineweaver-Burk para la actividad enzimática de la PFO de manzana.

Los valores cinéticos para el sistema polifenoloxidasas que se encuentran en bibliografía son muy variables. En la Tabla 4.1 se resumieron los datos para las constantes halladas para actividad de PFO de distintas fuentes. Las diferencias observadas pueden deberse a la diversidad de sustratos fenólicos naturales que estas enzimas encuentran en las plantas y a las distintas afinidades que presenten hacia dichos sustratos.

Tabla 4.1. Datos cinéticos de actividades de polifenoloxidasas de distintas fuentes como sustrato, con sus referencias correspondientes.

Fuente	K_M	Referencia
Frambuesa	663.9 mM	González y col. 1999
Lechuga	15 mM	Altunkaya y Gokmen, 2008
Banano	2,6 mM	Guerrero, 2009.
Menta	7,41 mM	Neves y col, 2009.
Manzana	232,80 mM	Gasull y Becerra, 2006.
Tallos de clavel	249 mM	Roquesa Higuera, 2007.

4.1.1.2 Efecto del pH sobre la actividad de PFO

En la Figura 4.4 se muestra el comportamiento de la PFO en el extracto de manzana, a diferentes valores de pH. Las curvas obtenidas indican que el pH óptimo para la máxima actividad es de 6,0. Estos datos son similares a los publicados en la literatura para esta fruta (Das y col., 1997; Weemaes y col., 1998; Kavrayan y Aydemir, 2001; Aydemir, 2004).

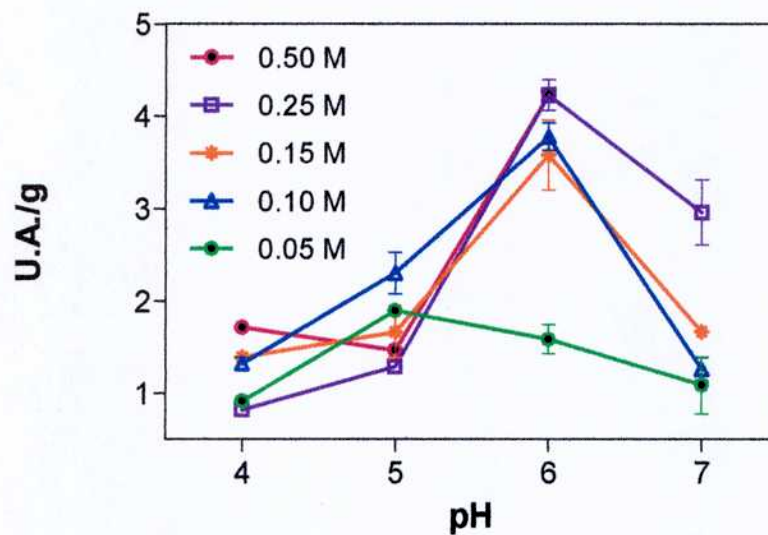


Figura 4.4 Actividad enzimática de PFO de manzana en función del pH. U.A./g: unidades de absorbancia a 420 nm por gramo de extracto de manzana.

El pH óptimo obtenido en este ensayo fue luego utilizado para la determinación de la temperatura óptima.

4.1.1.3 Efecto de la temperatura sobre la actividad de PFO

La temperatura óptima de actividad enzimática de la PFO de manzana se muestra en el Figura 4.5. En ella pueden verse los valores de absorbancia para las distintas temperaturas estudiadas.

4. Resultados y Discusión

Se puede observar que a temperaturas superiores a 60°C, se da una marcada disminución de la activación de la enzima, lo cual indica la labilidad de la misma. A 11°C la reacción no muestra el comportamiento típico, lo que puede deberse a la formación de algún componente químico que actúa disminuyendo la velocidad pero permitiendo una mayor formación de producto. La actividad enzimática fue máxima para un rango de temperaturas entre 30 y 40°C. Este intervalo de temperaturas concuerda con reportes de PFO de manzana, menta, alcaucil y otros (Das y col., 1997; Kavrayan y Aydemir, 2001; Aydemir, 2004).

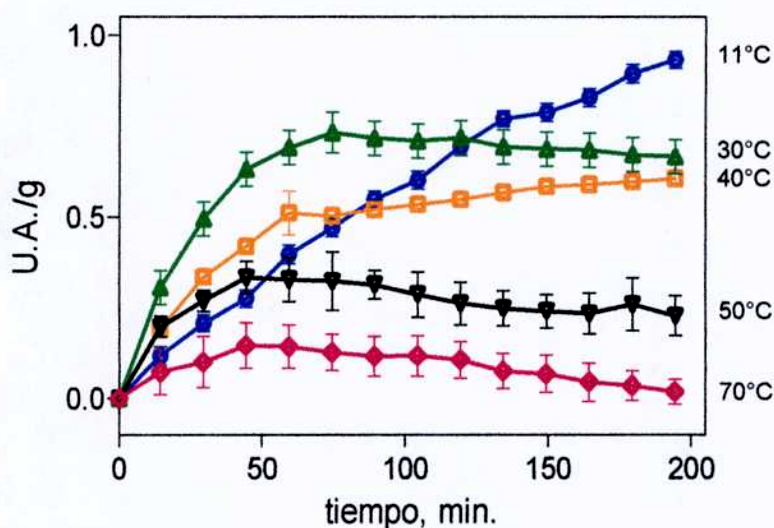


Figura 4.5. Actividad enzimática del extracto de manzana conteniendo PFO en función del tiempo a diferentes temperaturas. U.A./g: unidades de absorbancia a 420 nm por gramo de extracto de manzana.

4.1.1.4 Inhibición de la PFO de manzana por los extractos de cebolla, coliflor y repollo.

Se ha estudiado el efecto inhibitor de diferentes extractos acuosos de vegetales sobre la actividad de la PFO para la prevención del oscurecimiento enzimático del extracto de manzana. Dichos extractos fueron sometidos a un tratamiento térmico a 121°C durante 5 minutos. Este tratamiento se realizó para

inhibir la actividad PFO propia de los mismos. En la Figura 4.6 se muestran los resultados obtenidos al mezclar el extracto de repollo con el extracto de manzana conteniendo actividad PFO, en el cual puede observarse el comportamiento del mismo con tratamiento térmico y sin él. Se observa que si no se realiza el tratamiento térmico al extracto se obtiene mayor actividad enzimática y mayor formación de pigmentos pardos con respecto a la actividad del control, debido a que las enzimas con actividad polifenoloxidasas que quedaron presentes en el extracto de repollo tienen buena afinidad por el sustrato catecol.

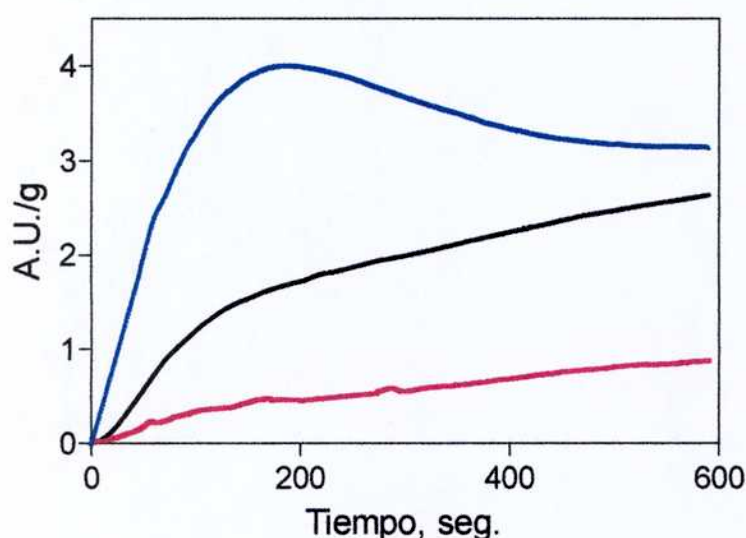
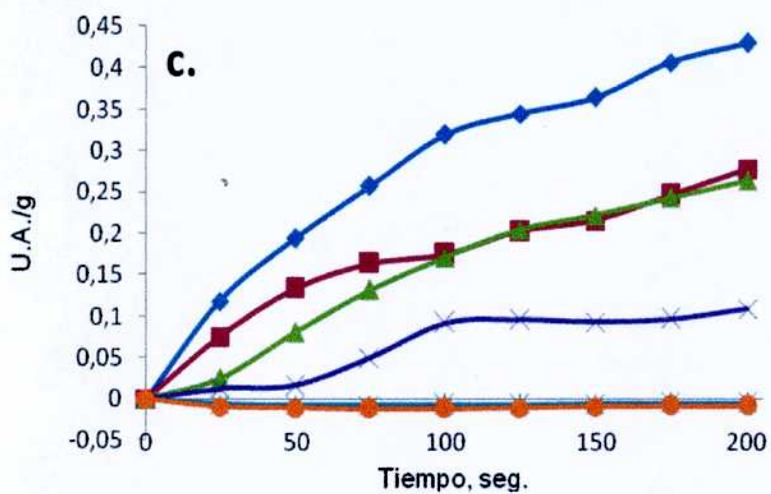
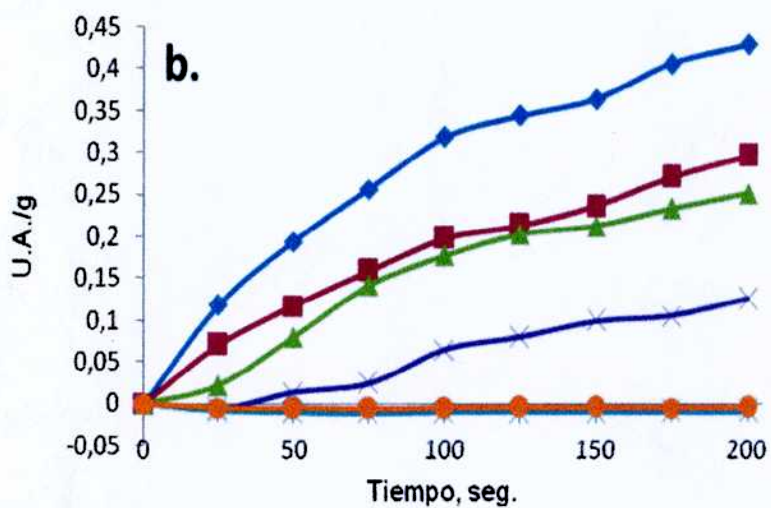
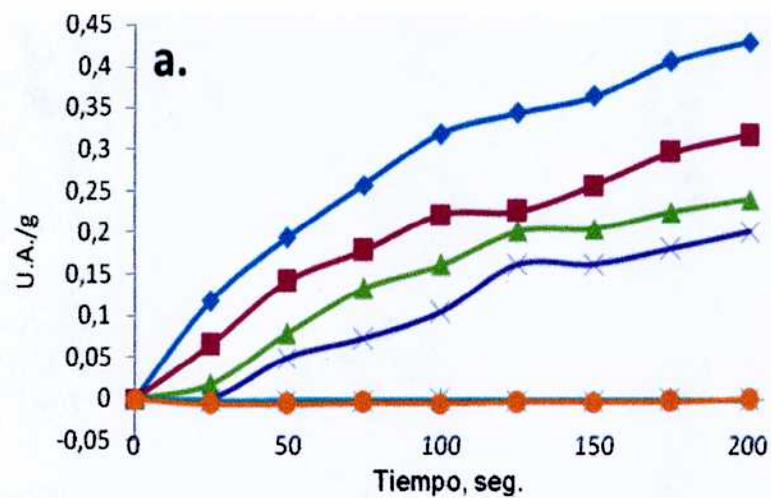


Figura 4.6. Reacción de la enzima PFO empleando como inhibidor extracto de repollo con tratamiento térmico (línea roja). Se grafican para comparación los datos para el control sin inhibidor (línea negra) y con el extracto sin tratamiento térmico (línea azul), en función del tiempo.

4.1.1.5 Efecto de la concentración de los extractos vegetales sobre la inhibición enzimática.

Se estudió el efecto de inhibición de la reacción de pardeo enzimático causado por los extractos vegetales a diferentes concentraciones. En la Figura 4.7 se observa el efecto de la concentración sobre el desarrollo de pigmentos pardos.



—◆— Control —■— 2 % —▲— 5 % —×— 10 % —*— 20 % —●— 33 %

Figura 4.7. Inhibición de extracto de manzana con actividad de polifenoloxidasas por extractos naturales de cebolla (a), coliflor (b) y repollo (c) a diferentes concentraciones en función del tiempo.

Para los sistemas con extracto de cebolla de concentración del 2% peso en volumen (p/v) a 200 segundos se observó un porcentaje de inhibición de 25,6%. Para las demás concentraciones (5% p/v y 10% p/v) el porcentaje de inhibición fue de 44,2 y 53,5% respectivamente. Para los sistemas con extracto de coliflor a los 200 segundos se determinaron porcentajes de inhibición de 30,2, 41,9 y 72,1% para las concentraciones de 2, 5 y 10% p/v respectivamente. En el caso de los extractos de repollo los porcentajes de inhibición a los 200 segundos fueron de 34,9, 39,5 y 74,4% para las respectivas concentraciones de 2, 5 y 10% p/v, respectivamente.

Es de destacar que con todos los extractos ensayados a concentraciones de 20 y 33% p/v a los 200 segundos se determinó una inhibición del 100% de la formación de compuestos pardos.

Como se había observado en los experimentos preliminares, al comparar la actividad inhibitoria de los tres extractos se puede ver claramente que a todas las concentraciones analizadas el extracto de cebolla el cual pertenece a una familia diferente (*Allinaceae*) provoca menor inhibición que los presentados por los extractos de las otras dos plantas pertenecientes a la familia de las *Brassicaceae*.

Dado que los extractos estudiados con potencial efecto inhibidor sobre el pardeamiento enzimático presentan en su composición compuestos con aromas de muy alto impacto ("fuertes"), se evaluó el efecto de la concentración de los extractos sobre la inhibición de la actividad de PFO a las más bajas concentraciones inhibitorias posibles, según el experimento previo, con el

4. Resultados y Discusión

objetivo de elegir la menor concentración efectiva y evitar el efecto dicho organoléptico.

Se prepararon dos diluciones de los extractos vegetales en *buffer* fosfato 0,2M de pH 6,0. La primera, llamada de ahora en adelante solución de “alta concentración” se preparó diluyendo 2,0 g de cada uno de los extractos liofilizados en 100 mL de *buffer* y la segunda, llamada de ahora en adelante solución de “baja concentración” se preparó diluyendo 0,2 g de cada uno de los extractos liofilizados en 100 mL de *buffer* anteriormente mencionado. En la Fig. 4.8 se observa el efecto de los extractos de cebolla (a), coliflor (b) y repollo (c) sobre el desarrollo de pardeamiento de los extractos de manzana con actividad PFO y en presencia de catecol 50mM como sustrato.

En dicha figura se puede observar que todos los extractos provocan inhibición de la PFO tanto a altas como a bajas concentraciones. Tanto para bajas como para altas concentraciones de extractos inhibidores, el extracto de coliflor es el que provoca mayor inhibición, en comparación con los extractos de cebolla y repollo.

A pesar de que tuvieron efecto inhibidor con respecto al control, los sistemas con extractos de cebolla (de la familia de *Allinaceae*) en altas concentraciones presentaron menor efecto inhibidor de la reacción de pardeamiento. Los sistemas de repollo (de la familia *Brassicaceae*), presentaron menor inhibición cuando se utilizaron en bajas concentraciones, lo cual podría atribuirse a los diferentes compuestos (seguramente azufrados) de cada una de ellas.

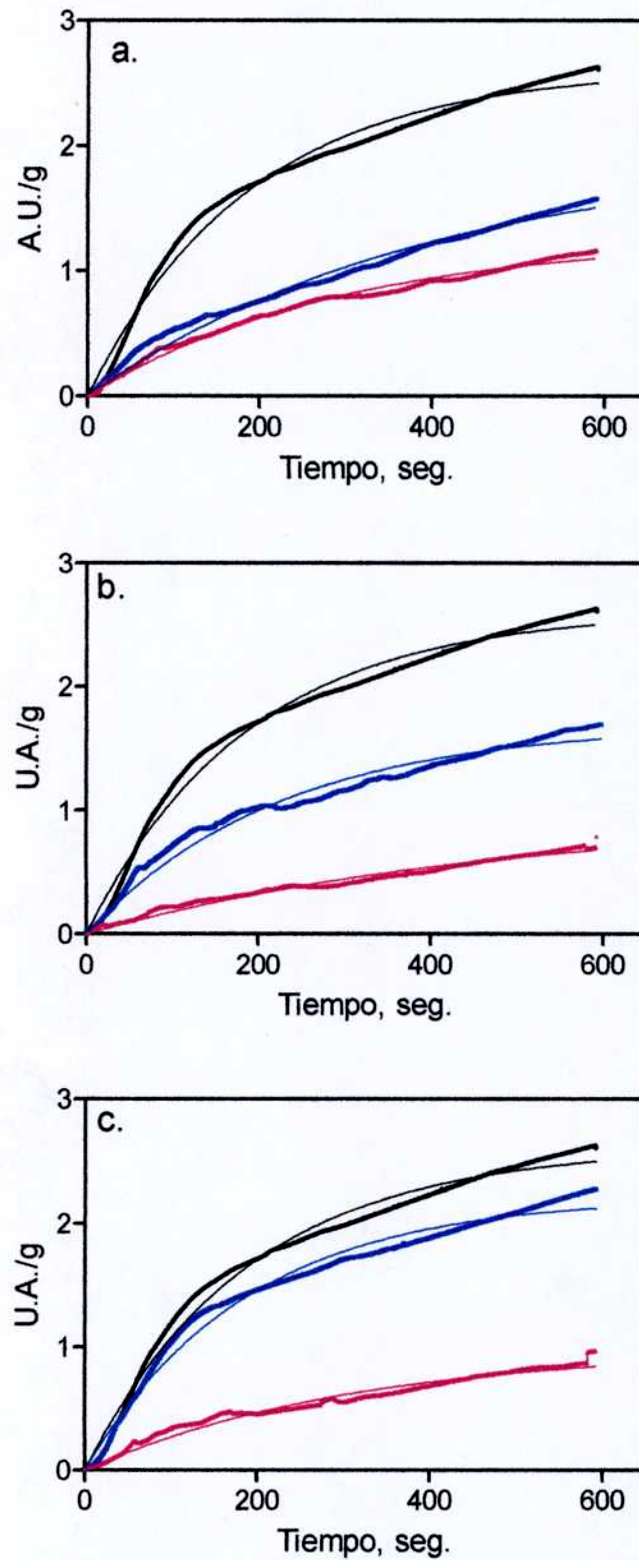


Figura 4.8. Inhibición de extracto de manzana con actividad de polifenoloxidasas por extractos naturales de cebolla (a), coliflor (b) y repollo (c), en alta (rojo) y baja (azul) concentración en función del tiempo.

4.1.1.6 Porcentaje de inhibición causada por los extractos vegetales

Se realizó el ajuste matemático de las curvas de absorbancia en función del tiempo para cada extracto. El modelo aplicado para todas las curvas fue el de asociación exponencial de una fase definido por la siguiente ecuación:

$$A = A_{M\acute{a}x} * (1 - \exp^{(-K * t)})$$

Donde $A_{M\acute{a}x}$ corresponde al valor de la absorbancia de saturación (a 420 nm), t es el tiempo de reacción y K es la constante cinética del ajuste. Los valores obtenidos del ajuste para las absorbancias máximas se muestran en la tabla 4.2 para extractos vegetales preparados a alta y a baja concentración. En la tabla 4.3 se muestran los resultados obtenidos de las constantes cinéticas para altas y bajas concentraciones.

a) Porcentaje de inhibición analizando las absorbancias máximas

Se determinó el porcentaje de inhibición causada por los extractos vegetales sobre la PFO de manzana, analizando las absorbancias máximas ($A_{M\acute{a}x}$) para cada una de las concentraciones estudiadas. Para esto se empleó la siguiente ecuación (Baurin y col., 2002):

$$\% \text{Inhibición del pardeamiento} = 100 \times \frac{A_{M\acute{a}x \text{ Control.}} - A_{M\acute{a}x \text{ Ensayo}}}{A_{M\acute{a}x \text{ Control.}}}$$

Dónde:

$A_{M\acute{a}x \text{ Control.}}$: Valor de la absorbancia de saturación para la solución en ausencia del inhibidor.

$A_{M\acute{a}x \text{ Ensayo.}}$: Valor de la absorbancia de saturación para la solución con cada extracto inhibidor.

4. Resultados y Discusión

En la tabla 4.2. Se muestran los valores de absorbancia máxima obtenidos en los ensayos de inhibición para cada uno de los extractos vegetales y los valores del porcentaje de inhibición calculados a partir de la absorbancia máxima.

Tabla 4.2 Disminución de las $A_{Máx}$ (absorbancia máxima) y porcentaje del efecto inhibitor de los extractos vegetales sobre el extracto de manzana con actividad PFO.

Extractos vegetales.	$A_{Máx}$ Control	$A_{Máx}$ de los inhibidores.	Porcentaje de inhibición.
Cebolla alta concentración	2,6± 0,3	1,3 ± 0,3	51,2± 0,2
Cebolla baja concentración		1,9 ± 0,4	25,3± 0,4
Coliflor alta concentración		0,9± 0,2	62,8± 0,3
Coliflor baja concentración		1,7 ± 0,4	35,1± 0,3
Repollo alta concentración		1,0 ± 0,3	61,9± 0,2
Repollo baja concentración		2,2 ± 0,4	15,1± 0,4

En la Figura 4.9 Se graficaron los valores de absorbancias máximas y porcentajes de inhibición para las muestras conteniendo extractos inhibidores en altas y bajas concentraciones (Fig. 4.9a) y (Fig. 4.9b) respectivamente.

Se puede observar que todos los extractos vegetales inhiben (en menor o mayor proporción) el desarrollo de absorbancia máxima ($A_{Máx}$) producida por los pigmentos pardos (figura 4.9a izq.). El extracto de coliflor es el que provoca una mayor inhibición en el valor máximo de absorbancia, con una $A_{Máx}$ de 0,9 U.A./g frente a la muestra control (que no posee ningún inhibidor). La muestra control tiene una $A_{Máx}$ de 2,6 U.A./g. El repollo tiene un comportamiento similar a la coliflor con una $A_{Máx}$ de 1,0 U.A./g. Cabe recordar que tanto el repollo como la coliflor pertenecen a plantas de la familia *Brassicaceae*.

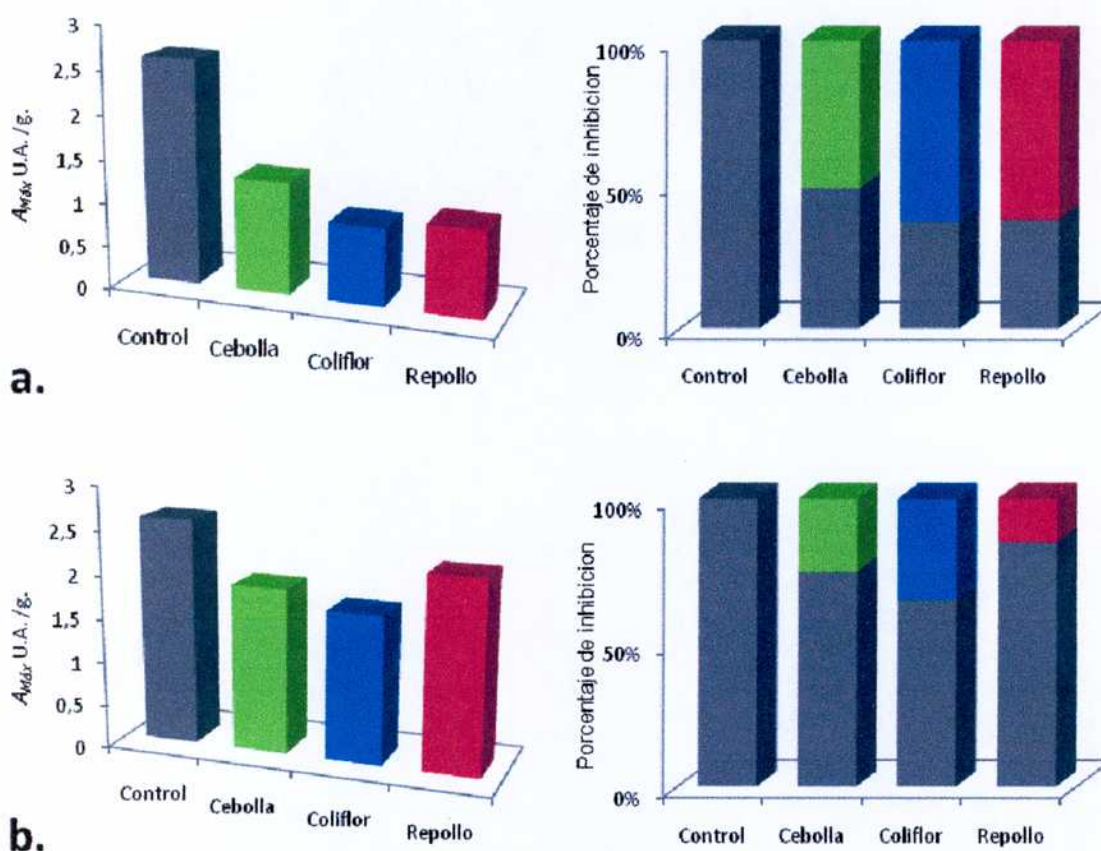


Figura 4.9. Variación de la absorbancia máxima del extracto de manzana conteniendo PFO y porcentaje de inhibición causado por cada uno de los extractos vegetales inhibidores empleados a alta (a) y a baja (b) concentración, en base a los valores de absorbancia alcanzados a 420 nm.

En la Figura 4.9a. (der.) se puede ver que las mezclas que contienen los inhibidores de la familia de las *Brassicaceae* presentan porcentajes de inhibición muy similares, con valores de 62,8% y 61,9% para coliflor y repollo respectivamente. El extracto de cebolla presenta una inhibición menor a las anteriores con un valor del 51,2%.

Cabe destacar que la inhibición lograda con los tres extractos ensayados a la máxima concentración corresponde a más del 50% con respecto al control, por lo que se considera que estos extractos son bastante efectivos.

4. Resultados y Discusión

En la Figura 4.9b. (izq.) se muestran los valores de absorbancia máximas correspondientes a cada extracto vegetal agregado en baja concentración. Se observa que al igual que para altas concentraciones el extracto de coliflor es el que inhibe mayormente el desarrollo de la $A_{Máx}$ con un valor de 1,7 U.A./g.

Los extractos de cebolla y el repollo, presentan valores de 1,9 U.A./g y 2,2 U.A./g respectivamente, colocando en este caso la actividad inhibitoria de la cebolla por encima del repollo. En el grafico 4.9b. (der.) se pueden observar los porcentajes de inhibición para coliflor, cebolla y repollo con valores del 35,1%, 25,3% y 15,1% respectivamente.

Se destaca que aunque la inhibición del desarrollo de color logrado en los en los extractos a baja concentración no es tan efectiva como para los de alta concentración, los *flavors* de los extractos también son mucho menos apreciables. De esta manera se podría hacer un balance entre efecto inhibitorio e impacto del aroma y establecer una solución de compromiso.

b) Porcentaje de inhibición analizando las constantes de la cinética enzimática

Se determinó el porcentaje de inhibición causada por los extractos vegetales sobre la PFO de manzana, analizando la variación de las constantes cinéticas para cada una de las concentraciones estudiadas. Para esto se empleó la siguiente ecuación:

$$\% \text{Inhibición de la cinética.} = 100 \times \frac{K_i \text{ Control.} - K_i \text{ Ensayo.}}{K_i \text{ Control}}$$

Donde:

$K_{i \text{ Control}}$: Valor de la constante cinética de pardeamiento para la solución en ausencia del inhibidor.

$K_{i \text{ Ensayo}}$: Valor de la constante cinética de pardeamiento para la solución con cada extracto inhibidor.

En la tabla 4.3. Se muestran los valores de las constantes cinéticas obtenidas en los ensayos de inhibición para cada uno de los extractos vegetales y los valores del porcentaje de inhibición de la velocidad inicial calculados a partir de las constantes cinéticas.

Tabla 4.3 Constantes cinéticas y porcentaje de reducción de la velocidad inicial de la reacción de los extractos a altas concentraciones, analizando las K_i .

Extractos vegetales.	K_i Control	K_i de los inhibidores.	% de inhibición.
Cebolla alta concentración	$5,3 \times 10^{-3} \pm 0,3$	$2,5 \times 10^{-3} \pm 0,4$	$58,7 \pm 2,3$
Cebolla baja concentración		$3,4 \times 10^{-3} \pm 0,3$	$36,5 \pm 0,4$
Coliflor alta concentración		$2,0 \times 10^{-3} \pm 0,2$	$61,4 \pm 0,2$
Coliflor baja concentración		$4,4 \times 10^{-3} \pm 0,3$	$16,1 \pm 0,2$
Repollo alta concentración		$3,2 \times 10^{-3} \pm 0,3$	$40,1 \pm 0,2$
Repollo baja concentración		$5,4 \times 10^{-3} \pm 0,2$	$-1,3 \pm 0,3^*$

* La inhibición tiene un valor negativo porque en realidad acelera.

En la Figura 4.10 se graficaron los valores de absorbancias máximas y porcentajes de inhibición de la velocidad inicial para las muestras conteniendo alta concentración de extracto inhibidor (Fig. 4.10a) y con baja concentración de extracto inhibidor (Fig. 4.10b).

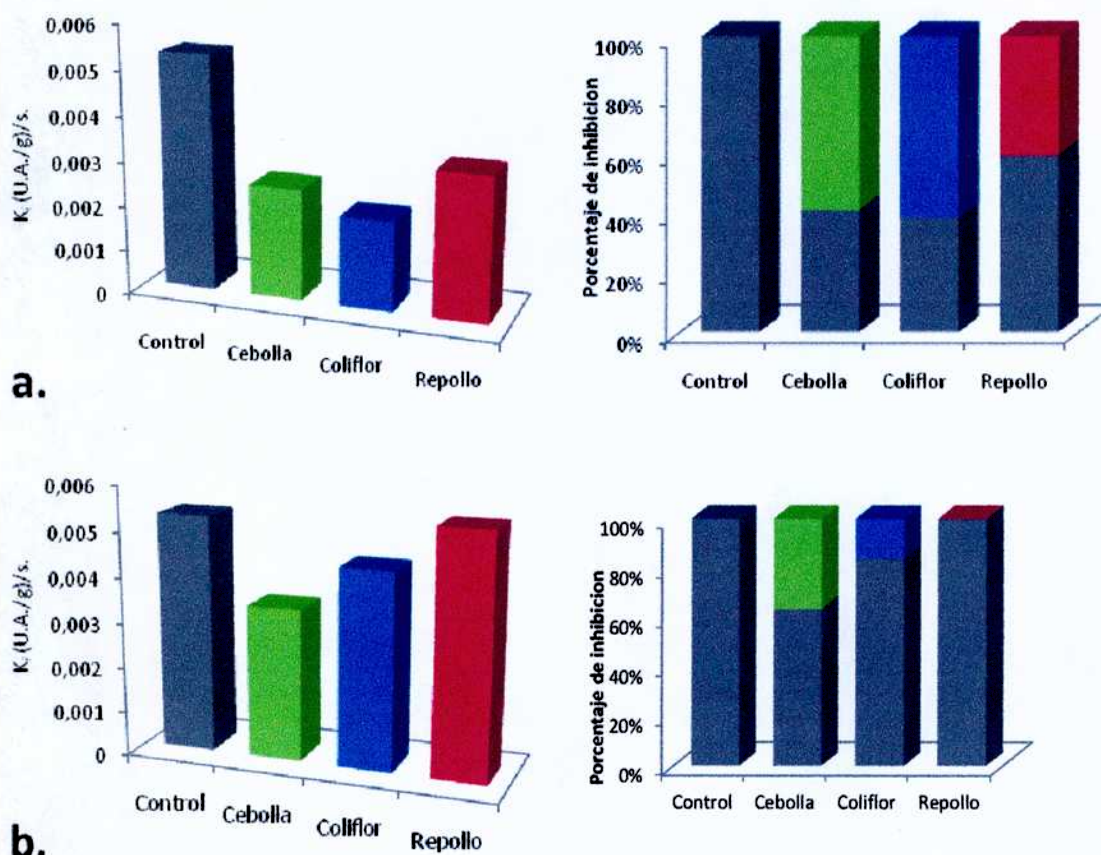


Figura 4.10. Variación de las constantes cinéticas del extractos de manzana conteniendo PFO y porcentaje de inhibición de la velocidad inicial causado por cada uno de los extractos vegetales inhibidores empleados a alta (a) y a baja (b) concentración, en base a los valores de las constantes cinéticas a 420nm.

La disminución de las constantes cinéticas y sus respectivos porcentajes de inhibición de las velocidades iniciales se muestran en las Figuras 4.10a para los extractos a alta concentración. Se puede observar que todos los extractos vegetales inhiben (en menor o mayor proporción) la velocidad a la que ocurre la reacción (Figura 4.10a izq.). La coliflor es el extracto que provoca una mayor disminución en la constante cinética. Al evaluar los valores de K_i para los extractos a altas concentraciones se destaca que solo los sistemas que contienen extractos de coliflor y cebolla alcanzan valores que corresponden a

4. Resultados y Discusión

más del 50% con respecto al control, sus porcentajes de inhibición son de 61,4 y 58,7% respectivamente. Como se puede ver en la Figura 4.10b (der.), el repollo por el contrario solo presenta un porcentaje de inhibición del 40,1%.

En la Figura 4.10b (izq.) se muestran los valores de las constantes cinéticas correspondientes a cada uno de los extractos vegetales agregados en baja concentración. Se observa que a diferencia de las altas concentraciones la cebolla es el extracto que más inhibe. Por otro lado si bien como vimos antes el extracto de repollo inhibe el valor de absorbancia final, no provoca disminución de la velocidad de reacción. Este es el único caso en todos los ensayos en el que se muestra que uno de los extractos estudiados no presenta efecto sobre una variable cinética, es más, la favorece levemente. Por lo tanto en estas condiciones el extracto de cebolla provoca mayor disminución de la constante de velocidad.

Dados los anteriores resultados podría considerarse que aunque los extractos de coliflor y el repollo son de misma familia (*Brassicaceae*), los compuestos inhibidores, su concentración o la forma en que estos actúan sobre a velocidad de la reacción pueden ser diferentes. Por otro lado, en la cebolla, del género *Allium*, han sido caracterizados compuestos volátiles sulfurados que contienen grupos tioles (Griffiths y col., 2002; Negishi y col., 2002) y se ha postulado que estos compuestos organosulfurados de bajo peso molecular presentes en la cebolla podrían ser los responsables de la inhibición de la actividad de la PFO (Kim y col., 2005).

4.1.1.7 Comparación de la efectividad de los extractos inhibidores con la del sulfito

La Figura 4.11 muestra la capacidad inhibidora del pardeo enzimático de los extractos naturales en comparación con el metabisulfito de sodio, que es el agente tradicionalmente empleado para inhibir este tipo de pardeo. Se empleó una concentración de metabisulfito de 10 ppm que es el límite máximo permitido por la FDA y la UE.

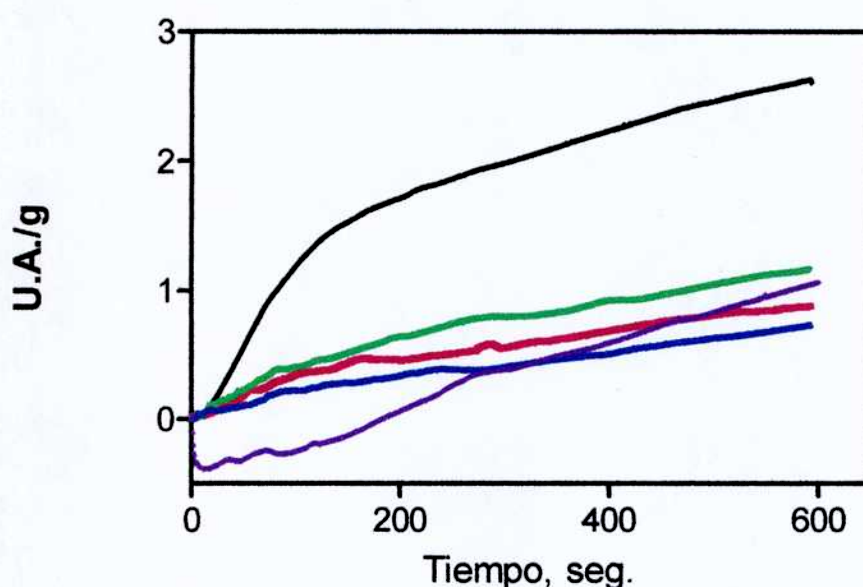


Figura 4.11 Actividad enzimática del extracto de manzana conteniendo PFO en función del tiempo a para diferentes extractos naturales. ■ control; ■ cebolla alta concentración; ■ repollo alta concentración; ■ coliflor alta concentración; ■ metabisulfito de sodio.

El metabisulfito de sodio provoca una mejor inhibición de la velocidad inicial frente a los demás inhibidores. Sin embargo, al observar la inhibición a lo largo del tiempo los extractos de coliflor y el repollo proveen un efecto más conservado en el tiempo. Es decir, los extractos naturales no disminuyen tanto

la velocidad inicial como el metabisulfito, pero tienen efecto sobre la máxima absorbancia alcanzada, es decir la forma de la curva de absorbancia vs tiempo favorece la efectividad de los extractos naturales a lo largo del tiempo.

4.1.2 Evaluación de la inhibición del PFO en rodajas de manzana mediante análisis de imagen

Además del estudio de inhibición realizado por las mediciones de absorbancia en medios líquidos, se determinó la inhibición de pardeamiento directamente sobre rodajas de manzana. Para ello se efectuaron mediciones de reflectancia de las muestras, empleando análisis de imágenes, tal como se detalla en la sección 3.2.1.6 dicha determinación se realizó mediante el uso de las variables de luminosidad (L^*) la cual presenta valores que varían entre 0 (negro) y 100 (blanco), y las coordenadas cromáticas a^* con variaciones del verde (-120) al rojo (120) y b^* con colores del azul (-120) al amarillo (120). En este trabajo también se determinó el cambio de color global de las muestras, a través de la función ΔE_{00} CIEDE 2000 (Sharma y col., 2005).

4.1.2.1 Evaluación de la inhibición de la PFO en muestras liofilizadas y posteriormente embebidas en extractos inhibitorios

Se liofilizaron rodajas de manzana de 2cm de diámetro. Posteriormente, sobre cada rodaja se dispensó 1 mL de los extractos vegetales que habían demostrado efecto inhibitorio de la PFO, conteniendo 5 g del extracto vegetal liofilizado correspondiente suspendido en 100 mL de *buffer* fosfato de pH 6,0. Tal como se observa en la Figura 4.12, el extracto que ofreció mayor inhibición

4. Resultados y Discusión

es el de coliflor, resultado que concuerda con la inhibición de la PFO en medio líquido. Los extractos de cebolla y repollo, sin embargo no fueron tan efectivos.



Figura 4.12. Galería de imágenes de rodajas de manzana liofilizadas y posteriormente embebidas en extractos inhibitorios almacenados a 0 minutos (a), 25 minutos (b) y 55 minutos (c).

- **Cambio global de color.** Se calculó el cambio global de color a través de la función ΔE_{00} , considerando el cambio de color global de cada extracto con respecto a la muestra control, a la cual se le agregó agua. Tal como se observa en la Tabla 4.4 y en la Figura 4.13, para todas las muestras analizadas después de 55 minutos el cambio de color ΔE_{00} fue superior a 5 unidades, con respecto al estado inicial de cada una de ellas, que corresponde a la mínima diferencia perceptible visualmente. Se puede decir que el cambio representado por los valores de ΔE_{00} son importantes solo en el caso del extracto de coliflor.

4. Resultados y Discusión

Tabla 4.4 Valores del cambio global del color (ΔE_{00}) para los extractos vegetales inhibidores de pardeamiento

Extractos vegetales	Cambio global del color ΔE_{00}
Control	13,66
Cebolla	9,60
Coliflor	7,67
Repollo	11,10

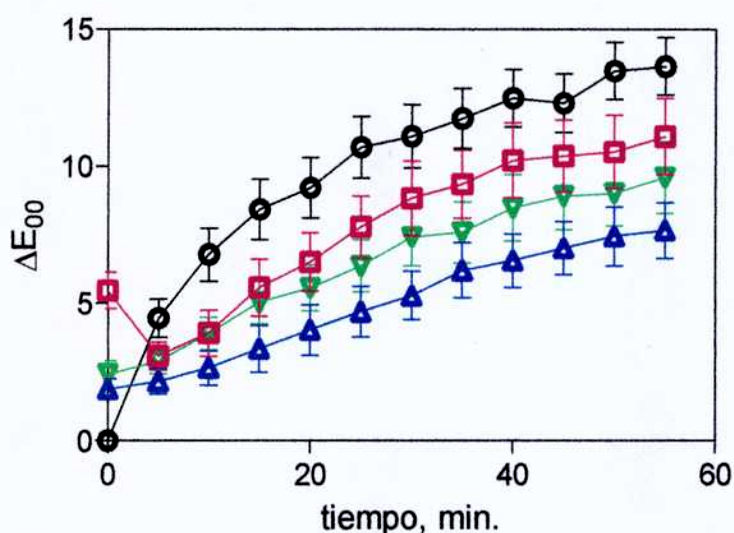


Figura 4.13. Cambios de color global (ΔE_{00}) para rodajas de manzana liofilizadas y posteriormente embebidas en agua (○) y extractos inhibidores de cebolla (▽), coliflor (△) y repollo (□), en función del tiempo.

La función ΔE_{00} refleja el cambio de color global, pero no indica cómo es la composición cromática de cada sistema. Para una mejor caracterización de los cambios se determinaron en forma independiente las variaciones de las coordenadas L^* , a^* y b^* del espacio CIELAB.

En la Figura 4.14 se muestran las diferencias de los valores de luminosidad y de las variables cromáticas, respecto del tiempo inicial de cada muestra, representadas por $L_0^*-L^*(a)$, $a_0^*-a^*(b)$, $b_0^*-b^*(c)$, respectivamente.

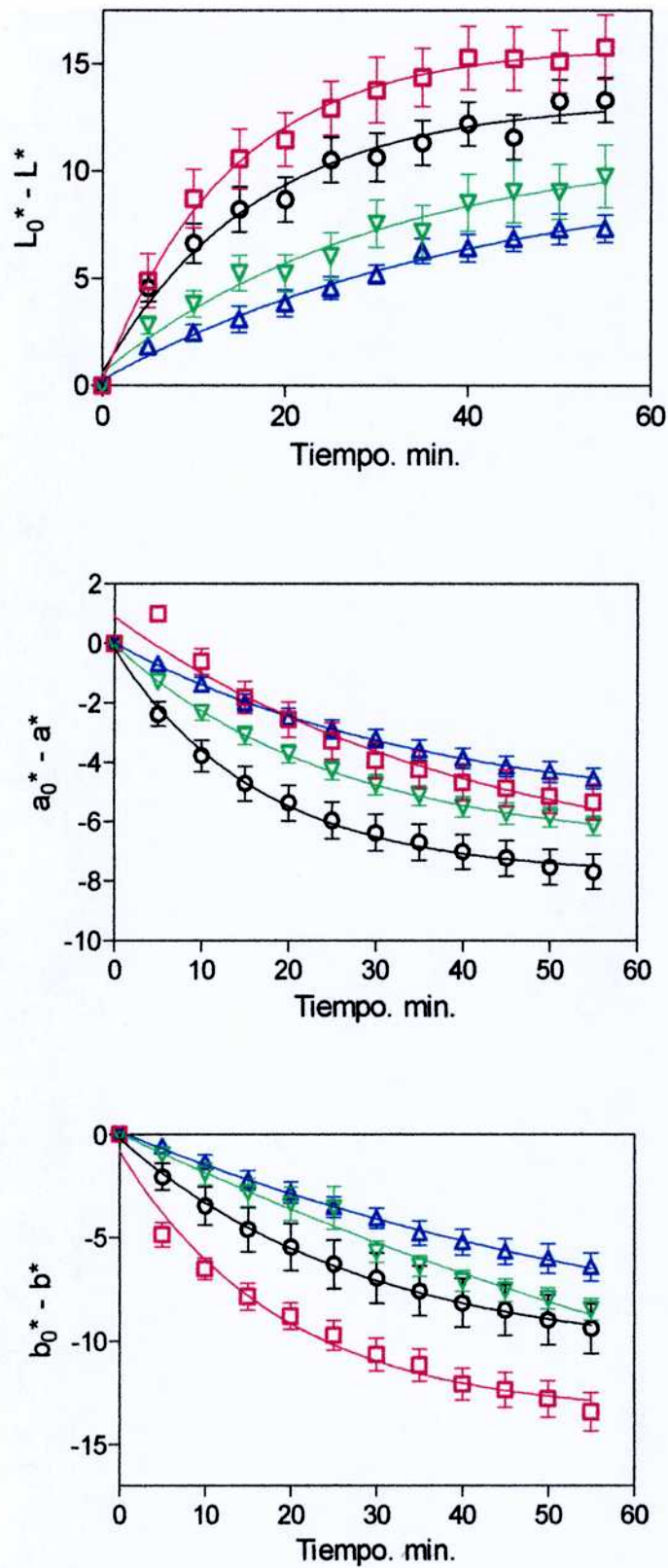


Figura 4.14. Cambio de las funciones de color a) luminosidad ($L_0^* - L^*$); b) rojo ($a_0^* - a^*$) y c) amarillo ($b_0^* - b^*$), para rodajas de manzana embebidas en agua ($\circ$) y extractos de cebolla (∇), coliflor (Δ) y repollo ($\square$) en función del tiempo.

4. Resultados y Discusión

En dicha figura puede observarse que todos los sistemas estudiados presentaron un cambio global de color representado por la disminución de la luminosidad y aumento de las variables cromáticas.

- **Cambio de luminosidad.** El extracto de coliflor fue el que presentó mayor capacidad de inhibición del oscurecimiento de las muestras, dado que se observó menor disminución en el parámetro de luminosidad, siendo el sistema al que se le había dispensado el extracto de repollo el que más se oscureció, superando incluso las muestras control (agua) en el periodo de tiempo estudiado.
- **Cambio de componente roja.** Como en todos los sistemas hay desarrollo de productos pardos y, por lo tanto, se observa un aumento en los valores de a^* , siendo las rodajas de manzana embebidas en agua (control) las muestras que presentaron mayores valores en esta coordenada. El extracto de coliflor fue el más efectivo para la inhibición de la componente roja del pardeamiento, (con el que se obtuvieron los valores de a^* más bajos), tal como lo discutido para luminosidad.
- **Cambio de la componente amarilla.** En el caso de la coordenada cromática b^* se presenta un aumento del color amarillo de todas las muestras, siendo nuevamente el extracto de coliflor que mostró menor desarrollo de la variable b^* , y a su vez el repollo el extracto que produjo en las rodajas mayores valores de b^* .

4. Resultados y Discusión

Constantes cinéticas de pardeamiento. Se calcularon las constantes cinéticas a partir del ajuste de los datos de las curvas $L_0^* - L^*$ en función del tiempo empleando el siguiente modelo de correlación no lineal:

$$L_0^* - L^* = (A) \cdot (1 - \exp(-K \cdot t))$$

Donde: A: es el valor de $L^* - L_0^*$ a tiempos largos (en el *plateau*)

K: constante cinética; t: tiempo

En la tabla 4.5 se muestran los valores obtenidos para las muestras control y para cada uno de los extractos inhibidores estudiados. Puede observarse que el extracto de repollo presenta mayor velocidad de pardeamiento en el tiempo estudiado, alcanzando valores de $L_0^* - L^*_{Máx}$ superiores a los obtenidos para la muestra control.

Tabla 4.5 Valores de las constantes cinéticas y $L_0^* - L^*_{Máx}$ para las muestras control y muestras con cebolla, coliflor y repollo

Extractos	K ($L_0^* - L^*$)/min)	$L_0^* - L^*_{Máx}$ de los inhibidores.
Control	0,05864	13,3
Cebolla	0,03252	11,3
Coliflor	0,02403	10,2
Repollo	0,07103	15,8

Esto podría deberse a que las enzimas con actividad de polifenoloxidasas presentes en la manzana tengan mucha afinidad por algún sustrato naturalmente presente en el repollo. Sin embargo esto no se había verificado

4. Resultados y Discusión

en los experimentos en medio líquido (sección 4.1.1.2). El extracto que provocó menor velocidad del pardeamiento de las rodajas de manzana, fue el de coliflor, obteniendo valores de máximo cambio de luminosidad de 10,2 y la menor velocidad de reacción. En el caso del extracto de cebolla también se observó un efecto inhibitor del pardeamiento de las rodajas de manzana, siendo un poco menor que el obtenido para el extracto de coliflor.

Con el objetivo de observar el desplazamiento de color de cada una de las rodajas embebidas en los diferentes extractos, se graficaron los valores de cambio global en el plano cromático a^* , b^* . Se observa que las muestras son levemente verdosas en el punto inicial y se desplazan hacia el rojo y hacia el amarillo a medida que se pardean.

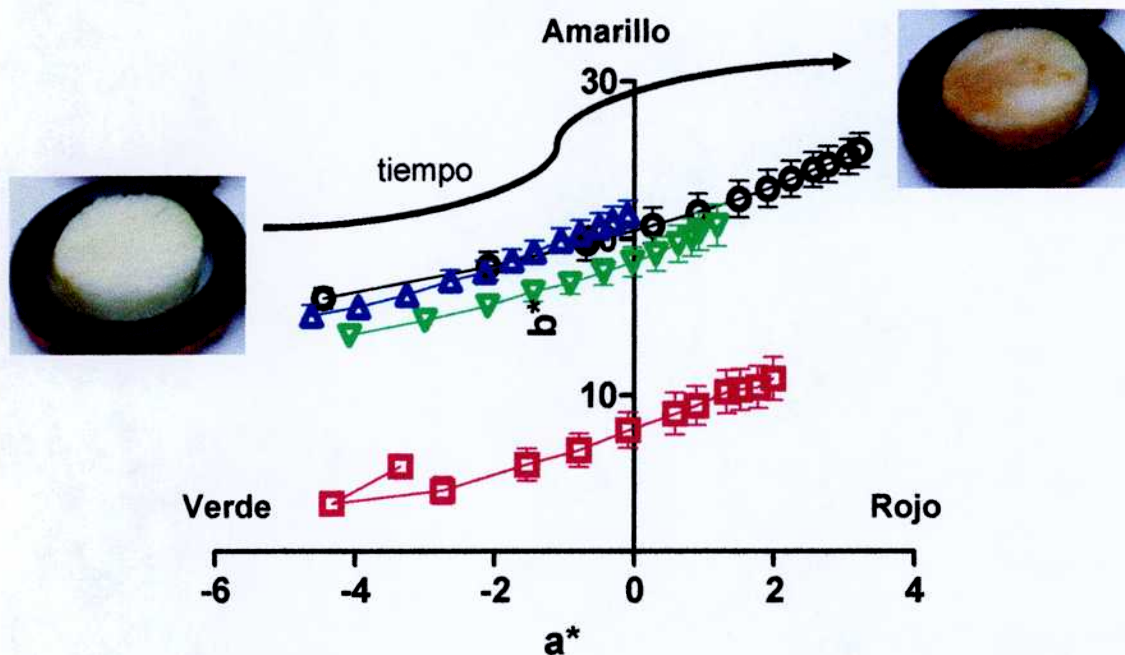


Figura 4.15. Desplazamiento cromático para el control ($\circ$) y los extractos vegetales de cebolla (∇), coliflor (Δ) y repollo ($\square$) en rodajas de manzana liofilizadas y posteriormente embebidas.

4. Resultados y Discusión

4.1.2.2 Evaluación de la inhibición del PFO en muestras frescas embebidas en extractos inhibitorios y posteriormente liofilizadas

Con la finalidad de estudiar el efecto del agua en la inhibición del pardeamiento de los extractos vegetales se humidificaron rodajas de manzana liofilizadas y posteriormente embebidas en cada uno de los extractos. Se eligieron humedades relativas de 11%, 43%, 84% y 93%. Dicho análisis se realizó a través del análisis de imagen en función del tiempo de humidificación a 20°C.

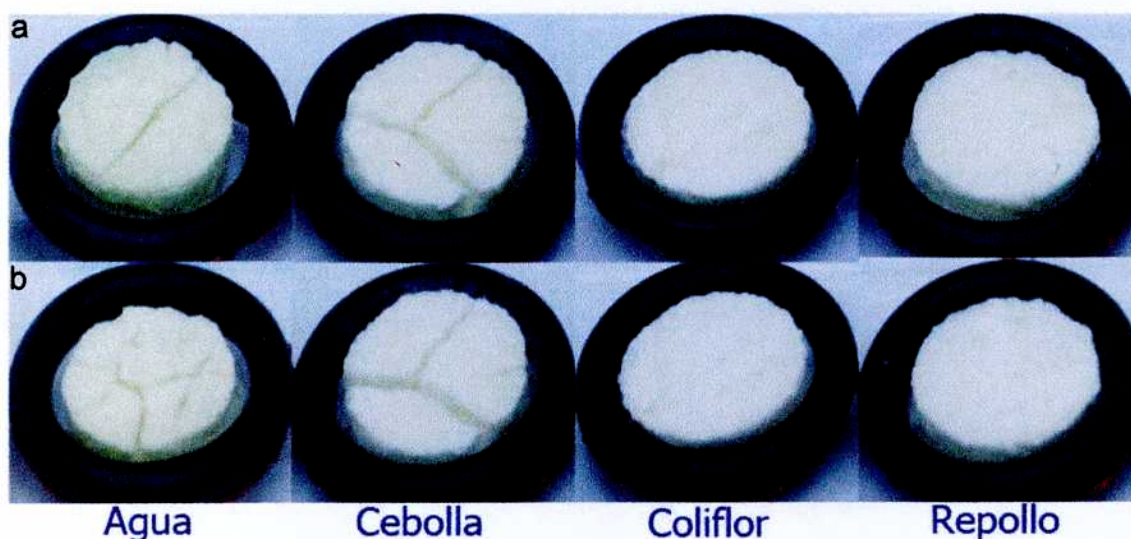


Figura 4.16. Galerías de imágenes de la evaluación de la inhibición del PFO en muestras frescas embebidas en extractos inhibitorios y posteriormente liofilizadas, humidificadas a 11% de humedad relativa y almacenadas a 0 días (a) y 27 días (b).

En la Figura 4.16. Se puede observar que al final del tratamiento de humidificación a 11% de HR no hay cambios notables de desarrollo de color, lo que manifiesta el impedimento cinético de la enzima para la formación de pigmentos pardos debido a la baja movilidad molecular bajo estas condiciones.

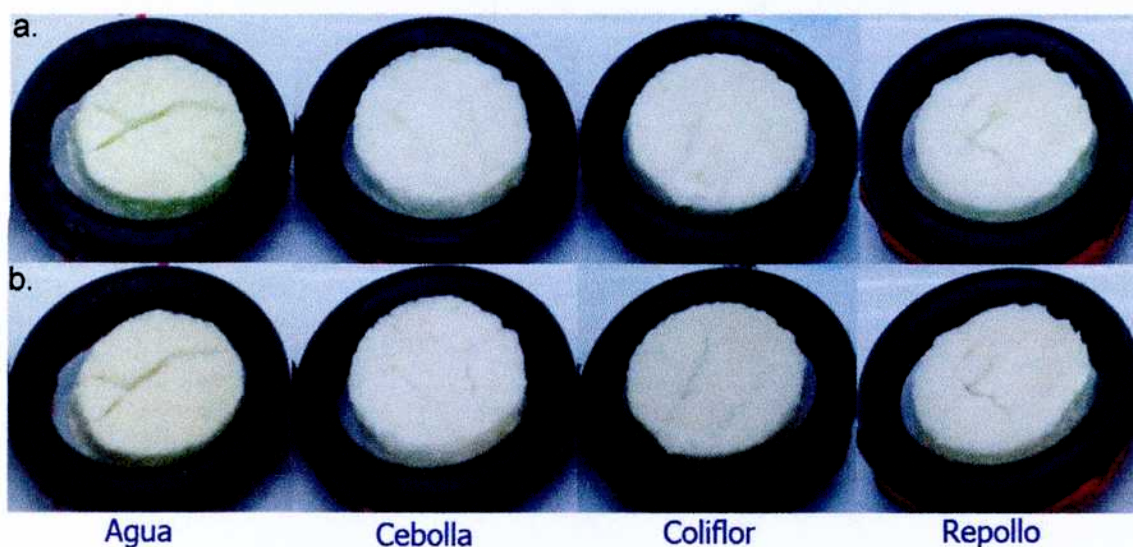


Figura 4.17. Galerías de imágenes de la evaluación de la inhibición del PFO en muestras frescas embebidas en extractos inhibitorios y posteriormente liofilizadas, humidificadas a 43% de humedad relativa y almacenadas a 0 días (a) y 27 días (b).

En la Figura 4.17 se observa un muy leve desarrollo de pigmentos pardos dado por el inicio de la interacción enzima-sustrato que se ve apenas favorecida por esta HR, los cambios en color son más notorios que los expuestos para la Figura 4.16. Sin embargo son difícilmente perceptibles, esto se puede percibir en la Figura 4.19b donde las variaciones de luminosidad y el cambio global de color no representan valores que los hagan representativos.

Las muestras humidificadas a 84% de humedad relativa presentan una nítida formación de pigmentos pardos al cabo de tiempos prolongados de tratamiento (comparar los 27 días de este experimento con las 72 horas del experimento con las rodajas de manzana liofilizadas y posteriormente embebidas en extractos inhibitorios).

Esto se debe a que a dicha humedad el sistema tiene la movilidad molecular suficiente para que exista la interacción enzima-sustrato que permita el

4. Resultados y Discusión

oscurecimiento de las muestras tal y como se observa en la Figura 4.18, pero aún existen impedimentos cinéticos ya que el color desarrollado es mucho más pálido que en las muestras de la Figura 4.12. Además, también se puede observar como la muestra control (agua) presenta el desarrollo de hongos al final del tratamiento a diferencia de las muestras embebidas en los extractos que a esta humedad relativa no existió crecimiento de hongos a los 27 días.



Figura 4.18. Galerías de imágenes de la evaluación de la inhibición del PFO en muestras frescas embebidas en extractos inhibitorios y posteriormente liofilizadas, humidificadas a 84% de humedad relativa y almacenadas a 0 días (a), 3 días (b) y 27 días (c).

La Figura 4.19 muestra los valores de ΔE_{00} y de la coordenada luminosidad (L^* , que es la que mostró mayor variación) de cada uno de los extractos vegetales estudiados para varias humedades relativas (11%, 43 y 84%).

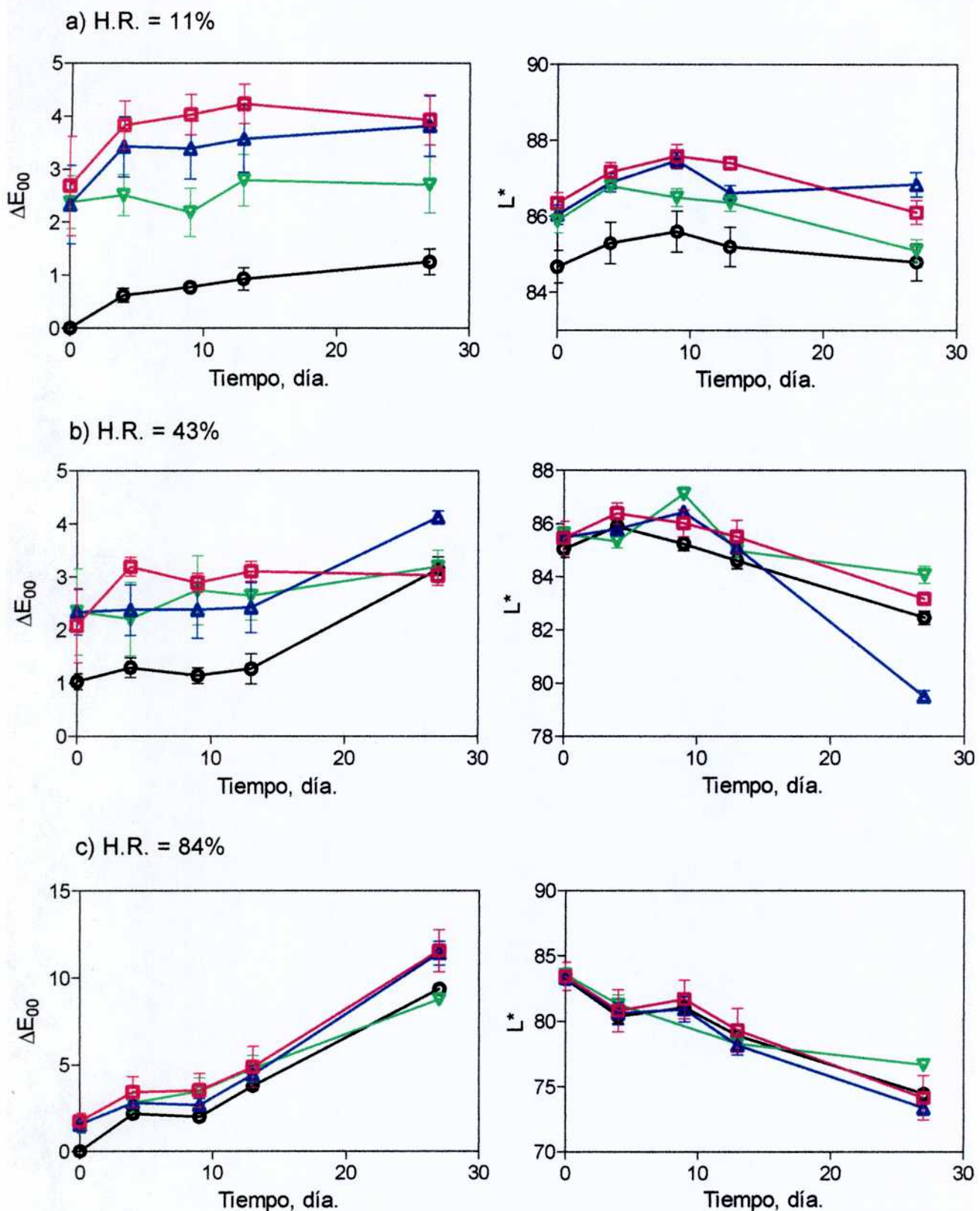


Figura 4.19. Cambios globales de color y variación de la luminosidad de rodajas de manzana embebidas en agua ($\circ$) y en extractos vegetales de cebolla (∇), coliflor (Δ) y repollo ($\square$) humidificadas a 11% (a), 43% (b) y 84% (c) de humedad relativa en función del tiempo.

4. Resultados y Discusión

En las Figura 4.19 a y b puede observarse que a bajas HR (11 y 43%) los cambios en ΔE_{00} y luminosidad no fueron importantes. Teniendo en cuenta que el ser humano percibe diferencias de color cuando los valores de L^* difieren en 10 unidades se puede considerar que en el tiempo de humidificación no hay cambios en el color del material. Esto se debe a la baja movilidad molecular que presentan las rodajas de manzana, ya que la enzima está inmovilizada en una matriz altamente viscosa (Burin y Buera, 2001). Por lo tanto, independientemente del extracto empleado para la imbibición los sistemas tienen comportamiento similar, limitado por impedimentos cinéticos dados por la matriz. Si bien a 11 y 43% de HR el ΔE_{00} aumenta con el tiempo y L^* disminuye, estos cambios quedan por debajo del nivel de percepción visual, tal como se observa en las Figuras 4.16 y 4.17. A HR de 84% el material ya presenta una mayor movilidad molecular, lo cual favorece las reacciones enzimáticas logrando así el nítido desarrollo de pigmentos pardos, por lo que el aumento de ΔE_{00} con el tiempo es claramente distinguible en forma visual aunque a tiempos muy largos en comparación con los experimentos analizados en la sección 4.1.2.1. Además, dada la presencia de agua libre, el material se vio afectado por el desarrollo de hongos. En la figura 4.18 se puede observar el desarrollo de hongos que se obtuvo en las rodajas al final del tratamiento de humidificación.

Estas imágenes muestran que el extracto de coliflor además de inhibir el pardeamiento podría ser un inhibidor del desarrollo de hongos. Estudios previos han demostrado que los productos con compuestos sulfurados pueden inhibir el desarrollo de estos microorganismos (Ding y col., 2002).

4. Resultados y Discusión

Como analizamos previamente, el valor de ΔE_{00} indica el cambio global respecto de una referencia, por lo tanto no informa acerca de la evolución cromática o del cambio de luminosidad. Por ejemplo, un valor dado de ΔE_{00} indica el apartamiento de un dado color pero no se puede decir si la muestra está más clara o más oscura respecto de un control. Por otro lado, la coordenada que presenta una mayor variación es L^* , que tampoco informa sobre las características cromáticas, solo indica mayor oscurecimiento. Se evaluaron por lo tanto las coordenadas, a^* y b^* en función del tiempo para tener información del desplazamiento cromático, y los resultados obtenidos se observan en la Fig. 4.20. En esta figura se muestran los valores de las variables cromáticas para los sistemas embebidos en extractos de cebolla, coliflor y repollo antes de la liofilización y luego equilibrados a humedades relativas de 11% (Figura 4.20a), 43% (Figura 4.20b) y 84% (Figura 4.20c).

A bajas HR (HR 11 y 43%) el material embebido en agua antes de su liofilización (control) presenta valores muy bajos de a^* , tiene una tonalidad verdosa y valores relativamente altos de b^* con respecto a los extractos estudiados. Las rodajas de manzana embebidas en extracto de coliflor previa a la liofilización fueron las que presentaron una mayor diferencia favorable frente al control.

4. Resultados y Discusión

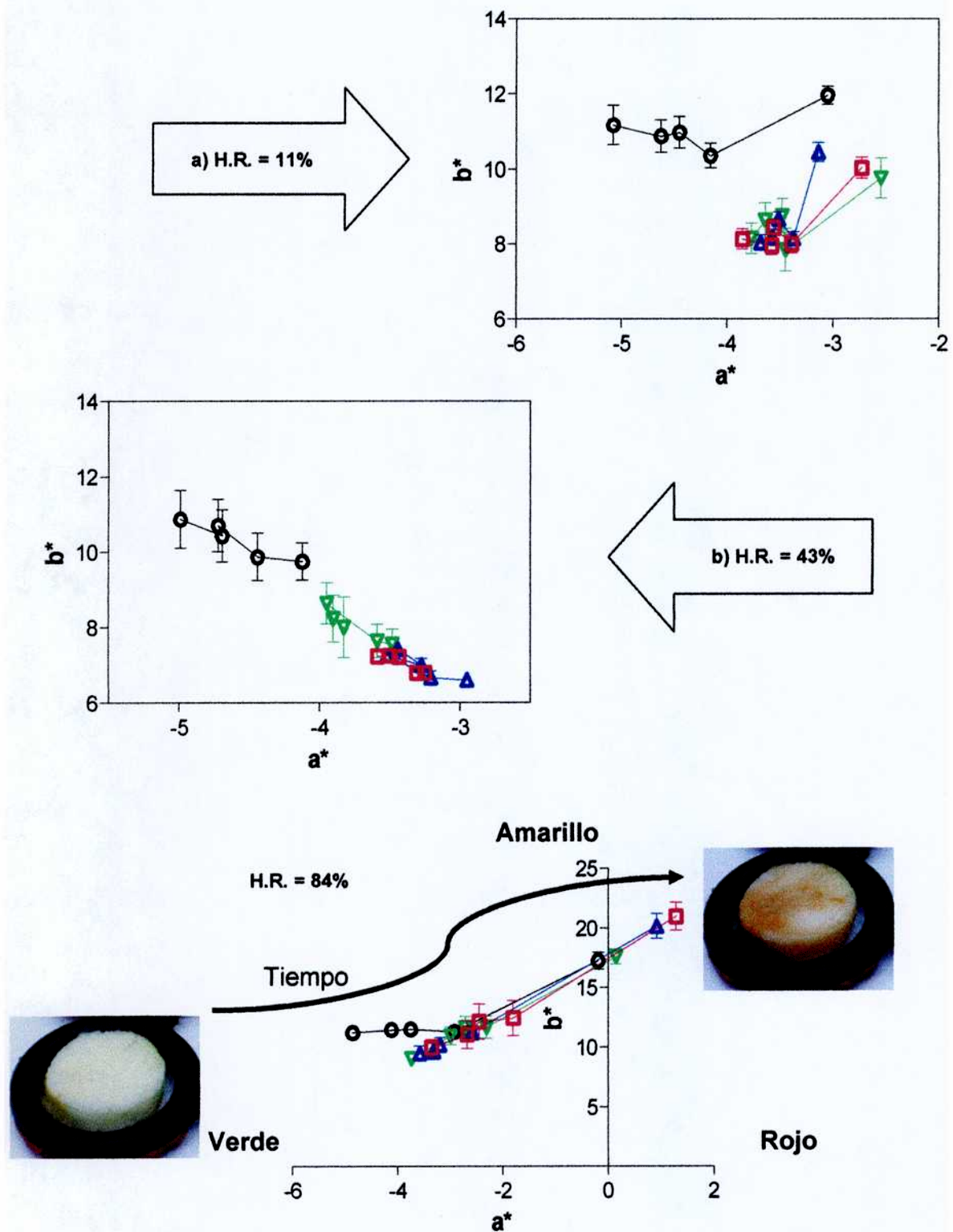


Figura 4.20. Desplazamiento de las variables cromáticas de las rodajas de manzana embebidas en agua ($\circ$), y extracto vegetal de cebolla (∇), coliflor (Δ) y repollo ($\square$) almacenado a 11% (a), 43% (b) y 84% (c) de HR.

4. Resultados y Discusión

En todos los casos el tiempo de almacenamiento generó disminución en los valores de b^* y un aumento en la variable a^* que por la magnitud que tienen no logran ser visualmente distinguibles a HR 11 y 43%. A HR 43% para el último tiempo de análisis (27 días), se empiezan obtener mayores valores de b^* y menores de a^* , lo que indicaría el inicio de las reacciones de pardeamiento. A altas humedades relativas (84%) empiezan a ser más marcados los cambios en las variables cromáticas producidas en el tiempo de almacenamiento, esto puede deberse a que a 84% de HR el material presenta mayor movilidad y por ende es más propenso a sufrir reacciones de deterioro, como se discutió previamente.

Como puede apreciarse, el grado de inhibición obtenido por el tratamiento de imbibición con extractos previo a la liofilización fue despreciable para las muestras de HR entre 11 y 84%, en comparación con lo discutido en la sección 4.1.2.1, para el tratamiento de imbibición de las rodajas de manzana luego de liofilizarlas, y el desarrollo de color ocurrió a un tiempos muy largos. Esto puede deberse a que aún a HR 84% los impedimentos cinéticos en la matriz enmascaran y son más limitantes que el efecto de los inhibidores.

Por el contrario, el análisis de imágenes para muestras de 93% de HR produjo un rápido desarrollo de las reacciones, y por lo tanto disminuyó el tiempo de estudio (Figura 4.21).

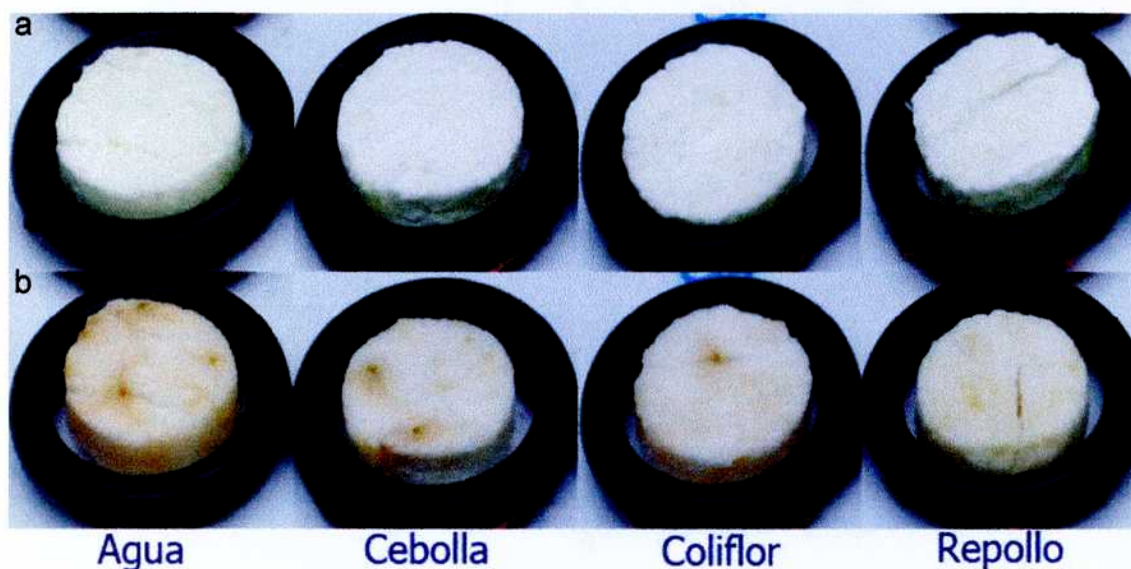


Figura 4.21. Galerías de imágenes de la evaluación de la inhibición del PFO en muestras frescas embebidas en extractos inhibitorios y posteriormente liofilizadas, humidificadas a 93% de humedad relativa y almacenadas a 0 horas (a) y 74 horas (b).

En la figura 4.21. se puede observar que a diferencia de las humedades relativas de 11, 43 y 84% (Figuras 4.16, 4.17 y 4.18), la humedad de 93% presentó una mayor velocidad del pardeamiento, lo que está dado por la alta movilidad molecular en la matriz, la cual favorece las reacciones enzimáticas. Dado que la humedad y la temperaturas son óptimas para el desarrollo de hongos dichas muestras solo pudieron ser analizadas hasta las 74 horas, pero fue suficiente para observar diferencias entre los distintos sistemas. En este caso los sistemas con extractos inhibidores presentan diferencias significativas con respecto a las muestras control.

A continuación en la figura 4.22. se presenta el cambio global de color (ΔE_{00}) para las rodajas de manzana embebidas en los extractos y posteriormente humidificadas a 93% de humedad relativa.

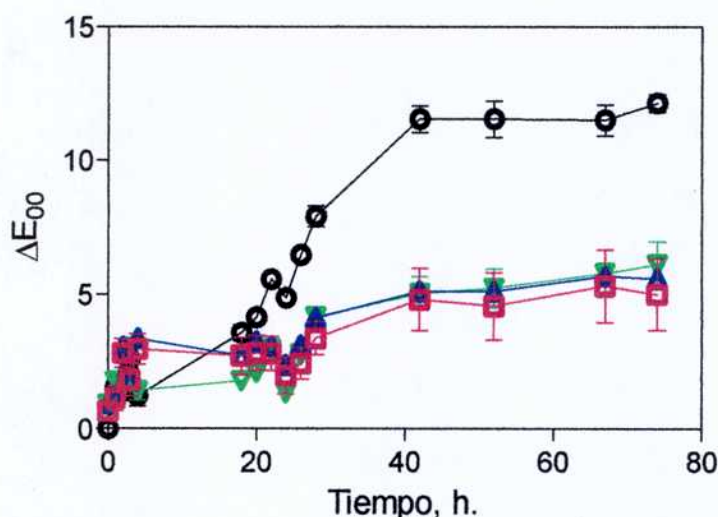


Figura 4.22. Cambios de color global (ΔE_{00}) para rodajas de manzana embebidas en agua (○) y extractos inhibitorios de cebolla (▽), coliflor (△) repollo (□), liofilizadas y posteriormente humidificadas a 93% HR, en función del tiempo.

Se observa que ocurrió un cambio global de color importante para todas las muestras analizadas. Con respecto al estado inicial de cada una de ellas el control fue la única muestra que presentó variaciones de ΔE_{00} muy por encima de las 5 unidades, alcanzando valores de 12, 13 unidades de ΔE_{00} . Las rodajas que contenían los extractos inhibitorios, al final del tratamiento térmico presentaron valores de ΔE_{00} levemente por encima de las 5 unidades. Considerando el cambio de color global de cada extracto con respecto a la muestra control, a la cual se le agregó agua, se puede decir que el cambio representado por los valores de ΔE_{00} empiezan a mostrar diferencias solo a partir de las 28 horas y al final del tratamiento cada una de las muestras que contenían el extracto inhibidor presentaron una diferencia con respecto al control de 7 unidades de ΔE_{00} aproximadamente.

En la figura 4.23 se encuentran graficados los parámetros de luminosidad y las variables cromáticas de las rodajas de manzana embebidas en los extractos

4. Resultados y Discusión

vegetales y posteriormente liofilizadas. Las muestras fueron humidificadas a 93% de HR por un periodo de 74 horas. En la Figura 4.23 se muestra el cambio de las coordenadas CIELAB en función del tiempo. Se puede observar que la luminosidad del material presentó una importante disminución en las muestras control, principalmente a partir de las 24 horas de almacenamiento. En el caso de los extractos vegetales, los cambios de luminosidad fueron pequeños en el tiempo de estudio. Con respecto a las variables cromáticas (Figuras 4.23 y 4.24) se observa la misma tendencia en todos los extractos estudiados, en los cuales se presentó un aumento de los valores de a^* y de b^* , siendo mucho más importantes dichos cambios en la muestra control.

El grado de inhibición obtenido con las muestras liofilizadas luego de embeberlas en los extractos inhibitorios y rehumidificadas hasta 93% de HR resultó similar al obtenido para las muestras liofilizadas y luego embebidas con los extractos (sección 4.1.2.1). En la Tabla 4.6 se observa la comparación de los datos obtenidos por ambos tratamientos.

Tabla 4.6 Comparación de los dos métodos utilizados para inhibir la reacción de pardeo enzimático sobre rodajas de manzanas

Extractos	Muestras liofilizada y embebida	Delta de procesos	Muestras embebidas y liofilizadas	Delta de procesos
Control	13,3	----	78,06	----
Cebolla	9,8	3,5	82,31	4,3
Coliflor	7,3	6,0	82,81	4,8
Repollo	15,8	-2,5	84,02	6,2

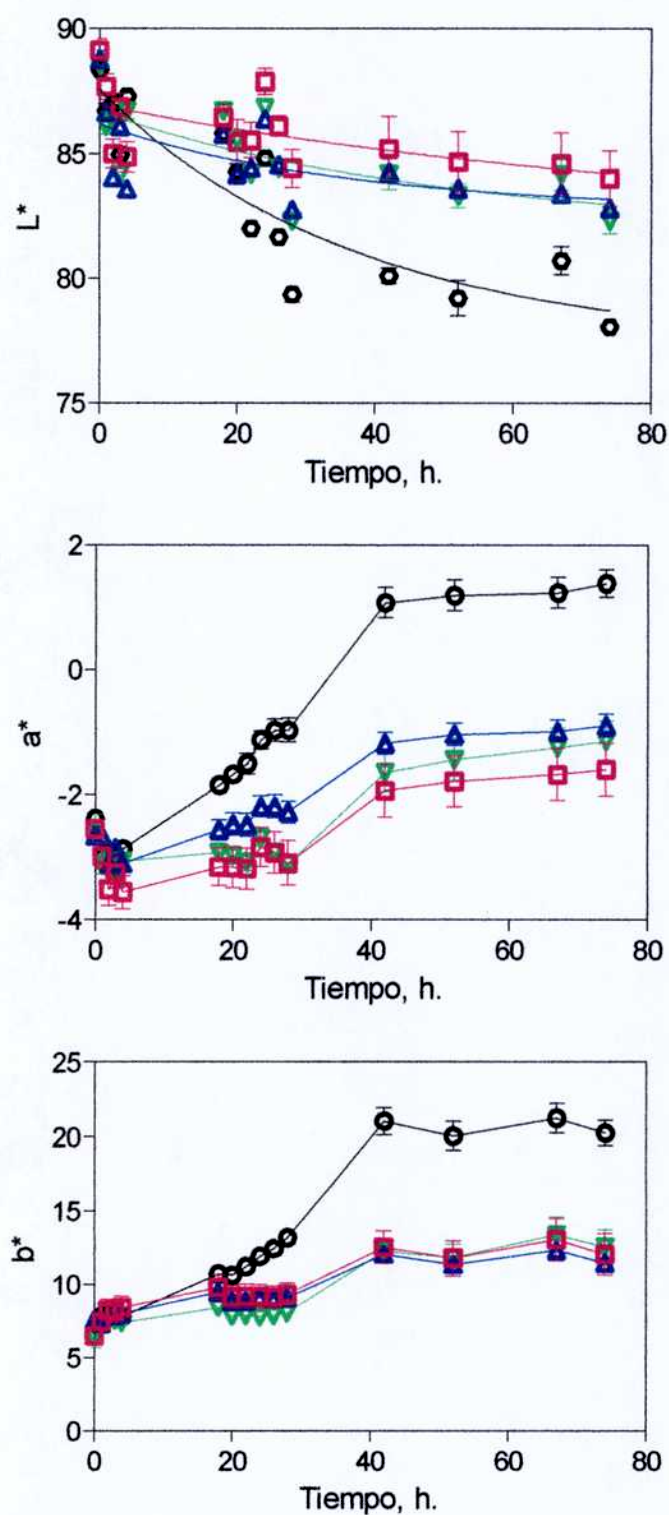


Figura 4.23. Cambio de luminosidad L^* (a) y de variables cromáticas a^* (b) y b^* (c), para rodajas de manzana embebidas en agua (○) y extractos de cebolla (▽), coliflor (△) y repollo (□) y posteriormente humidificadas a 93% de humedad relativa, en función del tiempo.

4. Resultados y Discusión

Tabla 4.7 Disminución de la luminosidad y porcentaje del efecto inhibitor de los extractos vegetales sobre rodajas de manzana humidificadas a 93% de HR.

Extractos	<i>Plateau</i>	Porcentaje de inhibición.
Control	78,06	0
Cebolla	82,31	5,44
Coliflor	82,81	6,08
Repollo	84,02	7,63

En la tabla se muestran los valores de luminosidad para las rodajas de manzana embebidas en los extractos vegetales y sus porcentajes de inhibición tomando como 100% las muestras embebidas en agua. Se observa que el extracto que presenta mayor inhibición del pardeamiento sobre las rodajas de manzana fue el repollo.

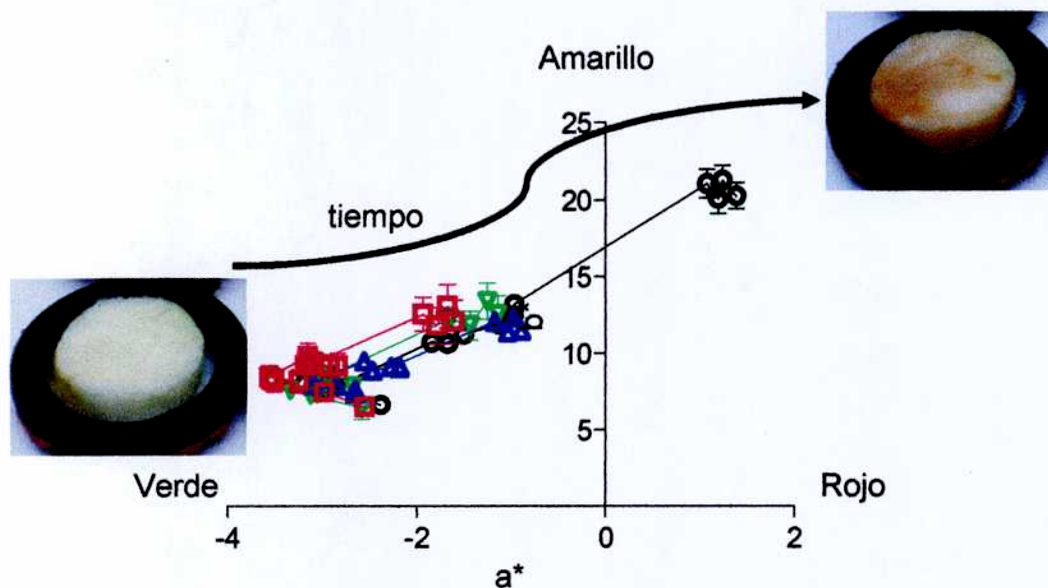


Figura 4.24. Desplazamiento cromático en el plano a^* , b^* para rodajas de manzana embebidas en agua ($\circ$) y extractos de cebolla (∇), coliflor (Δ) y repollo ($\square$) y posteriormente humidificadas a 93% de humedad relativa, en función del tiempo.

4.2 PARDEAMIENTO NO ENZIMÁTICO

4.2.1 Efectos de los extractos vegetales sobre la inhibición del pardeamiento no enzimático

4.2.1.1 Efectos de los extractos de cebolla, coliflor y repollo sobre la inhibición del pardeamiento no enzimático en sistemas glucosa/glicina

En esta parte del trabajo se evaluó la actividad inhibitoria de los extractos vegetales sobre el desarrollo de color producido por la reacción de Maillard en una solución de glucosa/glicina. Como es sabido, la incubación de proteínas o aminoácidos con glucosa lleva a la formación de productos de glicosilación a través de la reacción de Maillard que conduce en las etapas finales a la formación de pigmentos pardos.

En la Figura 4.25 se presenta el desarrollo de absorbancia a 420 nm en función del tiempo para las muestras control y aquellas conteniendo los extractos potencialmente inhibidores de la producción de pigmentos pardos. Las curvas obtenidas presentan la característica forma sigmoidea típica de la observada para el desarrollo de pigmentos pardos en sistemas líquidos (Buera y col., 1987). Presentan una zona inicial de desarrollo lento de color, otra zona intermedia con la máxima velocidad de desarrollo y finalmente una zona donde se llega al máximo o saturación de color.

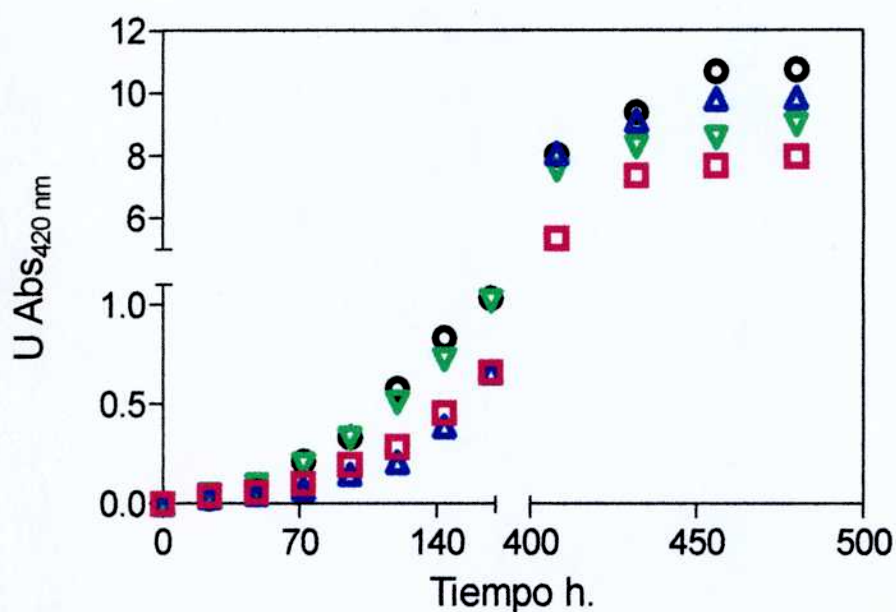


Figura 4.25 Desarrollo de absorbancia a 420 nm para sistemas glucosa-glicina (○) tratados a 70°C en presencia de extractos inhibitorios de cebolla (▽), coliflor (△) y repollo (□).

Para un mayor detalle se graficaron también las zonas de dicho gráfico que corresponden a las etapas iniciales (tiempos cortos) y a la etapa final (*plateau*) en una escala mayor (Figura 4.26 a y b). De esta forma se logra observar que los extractos de repollo y coliflor tuvieron actividad inhibitoria en la zona inicial, mientras que el sistema que contenía extracto de cebolla se comportó como el control. Por otro lado, los extractos de cebolla y repollo produjeron inhibición del desarrollo máximo de color.

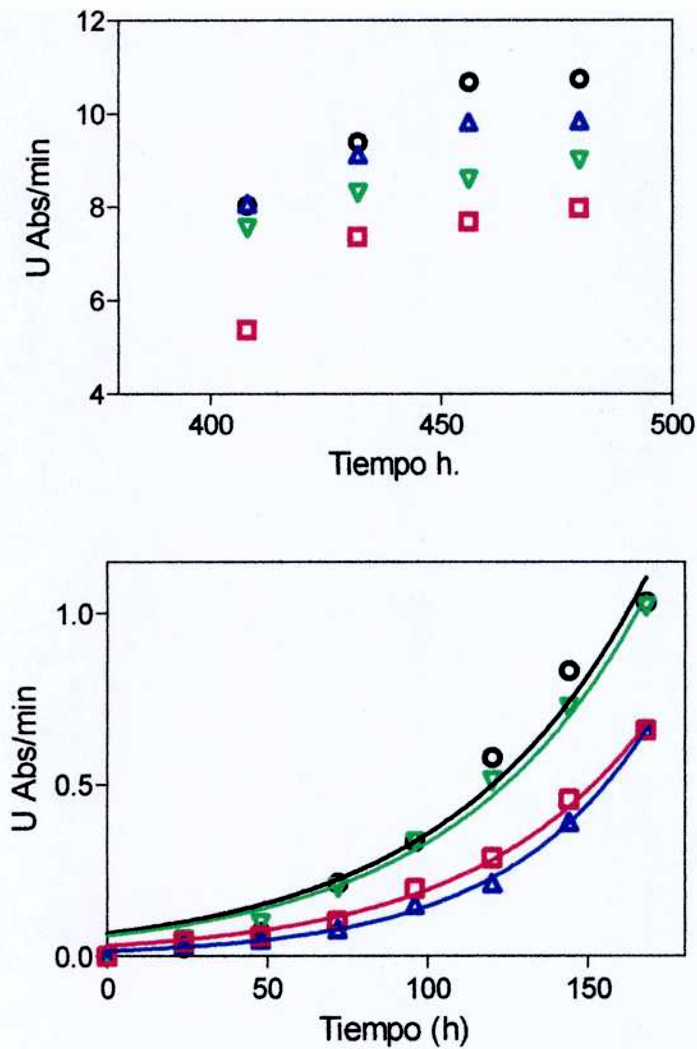


Figura 4.26 Inhibición del pardeo no enzimático desde las 0 h hasta las 178 h (izq.), de las 400 h a las 480 h (der.) para los sistemas control (○), cebolla (▽), Coliflor (△) y repollo (□).

Con los datos presentados en la figura 4.26 a se calcularon las velocidades iniciales del desarrollo de color empleando el siguiente modelo:

$$A = A_0 \cdot \exp(K \cdot t)$$

- Donde A_0 corresponde al valor de la absorbancia a tiempo cero (a 420 nm)
- K es la constante cinética del ajuste y t el tiempo.

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 4.8

Tabla 4.8 Constantes cinéticas, absorbancias máximas y porcentaje de inhibición de las absorbancias máximas para los sistemas conteniendo los extractos inhibitorios.

Sistemas	K_i (U.A./g)/s	$A_{Máx.}$ (U.A./g)	% de inhibición de la $A_{Máx.}$
Glucosa/Glicina	0,01663	10,8	0
Glucosa/Glicina/Cebolla	0,01695	9,0	16,7
Glucosa/Glicina/Coliflor	0,02216	7,8	27,8
Glucosa/Glicina/Repollo	0,01832	7,8	27,8

Productos e intermediarios de la compleja reacción de Maillard se caracterizan por su fluorescencia y con el tiempo llevan a la formación de pigmentos pardos y/o formación de entrecruzamientos. La composición del medio (pH, presencia de sales) y de factores ambientales (temperatura, humedad a la que el producto está expuesto) determinan la cinética de las reacciones.

Cuando se excitó a 340 nm, los espectros de emisión de fluorescencia de las muestras estudiadas presentaron un pico a 450 nm el cual fue utilizado para cuantificar los compuestos fluorescentes mediante una curva de calibración realizada con quinina según fue descrito en la sección 3.2.2.5.

Los valores obtenidos de unidades de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 340 nm y de emisión a 450 nm (corregidos por las diluciones realizadas) se muestra en la figura 4.27.

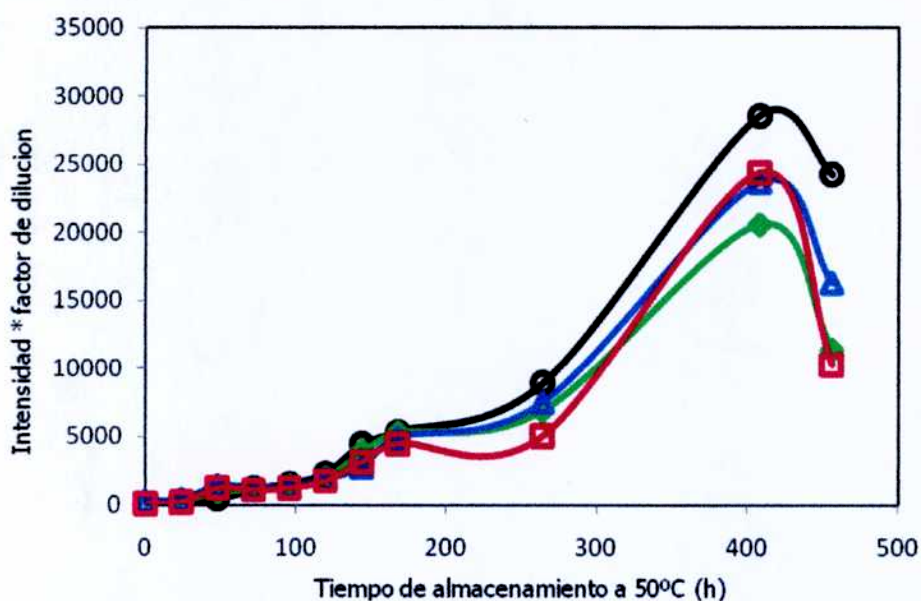


Figura 4.27 Desarrollo de fluorescencia en sistemas glucosa-glicina sometidos a tratamiento térmico a 70°C para los sistemas control (○) y en presencia de extractos inhibidores cebolla (▽), Coliflor (△) y repollo (□). Los intervalos de confianza se encuentran por debajo de los símbolos, siendo más pequeños que el tamaño de estos.

En la Figura 4.27 se observa el aumento de la intensidad de fluorescencia en función del tiempo para cada sistema conteniendo glucosa, glicina y cada uno de los extractos acuosos estudiados. La curva de desarrollo de fluorescencia presenta también distintas etapas, inicialmente el desarrollo es lento, luego aumenta la velocidad de generación de compuestos fluorescentes, pasa por un máximo y luego cae. Esto demuestra que los compuestos fluorescentes generados se comportan como intermediarios de la reacción. Por otro lado, los extractos agregados provocaron una cierta inhibición del desarrollo de fluorescencia a tiempos intermedios, dentro del periodo analizado, siendo el sistema conteniendo extracto de repollo el que presentó diferencias significativas con respecto al control. Además, los extractos provocaron la disminución del máximo valor de fluorescencia alcanzado. La eficiencia de la inhibición fue: cebolla > repollo=coliflor.

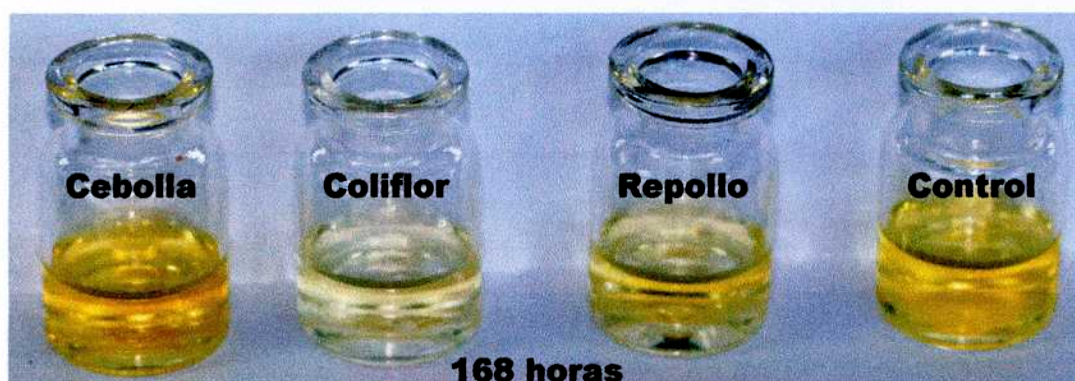


Figura 4.28 Galerías de imágenes de la evaluación de la inhibición de la reacción de pardeamiento no enzimático en sistemas glucosa-glicina en presencia de los extractos inhibitorios y luego de 168 horas de incubación a 50°C.

4.2.1.2 Pardeo no enzimático en rodajas de manzana frescas embebidas en los extractos inhibitorios, escaldadas al vapor, y tratadas a 70°C.

En esta sección se analizó el efecto inhibitor de los extractos vegetales de cebolla, coliflor y repollo sobre la reacción de pardeamiento no enzimático en rodajas de manzana previamente escaldadas para evitar la interferencia del pardeamiento enzimático. Para ello, se estudió el desarrollo de color a través del análisis de imágenes de rodajas de manzana.

Las rodajas de manzana fueron escaldadas en vapor de agua a 90°C por 3 minutos y luego el material fue embebido en los extractos de cebolla, coliflor y repollo y finalmente tratado a 70 °C.

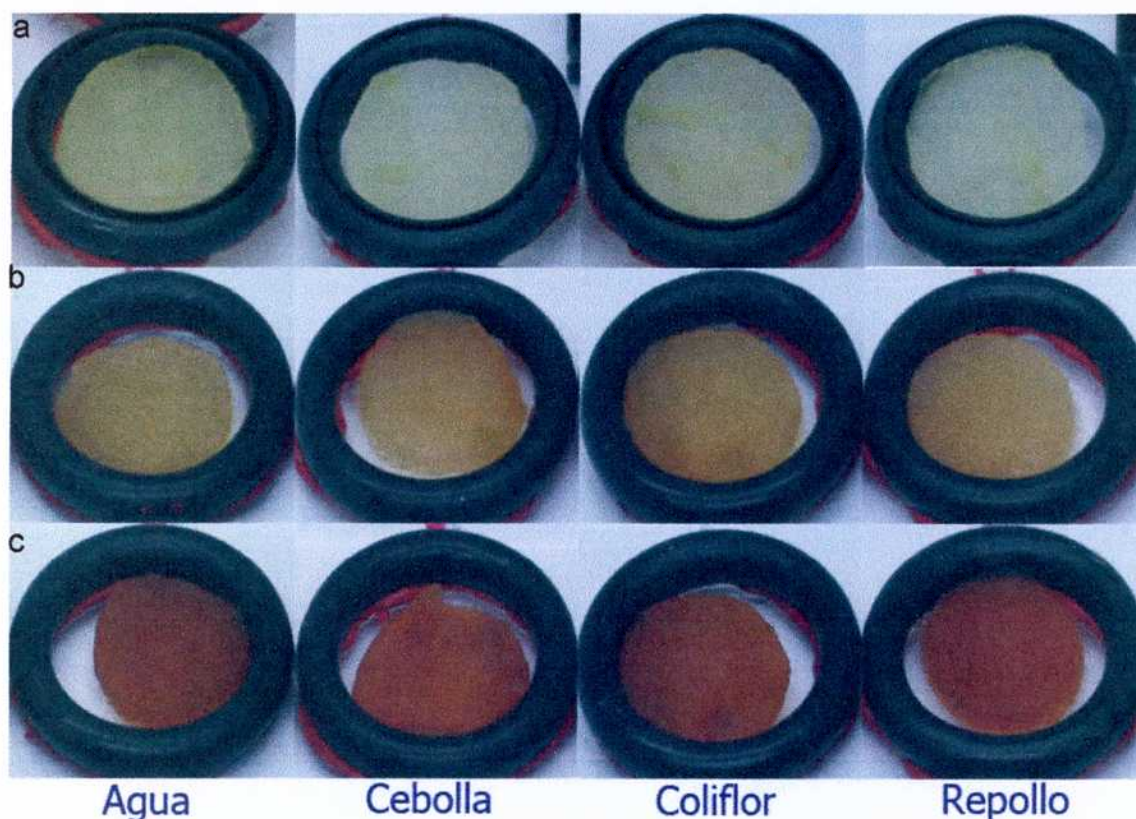


Figura 4.29. Galerías de imágenes de la evaluación de la inhibición del pardeamiento no enzimático en rodajas de manzana escaldadas y posteriormente embebidas en extractos inhibitorios a diferentes tiempos de almacenamiento a 70°C y almacenados a 0 horas (a), 28 horas (b) y 72 horas (c).

En la figura 4.29 se pueden observar las imágenes obtenidas durante el almacenamiento del material conteniendo el extracto inhibidor. El desarrollo de color durante el almacenamiento a 70°C producida por la reacción de pardeamiento provocó cambios rápidamente en el material, ya que a las 28 horas de tratamiento puede distinguirse un color diferente con respecto al inicial. En estas imágenes no se aprecia una diferencia en el color de las muestras embebidas en agua o con los distintos extractos estudiados.

En la figura 4.30 se encuentran graficados los valores de los parámetros de color obtenidos a partir de las imágenes de las rodajas de manzana.

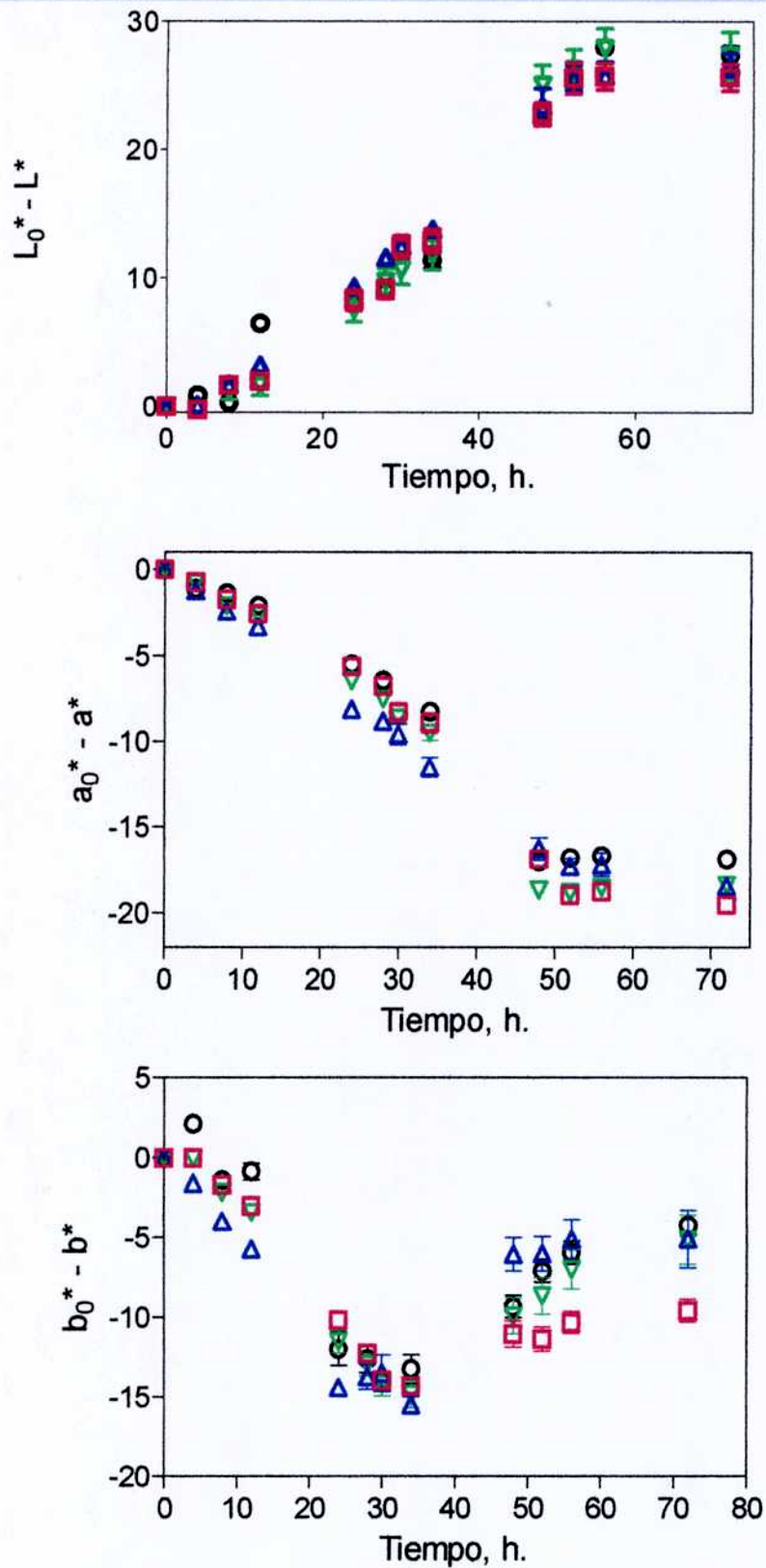


Figura 4.30 Evolución de las coordenadas de color (en el sistema CIELAB) por pardeo no enzimático en rodajas de manzana escaldadas, en función del tiempo de almacenamiento a 70°C, con respecto al valor inicial. a) cambio de luminosidad ($L_0^* - L^*$); b) cambios en la coordenada a^* ($a_0^* - a^*$); cambios en la coordenada b^* ($b_0^* - b^*$). Para los sistemas control (○), cebolla (▽), Coliflor (△) y repollo (□).

4. Resultados y Discusión

En ella puede observarse que la luminosidad del material representada por la variable $L_0^* - L^*$ (Fig 4.29a) cambia con el tiempo de almacenamiento mostrando para todos los extractos el mismo comportamiento que el control. En el caso de las variables cromáticas a^* (Fig 4.29b) y b^* (Fig. 4.2c) se presenta la misma tendencia que la obtenida para la luminosidad, siendo esta última la que más diferencias presenta. Esto indicaría que los extractos vegetales no tienen un efecto inhibitor importante sobre la reacción de pardeamiento no enzimático que se desarrolla en rodajas de manzana frescas.

RESUMEN DE RESULTADOS

- Se obtuvo un extracto de manzana con actividad PFO y extractos vegetales de cebolla, repollo y coliflor con potencial acción inhibitoria de la actividad PFO debido a su contenido en compuestos azufrados.
- Se caracterizaron las condiciones óptimas de pH y temperatura y la cinética de la actividad de PFO extraída de manzana, empleando catecol como sustrato, obteniéndose las constantes K_M y $V_{Máx}$.
- Los extractos vegetales liofilizados se ensayaron a dos concentraciones, conteniendo 2g y 0,2g de sólidos por 100 mL de buffer. Los extractos más concentrados presentaban un aroma de alto impacto y el empleo de una baja concentración disminuyó notablemente el aroma.
- El grado de inhibición se calculó a través de la constante cinética de pardeamiento y de la absorbancia máxima alcanzada en los extractos.
- Considerando la máxima absorbancia obtenida en los sistemas líquidos con actividad PFO de manzana, se verificó que todos los extractos tienen capacidad inhibitoria del pardeo enzimático, destacándose como más efectivo el extracto de coliflor y en el orden de efectividad coliflor>repollo>cebolla a altas concentraciones del extracto inhibitorio y coliflor>cebolla>repollo a bajas concentraciones del extracto agregado.
- Considerando la constante cinética a altas concentraciones de extracto, la efectividad fue coliflor>cebolla>repollo, mientras que a bajas concentraciones cebolla>coliflor>repollo.
- Es de destacar que teniendo en cuenta la apariencia final del producto interesa el mínimo desarrollo de color. El extracto de cebolla inhibe bien la

velocidad de desarrollo de color pero no es efectiva para impedir un extenso grado de pardeo al final de las reacciones. El extracto de coliflor inhibe ambas variables y por lo tanto es el más efectivo.

- Para las concentraciones más altas los extractos de coliflor, cebolla y repollo tuvieron un desempeño comparable a una concentración de metabisulfito de 10 ppm que es el límite máximo permitido por la FDA y la UE. Más aún, debido al distinto comportamiento de las curvas cinéticas, los sistemas con sulfito tienen un desarrollo de color más lineal en función del tiempo, lo que hace que a tiempos largos se logre un pardeamiento mayor en ellos.
- Mediante el análisis de imágenes de manzana liofilizadas y posteriormente embebidas en los extractos inhibitorios nuevamente se verificó que en los sistemas que el extracto de coliflor ofreció mayor grado de inhibición. Los extractos de cebolla y repollo tuvieron mucha menor efectividad, aunque medible.
- De las variables de color, la luminosidad fue la que reflejó más sensiblemente los cambios observados. El cambio fue muy bajo en el plano cromático (a^* , b^*) y el cambio de color global ΔE_{00} no ofreció información sobre el desplazamiento cromático de las muestras.
- La mayor efectividad del extracto de coliflor percibida visualmente se verificó además tanto por la constante cinética de la curva ($L_0^* - L^*$) vs tiempo como por el valor máximo de ($L_0^* - L^*$) alcanzado que refleja el oscurecimiento total.
- En otro conjunto de experimentos, las muestras de manzana se embebieron en los extractos inhibitorios antes de liofilizarlas y luego se

4. Resultados y Discusión

equilibraron a tres humedades relativas (HR = 11, 43 y 84%). Independientemente del extracto enzimático empleado, la actividad enzimática estaba inhibida en las muestras de HR 11 y 43%, debido a la baja movilidad molecular en dichas condiciones, en que todos los sistemas tuvieron comportamiento similar, y comparable al control. A 84% de HR la enzima mostró actividad pero bajo estas condiciones los tiempos necesarios para observar oscurecimiento se prolongados hasta casi un mes y no se manifestaron diferencias muy notorias con respecto a las muestras control. Los impedimentos cinéticos dados por la baja humedad probablemente enmascaran y limitan el efecto inhibitor de los extractos. Los efectos inhibitorios en este experimento se manifestaron más nítidamente a la humedad relativa de 93%, y en este caso el grado de inhibición alcanzado empleando los extractos fue similar al obtenido en los sistemas liofilizados y luego embebidos en los extractos.

- Los extractos de cebolla, coliflor y repollo tuvieron efecto inhibitorio sobre las distintas etapas de la reacción de Maillard. Algunos de ellos afectaron fundamentalmente la etapa inicial (repollo, coliflor) y otros el máximo de intensidad de color en la etapa final (repollo, cebolla). Por otro lado, la inhibición se manifestó también en la formación de productos fluorescentes. En este caso fue el extracto de cebolla el que inhibió mayormente la formación de dichos productos.
- El efecto de los extractos de cebolla, repollo y coliflor sobre el pardeamiento no enzimático de rodajas de manzana escaldadas y sometidas a tratamiento térmico a 70°C fue mucho menos notorio.

5. Conclusiones

En este trabajo de Tesis se demuestra que es posible obtener extractos vegetales con componentes naturales para su aplicación en reemplazo de aditivos sintéticos o cuya presencia no es natural, como los sulfitos.

Los agentes sulfitantes han sido ampliamente utilizados a lo largo de la historia debido a sus múltiples funciones (son agentes conservadores fungicidas, micostáticos y bacteriostáticos, antipardeo y antioxidantes). Dada su versatilidad y costo, se emplean en productos farmacéuticos, bebidas y alimentos. Sus desventajas desde el punto de vista nutricional y toxicológico, discutidos en esta tesis, si bien han provocado restricciones en su uso, no han podido contrarrestar sus ventajas tecnológicas. De esta manera, se hace importante la búsqueda de agentes alternativos.

En este trabajo se demostró que los extractos ensayados de repollo, coliflor y cebolla (previamente escaldados) presentaron actividad inhibitoria tanto sobre el pardeamiento enzimático sobre la formación de intermediarios y pigmentos de la reacción de Maillard. Además, se observó cierto efecto antifúngico o fungistático, sin que se haya profundizado en este último aspecto.

En particular, de los extractos estudiados, el de coliflor produjo la mayor inhibición de la actividad polifenoloxidasas e inhibió la producción de pigmentos pardos e intermediarios de la reacción de Maillard.

Estos extractos pudieron liofilizarse adecuadamente en matrices de maltodextrina, presentaron buena estabilidad y esto permitió su fácil manejo durante todo el periodo que duraron los experimentos de esta tesis.

Se destacan además, dentro de las metodologías empleadas, el valor de los métodos de análisis de imágenes por ser no destructivo, sensible y de fácil

implementación y de análisis de fluorescencia para identificar reacciones tempranas.

Las características organolépticas de los extractos estudiados son aspectos que podrían afectar el empleo comercial de los mismos, y queda por resolver este aspecto. Por el momento tendrían aplicación para productos en que sus aromas no afectaran negativamente o que inclusive podrían aportar un atractivo adicional (carnes, pescados, vegetales procesados como papas fritas o vegetales frescos como berenjenas o champiñones).

Ya que los extractos de diferentes fuentes tuvieron impacto en distintas fases de las reacciones (algunos afectando las etapas iniciales, otros la velocidad y otros la absorbancia o fluorescencia máximas), la combinación de varios de ellos podría considerarse una alternativa interesante para ensayos futuros. Por lo tanto, estos extractos o algunos de sus componentes purificados podrían considerarse como agentes antioxidantes (por inhibir la oxidación enzimática de polifenoles) y antipardeo. Además, la aplicación simultánea de ácido ascórbico podría representar una alternativa no analizada en esta tesis.

En pasos posteriores de la investigación, identificando específicamente los compuestos presentes en los extractos que poseen los beneficios mencionados, se podrá avanzar en los mecanismos involucrados y en aspectos básicos de los efectos observados. Sin embargo, en cuanto a los aspectos aplicados, la utilización de componentes purificados podría generar costos excesivos para que su producción y su uso sean competitivos. Si bien, durante los experimentos de la tesis los extractos mantuvieron su actividad inhibitoria, otro punto importante a evaluar es la conservación de dicha actividad de los

5. Conclusiones

extractos liofilizados en el tiempo de almacenamiento por periodos más prolongados.

Los extractos vegetales analizados representan de esta forma un paso inicial para la obtención de sustitutos del sulfito, que tantos problemas de índole nutricional y toxicológico conllevan.

6. Bibliografía

- Adhikari, H. R. (1973). Fluorescent products in a glucose-glycine browning reaction. *Journal of Food Science* 38: 486-488.
- Agudelo Laverde, L.M., Acevedo, N., Schebor, C. y Buera, M.P. (2011). Integrated approach for interpreting browning rate dependence with relative humidity in dehydrated fruits. *LWT-Food Science and Technology* 44: 963-968.
- Aguilera J., y Briones, V. (2005). Computer vision and food quality. *Food Aust.*, 57 (3): 79-87.
- Aguilera J., y Stanley, D. (1999). Microstructural principles of food processing and engineering. Lancaster: Aspen Publishers, EEUU.
- Ajandouz, E. H. y Puigserver, A. (1999). Nonenzymatic browning reaction of essential amino acids: effect of pH on caramelization and Maillard reaction kinetics. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 1786-1793.
- Altunkaya, A. y Gökmen, V. (2008). Effect of various inhibitors on enzymatic browning, antioxidant activity and total phenol content of fresh lettuce (*Lactuca sativa*). *Food Chem.*, 107: 1173-1179.
- Andersen, S.O.; Peter, M.G. y Roepstorff P. (1996). Cuticular sclerotization in Insects. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 113:689-705.
- Aydemir T. (2004). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads. *Food Chemistry*, 87: 59-67.
- Baker, E. H. y Bradford, K. J. (1994). The fluorescence assay for Maillard product accumulation does not correlate with seed viability. *Seed Sci. Res.* 4: 103-106.
- Balasundram, N., Sundram, K. y Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1): 191-203.
- Baurin, N., Arnoult, E., Scior, T., Do, Q.T. y Bernard, P. (2002). Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. *Journal of Ethnopharmacology* 82: 155-158.
- Bell, L. N. (1997). Maillard reaction as influenced by buffer type and concentration. *Food Chem*, 1: 143-147

- Billaud C., Roux, E., brun-Merimee, S., Maraschin, C y Nicolas, J. (2003). Inhibitory effect of unheated and heated D-glucose, D-fructose and L-cysteine solution and Maillard reaction product model system on polyphenoloxidase from apple. I. Enzymatic browning and enzyme activity inhibition using spectrophotometric and polarographic methods. *Food Chemistry* 81(1): 35-50.
- Billaud, C., Brun-Merimee, S., Louarme, L. y Nicolas, J. (2004). Effect of glutathione and Maillard reaction products prepared from glucose or fructose with glutathione on polyphenoloxidase from apple-I: enzymatic browning and enzyme activity inhibition. *Food Chem.* 84, 223–233.
- Birlouez-Aragón, I., Sabat, P. y Gouti, N. (2002) A new method for discriminating milk heat treatment. *Int. Dairy J.* 12: 59-67.
- Bittner, S. (2006) When quinones meet amino acids: chemical, physical and biological consequences. *Amino Acids* 30, 205-224.
- Blanka, I., Davidekb, T., Devauda, S. y Cletyb, N. (2002). Analysis of Amadori compounds by high performance anion exchange chromatography–pulse amperometric detection. *International Congress Series*, 1245: 263-267.
- Buera, M. P., Chirife, J., Resnik, S. L., y Wetzler, G. (1987) Nonenzymatic browning in liquid model systems of high water activity: kinetics of color changes due to Maillard's reaction between different single sugars and glycine and comparison with caramelization browning. *J. Food Sci.* 52: 1063-1067.
- Burin, L. y Buera, M.P. (2001) β - galactosidase activity as affected by apparent pH and physical properties of reduced moisture systems. *Enzyme and Microbial Technol.* 30:367-373.
- Burton, H. S., Mc Weeny, D. J., Pandhi, P. N. y Biltcliffe, D.O. (1962). Fluorescent compounds and non-enzymatic browning. *Nature.* 98: 4858, 948-950.
- Brownlee, M., Cerami, A. y Vlassara, H. (1988). Advanced products of nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic vascular disease. *Diabetes Metab. Rev.*, 4: 437-451.
- Carabasa, M. y Ibarz, A. (2000). Kinetics of colour development in aqueous fructose systems at high temperatures. *Journal of the science of food and agriculture*, 80: 2105-2113.

- Cerruti, P., Resnik, S. L., Seldes, A. y Ferro Fontán, C. (1985). Kinetics of deteriorative reactions in food systems of high water activity: glucose loss, 5-HMF accumulation and fluorescence development due to non-enzymatic browning. *J. Food Sci.*, 50: 627-636.
- Danehy, J., y Pigman, W. (1951). Reactions between sugars and nitrogenous compounds and their relationship to certain food problems. *Adv. Food Res.*, 3: 241-290.
- da Silva, R. Cheynier, J.M., Bouquet, V, Moutounet, J.M., Cabanis, M.J.C. y Bourzeix, M. (1991). Interaction of grape seed procyanidins with various proteins in relation to wine fining. *J. Sci. Food Agric.* 57, 111-125.
- Das J.R., Bhat, S.G. y Gowda, L.R. (1997). Purification and characterization of a polyphenol oxidase from the kew cultivar of Indian pineapple fruit. *J. Agric. Food Chem.* 45: 2031-2035.
- Davies, C. G. A., Netto, F. M., Glassenap, N., Gallaher, C. M., Labuza, T. P. y Gallaher, D. D. (1998). Indication of the Maillard reaction during storage of protein isolates. *J. Agric. Food Chem.* 46: 2485-2489.
- Ding, C. K., Chachin, K., Ueda, Y. y Wang, C. Y. (2002). Inhibition of loquat enzymatic browning by sulfhydryl compounds. *Food Chemistry* 76: 213–218.
- Ding, B., Song, T., Liu, Z. y Zhang, L. (2004) Investigation of the interaction between flavonoids and human serum albumin. *J. Molecular Structure* 703, 37-45.
- Eissa, H. A., Fadel, H. H. M., Ibrahim, G. E., Hassan, I. M. y AbdElrashid, A. (2006). Thiol containing compounds as controlling agents of enzymatic browning in some apple products. *Food Research International*, 39: 855–863.
- Ellis, G. (1959). The Maillard Reaction. En: M.L. Wolfrom (Ed.), *Advances in Carbohydrate Chemistry*, 63-134. New York: Academic Press.
- Ericksson, C.E. (1987). Oxidation of lipids in food systems. In: HWS Chan editor. *Autoxidation of Unsaturated Lipids*. Academic Press London: 207-231.
- Fahey, J.W, Zalcmann, A.T. y Talalay, P. (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants, *Phytochemistry* 56 5–51.

- Fennema, O. (1996). Fennema (Ed.). New York: Marcel Dekker.
- Friedman, M. (1996) Food browning and its prevention: an overview. J. Agric. Food Chem. 44, 631-653.
- Friedman, M., Molnár-Perl, I. y Knighton, D.R. (1992) Browning prevention in fresh and dehydrated potatoes by SH-containing amino acids. Food Addit Contam. 9:499-503.
- Gasull, E. y Becerra, D. (2006). Characterization of Polyphenoloxidase extracted from pears (cv. Packam's Triumph) and apple (cv. Red Delicious). Inf. Technol., 17 (6) 69-74.
- García-Molina, F., Muñoz, J.L., Varón, R., Rodríguez-López, J.N., García-Cánovas, F. y Tudela, J. (2007). A Review on Spectrophotometric Methods for Measuring the Monophenolase and Diphenolase Activities of Tyrosinase. J. Agric. Food Chem., 55(24): 9739–9749.
- Gardner, H.W. (1979). Lipid hydro peroxide reactivity with proteins and amino acid: A review. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 27(2): 220-229.
- Ge, S-J. y Lee, T-C. (1996). Effective HPLC method for the determination of aromatic Amadori compounds. J. Agric. Food Chem., 44: 1053 -1057.
- González, E.M., de Ancos, B. y Cano, M.P. (1999). Partial Characterization of Polyphenol Oxidase Activity in Raspberry Fruits. J. Agric. Food Chem. 47: 4068–4072.
- Gonzalez, R., y Woods, R. (1992). Digital imaging processing. Boston, USA: Addison-Wesley Longman Publishing Co. Inc.
- Goupy, P., Amiot, M.J., Richard-Forget, F., Duprat, F., Aubert, S. y Nicolas, J. (1995). Enzymatic browning of model solution and apple phenolic substrates by apple polyphenoloxidase. J Food Sci 60(3):497–501.
- Greenspan. L. (1977) Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. J. Res. 81 (A): 89-96.
- Griffiths, G., Trueman, L., Crowther, T., Thomas, B. y Smith, B. (2002). Onions, A global benefit to health. Phytotherapy Research, 16(7): 603–615.
- Guerrero Eraso, C.A. (2009). Inhibición de la actividad enzimática de la polifenol oxidasa extraída del banano (*cavendish valery*) mediante sistemas bifásicos acuosos con isoespintanol y ácido ascórbico. Trabajo

- de grado para optar al título de Magíster en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Medellín – Colombia.
- Hammer, F.E. (1993). Oxidoreductases: p. 221-227. En: T. Nagodawithana y G (eds). *Enzymes in Food Processing*. Academic Press, San Diego C
- Hicks, K. B., Sapers, G. M. y Seib, P. A. (1990). Process for preserving raw fruit and vegetable juices using cyclodextrin and compositions. US Patent (4): 975,293
- Hidalgo, F.J., Gallardo, E. y Zamora, R. (2005). Strecker type degradation of phenylalanine by 4-hydroxy-2-nonenal in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(26): 10254-10259.
- Jayas, D., Paliwal, J., y Visen, N. (2000). Multi-layer neural network for image analysis of agricultural products. *J. Agric. Eng. Res.*, 77: 119-128.
- Janovitz-Klapp, A.H., Richard, F.C., Goupy, P.M. y Nicolas, J.J. (1990). Inhibition studies on apple polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 38: 926–931.
- Jones, M.G., Hughes, J., Tregova, A., Milne, J., Tomsett, A. B. y Collin, H.A. (2004). Biosynthesis of the flavour precursors of onion and garlic *J. Exp Bot.* 55:1903-1918.
- Kavrayan D. y Aydemir T. (2001). Partial purification and characterization of polyphenoloxidase from peppermint (*Mentha piperita*). *Food Chem.* 74: 147-54.
- Kawai, K., Hagiwara, T., Takai, R. y Suzuki, T. (2004). Maillard reaction rate in various glassy matrices. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68: 2285-2288.
- Kim, J. y Uyama, H. (2005). Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 1707–1723.
- Kim, M., Kim, C. Y. y Park, I. (2005). Prevention of enzymatic browning of pear by onion extract. *Food Chemistry* 89: 181–184.
- Labuza, T.P., Fu, B. y Taoukis, P.S. (1992). "Prediction for Shelf Life and Safety of Minimally Processed CAP/MAP Chilled Foods," *J. Food Prot.*, 55(10): 741-750.
- Labuza, T. P. (1994). Interpreting the complexity of the kinetics of the Maillard reaction. En: "Maillard reactions in chemistry, food and health". The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 176-181.

- Labuza, T. y Baiser W. (1993). The kinetics of nonenzymatic browning. En: "Physical chemistry of foods". Academic Press. USA. Cap. 14.
- Lambrecht, H. S. (1995). Sulfite substitutes for the prevention of enzymatic browning in foods. *Enzymatic Browning and its Prevention*, 600: 313–323.
- Leclère, J. y Birlouez-Aragon, I. (2001) The fluorescence of advanced Maillard products is a good indicator of lysine damage during the Maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.* 49: 4682-4687.
- Lee, C. M., Sherr, B. y Koh, Y. (1984). Evaluation of kinetic parameters for a glucose-lysine Maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.*, 32: 379-382.
- León, K., Mery, D., Pedeschi, F. y León, J. (2006). Color measurement in L* a* b* units from RGB digital images. *Food research international*. 39: 1084-1091.
- Lineweaver, H. y Burk, D. (1934). The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *Journal of the American Chemical Society* 56 (3): 658-666.
- Luo Y. y Barbosa-Canovas GV. (1997). Enzymatic browning and its inhibition in new apple cultivars slices using 4-hexylresorcinol in combination with ascorbic acid. *Food Sci Technol Int* 3(3):195–201.
- Lowe, C.R. y Thomas, J.A. (1996). Purification and Analysis of Enzyme Preparations: 9-33. En: P.C.Engel (ed.). *Enzymology*. Academic Press, San Diego Ca.
- Lozano, R. (1978). *El color y su medición*. Buenos Aires: Editorial América Lee.
- Lu, S., Luo, Y. y Feng, H. (2006). Inhibition of apple polyphenol oxidase activity by sodium chlorite. *J. Agric. Food. Chem.* 54: 3693–3696.
- Maillard, L. y Gautier, M. (1912). Actino des acides amines sur les sucres: Formation des melanoidines par voie methodique. *Comp. Rend. Acad. Sci.*, 154: 66-68.
- Manzocco, L., Cagliari, S., Mastrocola, D., Nicoli M.C. y Lerici, C.R. (2001). Review of nonenzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Trens Food Sci. Technol.* 11, 340-346.
- Martínez, M.V. y Whitaker, J.R. (1995). The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science y Technology*, 6: 195-200.

- Matiacevich, S. B., Santagapita, P. R. y Buera, M. P. (2005). Fluorescence from the Maillard reaction and its potential application in food science. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.*, 45: 483-495.
- Matiacevich, S.B. (2008) Caracterización y fotoestabilidad de compuestos fluorescentes y pardos generados en reacciones enzimáticas y no enzimáticas. Implicancias en la conservación de materiales orgánicos. Tesis de investigación para optar al título de doctor en la Universidad de Buenos Aires, en el área Industrias. Argentina.
- Matiacevich, S. B. y Buera, M. P. (2006). A critical evaluation of fluorescence as a potential marker for the Maillard reaction. *Food Chem.*, 95: 423-430.
- Matiacevich, S. B., Castellión, M. L., Maldonado, S. B. y Buera, M. P. (2006). Thermal transitions of quinoa embryos and seeds as affected by water content. En: "Water properties of food, pharmaceutical and biological materials". P. Buera, J. Welte-Chanes, H. Corti, P. Lillford (Eds.). CRC Press, Argentina (9): 565-570.
- Mauron, J. (1981). The Maillard reaction in food: A critical review from the nutritional stand point. *Prog. Food Nutr. Sci.*, 5: 5.
- Mayer, A.M. (2006). Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review. *Phytochemistry* 67: 2318–2331.
- McEvily, A.J., Iyengar, R. y Otwell, W.S. (1992). Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Critical reviews in food science and nutrition*, 32(3): 253-273.
- Moeder, M.; Martin, C. y Koeller, G. (2004). Degradation of hydroxylated compounds using laccase and horseradish peroxidase immobilized on microporous polypropylene hollow fiber membranes. *Journal of Membrane Science* 245:183-190.
- Molnar-Perl, I. y Friedman, M. (1990)a. Inhibition of browning by sulfur amino acids. 2. Fruit juices and protein-containing foods. *J. Agric. Food Chem.*, 38(8): 1648–165.
- Molnar-Perl, I. y Friedman, M. (1990)b. Inhibition of Browning by Sulfur Amino Acids. 3. Apples and Potatoes. *J. Agric. Food Chem.* 38. 1652-1656.
- Moon, K. D., Son, S., y Lee, C. Y. (1999). Inhibitory effects of various antibrowning agents on apple slices. IFT Annual Meeting. Book of abstracts, Vol. 79D-45 (p. 227).

- Monsalve-Gonzalez, A., Barbosa-Canovas, G. V., Cavalieri, R. P., McEvily, A. J., y Iyengar, R. (1993). Control of browning during storage of apple slices preserved by combined methods. 4-Hexylresorcinol as anti-browning agent. *Journal of Food Science*, 58(4): 797–800.
- Morales, F. y Jiménez, S. (2001). Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Food chemistry*, 72: 119-125.
- Morales, F. J., Romero, C. y Jiménez-Pérez, S. (1996) Fluorescence associated with Maillard reaction in milk and milk-resembling systems. *Food Chem.* 57: 423-428.
- Moreno, D. A.; Carvajal, M.; López-Berenguer, C. y García-Viguera, C. (2006). Chemical and biological characterization of nutraceutical compounds of broccoli. *J Pharm Biomed Anal* 41:1508-1522.
- Negishi, O., Negishi, Y. y Ozawa, T. (2002). Effects of Food Materials on Removal of Allium-Specific Volatile Sulfur Compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 50 (13): 3856–3861.
- Neves, V.A., Gatte Picchi, D. y da Silva, M.A. (2009). Some Biochemical properties of polyphenoloxidase from spearmint (*Mentha arvensis*). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(4): 1001–1010.
- Nicolas, J.J., Richard-Forget, F.C., Goupy, P.M., Amiot, M.J. y Aubert, S.Y. (1994). Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Critical reviews in food science and nutrition*, 34(2): 109-157.
- Olcott, H. S. y Dutton, H. J. (1945) Chances in stored dried eggs: source of fluorescence. *Ind. Eng. Chem.* 37: 119-1122.
- Oms-Oliu, G., Rojas-Grau, M.A., Alandes-Gonzalez, L., Varela, P., Soliva-Fortuny, R., Hernando-Hernando, M.I., Perez-Munuera, I., Fiszman, S. y Martín-Belloso, O. (2010). Recent approaches using chemical treatments to preserve quality of fresh-cut fruit: A review. *Postharvest Biology and Technology*, 57(3): 139-148.
- Ono, E., Hatayama, M., Isono, Y., Sato, T., Watanabe, R., Yonekurasakakibara, K., Fukuchi-Mizutani, Tanaka, Y., Kusumi, T., Nishino, T. y Nakayama, T. (2006). Localization of a flavonoid biosynthetic polyphenol oxidase in vacuoles. *The Plant Journal* 45: 133-14

- Papadakis, S., Abdul-Malek, S., Kandem, R. y Yam, K. (2000). A versatile and inexpensive technique for measuring colour of foods. *Food technol.*, 54 (12): 48-51.
- Park, C. K. y Kim, D. H. (1983) Relationship between fluorescence and antioxidant activity of ethanol extracts of a Maillard browning mixture. *JAOCS*. 60: 22-26.
- Peschel, W., Sánchez-Rabaneda, F., Diekmann, W., Plescher, A., Gartzía, I., Jiménez, D., Lamuela-Raventós, R., Buxaderas, S. y Codina C. (2006). An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chemistry*, 97(1): 137-150.
- Pizzocarno, F., Torreggiani, D. y Gilardi, G. (1993). Inhibition of apple polyphenol oxidase by ascorbic acid, citric acid and sodium chloride *Journal of Food Processing and Preservation* 17:21–30.
- Pourcel, L., Routaboul, J-M., Cheynier, V., Lepiniec, L. y Debeaujon, I. (2007). Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends Plant Sci.*, 12 (1): 29-36.
- Price, N.C. y Stevens, L. (2001). Techniques for enzyme extraction: 209-224. En: R. Eisental y M.J. Danson (eds.). *Enzyme Assays*. Oxford University Press, Londres
- Prieto L, Paricio A, y Juyol M. (1989). Sulfitos en alimentos y bebidas. Un riesgo para algunos pacientes asmáticos. *Rev Esp Alergol Inmunol Clin* 4:29-35
- Reyes, F., Poocharoln, B. y Wrolstad, R. (1982). Maillard browning reaction of sugar-glycine model systems: Changes in sugar concentration, color and appearance. *J. Food Sci.*, 47: 1376-1377.
- Roldán, E.; Sánchez-Moreno, C., de Ancos, B. y Cano, M.P. (2008). Characterisation of onion (*Allium cepa* L.) by-products as food ingredients with antioxidant and antibrowning properties. *Food Chemistry* 108: 907–916.
- Roquesa-Mayorga, V. y Higuera M., B.L. (2007). Isolation and characterization of a Polyphenoloxidase related with Carnation (*Dianthus caryophyllus*) resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi* raza 2. *Acta bot. Colomb.* 12(2): 81-94.

- Rosa, E.A.S. y Heaney, R.K. (1993). The effect of cooking and processing on the glucosinolate content: Studies on four varieties of portuguese cabbage and hybrid white cabbage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 62(3): 259–265.
- Ruiz-Capillas Pérez, C. y Jiménez-Colmenero, F. (2009). Aplicación de análisis de inyección de flujo en la determinación de sulfitos en alimentos. *Alimentaria* 407.
- Rufian-Henares, J. A., Guerra-Hernandez, E. y García-Villanova, B. (2002) Maillard reaction in enteral formula processing: furosine, loss of o-phthalaldehyde reactivity, and fluorescence. *Food Res. Int.* 35: 527-533.
- Sapers, G. M., Hicks, K. B., Phillips, J. G., Garzarella, L., Pondish, D. L., Matulaitis, R. M., McCormack, T. J., Sondey, S. M., Seib, P. A., y El-Atawy, Y. S. (1989). Control of enzymatic browning in apple with ascorbic acid derivatives, polyphenol oxidase inhibitors, and complexing agents. *Journal of Food Science*, 54(4): 997–1002.
- Schwimmer, S. y Olcott, H. (1953). Reaction between glycine and the hexose phosphates. *J. Am. Chem. Soc.* 75: 4835-4842.
- Sharma, G., W. Wu y E.N. Dalal. (2005). The CIEDE2000 color difference formula: implementation notes, supplementary test data, and mathematical observations. *Color research and Applications* 30(1): 21-30.
- Sikorski, Z.E., (2007). *Chemical and Functional Properties of Food Components*. 3rd Ed., CRC Press, Boca Raton, USA, 544.
- Skoog, D.A; Crouch, y. Holler, J, 2008. *Principios de Análisis Instrumental* (6ta Edición) Cengage Learning Eds.
- Song, D. U., Jung, Y. D., Chay, D. O., Lee, K. H., Yang, S. Y., Shin, B. A. y Ahn, B. W. (2002). Effect of drinking green tea on age-associated accumulation of Maillard-type fluorescence and carbonyl groups in rat aortic and skin collagen. *Arch. Biochem. Biophys.* 397: 424-429.
- Sun, W. Q. y Leopold, C. (1995) The Maillard reaction and oxidative stress during aging of soybean seeds. *Physiol. Plant.* 94: 94-104.
- Tian, Q.; Rosselot, R.A. y Schwartz, S. J. (2005) Quantitative determination of intact glucosinolates in broccoli, broccoli sprouts, Brussels sprouts, and

- cauliflower by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 343:93-99
- US FDA. (1986). Sulfating agent: revocation of GRAS status for the use on fruits and vegetables served raw or sold to consumers. *Fed.Regist.* 51:25021–25026.
- Van Boekel, M. A. J. S. (1998). Effect of heating on Maillard reactions in milk. *Food chemistry*. 62: 403-414.
- Van Boekel, M. A. J. S. (2001). Kinetic aspects of the Maillard reaction: a critical review. *Nahrung/Food*. 45: 150-159.
- Vamosvigyazo, L. (1995). Prevention of enzymatic browning in fruits and vegetables, A review of principles and practice. *Enzymatic Browning and Its Prevention*, 600: 49–62.
- Vidal, S., Francis, L. y Guyot, S. (2003). The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *J. Sci. Food Agric.* 83, 564-573.
- Villamiel, M.D. del Castillo y N. Corso. (2006). Browning Reaction In: *Food biochemistry y food Processing*. Y.H. Hui Editor. Blackwell publishing. USA.
- Walker, J. R. L. (1995). Enzymatic browning in fruits: its biochemistry and control. In: C. Y. Lee, y J. R. Whitaker (Eds.), *ACS Symposium Series* (600). Enzymatic browning and its prevention, 8–22. Washington, DC: American Chemical Society.
- Weemaes, C.A., Ludikhuyze, L.R., Van den Broeck, I., Hendrickx, M.E. y Tobback, P.P. (1998). Activity, electrophoretic characteristics and heat inactivation of polyphenol oxidases from apples, avocados, grapes, pears and plums. *LWT*, 31: 44-49.
- Wen, L. y Wrolstad, R.E. (2005). Isolation of Enzymatic Browning 1 Inhibitors from Pineapple Juice. *Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements*. *J. Food Sci.*, 73: 4290-4302.
- Yaylayan, V. A. y Huyghues-Despointes, A. (1994). Chemistry of Amadori rearrangement products: analysis, synthesis, kinetics, reactions, and spectroscopic properties. *CRC Rev. Food Sci. Nutr.*, 34: 321–369.

6. Bibliografía

Zocca, F., Lomolino, G. y Lante, A. (2010). Antibrowning potential of Brassicaceae processing water. *Bioresource Technology* 101:3791–3795