



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Industrias

Potencial tecnológico de extractos vegetales en reemplazo de aditivos sintéticos para inhibir reacciones de deterioro en alimentos procesados y almacenados

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

Lic. Leonardo Cristian Favre

Director de tesis: Dra. María del Pilar Buera

Director asistente: Dra. María Florencia Mazzobre

Consejero de estudios: Dra. Stella Maris Alzamora

Lugar de trabajo: Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires e Instituto de Tecnología de Alimentos y Procesos Químicos (ITAPROQ), UBA-CONICET.

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2019

Fecha de defensa: 14 de marzo de 2019

Potencial tecnológico de extractos vegetales en reemplazo de aditivos sintéticos para inhibir reacciones de deterioro en alimentos procesados y almacenados

RESUMEN

Las reacciones de pardeo no enzimático (como la reacción de Maillard) modifican las características fisicoquímicas, funcionales y organolépticas de alimentos, nutraceúticos y cosméticos. Sin embargo, en los últimos años distintas organizaciones internacionales identificaron compuestos que se generan en alimentos como potencialmente tóxicos y/o cancerígenos. Algunos de ellos son furfurales y compuestos heterocíclicos (furanos, pirroles y piridinas) y acrilamida. Se detectaron en concentraciones variables dependiendo de la severidad del tratamiento térmico o de las condiciones de almacenamiento. La ocurrencia de reacciones oxidativas o radicalarias, por lo general, no se tienen en cuenta cuando se analizan los factores que intervienen en la cinética de la reacción de Maillard, y sin embargo las mismas afectan no sólo a los lípidos sino también a los azúcares y juegan un papel muy importante en el transcurso de la reacción y en los productos que se forman. El objetivo de esta tesis fue explorar fuentes naturales de inhibidores de reacciones de deterioro, en particular estudiar la relación entre acción antioxidante y efecto antiglicante. Se evaluó la efectividad de extractos de hierbas y especias seleccionadas, de las familias Piperaceae, Lamiaceae, entre otras, para mitigar reacciones de deterioro y/o reemplazar aditivos sintéticos. Se abordó el objetivo desde una perspectiva de una química limpia y libre de solventes orgánicos combinada con nuevas tecnologías para la optimización de la extracción de biomoléculas con las funcionalidades deseadas. Los extractos vegetales se prepararon empleando soluciones etanol-agua, o β -ciclodextrina-agua en combinación con ultrasonido para facilitar la extracción de biomoléculas con actividad antiradicalaria y reductora. Se optimizó la extracción de antioxidantes a través de la metodología de superficie de respuesta. Sobre los extractos obtenidos se estudió la capacidad antioxidante e inhibitoria del pardeo. Se evaluaron marcadores químicos de distintas etapas de la reacción de Maillard: furosina, hidroximetilfurfural, glicosilación mediante SDS-PAGE con tinción específica, y absorbancia a 420 nm. Los extractos naturales presentaron efecto inhibitorio en el siguiente orden: pimienta de Jamaica > tomillo > pimienta verde > negra > blanca. El contenido de polifenoles correlacionó con la actividad antiglicante, lo que indica que los caminos oxidativos que llevan a la formación de productos pardos tienen una importante influencia, además de la vía tradicional de generación de intermediarios a través del reordenamiento de Amadori. La transición vítrea en los extractos estabilizados por liofilización en trehalosa provocó disminución de la capacidad antioxidante acentuada por cristalización de la matriz. Los resultados obtenidos contribuirán a mejorar la seguridad alimentaria y mitigar la generación de intermediarios no deseables en el procesado térmico de alimentos, ampliando las aplicaciones tecnológicas de productos naturales.

Palabras claves: *Thymus vulgaris*. *Piper nigrum*. Antioxidantes. Antiglicantes. Maillard. β -Ciclodextrina.

Technological potential of plant extracts in the replacement of synthetic additives for inhibiting deteriorative reactions in processed and stored foods

ABSTRACT

Non-enzymatic browning reactions (such as the Maillard reaction) modify the physicochemical, functional and organoleptic characteristics of foods, nutraceuticals and cosmetics. However, in recent years different international organizations have identified compounds that are generated in foods as potentially toxic and/or carcinogenic. Some of them are furfural and heterocyclic compounds (furans, pyrroles and pyridines) and acrylamide. They were detected in variable concentrations depending on the severity of the heat treatment or storage conditions. The occurrence of oxidative or radical reactions, in general, are not taken into account when analyzing the factors involved in the kinetics of the Maillard reaction, and yet they affect not only the lipids but also the sugars and they play a very important role in the course of the reaction and in the products that are formed. The objective of this thesis was to explore natural sources of inhibitors of deteriorative reactions, in particular the relationship between antioxidant action and antiglycating effect was studied. The effectiveness of extracts of selected herbs and spices, from the families Piperaceae, Lamiaceae, among others, was evaluated to mitigate deteriorative reactions and/or replace synthetic additives. The objective was addressed in the framework of a clean chemistry and free of organic solvents, combined with new technologies that favor the extraction of biomolecules with the desired functionalities. The plant extracts were prepared using ethanol-water solutions, or β -cyclodextrin-water in combination with ultrasound to facilitate the extraction of biomolecules with antiradical and reducing activity. The extraction of antioxidants was optimized through the response surface methodology. On the obtained extracts, the antioxidant and inhibitory capacity of browning were studied. Chemical markers of different stages of the Maillard reaction were evaluated: furosine, hydroxymethylfurfural: furosine, hydroxymethylfurfural, glycosylation by SDS-PAGE with specific staining, and absorbance at 420 nm. The natural extracts had inhibitory effect in the following order: Jamaica pepper > thyme > green pepper > black pepper > white pepper. The content of polyphenols correlated with the antiglycating activity, which indicates that the oxidative pathways that lead to the formation of brown products have an important influence, in addition to the traditional way of intermediaries generation through the rearrangement of Amadori. The glass transition in the extracts stabilized in trehalose by freeze-drying, led to a decreased antioxidant capacity accentuated by the crystallization of the matrix. The obtained results contribute to improve food safety and to mitigate the generation of undesirable intermediaries in the thermal processing of foods, expanding the technological applications of natural products.

Key words: *Thymus vulgaris*. *Piper nigrum*. Antioxidants. Anti-glycants. Maillard. β -Cyclodextrin.

AGRADECIMIENTOS

En estos últimos años he experimentado muchos cambios que significaron ampliar el conocimiento sobre la ciencia, la tecnología y el desarrollo de los alimentos, como también los lazos socioculturales y humanos entre las personas, los cuales se desarrollaron durante el transcurso de mi posgrado. Hoy llegó el día de decir, que el producto de esos vínculos humanos y el conocimiento se pueden plasmar en la presente tesis doctoral. Es por lo que quiero agradecer a todos los que me acompañaron durante estos años.

Gracias para cada uno de ustedes...

A Pilar, mi directora, por brindarme la confianza, el espacio y acompañamiento para mi aprendizaje y desarrollo profesional. Por transmitirme los valores que deben acompañar al desarrollo del conocimiento con responsabilidad, ética, generosidad y calidez personal. ¡Muchas gracias Pilar, por tu confianza!

A Florencia, mi directora asistente, por el tiempo dedicado y el apoyo en el proceso de escribir esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio: Tatiana, Guido, Cristina, Verónica, Paula, Diego, Mario, Ignacio, Hernando, Rocío, Maite, Silvio, Beatriz, Patricio, Abel y Carolina. Gracias Paula y Cristina por los trabajos compartidos y por su ayuda en los momentos en que no todo parecía ir como uno lo deseaba, pero que ahí estuvieron presentes para hacer que todo siga por el camino adecuado. Gracias Mario y Guido por los buenos y lindos momentos compartidos en las estancias en España y Sudafrica. Gracias a mis compañeros de oficina, Tatiana, Guido y Verónica, por los muchos momentos de

trabajo, charlas y risas compartidos en estos años; sin dudas, que, sí algo nos une es la felicidad y juventud que nos contagia en cada día compartido. ¡Gracias a todos!

Al Dr. José Ángel Rufián Henares y su grupo por recibirme en su laboratorio de investigación en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, España, y permitirme desarrollar parte de mi tarea de investigación con total apoyo técnico y científico, gracias a Celeste por su colaboración.

A la Dra. Jessy van Wyk y su grupo por recibirme en el *Department of Food Technology* de la *Cape Peninsula University of Technology, Cape Town, South Africa*, y hacer posible el trabajo en sus laboratorios, gracias a Lusani y Ndumiso por su gran colaboración.

A la *Fundação de Amparo e Desenvolvimento da Pesquisa (FAPESP)* por la beca otorgada para participar de la escuela Internacional, *São Paulo School of Advanced Sciences in the Reverse Engineering of Processed Foods*, desarrollada en la *Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)*, Brasil.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por la beca doctoral otorgada y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (UBA) por el financiamiento y espacio de trabajo brindado para el desarrollo de la presente tesis.

A la Red Temática 415RT0495 del Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). Al programa de Proyectos de Desarrollo Tecnológico y Social (PDTS), al programa de Proyectos de Investigación Científica y Tecnológica (PICT) de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT), del Ministerio de Educación, Cultura, Ciencia y Tecnología de la Nación por el financiamiento recibido para el desarrollo de la presente tesis.

A Marta, mi mamá, y Carina, mi hermana, que, en la distancia están presentes y son importantes para mi.

A mis abuelos, que ya no están pero que fueron muy importantes en mi vida y que en parte hicieron que años más tarde pueda alcanzar este objetivo personal.

A Miguelina, mí tía, que descansas en un jardín de luz, que sin dudas hoy estarías muy feliz de verme cumpliendo este objetivo personal, hoy lo comparto contigo en mi corazón.

A Liliana, por haberme acompañado y alentado siempre a crecer y seguir mis deseos y objetivos, gracias siempre por tu ayuda.

A mis amigos: Enzo, Leonardo, Sebastián, María, Fernanda, Gonzalo y María que en estos años hicieron que vivir en Buenos Aires siempre tenga un momento de compartir sonrisas cómplices; a vos Enzo en especial por los años de amistad que nos unen y bancarme en los diversos momentos que vivimos.

A Dios y la vida, por dejarme ver el camino de las oportunidades y dejarme volar la imaginación.

Simplemente, ¡¡¡GRACIAS!!!

A Miguelina y Liliana

TABLAS DE CONTENIDOS



TABLAS DE CONTENIDOS

PORTADA	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
AGRADECIMIENTOS	4
TABLAS DE CONTENIDOS	9
TABLA DE FIGURAS	14
TABLA DE TABLAS	23
ABREVIATURAS	25
Capítulo 1. INTRODUCCIÓN	28
1.1. Reacciones químicas en alimentos	30
1.1.1. Pardeamiento no enzimático. Reacción de Maillard	30
1.1.2. Glicación de proteínas <i>in vitro</i>	35
1.1.3. Glicación de proteínas <i>in vivo</i>	38
1.2. Agentes inhibidores de reacciones de deterioro provenientes de fuentes vegetales	42
1.2.1. Antioxidantes naturales y su funcionalidad	44
1.2.2. Antiglicantes naturales	45
1.3. Fuentes de antioxidantes y antiglicantes	47
1.3.1. Pimientas	47
1.3.2. Fenogreco	50
1.3.3. Comino	51
1.3.4. Tomillo	51
1.3.5. Arroz salvaje y salvado de arroz	53
1.4. Principales compuestos fenólicos de las especias estudiadas	55

1.5. Tecnologías y solventes para la obtención de extractos inhibidores -----	59
1.5.1. Extracción asistida por ultrasonido-----	59
1.5.2. β -ciclodextrina como facilitador de extracción-----	60
1.6. Evaluación de la estabilidad de los extractos liofilizados, propiedades térmicas	63
1.7. Cambios de color producidos por las reacciones de pardeamiento -----	64
1.7.1. Análisis computarizado de imágenes -----	66
1.8. Metodología de superficie de multirrespuesta -----	67
1.8.1. Función deseabilidad -----	68
Capítulo 2. OBJETIVO GENERAL-----	72
2.1. Objetivos específicos -----	72
Capítulo 3. MATERIALES Y MÉTODOS -----	75
3.1. Materiales -----	75
3.2. Soluciones de extracción y obtención de los extractos -----	76
3.3. Caracterización de los extractos -----	77
3.3.1. Evaluación del contenido de polifenoles totales por Folin-Ciocalteu (FC)--	77
3.3.2. Evaluación de la actividad antioxidante antirradicalaria por el método del radical libre DPPH• -----	79
3.3.3. Evaluación de la capacidad antioxidante a través del poder reductor de hierro (FRAP)-----	81
3.4. Optimización de la extracción empleando soluciones acuosas de β -ciclodextrina por metodología de superficie de multirrespuesta -----	82
3.4.1. Diseño de experimento-----	82
3.5. Deshidratación de los extractos con capacidad antioxidante optimizada -----	84
3.6. Preparación de los sistemas modelo para el estudio de capacidad inhibitoria del pardeo -----	85
3.6.1 Controles -----	85
3.6.2. Estudio de la glicación proteica a temperaturas moderadas -----	85
3.6.3. Estudio de la glicación proteica a altas temperaturas -----	85

3.7. Evaluación de la reacción de pardeo no enzimático de los extractos-----	86
3.7.1. Determinación de la producción de furosina por HPLC -----	86
3.7.2. Evaluación del entrecruzamiento proteico por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)-----	88
3.7.2.1. Tinción con Coomassie brilliant blue (CBB) -----	88
3.7.2.2. Tinción con ácido periódico Schiff (<i>Periodic Acid Schiff</i> , PAS) -----	89
3.7.3. Determinación de 5-hidroximetil-2-furfural (HMF) por HPLC-----	90
3.7.4. Determinación de productos pardos por espectroscopía UV-Vis -----	92
3.7.5. Sistema de visión computarizada (SVC) -----	92
3.7.5.1. Calibración del sistema de adquisición de imágenes para variables cromáticas-----	94
3.7.5.2. Cálculo del croma (C^*)-----	97
3.8. Cinéticas de producción de intermediarios (furosina y 5-hidroximetil-2-furfural, HMF) y productos pardos-----	97
3.9. Dependencia de la cinética de generación de intermediarios o de productos pardos con la temperatura. -----	98
3.10. Caracterización y estabilidad física de los extractos liofilizados -----	99
3.10.1. Determinación del contenido de agua en sistemas liofilizados -----	99
3.10.2. Isotermas de sorción de agua -----	100
3.10.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)-----	100
3.10.4. Determinación de la temperatura de transición vítrea (T_g) -----	101
3.11. Determinación de compuestos volátiles de los extractos acuosos liofilizados por GC-MS-SPME-----	101
3.11.1. Procedimiento de microextracción en fase sólida (SPME)-----	102
3.11.2. Condiciones de análisis por cromatografía GC-MS-----	102
3.12. Tratamiento de datos-----	103
Capítulo 4. RESULTADOS -----	105
4.1. Capacidad antiglicante de extractos de hierbas y especias a través del marcador temprano furosina -----	105

4.2. Relación entre la evolución de furosina y el contenido de polifenoles de los extractos -----	109
4.3. Evaluación del efecto del extracto de tomillo sobre la glicación a través de marcadores de daño avanzado-----	117
4.4. Contenido de polifenoles y capacidad antioxidante de los extractos obtenidos con distintos solventes. efecto de β -ciclodextrina -----	118
4.4.1. Extractos en agua-etanol (1:1) -----	118
4.4.2. Empleo de β -ciclodextrina como solvente <i>verde</i> de extracción-----	119
4.5. Optimización de la funcionalidad antioxidante de los extractos de tomillo y pimienta verde mediante superficie de multirrespuesta (SMR) -----	122
4.5.1. Tomillo -----	123
4.5.1.1. Análisis de superficie de multirrespuesta para el contenido total de polifenolespor FC.-----	127
4.5.1.2 Análisis de superficie de multirrespuesta para antioxidantes de acción antirradicalaria por ensayo de radical libre DPPH•. -----	130
4.5.1.3. Análisis de superficie de multirrespuesta para capacidad antioxidante del extracto de tomillo debida a su poder reductor, medida por el ensayo FRAP. -	133
4.5.1.4. Parámetros optimizados para la extracción de bioactivos de tomillo empleando soluciones acuosas de β -ciclodextrina -----	136
<i>Optimización por función deseabilidad</i> -----	136
<i>Validación experimental del ajuste obtenido por el modelo de MRS</i> -----	136
4.5.2. Pimienta verde-----	138
4.5.2.1. Análisis de superficie de multirrespuesta para el contenido total de polifenoles (CPT) por FC-----	142
4.5.2.2. Análisis de superficie de multirrespuesta para la actividad antirradical DPPH•-----	145
4.5.2.3. Análisis de superficie de multirrespuesta para la capacidad antioxidante, determinada por poder reductor de hierro (FRAP) -----	148
4.5.2.4. Parámetros optimizados para la obtención de extractos funcionales (antioxidantes) de pimienta verde empleando β -ciclodextrina-----	151
<i>Optimización por función Deseabilidad</i> -----	151
<i>Validación experimental del ajuste obtenido por el modelo de SMR</i> -----	151
4.5.3. Resumen del efecto de las variables de extracción-----	152

4.6. Efecto de extractos de hierbas y especias sobre la inhibición de la glicación evaluada a través del indicador intermedio hidroximetilfurfural (HMF)-----	154
4.6.1. Estudio de la formación de HMF a temperaturas moderadas-----	154
4.6.2. Estudio de la formación de HMF a altas temperaturas -----	158
4.6.3. Cálculos de Arrhenius a partir de las constantes cinéticas de formación de HMF. -----	163
4.7. Efectividad del extracto acuoso de tomillo con capacidad antioxidante optimizada para inhibir el pardeamiento no enzimático -----	167
4.8. Análisis integral de los resultados -----	171
4.9. Perfil de compuestos volátiles en los extractos liofilizados -----	175
4.10. Estabilización de los extractos con capacidad antiglicante y antioxidante-----	180
4.10.1. Temperaturas de transición vítrea (T_g) -----	180
4.10.2. Condiciones críticas de estabilidad -----	182
4.10.3. Estabilidad de los polvos liofilizados en relación al fenómeno de la transición vítrea-----	183
Capítulo 5. CONCLUSIONES -----	191
Capítulo 6. BIBLIOGRAFÍA -----	197
ANEXOS -----	222
Anexo I. Publicaciones generadas durante la presente tesis -----	222
I.a. Publicaciones en revistas internacionales con referato -----	222
I.b. Publicaciones en actas de reuniones científicas nacionales e internacionales	222

TABLA DE FIGURAS

- Figura 1.1.** Esquema clásico de la reacción de Maillard, propuesto por Hodge (1953).32
- Figura 1.2.** Esquema global de las reacciones que ocurren en los alimentos, considerando múltiples reactivos proveedores de grupos carbonilo. ----- 33
- Figura 1.3.** Principales compuestos α -dicarbonílicos (Thornalley, 2005).----- 36
- Figura 1.4.** Esquema de generación de AGEs *in vitro*.----- 37
- Figura 1.5.** Potenciales sitios de acción de compuestos antiglicantes.1: hipoglucemiantes; 2: inhibidores de enzimas del metabolismo de la glucosa; 3: atrapantes de α -dicarbonilos; 4: quelantes de metales y secuestrantes de radicales libres; 5: compuestos de escisión de entrecruzamientos; 6: bloqueantes de AGEs; 7: activadores de receptores de AGEs (modificado de Navarro-Gómez, 2017). M: metal. ----- 41
- Figura 1.6.** (a) Árbol de pimienta (*Piper nigrum*) y sus bayas en diferentes estadios de su maduración. (b) Árbol de pimienta de Jamaica (*Pimenta dioica*) y sus bayas maduras. (c) Árbol de falsa pimienta rosa (*Schinus molle*), Aguaribay y frutos maduros. ----- 48
- Figura 1.7.** Planta con vainas dentro de las cuales crecen las semillas de fenogreco o alholva (*Trigonella foenum-graecum*).----- 50
- Figura 1.8.** Tomillo: a la izquierda, ramas con sus hojas verdes y a la derecha, hojas secas. ----- 52
- Figura 1.9.** Granos de arroz salvaje (*Zizania palustris*) en sus diferentes tonalidades de color oscuro. A la derecha, se puede observar la planta y su panícula con granos. 53
- Figura 1.10.** Salvado de arroz, granos de arroz con parte del salvado aun presente en el grano y panícula seca con sus granos. ----- 54

- Figura 1.11.** Representación molecular de la estructura espacial y su potencial hidrofóbico calculados utilizando el programa Molinspiration. Las áreas lipofílicas se indican con un gradiente de colores. a) piperina, b) eugenol, c) α -terpineol, d) α -felandreno, e) timol y f) carvacrol.----- 58
- Figura 1.12.** Equipo empleado para realizar extracción asistida por ultrasonido (Hielscher Ultra Sound Technology modelo UP100H). ----- 60
- Figura 1.13.** Estructuras y dimensiones de β -ciclodextrina. La representación de las moléculas se realizó con el programa Molinspiration, en rojo se indican los átomos de oxígeno, en gris los átomos de carbono y en blanco los hidrógenos. Las dimensiones y volúmenes aproximados de moléculas se obtuvieron de bibliografía (del Valle, 2004; Szejtli, 1998). ----- 63
- Figura 3.1.** Recta de calibración obtenida para determinar contenido de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu, midiendo la absorbancia a 765 nm y utilizando ácido gálico (AG) como estándar. La ecuación de la recta se muestra en el gráfico. ----- 79
- Figura 3.2.** Recta de calibración obtenida para determinar actividad antirradicalaria, evaluada a través del radical libre DPPH•. Se midió la absorbancia a 517 nm y se utilizó ácido gálico (AG) como estándar. La ecuación de la recta se muestra en el gráfico. ----- 80
- Figura 3.3.** Recta de calibración obtenida para evaluar poder reductor de hierro (FRAP), Se midió la absorbancia a 595 nm y se utilizó ácido gálico (AG) como estándar. La ecuación de la recta se muestra en el gráfico.----- 81
- Figura 3.4.** Esquema de la generación de furosina y su tratamiento para la determinación analítica. ----- 86
- Figura 3.5.** Recta de calibración de concentración de furosina en función del área de pico cromatográfico. La ecuación de la recta se muestra en el gráfico. ----- 88
- Figura 3.6.** Recta de calibración para la determinación de 5-hidroximetil-2-furfural (HMF) a partir del área de pico cromatográfico. La ecuación de la recta se muestra en el gráfico.----- 91

Figura 3.7. Correlación entre los valores medidos con el fotocolorímetro y mediante el sistema de visión computarizado (cámara fotográfica y análisis de imágenes) para luminosidad L^* en (a), y en (b) y (c) las coordenadas cromáticas a^* y b^* respectivamente. ----- 96

Figura 4.1. Porcentaje de glicación en sistemas modelo BSA+GLU en ausencia (control) y presencia de los extractos estudiados luego de 7 días de incubación a 55 °C. El porcentaje de glicación se calculó relacionando el contenido de furosina (determinado por HPLC) en sistemas modelo BSA+GLU con extracto respecto al control. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (p -value <0,05), letras iguales indican que no hay diferencias significativas (p -value >0,05). Se incluye el desvío estandar para $n = 3$. ----- 106

Figura 4.2. Cinética de producción de furosina durante 7 días de incubación a 55 °C en sistemas modelo BSA+GLU en ausencia y presencia de los extractos naturales estudiados. Las curvas se ajustaron con la ecuación de decaimiento exponencial en una fase. Se incluyen los desvíos estándar ($n = 3$). ----- 107

Figura 4.3. Desarrollo de furosina en sistemas modelo BSA+GLU en ausencia (control) o en presencia de 3 % v/v de extracto hidroalcohólico de tomillo en función del tiempo de incubación a 55 °C. Los porcentajes se calcularon en relación con el control BSA+GLU. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (p -value <0,05), letras iguales indican que no hay diferencias significativas (p -value >0,05), * indica no corresponde aplicar ANOVA. Se incluyen los desvíos estándares ($n = 3$).----- 109

Figura 4.4. Cinética de producción de furosina hasta 72 horas de incubación a 55 °C en muestras de BSA+GLU en presencia de 3 % v/v de extracto hidroalcohólico de tomillo (To). (a) Expresa la disminución en el contenido de polifenoles evaluado por FC mientras aumentó la producción de furosina en el sistema modelo. (b) Presenta el ajuste por regresión lineal para el decaimiento del contenido de polifenoles a expensas del incremento de furosina. Se incluyen los desvíos estándar ($n = 3$). ----- 110

Figura 4.5. Cinética de producción de furosina hasta 72 horas de incubación a 55 °C en muestras de BSA+GLU en presencia de 3 % v/v de extracto hidroalcohólico de

pimienta de Jamaica (PJ). (a) Expresa la disminución en el contenido de polifenoles evaluado por FC mientras aumentó la producción de furosina en el sistema modelo. (b) Presenta el ajuste por regresión lineal para el decaimiento del contenido de polifenoles a expensas del incremento de furosina. Se incluyen los desvíos estándar ($n = 3$). ----- 111

Figura 4.6. Cinética de producción de furosina hasta 72 horas de incubación a 55 °C en muestras de BSA+GLU en presencia de 3 % v/v de extracto hidroalcohólico de pimienta verde (PV). (a) Expresa la disminución en el contenido de polifenoles evaluado por FC mientras aumentó la producción de furosina en el sistema modelo. (b) Presenta el ajuste por regresión lineal para el decaimiento del contenido de polifenoles a expensas del incremento de furosina. Se incluyen los desvíos estándar ($n = 3$). ----- 112

Figura 4.7. Cinética de producción de furosina hasta 72 horas de incubación a 55 °C en muestras de BSA+GLU en presencia de 3 % v/v de extracto hidroalcohólico de pimienta negra (PN). (a) Expresa la disminución en el contenido de polifenoles evaluado por FC mientras aumentó la producción de furosina en el sistema modelo. (b) Presenta el ajuste por regresión lineal para el decaimiento del contenido de polifenoles a expensas del incremento de furosina. Se incluyen los desvíos estándar ($n = 3$). ----- 113

Figura 4.8. Cinética de producción de furosina hasta 72 horas de incubación a 55 °C en muestras de BSA+GLU en presencia de 3 % v/v de extracto hidroalcohólico de pimienta blanca (PB). (a) Expresa la disminución en el contenido de polifenoles evaluado por FC mientras aumentó la producción de furosina en el sistema modelo. (b) Presenta el ajuste por regresión lineal para el decaimiento del contenido de polifenoles a expensas del incremento de furosina. Se incluyen los desvíos estándar ($n = 3$). ----- 114

Figura 4.9. SDS-PAGE para identificar proteínas entre 50-250 kDa en los sistemas modelo (BSA+GLU) en ausencia o presencia de 3 % (v/v) de extracto hidroalcohólico de tomillo, que fueron incubados distintos tiempos a 55 °C. (a) tinción Coomassie brilliant blue (CBB) y (b) tinción con ácido periódico Schiff (PAS). ----- 118

Figura 4.10. Contenido de polifenoles totales (CPT), en (a) y actividad antioxidante medida por la capacidad antirradicalaria (DPPH•) (b), de los extractos vegetales estudiados obtenidos en solución agua-etanol (1:1). ----- 119

Figura 4.11. (a) Contenido de polifenoles totales (CPT), (b) capacidad antioxidante determinada por ensayo del radical libre DPPH• y (c) por el poder reductor de hierro (FRAP) de extractos de tomillo obtenidos utilizando los solventes de extracción agua, β-ciclodextrina (β-CD) 15 mM y agua-etanol (1:1). Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (*p-value* <0,05), letras iguales indican que no hay diferencias significativas (*p-value* >0,05). Se incluyen los desvíos estándar (*n* = 3). ----- 121

Figura 4.12. Correlación entre el contenido de polifenoles totales (CPT) y la capacidad antioxidante determinada por ensayo del radical libre DPPH y por el poder reductor de hierro (FRAP) para extractos de tomillo obtenidos empleando como solventes de extracción agua, β-ciclodextrina (β-CD) 15 mM y agua-etanol (1:1).----- 122

Figura 4.13. Gráficas de superficie de respuesta de las variables independientes para el contenido total de polifenoles de los extractos de tomillo (CPT, mg AG/mL) mostrando el máximo para la combinación de variables correspondientes. Se indica el CPT como una función de: (a) la temperatura de extracción y la concentración de β-CD usando un tiempo de sonicación constante de 5,9 minutos; (b) temperatura y tiempo de sonicación usando una concentración constante de β-CD 15 mM; (c) tiempo de sonicación y concentración de β-CD usando temperatura constante de 36,6 °C. ----- 129

Figura 4.14. Gráficas de superficie de respuesta de las variables independientes para la actividad antioxidante (AO), como degradación del radical DPPH• en mg AG/mL de extracto de tomillo. AO como una función de: (a) la temperatura de extracción y la concentración de β-CD usando un tiempo de sonicación constante de 5,9 minutos; (b) temperatura y tiempo de sonicación usando una concentración constante de β-CD 15 mM; (c) tiempo de sonicación y concentración de β-CD usando temperatura constante de 36,6 °C. ----- 132

Figura 4.15. Gráficas de superficie de respuesta de variables independientes para el poder reductor de hierro (FRAP), en mg AG/mL de extracto de tomillo que muestra

el máximo para la combinación de variables correspondientes. *FRAP* como una función de: (a) la temperatura de extracción y la concentración de β -CD usando un tiempo de sonicación constante de 5,9 min; (b) tiempo de sonicación y concentración de β -CD usando temperatura constante de 36,6 °C; (c) temperatura y tiempo de sonicación usando una concentración constante de β -CD 15 mM.-----135

Figura 4.16. Gráficas de superficie de respuesta de las variables independientes para el contenido total de polifenoles de extractos de pimienta verde (PV) (CPT, mg AG/mL PV) mostrando el máximo para la combinación de variables correspondientes. CPT como una función de: (a) el tiempo de sonicación (min) y la concentración de β -CD (mM) fijando la temperatura constante en 41 °C; (b) la temperatura y la concentración de β -CD (mM) fijando el tiempo de sonicación en 5 min; (c) temperatura y tiempo de sonicación usando constante la concentración de β -CD en 15 mM.-----144

Figura 4.17. Gráficos de superficie de respuesta de las variables independientes para la actividad antioxidante (AO), evaluada como la degradación del radical libre DPPH• en mg AG/mL PV, de extracto de pimienta verde. AO en función de: (a) la temperatura de extracción y la concentración de β -CD utilizando un tiempo de sonicación fijo de 5 min; (b) temperatura y tiempo de sonicación utilizando una concentración constante de β -CD 15 mM; (c) tiempo de sonicación y concentración de β -CD utilizando temperatura constante a 41 °C. -----147

Figura 4.18. Gráficos de superficie de respuesta de variables independientes para el poder reductor de hierro (FRAP), en mg AG/mL PV, de extracto de pimienta verde exhibiendo los máximos para la combinación de variables. FRAP en función de: (a) el tiempo de sonicación y la concentración de β -CD utilizando la temperatura constante en 41 °C; (b) la temperatura y la concentración de β -CD utilizando el tiempo de sonicación constante en 5 min; (c) la temperatura y el tiempo de sonicación utilizando una concentración constante de 15 mM de β -CD. -----150

Figura 4.19. Formación de HMF en sistemas modelo BSA+GLU en ausencia y presencia de los extractos estudiados en función del tiempo de reacción a 55 °C. En línea rayada, se presenta el sistema control BSA+GLU y en línea punteada el sistema control BSA+GLU+ β -CD. (a) Efecto de extracto de pimienta de Jamiaca

(PJ) y tomillo (To), (b) efecto de extracto de pimienta verde (PV), (c) efecto de extracto de pimienta negra (PN), (d) efecto de extracto de pimienta blanca (PB).156

Figura 4.20. Formación de HMF en sistemas modelo BSA+GLU en ausencia y presencia de extracto de tomillo (To) en función del tiempo de reacción (en horas) a 70 (a), 80 (b) y 90 °C (c). En línea rayada, se presenta el sistema control BSA+GLU y en línea punteada el sistema control BSA+GLU+ β -CD. (d) Gráficas de Arrhenius correspondientes.-----159

Figura 4.21. Formación de HMF en sistemas modelo BSA+GLU en ausencia y presencia de extracto de pimienta de Jamaica (PJ) en función del tiempo de reacción (en horas) a 70 (a), 80 (b) y 90 °C (c). En línea rayada, se presenta el sistema control BSA+GLU y en línea punteada el sistema control BSA+GLU+ β -CD. (d) Gráficas de Arrhenius correspondientes.-----160

Figura 4.22. Formación de HMF en sistemas modelo BSA+GLU en ausencia y presencia de extracto de pimienta verde (PV) en función del tiempo de reacción (en horas) a 70 (a), 80 (b) y 90 °C (c). En línea rayada, se presenta el sistema control BSA+GLU y en línea punteada el sistema control BSA+GLU+ β -CD. (d) Gráficas de Arrhenius correspondientes.-----161

Figura 4.23. Formación de HMF en sistemas modelo BSA+GLU en ausencia y presencia de extracto de pimienta negra (PN) en función del tiempo de reacción (en horas) a 70 (a), 80 (b) y 90 °C (c). En línea rayada, se presenta el sistema control BSA+GLU y en línea punteada el sistema control BSA+GLU+ β -CD. (d) Gráficas de Arrhenius correspondientes.-----162

Figura 4.24. Formación de HMF en sistemas modelo BSA+GLU en ausencia y presencia de extracto de pimienta blanca (PB) en función del tiempo de reacción (en horas) a 70 (a), 80 (b) y 90 °C (c). En línea rayada, se presenta el sistema control BSA+GLU y en línea punteada el sistema control BSA+GLU+ β -CD. (d) Gráficas de Arrhenius correspondientes.-----163

Figura 4.25. Cuantificación de HMF a 4 h (a la izquierda) y 6 h (a la derecha) de reacción a 80 °C en (a) y 90 °C en (b). Las barras grises corresponden a los controles y las barras negras a los sistemas modelo BSA+GLU en presencia de los

- distintos extractos: pimienta de Jamaica (PJ), tomillo (To), pimientos: verde (PV), negra (PN) y blanca (PB).-----166
- Figura 4.26.** Cinética de cambio de color por reacción de Maillard, evaluado por absorbancia a 420 nm en función del tiempo para diferentes temperaturas. (a) Sistemas control con y sin β -CD. (b) Sistema control con β -CD y sistemas BSA+GLU en presencia de extracto de tomillo. El gráfico inserto muestra la cinética de reacción a 70 °C. Los valores de absorbancia están multiplicados por el factor de dilución. -----168
- Figura 4.27.** Comparación de los ajustes a través de la ecuación de Arrhenius para los sistemas modelo control (BSA+GLU; BSA+GLU+ β -CD) y en presencia del extracto acuoso de tomillo (BSA+GLU+To). Se presenta el $\ln k$ (constante cinética de reacción) en función de la inversa de la temperatura expresada en K. -----170
- Figura 4.28.** Correlación de la producción de furosina a los 7 días de reacción a 55 °C versus contenido de polifenoles totales (CPT) y capacidad antioxidante determinadas por ensayo del radical libre DPPH• en los sistemas modelo BSA+GLU en presencia de los extractos de tomillo (To), pimienta de Jamaica (PJ), pimienta verde (PV), pimienta negra (PN) y pimienta blanca (PB) obtenidos en agua-etanol (1:1).-----173
- Figura 4.29.** Correlación de la producción de HMF a los 7 días de reacción a 55 °C versus contenido de polifenoles totales (CPT) y capacidad antioxidante determinadas por ensayo del radical libre DPPH en los sistemas modelo BSA+GLU en presencia de los extractos acuosos de tomillo (To), pimienta de Jamaica (PJ), pimienta verde (PV), pimienta negra (PN) y pimienta blanca (PB). -----173
- Figura 4.30.** Esquema de las distintas vías de formación de AGEs, donde se indican los sitios de acción potenciales de los extractos activos (E). -----174
- Figura 4.31.** Isotermas de adsorción de agua a 25 ° C y temperaturas de transición vítrea para la matriz de trehalosa pura (Tr), y los extractos de tomillo (To) y de pimienta verde (PV) liofilizados en trehalosa. Las condiciones críticas para el almacenamiento a 25 °C se obtuvieron como se indica en la figura mediante líneas

- de puntos y rayas. Los intervalos de confianza del 95 % son menores que el tamaño de los símbolos.-----183
- Figura 4.32.** Cambios de la luminosidad ($L_0^*-L^*$) y la actividad antioxidante evaluados como porcentaje de actividad antirradical DPPH•, en los extractos liofilizados de: (a) tomillo (To) y (b) pimienta verde (PV), almacenados durante 15 días a diferentes valores de a_w (indicados en cada punto), en función de $T-T_g$. Los intervalos de confianza del 95 % se encuentran debajo del tamaño de los símbolos.-----184
- Figura 4.33.** Cambio de luminosidad ($L_0^*-L^*$) de los extractos de tomillo (To) y de pimienta verde (PV) liofilizados almacenados durante 15 días a diferentes valores de a_w (indicados en cada punto), en función de $T-T_g$. Los intervalos de confianza del 95 % se han trazado y se encuentran debajo de los símbolos.-----186
- Figura 4.34.** Imágenes de los extractos liofilizados de pimienta verde (PV) y tomillo (To) almacenados 15 días a 25 °C en actividades de agua (a_w) entre 0,11 y 0,75, obtenidas según la sección 3.7.5, sobre las cuales se realizó el análisis de las variables de color.-----186
- Figura 4.35.** Cambios de coordenadas cromáticas a^* , b^* y el croma (C^*), (a) de los extractos de tomillo (To) y (b) de pimienta verde (PV), almacenados durante 15 días a diferentes valores de a_w (indicados en cada punto), en función de $T-T_g$. Los intervalos de confianza del 95 % se han trazado y se encuentran debajo de los símbolos.-----188

TABLA DE TABLAS

Tabla 1.1. Principales compuestos fenólicos de las especies estudiadas.....	57
Tabla 1.2. Estándares de aceptación de deseabilidad para un producto o proceso.....	70
Tabla 3.1. Rango de códigos del diseño de Box-Behnken.	83
Tabla 4.1. Constantes cinéticas (k), <i>Plateau</i> y coeficientes de determinación (R^2) obtenidos a 55 °C para la producción de furosina en sistemas modelo BSA+GLU en ausencia (control) y presencia de los extractos naturales estudiados, calculadas mediante el ajuste cinético -asociación en una fase-.....	108
Tabla 4.2. Constantes cinéticas (k) y coeficientes de determinación (R^2) calculadas para la producción de furosina y disminución del contenido total de polifenoles en los sistemas estudiados, en función del tiempo de reacción, hasta 72 h a 55 °C.	115
Tabla 4.3. Variables independientes basadas en un diseño Box-Behnken para el análisis de superficie de multirrespuesta para optimizar la extracción con soluciones acuosas de β -ciclodextrina de compuestos funcionales de tomillo asistida por ultrasonido. Las variables dependientes fueron contenido total de polifenoles y actividad antioxidante (poder reductor y actividad antirradicalaria).	124
Tabla 4.4. Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo polinomial cuadrático ajustado para la optimización de los parámetros de extracción (concentración de β -CD, tiempo de sonicación y temperatura de extracción) de compuestos funcionales de tomillo.....	126
Tabla 4.5. Valores predichos y experimentales para las condiciones optimizadas.	137
Tabla 4.6. Valores de las variables independientes basados en un diseño Box-Behnken para el análisis de superficie de multirrespuesta, donde se optimizó la extracción con β -ciclodextrina de compuestos funcionales de pimienta verde asistida por ultrasonido. Contenido total de polifenoles, poder reductor y actividad antioxidante antirradicalaria de los extractos acuosos de pimienta verde.	139

Tabla 4.7. Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo polinomial cuadráticos ajustado para la optimización de los parámetros de extracción (concentración de β -CD, tiempo de sonicación y temperatura de extracción) de compuestos funcionales de pimienta verde.	141
Tabla 4.8. Valores predichos y experimentales para las condiciones optimizadas.	151
Tabla 4.9. Constantes cinéticas (k) y coeficiente de determinación (R^2) obtenidos por ajuste lineal para la producción de HMF en función del tiempo de reacción a 55 °C. Sistemas modelo BSA+GLU en ausencia y presencia de los extractos estudiados.	157
Tabla 4.10. Constantes cinéticas (k) y coeficiente de determinación (R^2) obtenidos por ajuste lineal para la producción de HMF a 70, 80 y 90 °C en los sistemas modelo control y en presencia de los extractos estudiados. Se indica también la energía de activación calculada a partir de la ecuación de Arrhenius.	165
Tabla 4.11. Valores de las constantes cinéticas (k) para la reacción de Maillard a 70, 80 y 90 °C, la energía de activación (E_a) y los coeficientes de Pearson calculados para los sistemas modelo control (sin extracto) y en presencia de tomillo.....	171
Tabla 4.12. Perfil de compuestos volátiles en los extractos acuosos liofilizados de las pimientas (verde, negra, blanca, de Jamaica) y del tomillo determinados por GC-MS-SPME.	176
Tabla 4.13. Principales componentes de la fracción volátil de los extractos estudiados, expesados como % del área total de volátiles del espacio cabeza (determinado por CG-MS).....	179
Tabla 4.14. Temperaturas de transición vítrea determinadas para los extractos estudiados, liofilizados en presencia de trehalosa y almacenados a diferentes humedades relativas (HR) a 25 °C.	181

ABREVIATURAS

AAR, Actividad antirradicalaria.

ACN, Acetonitrilo.

AG, ácido gálico.

AGEs, Productos finales de glicación avanzada.

ALEs, Productos de lipoxidación avanzada.

a_w , Actividad de agua.

b. s., Base seca.

BBD, Diseño Box-Behnken.

BP, Productos pardeados.

BSA, Albúmina de suero bovino.

CBB, *Coomassie brilliant blue*.

CD, Ciclodextrina.

CPT, Contenido de polifenoles totales.

D, Deseabilidad.

DAD, Detector de arreglo de diodos.

DSC, Calorimetría diferencial de barrido.

EAU, Extracción asistida por ultrasonido.

EPR, Espectroscopia de espín electrónico.

FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura.

FC, Folin-Ciocalteu.

FRAP, Poder reductor de hierro.

GC-MS, Cromatografía gaseosa con detector de masas.

GLU, D-glucosa.

H R, Humedad relativa.

HMF, 5-hydroxymethyl-2-furfural.

HPLC, Cromatografía líquida de alta resolución.

LOD, Límite de detección.

LOQ, Límite de cuantificación.

OMS, Organización mundial de la salud.

PAS, *Periodic Acid Schiff*.

PB, Pimienta blanca.

PBS, Buffer fosfatosalino.

PDMS/DVB, *Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene*.

PJ, Pimienta de Jamaica.

PN, Pimienta negra.

PNE, Pardeamiento no enzimático.

PV, Pimienta verde.

rcf, Fuerza centrífuga relativa.

RMN, Resonancia magnética nuclear.

ROS, Especies reactivas de oxígeno.

SDS-PAGE, Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.

SPME, Microextracción en fase sólida.

SRM, Superficie de multirrespuesta.

SVC, Sistema de visión computarizado.

TCA, Ácido tricloroacético.

T_g , Transición vítrea.

To, Tomillo.

Tr, Trehalosa.

β -CD, β -ciclodextrina.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años distintas organizaciones, tales como la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (*IARC*), la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (*FDA*) de EE.UU. y el Comité Mixto de Expertos de Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, y Organización Mundial de la Salud (*FAO/OMS*), identificaron algunos compuestos que se generan en alimentos como potencialmente tóxicos y/o cancerígenos.

Dichos compuestos se pueden formar a través de múltiples vías por las que principalmente lípidos, hidratos de carbono o ácido ascórbico, se degradan térmicamente. Algunos de estos compuestos indeseables incluyen furfurales (hidroximetilfurfural-HMF-, furfural, metilfurfural), acrilamida, compuestos heterocíclicos (furanos, pirroles y piridinas), cuya concentración depende de la severidad del tratamiento térmico aplicado y tiempo, y condiciones de almacenamiento (Rada-Mendoza y *col.*, 2004). Se identificaron en una amplia gama de alimentos que contienen hidratos de carbono tales como frutas procesadas (Rada-Mendoza y *col.*, 2004), miel (Fallico y *col.*, 2004) y leche (Morales y Jiménez-Pérez, 2001), cereales de desayuno y cereales extrudados para bebé (Fernández-Artigas y *col.*, 1999), galletas y pan horneado (Ameur y *col.*, 2006).

La gran complejidad de las reacciones que ocurren en el procesado y almacenamiento de alimentos, la presencia de sus productos en la dieta y las connotaciones tanto positivas como negativas que suscitan dichas reacciones, alientan la investigación en estas áreas. Los resultados permitirán lograr el equilibrio entre las tres características fundamentales que se buscan en un alimento: la calidad nutricional, la aceptabilidad

organoléptica y la seguridad de su consumo, a través de la mitigación de la formación de compuestos tóxicos.

Dada la tendencia mundial hacia la disminución del empleo de aditivos sintéticos en alimentos, y a la incorporación de componentes promotores de la salud, la interrelación de la investigación y el desarrollo con la cadena productiva cobra especial importancia a fin de agregar valor a recursos vegetales subvalorados, de los cuales se pueden obtener valiosos extractos con actividad antiglicante, antipardeo o antioxidante.

Desde la antigüedad, determinadas especias y hierbas han sido consideradas no sólo como importantes agentes saborizantes y exaltadores del sabor de los alimentos, sino también como agentes naturales con propiedades de protección y de conservación de los mismos (Wojdylo *y col.*, 2007). Las propiedades antimicrobianas de muchas especias son bien conocidas (Saeed *y col.*, 2008; Chatterjee *y col.*, 2007; Mathabe *y col.*, 2005; Nasar-Abbas y Kadir Halkman, 2004) y a su vez en los últimos años se han investigado las propiedades antioxidantes a través de su capacidad antirradicalaria y de su poder reductor (Shan *y col.*, 2005), pero aún es muy incipiente y no ha sido explorada en profundidad su capacidad inhibitoria de la reacción de Maillard (Teng *y col.*, 2018; Peng *y col.*, 2011; Dearlove *y col.*, 2008).

La profundización del conocimiento en estos aspectos tiene aplicaciones directas en los procesos de la conservación mediante componentes naturales con el aporte adicional de ser potencialmente funcionales, promoviendo beneficios adicionales para la salud, o previniendo enfermedades.

1.1. Reacciones químicas en alimentos

El tratamiento térmico durante el procesamiento, o los largos tiempos de almacenamiento, habitualmente producen efectos indeseables en los alimentos, debido a las reacciones químicas que tienen lugar en las matrices alimentarias.

1.1.1. Pardeamiento no enzimático. Reacción de Maillard

El pardeamiento no enzimático (PNE) comprende un conjunto complejo de reacciones que constituyen una de las principales causas de las modificaciones químicas en los alimentos, y, por lo tanto, es importante el conocimiento de los factores determinantes del progreso de las mismas. Las reacciones de PNE incluyen los fenómenos de caramelización, degradación de ácido ascórbico o de polifenoles oxidados y/o la interacción de proteínas o aminas con compuestos tales como azúcares reductores y otros hidratos de carbono, productos de oxidación de polifenoles o de lípidos. Lo que caracteriza a estas reacciones, es que en todas ellas intervienen grupos carbonilo llamados “activos”. En el caso en que estos interactúan con grupos amino, a dicho conjunto de reacciones se lo denomina reacción de Maillard (Delgado-Andrade y *col.*, 2007a; Delgado-Andrade y *col.*, 2007b; Somoza y *col.*, 2005; Chuyen, 1998; Fennema, 1996). 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, vitaminas como el ácido ascórbico.
- Producción de intermediarios de acción potencialmente tóxica (furanos, furfurales y heterociclos de azufre o nitrógeno).
- Liberación de gas (CO₂).
- Disminución del pH.

La cascada de reacciones que se produce implica una secuencia de pasos que no siguen una ruta lineal, ocurren en forma simultánea y llevan a la formación de una gran variedad de compuestos. En la **Figura 1.1** se muestra el esquema clásico de la reacción de Maillard, sugerido por Hodge (1953).

Se pueden distinguir tres etapas principales (temprana, intermedia y final) donde se generan los compuestos pardos (Yu y *col.*, 2017; Ajandouz y *col.*, 2001).

Etapas temprana: formación de la base de Schiff y compuestos de Amadori, o sus derivados como furosina.

Etapas intermedia: compuestos de deshidratación (hidroximetilfurfural y otros furfurales), aldehídos de Strecker, heterociclos de O, N y S, CO₂, compuestos fluorescentes.

Etapas final: compuestos fluorescentes, productos pardos.

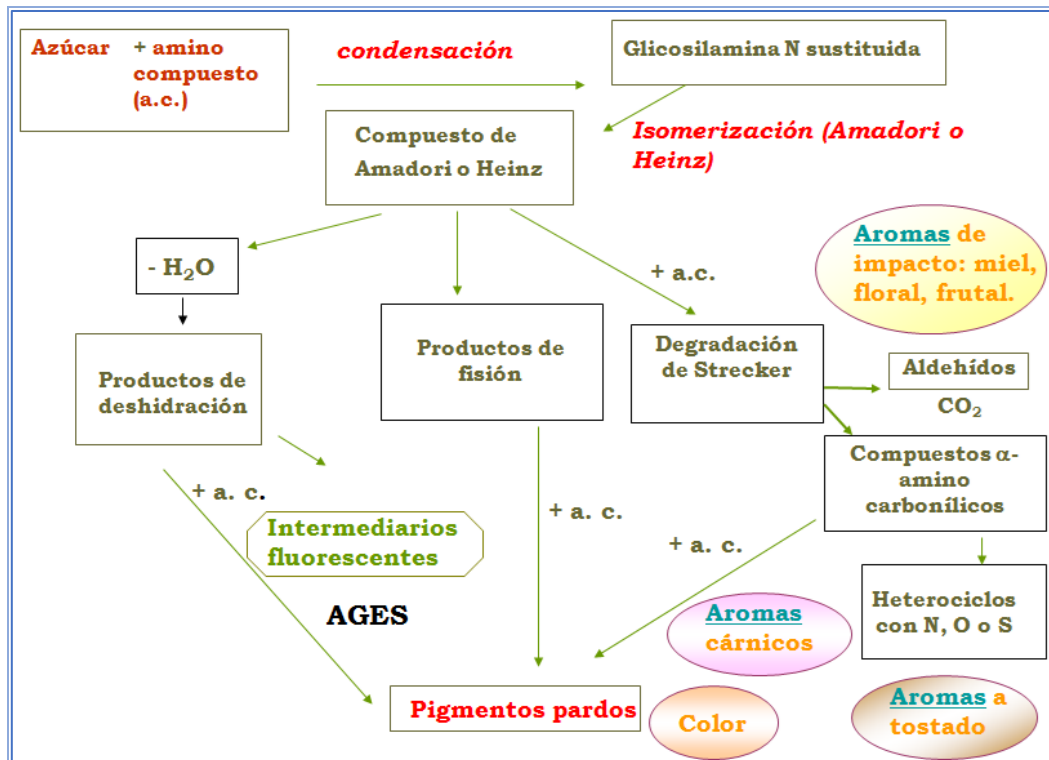


Figura 1.1. Esquema clásico de la reacción de Maillard, propuesto por Hodge (1953).

Por otro lado, un esquema más realista, considerando los múltiples reactivos potencialmente aportantes de grupos carbonilo activos, y productos de las potenciales reacciones químicas que ocurren en alimentos (Farroni y Buera, 2012), se muestra en la **Figura 1.2.**

Los azúcares reductores, los lípidos insaturados, el ácido ascórbico y los compuestos fenólicos pueden considerarse como los reactivos primarios. Estos compuestos pueden reaccionar directamente o después de su oxidación, con los grupos amino de las proteínas o los aminoácidos (Degen y *col.*, 2012) siendo el grupo ϵ -amino de la lisina un sitio preferencial de reacción.



Figura 1.2. Esquema global de las reacciones que ocurren en los alimentos, considerando múltiples reactivos proveedores de grupos carbonilo.

La composición y contenido de los productos resultantes están altamente condicionados por muchos factores, como la composición química de los alimentos, la temperatura, la actividad del agua y el pH, pudiendo incluso las distintas reacciones tener lugar de forma simultánea (Zanoni y *col.*, 1995). El PNE está favorecido en alimentos con elevado contenido en proteínas y carbohidratos reductores, y depende del tiempo de reacción.

El aumento de temperatura tiene un efecto acelerador sobre la formación de intermediarios y desarrollo de color, ya que favorece cada una de las etapas de la reacción. Un factor importante a tener en cuenta es que la temperatura además tiene efecto sobre otras reacciones paralelas a las de pardeamiento, en las que se pueden generar grupos reactivos que participan en las reacciones de formación de color. Por ejemplo, la oxidación de lípidos o la hidrólisis de azúcares no reductores y cualquier otra reacción en la que se generen carbonilos reactivos.

La actividad de agua óptima para las reacciones de PNE está entre 0,30 y 0,70, dependiendo mucho de la estructura de la matriz (Kocadağlı, 2016; Nielsen De Almeida, 2013) y los valores de pH que las favorecen están en el intervalo de 4,00 – 7,00. Esta reacción ocurre lentamente a bajas temperaturas y con mayor facilidad en alimentos deshidratados (Miao y Roos, 2005; Fernández-Artigas y *col.*, 1999; Labuza y Saltmarch, 1981).

En cambio, la caramelización (en la que sólo intervienen azúcares reductores) depende de la degradación directa de los carbohidratos provocada por altas temperaturas y por ello necesita condiciones más drásticas que la reacción de Maillard. Está favorecida a temperaturas superiores a los 120 °C, pH inferior a 3 o superior a 9 y muy bajo contenido de agua (Kroh, 1994). Varios de los productos formados en la caramelización son similares a los obtenidos en la reacción de Maillard.

La lisina se encuentra dentro del grupo de aminoácidos esenciales para el hombre, además, es el más reactivo de los aminoácidos que componen las proteínas alimentarias, debido a su grupo ϵ -amino libre. Por ejemplo, es un aminoácido limitante en los cereales y tanto su cantidad como su biodisponibilidad son los principales criterios que definen la calidad nutritiva de los mismos (Meredith y Caster, 1984). La participación de lisina en la reacción de Maillard puede producir un notable deterioro de la calidad nutricional, motivo por el cual en numerosas ocasiones es importante inhibir y/o retardar su reacción. En otras, un cierto grado de reacción proporciona el color, aroma y sabor característico de un producto dado sin alterar su calidad nutricional (McAuley y *col.*, 1987). Por lo tanto, se debe adoptar un compromiso en el procesamiento térmico, de manera que sea mínimo el deterioro de la calidad nutricional. Con este propósito, los indicadores químicos del tratamiento térmico en alimentos son de gran ayuda en el

control de procesos, ofreciéndonos la posibilidad de optimizar las condiciones de tratamiento y almacenamiento. Un intermediario del ordenamiento de Amadori, furosina, se considera un marcador importante de las etapas tempranas de la reacción y del grado de compromiso de lisina en la reacción (Rada-Mendoza y *col.*, 2004).

Además de los daños que producen estas reacciones sobre los nutrientes, afectando su disponibilidad, se ha observado que pueden producir varios compuestos potencialmente tóxicos en alimentos procesados y almacenados. Entre ellos, compuestos tales como furanos, furfurales y acrilamida (Rannou y *col.*, 2016; Crews y Castle, 2007). En este sentido según la OMS este es un tema de gran preocupación en todo el mundo.

1.1.2. Glicación de proteínas *in vitro*

Las principales vías de reacción de daño a las macromoléculas mediadas por glicación involucran tanto procesos no oxidativos como oxidativos.

En la reacción de Maillard, los grupos amino libres de proteínas reaccionan lentamente con azúcares reductores, como la glucosa, formando inicialmente bases de Schiff, que se reordenan (isomerizan) para formar los productos de Amadori relativamente estables. Debido a esta isomerización, la glucosa, por ejemplo, dará derivados fructosilados. Los productos de Amadori se degradan posteriormente a través de reacciones de oxidación y deshidratación en una variedad de compuestos α -carbonílicos (glioxal, metilglioxal, desoxiglucosonas), algunos de los cuales se muestran en la **Figura 1.3**. En la vía oxidativa, estos compuestos se pueden formar directamente por oxidación de glucosa o lípidos y son mucho más reactivos que los azúcares parentales con respecto a su capacidad para reaccionar con grupos amino de proteínas. Generan por entrecruzamiento productos finales estables llamados productos avanzados de Maillard o productos finales de glicación avanzada (*AGEs*) (Ahmed, 2005). Se ha demostrado

que los AGEs reaccionan (se entrecruzan) con el grupo amino del residuo de aminoácido N-terminal, principalmente con las cadenas laterales de los residuos de arginina y lisina y a través de sus reacciones posteriores con grupos funcionales amino, sulfhidrilo y guanidina de las proteínas.

Se han identificado cuatro precursores principales del aroma y del color que generan esta serie de reacciones: α -hidroxicarbonilos, α -dicarbonílicos, α -aminocarbonílicos y 1-aminoácido-2-carbonilo (Yaylayan, 2003). Mientras que los α -hidroxicarbonilos podrían ser considerados precursores de los otros tres, los α -dicarbonilos son intermediarios implicados en el desarrollo de color. La formación de compuestos α -dicarbonílicos es un paso esencial para la reacción de entrecruzamiento, que conduce a la formación de AGEs.

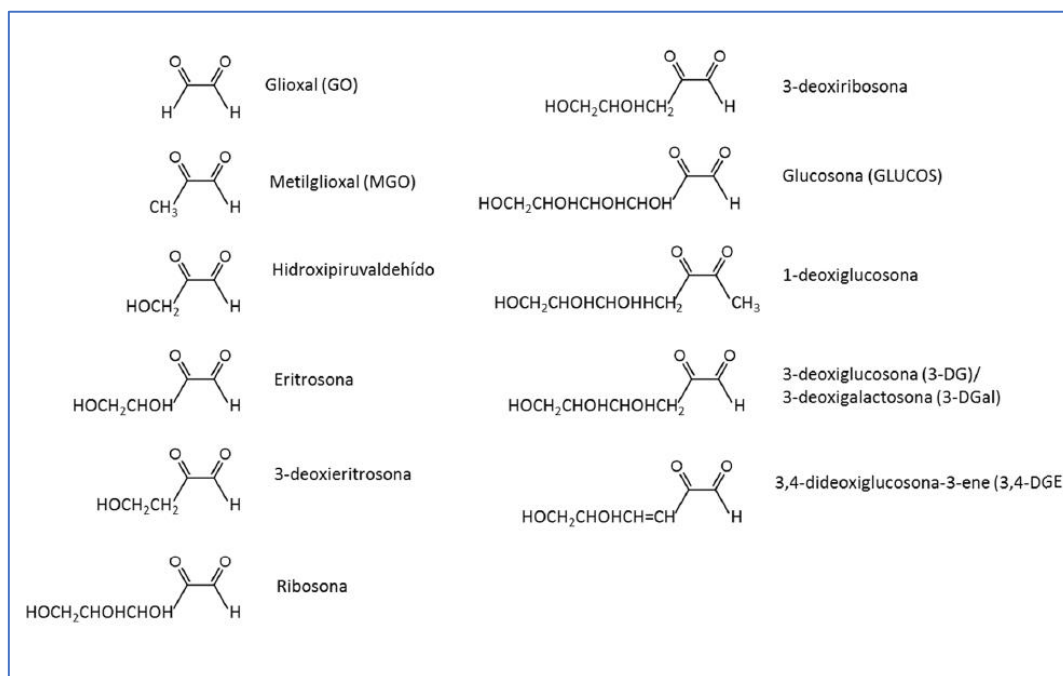


Figura 1.3. Principales compuestos α -dicarbonílicos (Thornalley, 2005).

Las principales vías de reacción de daño a las macromoléculas mediadas por glicación involucran tanto procesos no oxidativos como oxidativos.

A través de espectroscopia de espín electrónico (EPR) y otros métodos se han identificado tres tipos de especies de radicales libres que se generan durante la reacción del compuesto dicarbonílico metilglioxal con alanina (Yim y *col.*, 1995).

Es interesante resaltar que, por un lado, un esquema como el de la **Figura 1.2** permite observar un panorama completo de las reacciones. Por otro lado, la ocurrencia de reacciones oxidativas o radicalarias, por lo general, no se tienen en cuenta cuando se analizan los factores que intervienen en la cinética de la reacción de Maillard, y sin embargo las reacciones oxidativas que afectan no sólo a los lípidos sino también a los azúcares, juegan un papel muy importante en el transcurso de la reacción y en los productos que se forman. De manera que un panorama completo de generación de AGEs sería el que muestra la **Figura 1.4**.

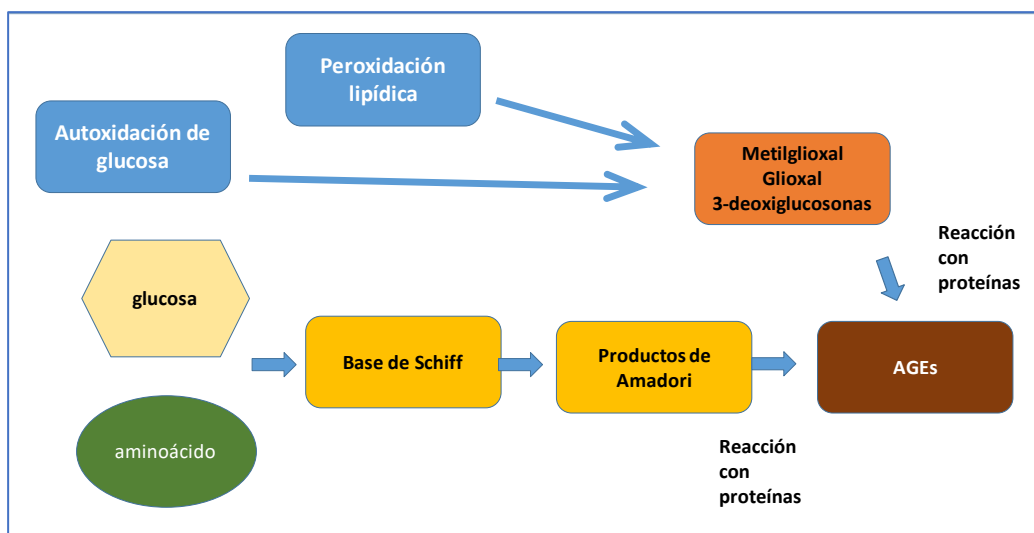


Figura 1.4. Esquema de generación de AGEs *in vitro*.

1.1.3. Glicación de proteínas *in vivo*

La modificación que se produce en las proteínas de sistemas biológicos por glicación *in vivo* ha recibido una atención creciente desde el ámbito médico y farmacológico en los últimos veinte años.

A diferencia de los alimentos donde la combinación temperatura-tiempo es quizás el principal factor que impacta en la cinética de la reacción, en los sistemas biológicos los factores limitantes son la concentración del azúcar reductor (glucemia) y el tiempo de exposición (la edad).

Los productos de glicación avanzada *in vivo*, también conocidos por sus siglas en inglés “AGEs”, gozan de especial relevancia puesto que su acumulación en el organismo se relaciona con los procesos biológicos de envejecimiento normal (Vistoli y col., 2013; Avery y Bailey, 2006) y con el avance y las complicaciones de enfermedades multifactoriales de alta prevalencia en nuestra sociedad como la diabetes, Alzheimer y enfermedades cardiovasculares, renales, diabetes mellitus y sus complicaciones a largo plazo (Vlassara y Uribarri, 2013; Gould y col., 2011; Milne y Brownstein, 2011). La acumulación de AGEs en diferentes tejidos y órganos, está directamente relacionada con la edad, el recambio de proteínas y el estado glucémico del individuo (Franco y col., 2018; Beseni y col., 2017; Ramos-Hernandez y Luevano-Contreras, 2017; Chinchansure y col., 2015; Fuentes y col., 2015; Kazeem y col., 2012; Odjakova y col., 2012).

Los estudios iniciales sobre los AGEs fueron a partir de la observación de la hemoglobina glicosilada en diabéticos. Actualmente está bien aceptado que los AGEs se pueden formar *in vivo* a través de diferentes vías como la autooxidación de la glucosa, la peroxidación lipídica, la glucólisis y la vía del poliol (Teng y col., 2018).

De este modo, el aumento de glucosa circulante o su deficiente clarificación promueven el proceso de glicación en el que se ven involucradas proteínas y, en ocasiones, lípidos endógenos para formar productos de glicación avanzada, *AGEs* o productos de lipoxidación avanzada “*advanced lipoxidation end-products*”, *ALEs* (Vistoli y col., 2013). Entre la amalgama de compuestos químicos que se generan, los compuestos α -dicarbonílicos son clave en el proceso de glicación ya que pueden formar *AGEs* directamente, es decir, sin requerir precursores como los productos de Amadori al reaccionar directamente con proteínas, nucleótidos y fosfolípidos.

El término de estrés carbonílico fue descrito por Miyata y col. (1999) como la situación que se deriva del desequilibrio entre la relación de formación de especies carbonílicas reactivas (RCS), procedentes de la oxidación de carbohidratos y lípidos, y la correspondiente a la eliminación o inactivación de los mismos. Acorde con esta definición, numerosas investigaciones han relacionado estrechamente el estrés oxidativo producido por altas concentraciones de especies reactivas de oxígeno (ROS) con el incremento del estrés carbonílico y viceversa.

In vivo, se han descrito fuentes endógenas para la formación de los compuestos α -dicarbonílicos por acción enzimática, como la glicólisis, la vía de los polioles o la oxidación de aminoácidos y de origen no enzimático, como la peroxidación lipídica y la glicación (Semchyshyn y Lushchak, 2012).

La absorción, biodisponibilidad, destino metabólico y excreción de los *AGEs* dietéticos se han investigado en ratas y humanos pero los resultados son controversiales: numerosos estudios indican que una dieta con un contenido elevado de *AGEs* dietéticos incrementa la carga de *AGEs* endógenos, ya que una parte de ellos se absorbe, aumentando la circulación total de *AGEs* (Koschinsky y col., 1997) y promoviendo el

incremento de factores proinflamatorios (Uribarri y *col.*, 2005; López-García y *col.*, 2004). Por otro lado, otros escapan a esta digestión intestinal (Verzijl y *col.*, 2000), y se cree que una proporción significativa podría alcanzar el colon donde podría modular el crecimiento de la flora intestinal (Rai y *col.*, 2012; Faist y Erbersdobler, 2001).

Con el objetivo de estudiar compuestos con potencial capacidad de inhibición total o parcial de la glicación proteica, diversas disciplinas científicas han trabajado en la temática. A principios de los años 80, los investigadores en el área clínica y farmacológica Monnier y Cerami, pioneros de la “teoría de la glicosilación no enzimática del envejecimiento”, plantearon que durante el envejecimiento los entrecruzamientos mediados por *AGEs* sobre proteínas de larga vida contribuyen a la disminución de su función a nivel celular y de tejidos (Monnier y Cerami, 1981).

Los efectos negativos de los *AGEs* en los sistemas biológicos se atribuyen fundamentalmente a su capacidad entrecruzante y a su acción inflamatoria y prooxidante (Ahmed, 2005). En la **Figura 1.5** se esquematizan distintas estrategias llevadas a cabo para prevenir o combatir el estrés carbonílico (que frecuentemente viene asociado a un estrés oxidativo). Se centran fundamentalmente en los puntos críticos de las distintas etapas del proceso de glicación, que consisten fundamentalmente en control del índice glucémico, terapia antioxidante y terapia antiglicante.

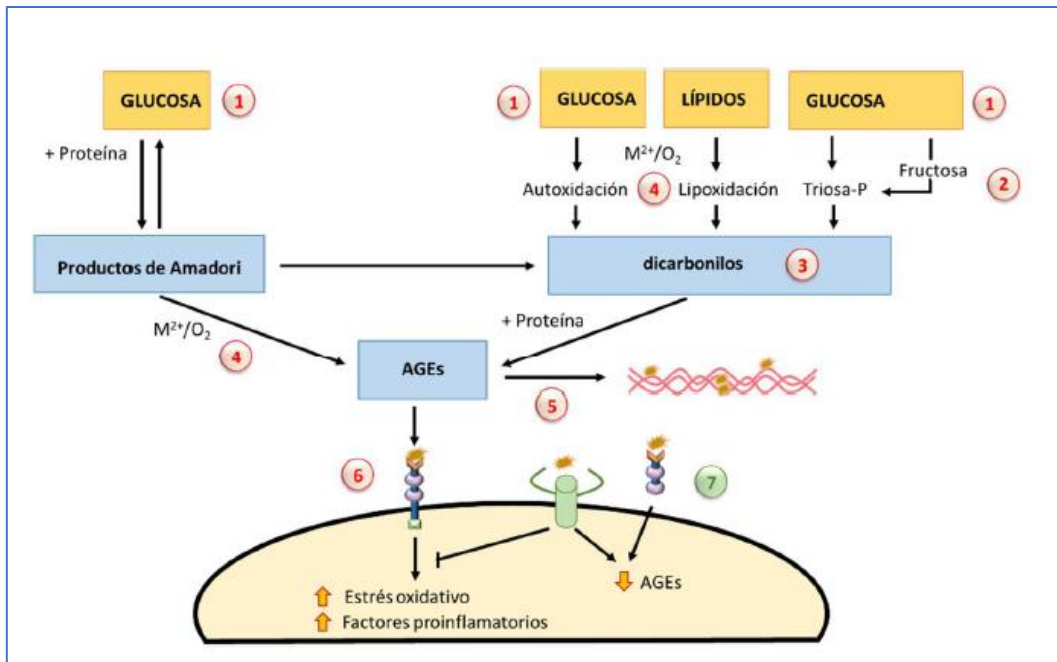


Figura 1.5. Potenciales sitios de acción de compuestos antiglicantes. **1:** hipoglucemiantes; **2:** inhibidores de enzimas del metabolismo de la glucosa; **3:** atrapantes de α -dicarbonilos; **4:** quelantes de metales y secuestrantes de radicales libres; **5:** compuestos de escisión de entrecruzamientos; **6:** bloqueantes de AGEs; **7:** activadores de receptores de AGEs (modificado de Navarro-Gómez, 2017). **M:** metal.

Los primeros estudios sobre la inhibición de formación de AGEs *in vitro* e *in vivo* surgieron desde el ámbito farmacológico con el diseño de compuestos de síntesis, como la aminoguanidina (Thornalley y *col.*, 2003). Es una hidracina capaz de atrapar compuestos α -dicarbonílicos como los mostrados en la **Figura 1.3** (Thornalley y *col.*, 2003) y ejercer una actividad antioxidante al quelar radicales oxidrilos libres (Giardino y *col.*, 1998). Sin embargo, los efectos secundarios adversos que se presentaron en los ensayos clínicos posteriores dirigieron las investigaciones hacia la búsqueda de compuestos bioactivos de origen natural.

Estos estudios sobre las reacciones *in vivo* han aportado datos para el entendimiento de los mecanismos de reacción y de inhibición y contribuido a los avances en la metodología analítica para la definición y detección de intermediarios.

1.2. Agentes inhibidores de reacciones de deterioro provenientes de fuentes vegetales

La industria alimentaria emplea productos químicos de diferente funcionalidad, ya sea como ingredientes sintéticos específicos o aditivos con el fin de inhibir algunas de las reacciones químicas mencionadas. Los sulfitos y compuestos antioxidantes sintéticos son considerados inhibidores universales del pardeamiento, y se han empleado durante décadas para controlar el pardeamiento enzimático, no enzimático y el deterioro de los lípidos. Sin embargo, dado que el uso de sulfitos ha sido prohibido para su uso en frutas y verduras frescas (FDA, 1987) y los antioxidantes sintéticos han sido cuestionados por su toxicidad, hay una necesidad de encontrar extractos naturales para el reemplazo de aditivos sintéticos (Martín-Diana y *col.*, 2008).

Sin embargo, existe una demanda mundial de métodos de producción de bajo impacto en la calidad nutricional de los alimentos y/o del empleo de aditivos naturales. Desde hace algunos años, los estudios sobre empleo de extractos vegetales, por ejemplo, para inhibir reacciones de oxidación, o ciertas sales o polioles para retardar la cinética de PNE, muestran la potencialidad de agentes naturales como inhibidores de reacciones de deterioro.

Sobre la base de los estudios *in vivo*, los mecanismos subyacentes de los inhibidores de AGEs de los extractos naturales podrían actuar de diferentes maneras (Ramkissoon y *col.*, 2013; Ramkissoon y *col.*, 2012)., por ejemplo:

- a) bloqueando la unión de los azúcares a las proteínas, ejerciendo efectos en etapas tempranas de la glicación inhibiendo la formación de la base de Schiff,
- b) bloqueando la formación de productos intermedios de Amadori,

- c) atenuando la glicosilación y estrés oxidativo atrapando o barriendo algunos productos intermedios, incluyendo dicarbonilos reactivos y radicales libres, producidos durante el proceso de glicación, y
- d) rompiendo enlaces cruzados generados durante la formación de AGEs.

Los compuestos fenólicos se situaron en el centro de atención de las investigaciones debido principalmente a la relación entre la capacidad antioxidante de los mismos y los beneficios frente diversas patologías (Beseni *y col.*, 2017; Balasundram *y col.*, 2006).

Las investigaciones sobre posibles compuestos inhibidores y antioxidantes obtenidos a partir de vegetales comestibles se encuentran en crecimiento, ya que tienen las condiciones requeridas: no son tóxicos y no tienen efectos secundarios conocidos (Gao *y col.*, 2016; Balasundram *y col.*, 2006).

Por otro lado, los subproductos vegetales generados en la industria agroalimentaria son una fuente rica de compuestos bioactivos beneficiosos para la salud que podrían ser aprovechados como suplementos alimentarios, nutracéuticos, cosméticos e incluso productos de uso farmacológico. Pueden suponer un problema de gestión medioambiental, además de limitar el rendimiento económico del proceso.

La búsqueda de compuestos inhibidores de reacciones que se producen durante el procesado y almacenaje de alimentos a partir de extractos vegetales ofrece la posibilidad de mitigar la proporción de sustancias potencialmente tóxicas cumpliendo con la premisa de emplear ingredientes naturales y optimizar procesos de producción mejorando la seguridad de los alimentos procesados y almacenados (Sirichai *y col.*, 2012; Chatterjee *y col.*, 2007).

1.2.1. Antioxidantes naturales y su funcionalidad

Los antioxidantes naturales son moléculas que tienen como objetivo prevenir o retardar las reacciones oxidativas de otras moléculas, generalmente sustratos biológicos como proteínas o ácidos nucleicos y lípidos. La oxidación de dichos sustratos podrá ser iniciada por dos especies distintas: los radicales libres, y aquellas especies que, sin ser radicales libres, son suficientemente reactivas para inducir la oxidación de sustratos como los mencionados (Brewer, 2011; Dugan, 1980;). A partir de esta definición un antioxidante presente en un producto determinado está destinado a conseguir que el mismo conserve sus condiciones óptimas durante un mayor periodo de tiempo.

Existen diversas formas de clasificar los antioxidantes, los exógenos (liposolubles e hidrosolubles) incorporados a través de la dieta, según Brewer (2011) se clasifican en:

- Vitaminas-antioxidantes, como ácido ascórbico, α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol, δ -tocoferol y β -caroteno (o provitamina A).
- Carotenoides (como luteína, zeaxantina y licopeno).
- Polifenoles, en sus categorías de flavonoides y no-flavonoides, la actividad antioxidante se debe con frecuencia a los ácidos fenólicos (ácido gálico, protocatecúico, cafeico y rosmarínico), diterpenos fenólicos (carnosol, ácido carnósico, rosmanol y rosmadial), flavonoides (quercetina, catequina, naringenina y kaempferol) y volátiles aceites (eugenol, carvacrol, timol y mentol).
- Compuestos que no caen en las tres categorías anteriores, como son algunos glucosinolatos (ej. isotiocianatos) y ciertos compuestos organo-azufrados (ej. dialil-disulfuro).

Los tocoferoles existen en la naturaleza como una mezcla de cuatro isómeros (alfa, beta, gamma y delta). La actividad antioxidante de los isómeros es diferente al igual que su poder vitamínico. Numerosos estudios demuestran que la capacidad antioxidante radica fundamentalmente en los isómeros gamma y delta, siendo prácticamente nula en los isómeros alfa y beta (Brewer, 2011). Estos antioxidantes previenen la oxidación de los lípidos al detener las reacciones en cadena de los radicales libres.

Los flavonoides, los fenoles totales y los compuestos fenólicos no flavonoides están fuertemente correlacionados con la actividad antioxidante (ORAC y DPPH•) (Granato y *col.*, 2010).

Por norma general, los antioxidantes como aditivos para uso en alimentación deben ser económicos, seguros, eficaces en bajas concentraciones, estables durante el procesamiento y en los productos terminados y carentes de efectos indeseables como color, sabor y olor (Capanoglu y *col.*, 2010). En la actualidad, no existe ningún antioxidante que cumpla con todas estas características a la vez, por lo que la selección de los antioxidantes dependerá de factores como la aplicación deseada, la compatibilidad, las directrices reglamentarias o las tendencias del mercado (Capanoglu y *col.*, 2010).

1.2.2. Antiglicantes naturales

En los últimos años se han probado extractos naturales de diferente procedencia, con potencial acción antiglicante. Entre los más destacados se encuentran las especias, frutas, hortalizas, hierbas y semillas cuya riqueza en fitoquímicos bioactivos les confiere la actividad buscada.

Se comprobó que extractos de vegetales de las familias Brassicaceae o Alliaceae pueden inhibir el pardeo enzimático y tienen también efecto antioxidante sobre los componentes lipídicos de alimentos tanto sólidos como líquidos y en sistemas modelo (Bustos y col., 2015; Bustos y col., 2014; Paradiso y col., 2009; Roldán y col., 2008; Kim y col., 2005). Asparaginasa, ácidos, fosfolípidos, hidrocoloides, antioxidantes, proteínas y aminoácidos, entre otros, se han propuesto alternativamente como agentes de mitigación eficaz de compuestos indeseables en sistemas de alimentos (Jia y col., 2012; Medeiros Vinci y col., 2012; Salazar y col., 2012; Anese y col., 2011; Kotsiou y col., 2011; Zamora y col., 2011).

Entre las especias más importantes con destacadas propiedades funcionales como antioxidantes y antiglicantes se encuentran las de la familia Lamiaceae (orégano, tomillo, salvia, mejorana, albahaca, cilantro y pimientos) (De La Torre y col., 2017) y algunos cereales como el arroz y sus derivados (Premakumara y col., 2013) y otras fuentes que han demostrado gran potencial como la pimienta (Cazzola y Venvenuto, 2014; Saraswat y col., 2009) y el fenogreco (Abeysekera y col., 2018; Srinivasan, 2006).

Recientemente Moniruzzaman y col. (2015) determinaron la actividad antiglicante de 40 especias en diferentes modelos de glicación *in vitro* donde el clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) mostró la mayor actividad antiglicante correlacionada directamente con su mayor contenido en compuestos fenólicos. Otro grupo con un alto contenido en compuestos fenólicos son las frutas y hortalizas. Estudios llevados a cabo *in vitro* en la granada (*Punica granatum*) destacan sus propiedades antioxidante, antidiabética, hipolipemiente, antiinflamatoria, antitumoral y cardiosaludable atribuidas a su contenido fenólico y especialmente a su contenido en taninos hidrolizables, punicalagina, antocianinas y derivados del ácido elágico (Viuda-Martos y col., 2010).

1.3. Fuentes de antioxidantes y antiglicantes

Las especias han sido utilizadas durante miles de años como agentes aromatizantes, colorantes y conservantes de alimentos y se destacan especialmente por ser utilizadas como medicina natural para el tratamiento de ciertas enfermedades crónicas por su alto contenido en compuestos bioactivos (Srinivasan, 2007; Srinivasan, 2006). Las especias generalmente carecen de clorofila e incluyen rizomas o raíces (jengibre), cortezas (canela), yemas florales (clavo de olor), frutos (pimienta) y semillas (nuez moscada, fenogreco). Por otro lado, las hierbas sí tienen clorofila y comprenden plantas herbáceas, como la albahaca, orégano, romero, tomillo, así como arbustos aromáticos (salvia) y hojas de árbol (laurel) (Padín, 2015).

Sobre la base de datos de bibliografía se seleccionaron especias (pimientas, fenogreco y comino), una hierba (tomillo) y además salvado de arroz y arroz salvaje. Todos ellos, además de poseer características antioxidantes han demostrado algún efecto *in vivo* o *in vitro* sobre la captación de compuestos dicarbonílicos, o capacidad hipoglucemiante.

1.3.1. Pimientas

En la familia de las piperáceas se encuentra la especie *Piper nigrum* de la cual se obtienen sus bayas que se comercializan como pimienta verde, pimienta negra y pimienta blanca. Todas estas variedades de pimientas difieren en el período de maduración en que se recolectan o en el tratamiento dado a las bayas (**Figura 1.6.a**).



Figura 1.6. (a) Árbol de pimienta (*Piper nigrum*) y sus bayas en diferentes estadios de su maduración. (b) Árbol de pimienta de Jamaica (*Pimenta dioica*) y sus bayas maduras. (c) Árbol de falsa pimienta rosa (*Schinus molle*), Aguaribay y frutos maduros.

Las bayas de **pimienta verde** de aroma y sabor frutado (**Figura 1.6.a**), con menor grado de picor de las tres, son cosechadas sin madurar y secadas para su posterior consumo como granos enteros y/o triturados al momento de su utilización.

La **pimienta negra** es cosechada a mitad de maduración (**Figura 1.6.a**), seguidamente es brevemente escaldada en agua para romper las paredes celulares y de este modo acelerar el proceso de oscurecimiento que sucederá durante el secado, lo cual incrementará el grado de picor.

El grano de **pimienta blanca** se cosecha totalmente maduro cuando alcanza tonalidades rojizas (**Figura 1.6.a**), entonces se seca y mediante un proceso mecánico se retira el

pericarpio del fruto por lo cual el grano queda de color blanco y con un grado de picor menor al de pimienta negra y mayor a la verde.

En todas las bayas de estas pimientos el compuesto químico del tipo alcaloide, piperina, es el responsable principal de las propiedades aromáticas y de sabor característico. La piperina (5-(3,4-metilenedioxifenil)-2,4-pentadienoil-2-piperidina) se encuentra en la capa externa del fruto y puede aislarse químicamente como una sustancia cristalina e incolora o de leve color amarillo crema. Este compuesto es responsable del sabor picante-amargo y de la mayoría de las propiedades bioactivas atribuidas a la especie *Piper nigrum* (Ahmad y col., 2012).

La **pimienta de Jamaica** (*Pimenta dioica*) es una especie de la familia de las Myrtaceae de la cual se cosechan sus frutos maduros y se secan para su consumo y comercialización en forma de granos enteros y en polvo. Su aroma y sabor fresco es muy característico al igual que su color marrón muy oscuro, posee un grado de picor menor que el de pimienta negra (**Figura 1.6.b**). Esta pimienta se utiliza medicinalmente como carminativo, estimulante, antioxidante, antidisentérico y con propiedades contra la gastritis debido al efecto analgésico del principal compuesto presente en la misma, el eugenol. Los granos de esta pimienta se caracterizan por una superficie rugosa debido a las glándulas presentes en la misma que contribuyen al aroma de estos granos.

La **pimienta rosa** (*Schinus molle*) es una especie de la familia de las Anacardiaceae, popularmente conocido su árbol con el nombre de Aguaribay (falso pimentero), es originario del sur de Brasil, Uruguay y la región Mesopotámica de Argentina, sus semillas cosechadas maduras de color rosa y secadas, se consumen como pimienta rosa o sucedáneo de la pimienta (**Figura 1.6.c**). Es de picor muy suave y aroma frutado muy intenso debido a sus aceites esenciales muy volátiles, y al felandreno y el terpineol

presentes en estos frutos. Existen en forma salvaje y sus propiedades no han sido analizadas en forma completa (Padín, 2015).

1.3.2. Fenogreco

El **Fenogreco** o alholva (*Trigonella foenum-graecum*), (**Figura 1.7**), es una variedad de legumbre perteneciente a la familia de las fabáceas, su semilla es de forma triangular, de color marrón claro, de sabor amargo, aroma a heno fresco y penetrante. En polvo se usa como una especia para aromatizar sopas y verduras, facilita la digestión y combate la halitosis.



Figura 1.7. Planta con vainas dentro de las cuales crecen las semillas de fenogreco o alholva (*Trigonella foenum-graecum*).

El consumo de suplementos de fenogreco o alholva ha demostrado reducir los niveles de colesterol, triglicéridos y lipoproteínas de baja densidad. Algunas pruebas en

humanos han demostrado que los efectos antidiabéticos de estas semillas disminuyen mucho los síntomas asociados con la diabetes mellitus tipo I y II; tanto en humanos como en modelos animales (Srinivasan, 2006; Basch *y col.*, 2003;).

1.3.3. Comino

El **comino** (*Cuminum cyminum*) es una planta que pertenece a la familia de las Apiaceae, de la cual se cosechan sus semillas post florescencia para ser usadas como especies aromáticas en la gastronomía y en medicina debido a sus importantes efectos antiinflamatorio, carminativo, antiespasmódico, diurético e hipoglucemiante (Sowbhagya, 2013).

El comino es una fuente de hierro, vitamina C y E, y por dichos aportes se considera su capacidad para mantener el sistema inmunológico y el digestivo en forma saludable, (Sowbhagya, 2013). Recientemente se ha reportado que posee propiedades antiglicantes *in vitro* e *in vivo* (Zhang *y col.*, 2015). Así mismo el aceite esencial de comino también posee propiedades antifúngicas y antimicrobianas (Mnif y Aifa, 2015), además de ser una fuente importante de antioxidantes (Nadeem y Riaz, 2012).

1.3.4. Tomillo

En estudios recientes se encontró que las hojas de tomillo (*Thymus vulgaris*), (**Figura 1.8**), las cuales se extraen de un arbusto nativo de la región del Mediterráneo occidental poseen eficiente actividad antimicrobiana y antifúngica y se usan en algunos alimentos para extender su vida útil (Liu *y col.*, 2017; Assiri *y col.*, 2016; Hussein *y col.*, 2011).



Figura 1.8. Tomillo: a la izquierda, ramas con sus hojas verdes y a la derecha, hojas secas.

El tomillo es muy útil en casos de infecciones e infestaciones intestinales variadas, como anquilostomas, bacterias gram-positivas y gram-negativas, hongos y levaduras. Su componente bioactivo, el timol (**Figura 1.11.a**), es efectivo contra las enterobacterias y cocos. El tomillo también puede mejorar el funcionamiento del hígado y actuar como un estimulante del apetito. Se usa en el tratamiento del tubo cartilaginoso, las infecciones bronquiales y urinarias (Liu y *col.*, 2017; Prasanth y *col.*, 2014; Manou y *col.*, 1998). La concentración de aceite esencial puede variar entre el 0,8 y el 2,5 % en función de la procedencia y del periodo en el que se recolecte de la planta. Es rico en timol y carvacrol (80 %) (**Figura 1.11.b**), γ -terpineno, p-cimeno, limoneno, borneol, α y β -pínenos, linalol, geraniol, 1,8-cineol, terpineno-1-ol-4, tujan-4-ol, cis-mircenol (Kulisic y *col.*, 2005).

Además, posee los flavonoides: timonina, cirsilineol, narnigenina, erodictol, luteonina, apigenina, quercetina, rutina, cirsimaritina, eupatorina, timusina, xantomicro; los

aminoácidos: isoleucina, cistina, valina, glicina y las vitaminas B1, B2, B3 y vitamina C (Muñoz Acevedo, 2007; Kulisic y *col.*, 2005; Manou y *col.*, 1998;).

1.3.5. Arroz salvaje y salvado de arroz

El **arroz salvaje** (*Zizania palustris*) pertenece a la familia de las poáceas, y puede ser consumido como otros cereales, en particular como el arroz común, por tener características parecidas, aunque pertenecen a géneros diferentes. Es notable su particular color oscuro como se puede observar en la **Figura 1.9**. Además, este arroz salvaje posee propiedades antioxidantes, antiinflamatorio, protector cardiovascular y hepático (Asamarai y *col.*, 1996; Wu y *col.*, 1994).



Figura 1.9. Granos de arroz salvaje (*Zizania palustris*) en sus diferentes tonalidades de color oscuro. A la derecha, se puede observar la planta y su panícula con granos.

Si bien el arroz salvaje no es una fuente completa de proteínas, porque no contiene cantidades adecuadas de todos los aminoácidos esenciales, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (*USDA*) informó en un examen de composición nutricional que contiene “más lisina y metionina que la mayoría de los cereales

comunes” y es una fuente de vitaminas del complejo B, como tiamina, riboflavina y niacina.

Por su composición de aminoácidos (lisina, metionina) juega un papel importante en la formación de colágeno, y tiene impacto en la reparación de tejido de la piel, y es beneficioso para el sistema inmune y el desarrollo de anticuerpos. Además, es un componente vital para la transformación de las grasas y mantener un hígado sano mediante la prevención de la acumulación de grasas y toxinas (Asamarai y *col.*, 1996; Wu y *col.*, 1994).

El **salvado de arroz** (*Oryza sativa*), (**Figura 1.10**), se obtiene durante el proceso de pulido del arroz y en concreto está compuesto por las cinco capas más externas del grano, la primera capa exterior de envuelta o cutícula, la segunda o epicarpio, la tercera o endocarpio, la cuarta capa, llamada testa y la quinta denominada aleurona.



Figura 1.10. Salvado de arroz, granos de arroz con parte del salvado aun presente en el grano y panícula seca con sus granos.

En algunos estudios se concluyó que diferentes tipos de arroz y sus derivados tienen capacidad antiglicante y antiamilasa, observada principalmente en los granos coloreados, lo cual se relaciona con la presencia de compuestos antioxidantes en dichos granos (Premakumara *y col.*, 2013).

1.4. Principales compuestos fenólicos de las especias estudiadas

Recientemente ha cobrado especial relevancia la búsqueda de compuestos bioactivos capaces de captar α -dicarbonilos como mecanismo para inhibir el proceso de glicación, ya que estos compuestos intermediarios participan activamente en la formación de AGEs. Lo *y col.* (2011) concluyeron que los compuestos fenólicos con tres sustituyentes OH en el anillo benceno mostraban una mayor eficacia de atrapamiento de metilglioxal tras una incubación de una hora en condiciones fisiológicas simuladas con respecto a los que contaban únicamente con uno o dos sustituyentes, que apenas mostraban actividad. Adicionalmente, la presencia de un grupo carboxilo en el benconotriol produjo impedimentos estéricos y cambios de carga en los carbonos, por lo que influyó negativamente en su reactividad con el α -dicarbonilo (Lo *y col.*, 2011).

Otro estudio similar llevado a cabo por Shao *y col.* (2014) mostró que el anillo A de los flavonoides era el responsable de la captación de metilglioxal mediante una reacción nucleofílica. Las posiciones orto mostraron favorecer en mayor medida el desarrollo de la reacción con el α -dicarbonilo que las posiciones meta, mientras que el número de oxidrilos presentes en el anillo B o C no influyó.

Además de los aspectos tecnológicos que implican la preservación del valor nutricional y la mitigación de la formación de compuestos potencialmente tóxicos, preservando las características adecuadas de los alimentos, las fuentes naturales con alto contenido en

fitoquímicos bioactivos han constituido un enfoque de gran interés para combatir el desarrollo de enfermedades crónicas.

Dada la evidente relación de los compuestos fenólicos en los procesos antiglicantes, en la **Tabla 1.1** se indican algunos de los principales componentes fenólicos de las especies estudiadas.

Los polifenoles tienen en general propiedades anfifílicas, dependiendo su hidrofobicidad del tipo y posición de los sustituyentes. En su forma estructural más elemental, una función fenólica constituye un resto anfifílico que combina el carácter hidrófobo de su núcleo aromático planar con el carácter hidrófilo de su sustituyente hidroxil polar, que puede actuar como donante o como aceptador de enlaces de hidrógeno. Las interacciones hidrófobas y la formación de enlaces de hidrógeno son aparentemente dicotómicas, pero a menudo son efectos complementarios que los compuestos fenólicos vegetales emplean para interactuar físicamente con otras biomoléculas, como las proteínas. La presencia de al menos dos grupos hidroxil adyacentes en un anillo de fenilo permite la quelación de metales, por ejemplo.

Tabla 1.1. Principales compuestos fenólicos de las especies estudiadas.

Especies	Compuestos fenólicos	Familia	Referencias
Pimienta (<i>Piper nigrum</i>)	Piperina; en la verde: glucósido 3,4-dihidroxifenil etanol, 3,4-dihidroxi-6-(N-etilamino) benzamida y glicósidos de ácido fenólico; glicósidos de los flavonoides kampfrol, ramnetina y quercetina, y amidas fenólicas	Piperaceae	Bandyopadhyay y col. (1990); Variyar y col. (1988); Vösgen y Herrmann (1980).
Pimienta de Jamaica, Allspice (<i>Pimenta dioica</i>)	Eugenol, quercetina, ácido gálico, ericifolina (pimentol)	Myrtaceae	Zhang y Lokeshwar (2012).
Pimienta rosa Aguaribay (<i>Schinus molle</i>)	Felandreno y terpineol	Anacardiaceae	Padín (2015).
Tomillo (<i>Thymus vulgaris</i> L.)	Ácidos fenólicos: gálico, cafeico, rosmarínico; Compuestos volátiles (timol, carvacrol), diterpenos fenólicos, flavonoides	Lamiaceae	Kulisic y col. (2005).
Fenogreco Alholva (<i>Trigonella foenum-graecum</i>)	Estilbeno, resveratrol, flavonoides derivados de apigenina, luteolina y kamferol	Fabaceae	Benayad y col. (2014); Ali y ElNour (2012).
Arroz salvaje (<i>Zizania palustris</i>)	Flavonoides (epigalocatequina, epicatequina), antocianinas (rutina), ácidos (ferúlico, vaníllico, elágico, sinápicosiríngico; cafeico, o-cumarico, p-hidroxibenzoico, protocatechuico, gálico y cinámico	Poaceae	Sumczynski y col. (2017).
Salvado de arroz (<i>Oryza sativa</i>)	Antocianinas (glucósidos de cianidina y peonidina); antocianidinas (cianidina y malvidina); ácidos fenólicos (ferúlico, cafeico y protocatechuico	Poaceae	Yawadio y col. (2007); Chen y col. (2006); Zhang y col. (2006); Hyun y Chung, (2004); Yan y col. (2018).
Comino (<i>Cuminum cyminum</i> L.)	Ácidos: cumárico y p-cumárico, rosmarínico, trans-2-dihidrocinámico. Flavonoides: lutelina, cumarina	Apiaceae	Rebey y col., (2012).

En la **Figura 1.11**, se presentan las estructuras químicas y el potencial hidrofóbico para algunos de los principales compuestos responsables de las características funcionales de los vegetales investigados. A través del programa Molinspiration se representó la superficie lipofílica de dichos compuestos mediante un código de colores indicado en la figura, desde rosa-azul-verde-amarillo y rojo de mayor a menor hidrofobicidad.

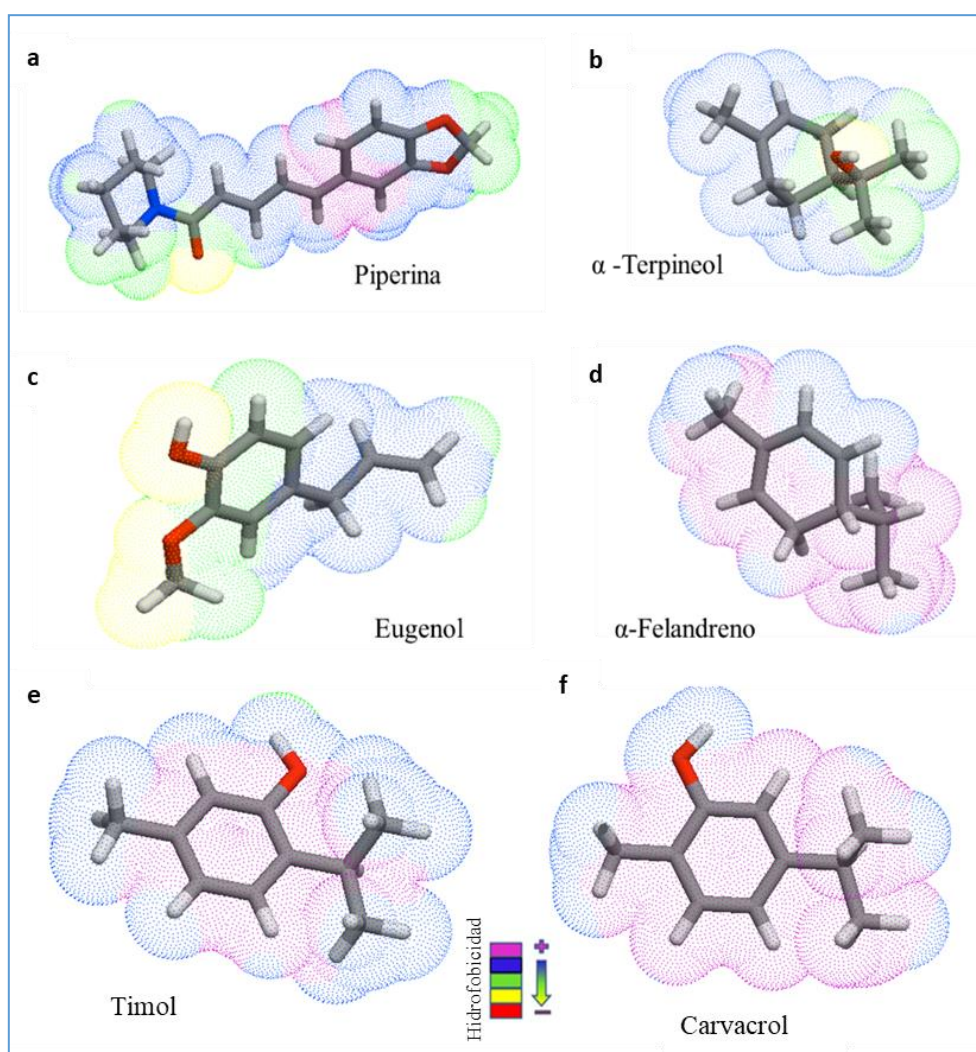


Figura 1.11. Representación molecular de la estructura espacial y su potencial hidrofóbico calculados utilizando el programa Molinspiration. Las áreas lipofílicas se indican con un gradiente de colores. **a)** piperina, **b)** eugenol, **c)** α -terpineol, **d)** α -felandreno, **e)** timol y **f)** carvacrol.

1.5. Tecnologías y solventes para la obtención de extractos inhibidores

La extracción de compuestos bioactivos a partir de fuentes naturales, utilizando técnicas verdes (*green technology*) y solventes de extracción apropiados, constituye un paso importante en la elaboración de productos ricos en fitoquímicos con propiedades anti-pardeamiento y antioxidantes (Gao y *col.*, 2016). La extracción de bioactivos de fuentes naturales tradicionalmente implicó el uso de solventes orgánicos, como etanol, metanol, acetona, cloroformo, que permiten aumentar el rendimiento y composición química de los extractos. Sin embargo, su uso ha sido cuestionado ya que están asociados con problemas toxicológicos, contaminación del medio ambiente y son relativamente costosos (Barba y *col.*, 2016).

1.5.1. Extracción asistida por ultrasonido

Entre las técnicas de extracción no convencionales estudiadas en los últimos años, la extracción asistida por ultrasonidos (EAU) ha demostrado una alta eficiencia de extracción con bajo consumo de energía y de disolventes, por lo que la aplicación de ultrasonido se ha comenzado a utilizar cada vez con mayor éxito (Nipornram y *col.*, 2018; Talmaciu y *col.*, 2015; Wakte y *col.*, 2011). El método de EAU emplea ondas acústicas en un rango de frecuencias entre 20 y 100 kHz, que son mucho menores que aquellas empleadas para pruebas diagnósticas (estas últimas son del rango de 5 a 10 MHz).

En la **Figura 1.12** se observan equipos empleados en extracción asistida por ultrasonido. Cuando se sonicen líquidos con ultrasonido, las ondas de sonido se propagan en el medio en ciclos alternantes de alta presión (compresión) y baja presión (rarefacción), con velocidades dependientes de la frecuencia.

En los ciclos de baja presión, las ondas producen burbujas de vacío o huecos en el líquido. Cuando estas alcanzan un volumen al que no pueden absorber más energía, colapsan violentamente en el ciclo de alta presión. Durante la implosión se alcanzan altas temperaturas y presiones locales. Esto causa eyección de líquido a altas velocidades y las fuerzas resultantes rompen paredes y membranas celulares y mejoran la transferencia de masa y la penetración del disolvente en el material vegetal (Roselló-Soto y *col.*, 2015). Este fenómeno se llama cavitación.



Figura 1.12. Equipo empleado para realizar extracción asistida por ultrasonido (Hielscher Ultra Sound Technology modelo UP100H).

1.5.2. β -ciclodextrina como facilitador de extracción

Los vegetales contienen generalmente gran cantidad de compuestos activos, siendo sus efectos generalmente atribuidos a interacciones sinérgicas de varios componentes (Kfoury y *col.*, 2015; Hu y *col.*, 2012). Por lo tanto, maximizar la extracción de estos compuestos, ha partir del tejido vegetal es clave para asegurar el efecto buscado (Gao y

col., 2016). Si bien la extracción en agua por cocción ha sido usada tradicionalmente, el proceso es largo, muchos compuestos pierden su actividad y sólo se extraen trazas de compuestos hidrofóbicos. El uso de solventes orgánicos ha sido cuestionado ya que están asociados con problemas toxicológicos, contaminación y son relativamente costosos (Chemat y *col.*, 2012). Esto hace indispensable la búsqueda de nuevos aditivos/solventes de extracción y el desarrollo de procedimientos seguros y no contaminantes (Diamanti y *col.*, 2017). Estudios recientes muestran que la encapsulación en ciclodextrinas (CDs) permitiría mejorar la eficiencia de extracción de compuestos naturales del tejido vegetal, mejorando su solubilidad, estabilidad y/o biodisponibilidad (Fenyvesi y *col.*, 2016; Gao y *col.*, 2016). Su baja toxicidad y biocompatibilidad las hace especialmente atractivas para su uso como aditivos (Chen y *col.*, 2007)

Las ciclodextrinas (CD) son oligosacáridos cíclicos, que típicamente contienen seis (α -CD), siete (β -CD) u ocho (γ -CD) unidades de glucopiranosas. Pueden formar complejos con una amplia gama de compuestos gracias a su estructura especial de cono truncado, con el exterior hidrofílico y una cavidad interior lipofílica. Esta característica les permite encapsular total o parcialmente, moléculas de diferentes geometrías y tamaños (Fenyvesi y *col.*, 2016; Ratnasooriya y Rupasinghe, 2012, Li y *col.*, 2010). La inclusión cambia las propiedades fisicoquímicas del compuesto encapsulado mejorando su solubilidad, estabilidad y/o biodisponibilidad (Astray y *col.*, 2010; Szente y Szejtli, 2004). En particular, la β -ciclodextrina se usa comúnmente como un agente protector de compuestos sensibles y para aumentar la solubilidad de los ligandos incluidos (Chao y *col.*, 2012; Loftsson y Duchêne, 2007).

En relación a la obtención de extractos naturales, las CD permiten mejorar la extracción de biomoléculas de interés, tanto hidrofílicas como hidrofóbicas, de matrices vegetales.

La extracción de compuestos fenólicos empleando soluciones acuosas de CD ha demostrado ser un proceso eficiente y ecológico (Parmar y *col.*, 2015; Ratnasooriya y Rupasinghe, 2012).

Las CD tienen menor toxicidad y menor potencial de producir contaminantes secundarios que los solventes tradicionales, siendo un aditivo ecológico para la extracción rápida y efectiva de compuestos hidrofílicos e hidrofóbicos de fuentes naturales. Las tecnologías que utilizan CDs como agentes de extracción aún se encuentran en desarrollo, por lo cual su potencial tecnológico y de mayor rendimiento aún es desconocido (Parmar y *col.*, 2015).

En la **Figura 1.13** se presenta la estructura química y las dimensiones aproximadas de la cavidad, ancho y alto de la β -ciclodextrina, así como el volumen de la cavidad interna. La β -ciclodextrina es una molécula simétrica, a diferencia de α -ciclodextrina y γ -ciclodextrina que presentan una leve distorsión (Astray y *col.*, 2009).

Estudios espectroscópicos (rayos X, RMN) han demostrado que la conformación espacial de las CDs en solución es similar a la que tienen en estado cristalino (Komiyama y Bender, 1978). Además, estos estudios mostraron que la cavidad no polar se encuentra ocupada por moléculas de agua (Lindner y Saenger, 1982) tanto en solución como en estado sólido. El desplazamiento de estas moléculas de agua de la cavidad es una de las fuerzas impulsoras de la formación de complejos debido a los cambios de energía que se producen asociados a la salida del agua de un entorno no polar al solvente polar (Astray y *col.*, 2009; Szente y Szejtli, 2004; Rekharsky e Inoue, 1998).

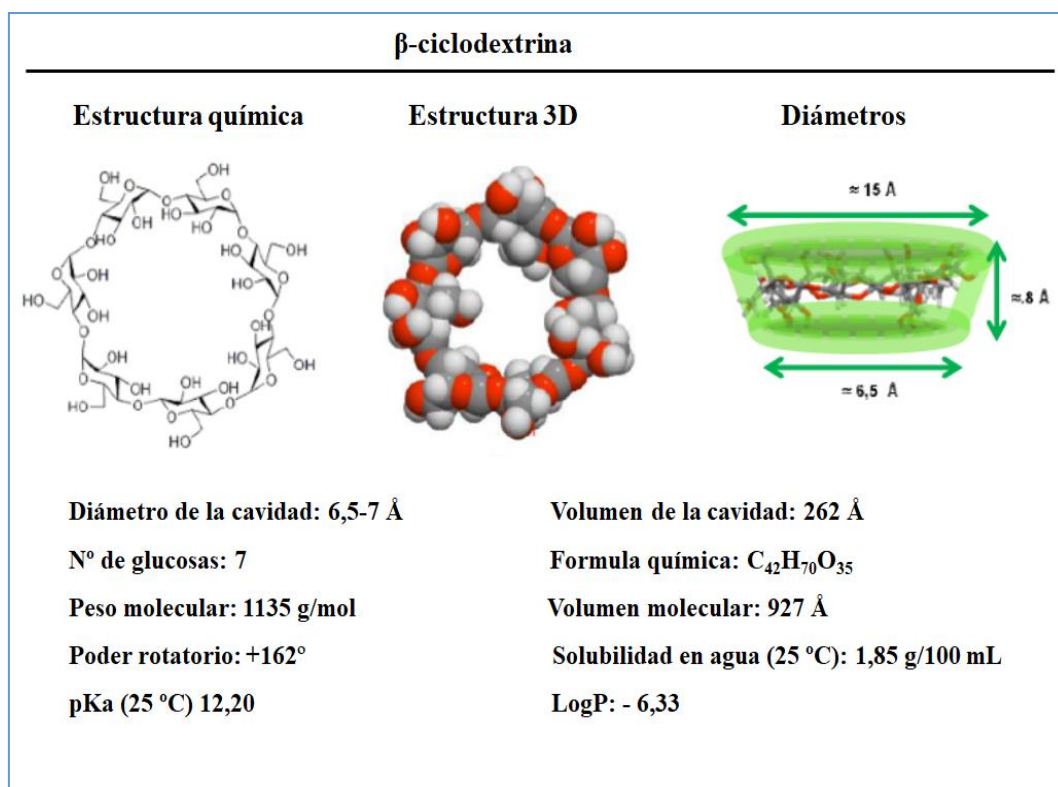


Figura 1.13. Estructuras y dimensiones de β-ciclodextrina. La representación de las moléculas se realizó con el programa Molinspiration, en rojo se indican los átomos de oxígeno, en gris los átomos de carbono y en blanco los hidrógenos. Las dimensiones y volúmenes aproximados de moléculas se obtuvieron de bibliografía (del Valle, 2004; Szejtli, 1998).

En la medida que el diámetro de la cavidad se incrementa, el número de moléculas de agua que podrían acomodarse en la misma aumentaría. Sin embargo, en las CDs de mayor número de glucosas (9 o más) esta fuerza impulsora disminuye porque existe menor diferencia de energía entre las moléculas de agua dentro y fuera de la cavidad (Astray y col., 2010; Astray y col., 2009).

1.6. Evaluación de la estabilidad de los extractos liofilizados, propiedades térmicas

Una vez que se han obtenido extractos eficientes para el fin buscado, es necesario disponer de métodos que permitan su conservación a largo plazo. La liofilización es uno de los métodos de deshidratación preferidos para este propósito.

La estabilidad de los productos liofilizados reside en que se encuentran en estado vítreo, caracterizado por una baja movilidad molecular. Las transiciones de fase y estado de estos materiales tienen efectos significativos en su conservación. Un material amorfo vítreo puede pasar al estado líquido sobreenfriado dependiendo de la temperatura y/o de la presencia de agua. El cambio entre los estados vítreo y líquido sobreenfriado se conoce como transición vítrea y corresponde a una temperatura a la cual los vidrios empiezan a perder rigidez y fluir (Sperling, 2006), perdiendo su capacidad estabilizante. Por debajo de la temperatura de transición vítrea (T_g), que es característica de cada sistema, el material es un sólido amorfo (vidrio). Los sólidos amorfos existen en un estado de no-equilibrio y exhiben cambios dependientes del tiempo (Acevedo y col., 2006).

La trehalosa es un disacárido no reductor de alta T_g , muy utilizado como excipiente en sistemas liofilizados. La estabilidad de estos sistemas está gobernada por la curva de T_g de trehalosa, que disminuye al aumentar el contenido de agua, y por las temperaturas de almacenamiento (Li y col., 2018).

El conocimiento de las temperaturas de transición vítrea en función del contenido de agua nos da una idea de los cambios complejos que ocurren en la humidificación y el tratamiento térmico de los sistemas, y por otro nos ayudan a predecir la estabilidad de los alimentos o ingredientes durante su almacenamiento o determinado procesamiento (Rahman, 2006).

1.7. Cambios de color producidos por las reacciones de pardeamiento

El color de un objeto es percibido a través de un fenómeno complejo en el cual intervienen varios factores, entre los que podemos mencionar los siguientes:

- La distribución de la energía espectral del iluminante, es decir, el tipo de luz que ilumina el objeto: luz natural, luz de lámpara de tungsteno, luz de led entre otras.
- Las condiciones en que el color es visto, el ángulo de visión, el color del contorno, la extensión del área coloreada y el nivel de iluminación.
- La sensibilidad del observador.
- Las características espectrales del objeto con respecto a la transmisión, absorción, y reflexión de la luz, a partir de los cuales es posible clasificar los objetos como opacos, transparentes o translúcidos.

La inspección visual humana puede determinar el color de un cuerpo, sin embargo, este fenómeno es muy subjetivo ya que depende de la traducción del estímulo en el cerebro del observador y, por lo tanto, para realizar un análisis de color objetivo, se requiere el uso de estándares de color como referencia. Para lograr una adecuada caracterización de los colores la Comisión Internacional de Color lleva adelante una estandarización de los sistemas de medida que emplean "espacios de color" y "coordenadas de color" y permiten especificar el espacio completo de color de forma tridimensional.

El espacio de color CIELAB de 1976 utiliza tres coordenadas para describir el color: L^* , a^* y b^* . El parámetro L^* representa la luminosidad del material y su valor varía en un rango de 0, que corresponde al color negro, hasta 100, que es el blanco. a^* varía de verde a rojo y b^* varía de azul a amarillo con valores que van desde -120 a 120 para ambos casos y representan las coordenadas cromáticas de este espacio. Este sistema ha sido ampliamente utilizado para medir el color en alimentos (Briones y Aguilera, 2005; Buera y col., 1991).

1.7.1. Análisis computarizado de imágenes

Para los materiales con distribución heterogénea del color, el uso de un sistema de visión computarizada permite eliminar y/o reducir algunas restricciones respecto de otros métodos instrumentales (Balaban, 2008). Desde hace algunos años se ha puesto énfasis en nuevas técnicas basadas en sistemas de visión computarizada y análisis de imágenes evaluar cambios durante el almacenamiento como el grado de pardeamiento y otras propiedades relacionadas con la calidad del alimento (Briones y Aguilera, 2005; Aguilera y Stanley, 1999).

La visión computarizada permite una gran resolución espacial cubriendo todo el objeto de interés, tarea que no es posible con un colorímetro triestímulo. Las cámaras digitales capturan los colores y pueden ser almacenados en computadoras usando el sistema RGB (*Red Green Blue*). 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 (González y Woods, 1992).

Hay 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 el uso de fórmulas matemáticas en el sistema CIELAB (González 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 aplicando el método de contornos y la segmentación de imágenes, se presenta como una alternativa interesante para sistemas heterogéneos, debido a que proporcionan gran cantidad de información en forma práctica (Jayas y col., 2000),

permitiendo la cuantificación del color de una manera más apropiada y facilitando el estudio de áreas con diferentes características cromáticas en simultáneo.

1.8. Metodología de superficie de multirrespuesta

Un paso importante en el desarrollo de inhibidores naturales funcionales es la optimización de las condiciones de extracción y luego el diseño de sistemas de estabilización. En este trabajo de tesis se analizó el efecto de diversas variables para optimizar la obtención de extractos naturales con funciones específicas. Para ello fue necesario emplear herramientas de análisis multivariado que permitieran un análisis global.

La metodología de superficie de multirrespuesta (SMR) es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas utilizadas en el tratamiento de problemas en los que una respuesta de interés está influida por varios factores de carácter cuantitativo. El propósito inicial de estas técnicas es diseñar un experimento que proporcione valores razonables de la variable respuesta y, a continuación, determinar el modelo matemático que mejor se ajusta a los datos obtenidos. El objetivo final de esta metodología es establecer los valores de los factores que optimizan el valor de la variable respuesta, o la combinación de múltiples variables respuestas (Favre *y col.*, 2018; Ribeiro Santos Rezende *y col.*, 2017; Myers *y col.*, 2009).

Una clase de diseño de tres niveles para estimar superficie de respuesta de segundo orden fue propuesta por Box-Behnken (1960), el cual es rotatable con una reducción importante del número de unidades experimentales en comparación con los diseños de 3ⁿ. Este diseño es esférico en vez de cuboidal ya que los puntos del diseño caen en los

bordes del cubo en vez de las esquinas (Shilpi y Mishra, 2017; Myers y *col.*, 2009; Kuehl y Kuehl, 2000).

Por lo tanto, el diseño de Box-Behnken es una superficie de respuesta esférica y giratoria, que incluye un punto central y puntos medios entre las esquinas, circunscritos sobre una esfera. Este diseño puede ser aplicado para la optimización de varios procesos químicos y físicos, donde el número de experimentos es determinado de acuerdo con los requerimientos del proceso (Myers y *col.*, 2009).

La optimización de los procesos de extracción implica la intervención de una gran cantidad de factores. Particularmente el uso de SMR es útil cuando varias variables de entrada tienen una influencia potencial en algunas medidas de rendimiento o características de la calidad, en el desarrollo, la mejora y la optimización de productos y procesos (Salamanca y *col.*, 2010; Deepak y *col.*, 2008).

1.8.1. Función deseabilidad

Con el fin de evaluar las respuestas a la combinación de factores que intervienen en la aplicación de los modelos de SMR estudiados Derringer y Suich (1980), establecieron la función deseabilidad (D), la cual es utilizada por numerosos autores Shilpi y Mishra (2017); Ribeiro Santos Rezende y *col.*, (2017) y Bonat y *col.*, (2015).

La deseabilidad individual y compuesta evalúa qué tan bien una combinación de variables satisface las metas que se definieron para las respuestas. La deseabilidad individual (d) evalúa la manera en que la configuración optimiza una respuesta individual; la deseabilidad compuesta (D) evalúa la manera en que la configuración optimiza un conjunto de respuestas en general. La deseabilidad tiene un rango entre cero

y uno. Uno representa la situación ideal; cero indica que una o más respuestas están fuera de los límites aceptables (Derringer y Suich, 1980).

El método de aplicación de la función de deseabilidad consiste en definir una función de deseabilidad para cada una de las variables de respuesta y, a partir de estas últimas, se define una deseabilidad global, con lo que el problema de optimización multivariado se convierte en un problema de optimización univariado ya que se desea maximizar la deseabilidad global para obtener un punto óptimo (Derringer y Suich, 1980). Una vez que se tienen los modelos ajustados para cada una de las respuestas hay que definir la función de deseabilidad, tal que refleje los valores más deseados que el usuario tiene para dichas respuestas.

La función de deseabilidad implica transformaciones de cada una de las variables de respuesta estimadas $Y_i(x)$ a un valor de deseable $d_i(x)$, donde $0 \leq d_i(x) \leq 1$. Si $d_i(x) = 1$, significa que la correspondiente respuesta estimada $Y_i(x)$ alcanza su máximo valor deseable; si $d_i(x) = 0$, la respuesta toma un valor no deseado.

Las deseabilidades individuales son combinadas usando la media geométrica para obtener una deseabilidad global D , **Ecuación 1.1**:

$$D = (d_1(Y_1) \cdot d_2(Y_2) \dots d_i(Y_i))^{1/i} \quad (\text{Ec. 1.1})$$

Donde:

los pesos $1/i$ son constantes que balancean la importancia relativa de cada variable. Esta elección es lógica ya que si alguna $d_i(x) = 0$, la deseabilidad global será $D = 0$,

indicando que el producto total es inaceptable, además de que $1/i$ son constantes que permiten balancear la importancia relativa de cada variable. La función de deseabilidad puede especificarse con transformaciones de una o dos colas, dependiendo de si la respuesta desea maximizarse, minimizarse o si se desea un valor objetivo, según la propuesta de Derringer y Suich (1980).

Según la escala de deseabilidad presentada por Lazić (2004), podemos interpretar los valores obtenidos para la función deseabilidad en términos de la calidad del producto y/o proceso. Los estándares para la deseabilidad se presentan en la **Tabla 1.2**.

Tabla 1.2. Estándares de aceptación de deseabilidad para un producto o proceso.

Valores	Escala	Calidad del producto o proceso
1,00	Excelente	Lo esencial en satisfacción o calidad. La mejora más allá de este punto no tendría ningún valor apreciable
0,80 - 1,00	Muy bueno	Aceptable y excelente, calidad o desempeño inusual, es mejor que lo disponible comercialmente.
0,63 - 0,80	Bueno	Aceptable y bueno, representa una mejora sobre la mejor calidad comercial.
0,37 - 0,63	Satisfactorio	Aceptable pero pobre. La calidad es aceptable para los límites de especificación, pero se desea que mejore.
0,20 - 0,37	Malo	Inaceptable. Los materiales con esta calidad conducirían a la falla del proceso.
0,00 - 0,20	Muy malo	Completamente inaceptable.

OBJETIVOS



2. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la efectividad de extractos de especias, condimentos y derivados de cereales seleccionados, como agentes con funcionalidad inhibidora del pardeo no enzimático, ya sea por sus efectos directos como agentes antiglicantes, o indirectos por su poder antioxidante. Los estudios tienen utilidad para la búsqueda de reemplazantes de aditivos sintéticos y para ampliar las aplicaciones tecnológicas de productos naturales en el desarrollo de alimentos novedosos.

2.1. Objetivos específicos

- Obtener extractos funcionales a partir de especias, condimentos y derivados de cereales. Se investigarán: pimienta verde, pimienta negra, pimienta blanca (*Piper nigrum*), pimienta de Jamaica (*Pimenta dioica*), pimienta rosa (*Schinus molle*), tomillo (*Thymus vulgaris*), fenogreco (*Trigonella foenum-graecum*), arrozsalvaje (*Zizania palustris*), salvado de arroz (*Oryza sativa*), comino (*Cuminum cyminum*).
- Optimizar la funcionalidad antioxidante de los extractos empleando técnicas verdes de extracción, analizando las variables tipo de solvente (etanol, agua y soluciones acuosas de β -ciclodextrina), tiempo y temperatura, combinadas con la extracción asistida por ultrasonido.
- Caracterizar e investigar la relación entre la capacidad antioxidante, antipardeo y antiglicante (*in vitro*) de los extractos vegetales seleccionados y sus posibles interacciones en sistemas modelos líquidos.

- Formular matrices de estabilización para los principios activos durante el proceso de secado por liofilización.
- Estudiar la estabilidad de los extractos seleccionados y su funcionalidad durante el almacenamiento, bajo distintas condiciones de temperatura y humedad relativa ambiente.

MATERIALES Y MÉTODOS



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

Especias, condimentos y derivados de cereales

Se estudiaron extractos de las especias; pimienta verde (origen India), pimienta negra, pimienta blanca (*Piper nigrum*) (ambas origen Brasil), pimienta de Jamaica (*Pimenta dioica*, origen México), pimienta rosa (*Schinus molle*, origen Argentina), fenogreco (*Trigonella foenum-graecum*, origen India) y comino (*Cuminum cyminum*, origen Estados Unidos), de la hierba tomillo (*Thymus vulgaris*, origen Turquía) y además del arroz salvaje (*Zizania palustris*, origen India) y salvado de arroz (*Oryza sativa*, origen Brasil), que se adquirieron a un proveedor local (Melar) de Vila Ballester, Provincia de Buenos Aires, Argentina, en el año 2015. Las mismas se acondicionaron en ambiente seco y al resguardo de la luz para su utilización durante el tiempo de trabajo demandado.

Reactivos

Cloruro de Hierro (III) hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazina (TPTZ), 2,2-diphenyl-1-picrilhidrazil radical (DPPH•), albúmina de suero bovino (BSA), ácido gálico y 5-hidroximetil-2-furfural (calidad HPLC) se adquirió a Sigma–Aldrich® S.A. (St. Louis, MO, USA). Furosina ($\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4$) calidad HPLC se adquirió a Neosystem Laboratories (Strasbourg, France) y el reactivo de Folin-Ciocalteu (FC) a Biopack® (Buenos Aires, Argentina).

Sales y ácidos

Buffer acetato de sodio, carbonato de sodio trihidratado ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), ácido clorhídrico (HCl) (12M), etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$) y buffer fosfato salino de sodio (PBS) se adquirieron a Biopack[®] (Buenos Aires, Argentina). Heptasulfonato de sodio ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{SO}_3\text{Na}$), acetonitrilo ($\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$) y ácido fórmico (CH_2O_2) calidad HPLC, ácido tricloroacético (TCA) y metanol (CH_3O) se compraron a Sigma–Aldrich[®] S.A. (St. Louis, MO, USA).

Sacáridos y ciclodextrina

D-glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) y D-trehalosa ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) se adquirió a Biopack[®] (Buenos Aires, Argentina). β -Ciclodextrina (β -CD) ($\text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{O}_{35}$) (PM 1135) calidad alimentaria se adquirió a Roquette-Food (Francia, UE).

3.2. Soluciones de extracción y obtención de los extractos

Se realizó la molienda de cada una de las especias secas, condimentos y derivados de cereales seleccionados en Molino de Butt y el producto de la molienda se pasó por tamices hasta obtener un polvo fino de aproximadamente 10 μm .

Como solventes verdes de extracción se emplearon agua, soluciones acuosas de β -ciclodextrina 7,5 y 15 mM y mezcla agua-etanol (1:1).

La solución saturada de β -ciclodextrina, PM 1135, se preparó disolviendo 1,85 g en 100 mL de agua bidestilada para obtener una concentración 15 mM, la solución se calentó hasta 50 ± 2 °C aproximadamente por 30 min con agitación constante hasta

solubilización completa, luego se dejó reposar a temperatura ambiente (4 h a 25 °C) hasta su utilización.

La extracción se realizó siguiendo el protocolo establecido por Ramkissoon y *col.*, (2013) con algunas modificaciones, empleando una relación de sólidos secos a solvente 1:4 (p/p). Para ello, se pesaron 5 g de cada una de las muestras molidas en tubos de plástico de 50 mL, y se agregaron 15 mL del solvente seleccionado.

La extracción asistida por ultrasonido se realizó empleando un equipo UP100H (Hielscher Ultrasonics GmbH, Germany), equipado con un sonotrodo MS2 por 5 min, aplicando una densidad de poder acústico de 600 W/cm² a 0,5 ciclos con una amplitud de 220 µm (100 %). Durante el proceso, la mezcla de extracción se colocó en un tubo plástico de 50 mL sumergido en un baño de hielo a fin de impedir un sobrecalentamiento del extracto. Seguidamente se llevó a agitación por 24 h a las temperaturas de equilibrio ensayadas (20, 35 y 50 °C). Luego se centrifugó a 6372 rcf en centrifuga refrigerada a 4 °C por 30 min y el sobrenadante se colectó para su utilización.

3.3. Caracterización de los extractos

3.3.1. Evaluación del contenido de polifenoles totales por Folin-Ciocalteu (FC)

El contenido de polifenoles totales (CPT) se determinó en solución siguiendo el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Singleton y *col.*, 1999).

El reactivo de Folin-Ciocalteu es ampliamente utilizado para medir el contenido en compuestos fenólicos totales presente en los alimentos. Se basa en que los compuestos

fenólicos reaccionan con dicho reactivo, a pH básico, desarrollando una coloración azul que puede ser medida espectrofotométricamente a 765 nm.

El reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra a evaluar. El ácido fosfomolibdotúngstico, formado por las dos sales en medio ácido, de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya absorbancia a 765 nm se mide para evaluar el contenido en polifenoles totales. Como consiste en una reacción redox, puede considerarse también, como un método de medida de la actividad antioxidante total.

Brevemente, a 125 μL del reactivo de Folin-Ciocalteuse se agregaron 125 μL de una solución de Na_2CO_3 20 % (m/m), 800 μL de agua bidestilada y 50 μL de muestra. Se midió la absorbancia a 765 nm luego de 30 min de reacción a 25 °C en oscuridad.

Se construyó la recta de calibración empleando ácido gálico como estándar y el contenido de polifenoles totales se expresó como mg de ácido gálico (AG)/mL de extracto (**Figura 3.1**).

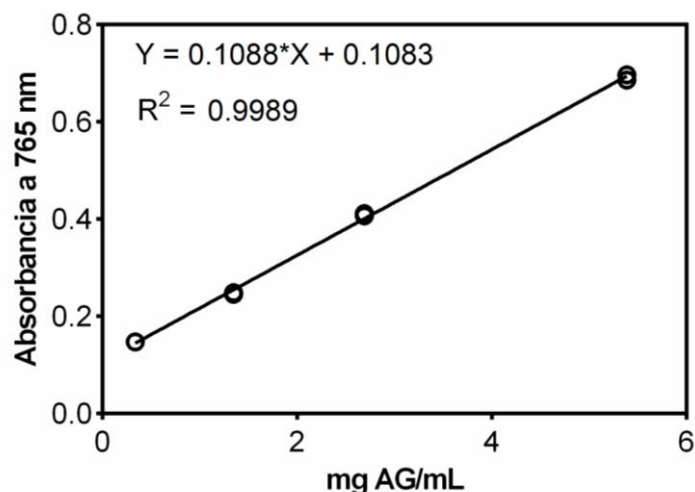


Figura 3.1. Recta de calibración obtenida para determinar contenido de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu, midiendo la absorbancia a 765 nm y utilizando ácido gálico (AG) como estándar. La ecuación de la recta se muestra en el gráfico.

3.3.2. Evaluación de la actividad antioxidante antirradicalaria por el método del radical libre DPPH•

Este método se basa en medir la capacidad de una dada sustancia (antioxidante) para neutralizar la actividad del radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•). El radical DPPH• es uno de los pocos radicales de nitrógeno que es estable, tiene un electrón desapareado lo que le otorga una coloración violeta. Cuando entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno u otra especie de radical, se reduce con la consiguiente pérdida de color.

La determinación se realizó siguiendo la técnica propuesta por Chaillou y Nazareno (2006), con algunas modificaciones. Se disolvieron 50 mg de radical DPPH• en 100 mL de etanol con agitación. Se midió espectrofotométricamente la absorbancia de la solución a 517 nm y se ajustó la dilución hasta lograr un valor de absorbancia igual a 1,00.

Se tomaron 50 μL de extracto, y se adicionaron 950 μL de solución de DPPH• y se midió espectrofotométricamente el decaimiento en la absorbancia luego de 30 min de reacción en oscuridad. Se utilizó la **ecuación 3.1** para calcular la cantidad porcentual de DPPH• degradado. Donde (A_f) es el valor de absorbancia final para la degradación del radical DPPH• de cada muestra a los 30 min y (A_0) absorbancia inicial, ajustada a 1,00.

$$\%AAR = 100 \times \left[1 - \frac{A_f}{A_0} \right] \quad (\text{Ecu. 3.1})$$

Se construyó la recta de calibración empleando ácido gálico como estándar y la actividad antirradicalaria (% AAR) se expresó como mg de ácido gálico (AG)/100 mL de extracto (**Figura 3.2**).

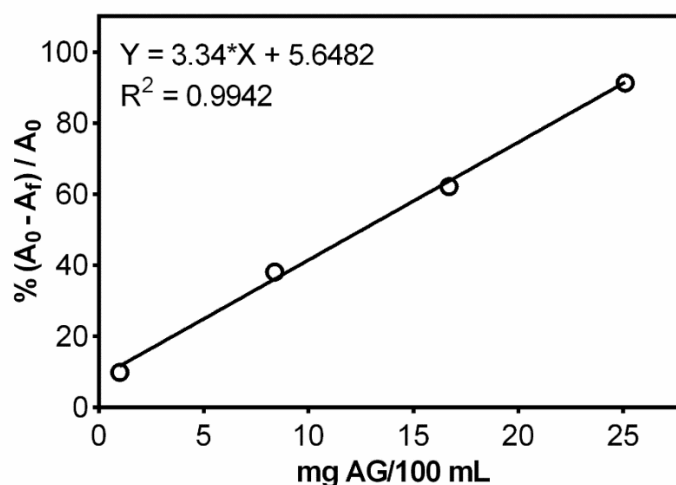


Figura 3.2. Recta de calibración obtenida para determinar actividad antirradicalaria, evaluada a través del radical libre DPPH•. Se midió la absorbancia a 517 nm y se utilizó ácido gálico (AG) como estándar. La ecuación de la recta se muestra en el gráfico.

3.3.3. Evaluación de la capacidad antioxidante a través del poder reductor de hierro (FRAP)

La capacidad de reducir el hierro (Fe^{+3}) se determinó según describen Benzie y Strain (1996). El reactivo de FRAP, se prepara diariamente y se compone de 25 mL de buffer acetato de sodio 0,3 mM pH 3,6 (6,1 mg de $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ en 250 mL de agua bidestilada), 2,5 mL de solución 10 mM de 2,4,6-tri(2-piridil)s-triazina (TPTZ) (31,2 mg de TPTZ en 10 mL de HCl 40 mM) y 2,5 ml de la solución de cloruro férrico 20 mM (135,2 mg de $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 25 mL de agua bidestilada).

Se tomaron 60 μL de muestra, se agregaron 840 μL de reactivo de FRAP y se midió la absorbancia a 595 nm luego de 30 min de reacción a 37 °C. Se construyó la recta de calibración empleando ácido gálico como estándar y el poder reductor del hierro se expresó como mg de ácido gálico (AG)/mL de extracto (**Figura 3.3**).

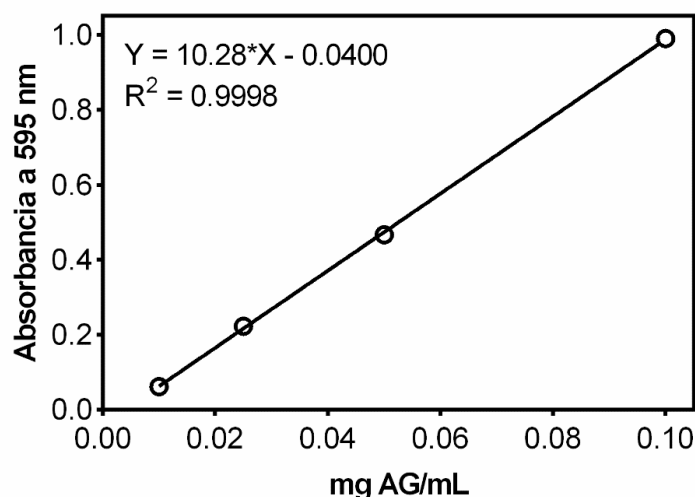


Figura 3.3. Recta de calibración obtenida para evaluar poder reductor de hierro (FRAP), Se midió la absorbancia a 595 nm y se utilizó ácido gálico (AG) como estándar. La ecuación de la recta se muestra en el gráfico.

3.4. Optimización de la extracción empleando soluciones acuosas de β -ciclodextrina por metodología de superficie de multirrespuesta

La extracción de compuestos activos o funcionales involucra una gran cantidad de factores que podemos combinar para optimizar el proceso. La metodología de superficie de multirrespuesta, comprende un conjunto de técnicas estadísticas y matemáticas, las cuales son útiles para el desarrollo, la mejora y la optimización de procesos y productos (Deepak y *col.*, 2008). La aplicación de SMR es particularmente útil cuando múltiples variables de entrada tienen una influencia potencial en el rendimiento o características de calidad del producto/proceso.

3.4.1. Diseño de experimento

Las muestras de tomillo y pimienta verde molidas se sometieron a extracción asistida con ultrasonido empleando soluciones acuosas de β -CD, como se detalla en la **sección 3.2**. Las condiciones de extracción se optimizaron a través de un diseño Box-Behnken (BBD). Las variables independientes (X) y sus niveles fueron: concentración de β -CD en un rango de 0 a 15 mM, tiempo de sonicación de 0 a 15 min y temperatura de extracción de 20 a 50 °C. Las respuestas fueron evaluadas a través del diseño de BBD para las siguientes variables dependientes (Y): contenido de polifenoles totales (CPT), capacidad antioxidante a través del poder reductor de hierro (FRAP) y de la actividad antirradicalaria evaluada por degradación del radical libre DPPH•, el rango del diseño se muestra en la **Tabla 3.1**.

Tabla 3.1. Rango de códigos del diseño de Box-Behnken.

Variables independientes	Código	Nivel codificado		
		-1	0	1
Concentración de β -CD (mM)	X ₁	0	7,5	15
Tiempo de sonicación (min)	X ₂	0,5	7,7	15
Temperatura de extracción (°C)	X ₃	20	35	50

Las respuestas predichas se calcularon mediante un modelo polinomial de segundo orden que se muestra en la **ecuación 3.2**:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^3 b_i X_i + \sum_{i=1}^3 b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 b_{ij} X_i X_j$$

(Ec. 3.2)

Donde:

Y es el valor de respuesta, b_0 es el término *off set*, b_i es el efecto lineal, b_{ii} es el efecto cuadrático, b_{ij} es el efecto de interacción y X_i y X_j son las variables independientes.

La función de deseabilidad (D) (**ecuación 3.3**) permite la optimización de múltiples respuestas para encontrar las condiciones de extracción que conducen a los niveles de compromiso: maximizar los valores de CPT, DPPH•, FRAP de las variables analizadas (Derringer y Suich, 1980).

$$D = (d_1(Y_1) \cdot d_2(Y_2) \dots d_i(Y_i))^{1/i} \quad (\text{Ec. 3.3})$$

Donde:

d_i (Y_i) son los valores normalizados (de 0 a 1) de cada respuesta estudiada.

Los datos, los coeficientes, *p-value* y los *F-value* se analizaron utilizando el software Design-Expert® (versión 11). Las condiciones experimentales de las variables dependientes se analizaron aplicando un análisis de varianza (ANOVA), análisis de regresión y graficas de SMR.

3.5. Deshidratación de los extractos con capacidad antioxidante optimizada

Los extractos obtenidos se liofilizaron para disponer de los mismos durante todos los experimentos. Previo a la liofilización, las muestras extraídas en solución agua-etanol (1:1), según la **sección 3.2**, se destilaron con evaporador rotatorio a 50 °C (Büchi B480, Labortechnik AG, Alemania) hasta reducir a la mitad del volumen inicial y eliminar la fracción etanólica. Tanto a estas muestras como a las extraídas en solución 15 mM de β -CD asistida por ultrasonido, se incorporó D-trehalosa en una concentración 20 % (m/m) como matriz protectora. Se dispensaron alícuotas de 2 mL de en viales de 5 mL y se congelaron a -20 °C en *freezer* por 24 h y por inmersión en nitrógeno líquido inmediatamente antes de ser liofilizadas. Se utilizó un liofilizador (ALPHA 1-4 LD2 Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen, GmbH, Alemania) que opera a -55 °C y una presión de cámara de 0,04 mbar. La liofilización se realizó durante 48 h.

3.6. Preparación de los sistemas modelo para el estudio de capacidad inhibitoria del pardeo

3.6.1 Controles

El estudio de la glicación proteica se realizó empleando un sistema modelo compuesto por proteína (albúmina) y un azúcar reductor (glucosa), siguiendo la metodología propuesta por Kaseen y *col.* (2012), con algunas modificaciones. Para ello, se disolvieron 10 mg/mL de albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma Aldrich S.A., Argentina) y 50 mg/mL de D-glucosa (GLU) en solución de buffer fosfato salino (PBS) 0,2 M ajustado a pH 7,40.

3.6.2. Estudio de la glicación proteica a temperaturas moderadas

Se prepararon viales con 5 mL del sistema modelo antes descrito y se adicionó 3 % (v/v) de extracto correspondiente liofilizado, el cual se resuspendió previamente en agua a su volumen original, para estudiar su capacidad antiglicante. Luego se incubó a 55 °C y se retiraron muestras a diferentes intervalos de tiempo entre 0 y 7 días. La reacción se detuvo colocando los viales en baño de hielo y posteriormente se almacenó en heladera a 4 °C.

3.6.3. Estudio de la glicación proteica a altas temperaturas

La reacción de glicación se ensayó también adicionando 3 % (v/v) de extracto extraído en β -CD al sistema modelo albúmina/glucosa, en un proceso acelerado a altas temperaturas: 70, 80 y 90 °C, a intervalos de tiempo entre 0 y 6 h. La reacción se detuvo colocando los viales en baño de hielo y posteriormente se almacenó en heladera a 4 °C.

En todas las condiciones de reacción estudiadas (55, 70, 80 y 90 °C) se favorece la glicación proteica que forma parte de las reacciones de Maillard en el pardeamiento no enzimático.

3.7. Evaluación de la reacción de pardeo no enzimático de los extractos

3.7.1. Determinación de la producción de furosina por HPLC

Con el fin de estudiar un marcador temprano de la reacción de Maillard se cuantificó el contenido de furosina en los sistemas modelo albúmina/glucosa, en presencia o no del extracto, en función del tiempo de almacenamiento de los sistemas a 55 °C (**sección 3.6.1 y 3.6.2**). En la **Figura 3.4** se esquematiza la generación y análisis de furosina, que comprende una etapa previa de hidrólisis en medio ácido.

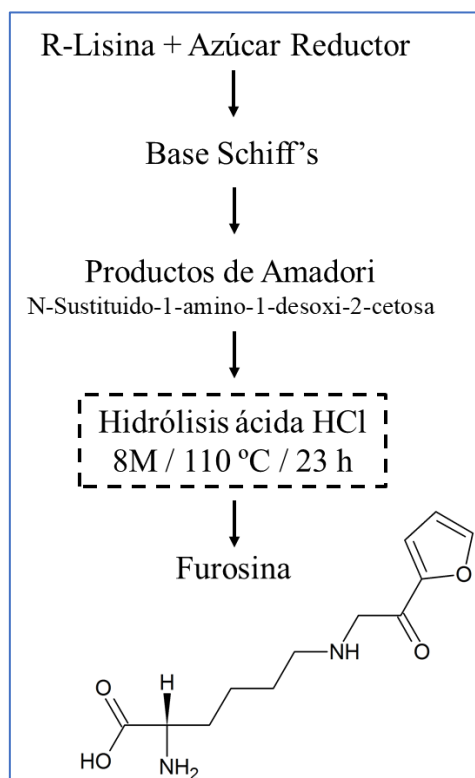


Figura 3.4. Esquema de la generación de furosina y su tratamiento para la determinación analítica.

Se utilizó la metodología descrita por Delgado-Andrade *y col.*, (2007a) con algunas modificaciones. Se partió de 30 μ L de mezcla de reacción, que se hidrolizó en 4 mL de HCl 7,95 M a 110 °C durante 23 h. Se utilizaron tubos Pyrex con septas de PTFE (polietilentereftalato). Los tubos se sellaron bajo atmósfera de N₂. Luego de la hidrólisis, se los llevó a temperatura ambiente y se los centrifugó a 6000 rcf por 10 min. Se tomaron 0,5 mL del sobrenadante y se pasaron por un cartucho Sep-pak C18 (Millipore), previamente humedecido con 5 mL de metanol y 10 mL de agua desionizada. La furosina se eluyó con 3 mL de HCl 3M. Se llevó a sequedad en Rotavap[®], y se resuspendió la muestra en ACN 5 %.

Se utilizó una columna analítica Extrasyl-ODS2 (25 x 0,40 cm, 5 μ m de tamaño de partícula, Tecknokroma, Barcelona, Spain), equilibrada a 32 °C. La corrida fue isocrática con un flujo de 1 mL/min. La fase móvil consistió en una solución 5 mM de heptasulfonato de sodio, con 20 % de acetonitrilo y 0,2 % de ácido fórmico. El volumen de inyección fue de 20 μ L y la longitud de onda utilizada para la detección fue de 280 nm. Se utilizó el método del estándar externo para la cuantificación. La recta de calibración se preparó en un rango entre 2,6 – 3,9 mg/L de furosina, por duplicado

Figura 3.5.

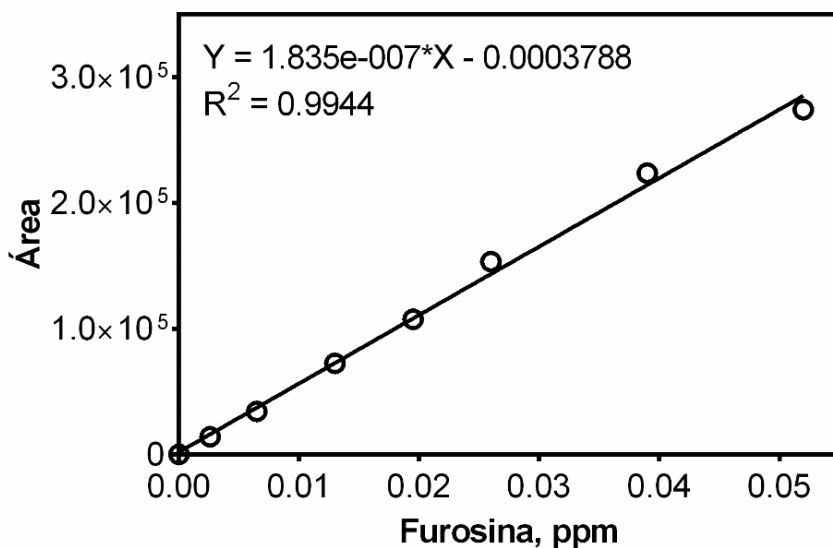


Figura 3.5. Recta de calibración de concentración de furosina en función del área de pico cromatográfico. La ecuación de la recta se muestra en el gráfico.

3.7.2. Evaluación del entrecruzamiento proteico por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)

Para evaluar el efecto de los extractos sobre las etapas avanzadas de glicación, se investigó la formación de agregados glicosilados de alto peso molecular en presencia y en ausencia de extracto hidroalcohólico de tomillo. Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE) seguido por las tinciones de Coomassie blue y la tinción con ácido periódico o reactivo de Schiff (PAS), que indica específicamente la presencia de glicoproteínas.

3.7.2.1. Tinción con Coomassie brilliant blue (CBB)

Los sistemas modelo control (sección 3.6.1) y los que contenían extracto hidroalcohólico de tomillo (sección 3.6.2) se fraccionaron mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE) de acuerdo con lo descrito por Laemmli (1970).

Se utilizó un gel separador de 10 % y un gel concentrador de 4 % (30 % T, 2,67 % C) de 1 mm de espesor. Las muestras se resuspendieron en una solución buffer conteniendo 2 % de SDS, 20 % de glicerol, 2 % de β -mercaptoetanol y 0,01 mg/mL de azul de bromofenol en 62,5 mM Tris- HCl (pH 6,8). Luego se calentaron a 99 °C por 5 min y se sembraron 7 μ l por calle. La electroforesis se corrió a 100 V durante 1 h en un equipo mini-Protean 3 de Bio-Rad. Finalizada la separación electroforética, los geles se tiñeron con una solución de Coomassie brilliant blue R-250 al 0,1 % en una solución de metanol-ácidoacético-agua (5:1:4 v/v/v) y decolorada en una solución de metanol-ácido acético-agua (2:1:7 v/v/v). Se utilizó Precisión Plus Protein™, de 10 a 250 kDa (Bio-Rad Laboratories, Inc., EE. UU.) como estándar de masa molecular.

3.7.2.2. Tinción con ácido periódico Schiff (*Periodic Acid Schiff*, PAS)

La identificación de glicoproteínas se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Thornton y *col.* (1996) con algunas modificaciones. Brevemente, las muestras se sometieron a electroforesis como se describió previamente (**sección 3.7.2**). El gel se lavó en etanol al 50 % durante 1 h, luego con agua destilada y se lo incubó 1 h en ácido periódico al 1 % (v/v) disuelto en ácido acético al 3 % (v/v). A continuación, se incubaron 15 min en metabisulfito de sodio al 0,1 % en HCl 10 mM y en oscuridad por 2 h en reactivo de Schiff. Finalmente, los geles se sumergieron en metabisulfito de sodio al 0,5 % en HCl 10 mM por al menos 2 h y se almacenaron en solución de ácido acético al 7,5 % (v/v) y metanol 5 % (v/v) en agua destilada. Se utilizó invertasa, que fue tratada y sembrada de la misma forma que las muestras arriba descritas, como indicador positivo para glicoproteínas. La intensidad de las bandas se analizó usando el software Gel-Pro Analyzer (Media Cybernetics Inc.). Todos los resultados de SDS-PAGE se replicaron un mínimo de tres veces.

3.7.3. Determinación de 5-hidroximetil-2-furfural (HMF) por HPLC

La metodología aplicada para cuantificar HMF se adaptó del método cromatográfico propuesto por van Boekel y Rehmen (1987) para productos lácteos. La separación del analito de interés se realizó en un sistema HPLC Agilent Technologies 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Waldbron, Alemania), equipado con una bomba cuaternaria y un inyector automático. Acoplado a este equipo se usó un detector de arreglo de diodos (DAD) ajustado a una longitud de onda de 284 nm. Se realizó el ensayo termoestabilizado a fin de mantener la columna a 25 °C. Con el software OpenLab CDS (Agilent Technologies) se registró, integró y calcularon las áreas y picos del cromatograma para calibrar y analizar los resultados obtenidos con las muestras ensayadas.

La recta de calibración para 5-hidroximetil-2-furfural (HMF) se realizó a partir de un estándar comercial (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.), en un rango de concentración de 0,05-2,5 mg/L ($R^2 = 0.9999$), **Figura 3.6**. Se inyectaron 20 µl del patrón o de las muestras. En cada ejecución del día, se inyectó una solución aleatoria de cada estándar para verificar la reproducibilidad. El límite de detección (LOD) fue 0,03 y el límite de cuantificación (LOQ) fue 0,05 ppm, calculados a partir de la relación señal ruido.

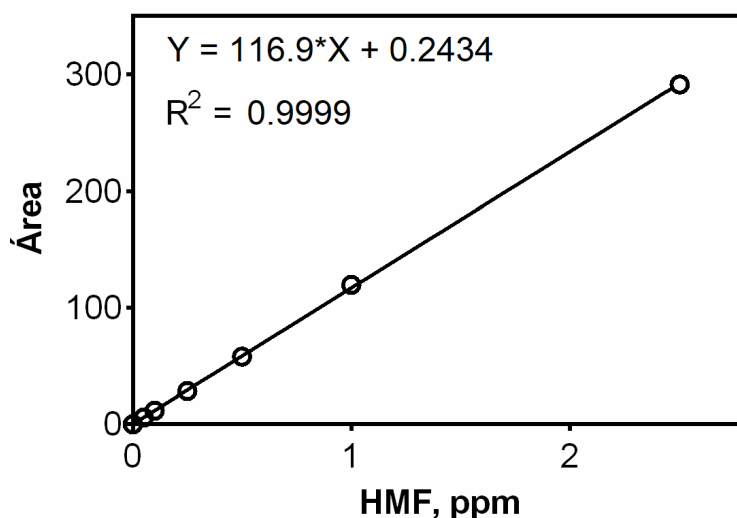


Figura 3.6. Recta de calibración para la determinación de 5-hidroximetil-2-furfural (HMF) a partir del área de pico cromatográfico. La ecuación de la recta se muestra en el gráfico.

En numerosos artículos (Ameur y *col.*, 2006; Ramírez-Jiménez y *col.*, 2004; Ruiz y *col.*, 2004; Ramírez-Jiménez y *col.*, 2000; van Boekel y Rehman, 1987), se propone realizar la extracción empleando una solución en agua y ácido tricloroacético (TCA) como se describe a continuación.

Se trasvasaron 200 μ L de la muestra líquida a un matraz aforado de 5 mL, se adicionó 1,00 mL de agua milli-Q y 0,25 mL de solución de TCA al 40 % (p/v), y se agitó la mezcla enérgicamente durante 5 min. La suspensión se ajustó a 5 mL con agua milli-Q y se agitó nuevamente. Luego, alícuotas de dos mililitros de esta solución se filtraron a través de un filtro de nylon de 0,45 μ m (Waters) y se llevaron al HPLC.

Las condiciones óptimas de trabajo se lograron empleando una columna BDS-C18 de 5 μ m (diámetro interno de 250 \times 2 mm i. d.) producida por Hewlett-Packard (Waldbron, Alemania). Se instaló un cartucho protector (ThermoQuest, Needham, Massachusetts) (4 \times 4 mm i.d.), delante de la columna analítica, empaquetado con 5 μ m de material de empaque Hypersil BDS-C18. El cartucho protector se reemplazó constantemente

después de 150-200 inyecciones. Se utilizó como fase móvil una solución de acetonitrilo-agua 5:95 (v/v) acidificada con un gradiente lineal de ácido acético al 1 % durante 20 minutos con un caudal de 1,00 mL/min. El tiempo de retención en estas condiciones fue de 5,11 min.

3.7.4. Determinación de productos pardos por espectroscopía UV-Vis

La medición de absorbancia a 420 nm se emplea ampliamente para estudiar la inhibición de las reacciones de pardeo no enzimático (Kaur y *col.*, 2016; Ajandouz y *col.*, 2001; Morimitsu y *col.*, 1995).

Se estudió la capacidad inhibidora del pardeo no enzimático de los extractos acuosos de tomillo (To), analizando la inhibición de la reacción de Maillard en el sistema modelo preparado en **sección 3.6.3**. Luego del almacenamiento en las diferentes condiciones estudiadas (ver **sección 3.6.3**) se midió la absorción UV-Visible a 420 nm a temperatura ambiente, tanto en los sistemas control (albúmina de suero bovino (BSA)+glucosa (GLU) y BSA+GLU+ β -CD) como en BSA+GLU con 3 % (v/v) de To en los tiempos de reacción seleccionados.

Se empleó un espectrofotómetro Jasco V-630 Uv-Vis (JASCO Inc., Easton, MD, EE. UU.). Las determinaciones se realizaron por triplicado, a distintos tiempos de almacenamiento para realizar estudios cinéticos.

3.7.5. Sistema de visión computarizada (SVC)

La variación en las propiedades de reflectancia de las muestras deshidratadas durante el estudio de estabilidad se evaluó determinando las funciones de color (L^* , a^* , b^*)

mediante un sistema de visión computarizada (SVC). Para ello se siguió el procedimiento propuesto por Agudelo-Laverde (2012):

- Las muestras se midieron colocándolas en una cabina color gris estándar (N7 escala Munsell) con dimensiones internas de 48 cm de ancho, 62 cm de largo y 48 cm de alto.
- El interior de la cabina cuenta con un sistema patrón de iluminación (iluminante D65) ubicado en la parte superior de la misma, una cámara digital (EOS 40D, Canon, Inc., Tokio, Japón) de alta resolución (10,1 mega-píxeles) que cuenta con un lente macro EF-S 60 mm f 2,8 (Canon Inc., Japón) ubicada de manera de formar un ángulo de 45° con el plano de la muestra y a una distancia de lente de 40 cm. Se fijaron los siguientes parámetros: velocidad de obturación 1/6,3 segundos (sin zoom, ni flash), modo macro enfocado, apertura de f=8 y sensibilidad ISO 100.
- Las imágenes se obtuvieron con una resolución de 3888 x 2592 píxeles, y se guardaron en formato JPEG. El sistema de adquisición de imágenes se encuentra conectado a una computadora (Pentium 4, CPU 1.80 GHz, 6 GHz de RAM), empleando un programa de captura remota de Canon Utility (Canon Inc., Tokio, Japón).
- Las imágenes se tomaron sobre fondo blanco, luego fueron procesadas con el programa Photoshop CS6 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA) que permite seleccionar las áreas de interés sobre la muestra excluyendo el fondo y zonas sombreadas.

3.7.5.1. Calibración del sistema de adquisición de imágenes para variables cromáticas

El sistema de visión computarizada se calibró utilizando como referencia un fotocolorímetro Minolta CM-508d (Minolta Co. Ltd., Japón). Se utilizaron cincuenta tarjetas de cartón de diferentes colores, opacas, las cuales no presentaron fluorescencia bajo luz ultravioleta con el sistema de visión computarizada utilizado. El rango de color de los patrones se eligió de manera que sus valores de L^* , a^* y b^* incluyeran a los obtenidos para las muestras. Dichas tarjetas se midieron con el fotocolorímetro utilizando las siguientes condiciones: ángulo de observador 2° , iluminante D65, componente especular excluida. Se utilizó un espesor suficiente para que la medición no fuera afectada por el fondo.

Además, se fotografiaron las tarjetas en la cabina de iluminación estandarizada (**sección 1.7.1**) utilizando un iluminante D65. Para ajustar el balance de grises se utilizó una tarjeta gris estándar marca Kodak con 18 % de reflectancia que equivale a un valor del $L^* = 50$ como fuera descrito por Briones y Aguilera (2005). Se determinó el color por análisis de imágenes como se describió en la **sección 3.7.5** y luego se corroboró que los valores de los parámetros de color L^* , a^* y b^* obtenidos por análisis de imagen coincidieran con los del fotocolorímetro mediante una regresión lineal. Todas las mediciones se realizaron por triplicado y los resultados se promediaron.

En la **Figura 3.7** se muestran las gráficas de los valores de cada uno de los tres parámetros de color en el sistema CIELAB, obtenidos por análisis de imagen (L_i^* ; a_i^* ; b_i^*) en función de los valores medidos con el fotocolorímetro. En el rango de valores de trabajo se verificó una correlación lineal entre ambos métodos, y los coeficientes de Pearson (R^2) determinados fueron los siguientes: $L^* = 0,9566$, $a^* = 0,9747$

y $b^* = 0,9744$, las correlaciones fueron significativas ($p\text{-value} < 0,05$) para los tres parámetros. Por lo tanto, los valores obtenidos a partir del análisis de imágenes se corrigieron (L_C^* ; a_C^* ; b_C^*) aplicando las **ecuaciones 3.4, 3.5 y 3.6**:

$$L_C^* = \frac{L_i^* - 3,423}{0,9945} \quad (\text{Ec. 3.4})$$

$$a_C^* = \frac{a_i^* - 0,4265}{0,9111} \quad (\text{Ec. 3.5})$$

$$b_C^* = \frac{b_i^* - 2,282}{0,9124} \quad (\text{Ec. 3.6})$$

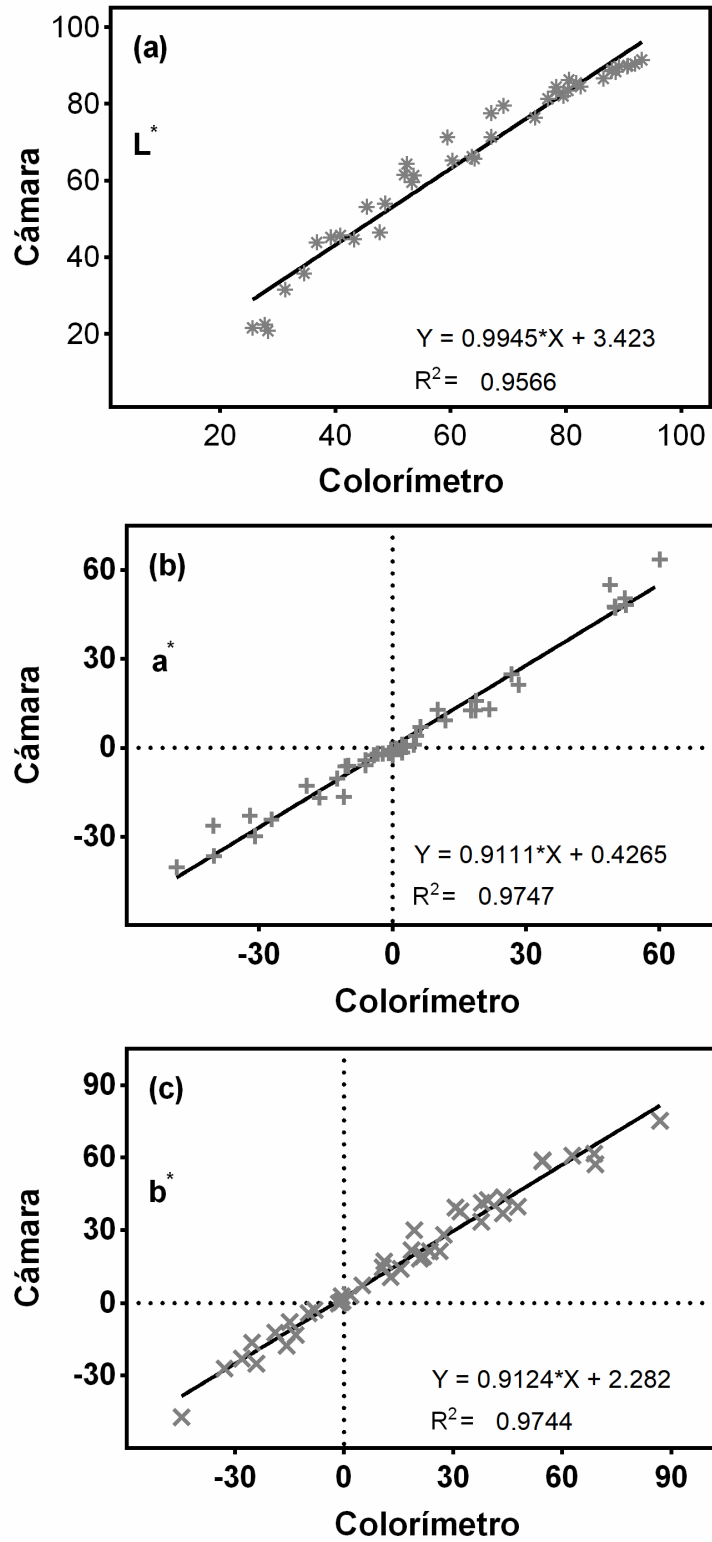


Figura 3.7. Correlación entre los valores medidos con el fotocolorímetro y mediante el sistema de visión computarizado (cámara fotográfica y análisis de imágenes) para luminosidad L^* en (a), y en (b) y (c) las coordenadas cromáticas a^* y b^* respectivamente.

3.7.5.2. Cálculo del croma (C^*)

Las coordenadas a^* y b^* definen la cromaticidad a través de la función de color croma (C^*) y junto con la claridad definen el color de un estímulo. El croma se calcula a partir de la siguiente **ecuación 3.7**:

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (\text{Ec. 3.7})$$

Donde C^* toma el valor 0 para estímulos acromáticos y, por lo general, no pasa de 150 aunque puede superar ese valor para estímulos monocromáticos.

3.8. Cinéticas de producción de intermediarios (furosina y 5-hidroximetil-2-furfural, HMF) y productos pardos

Las constantes de velocidad de reacción (k) para la formación de productos pardos o intermediarios (furosina, HMF), se calcularon a partir de las gráficas modeladas de concentración de analitos o absorbancia en función del tiempo de reacción para los sistemas modelo (BSA+GLU; BSA+GLU+ β -CD) en ausencia o presencia de 3 % (v/v) de cada uno de los extractos de PJ, PV, PN, PB y To, para cada temperatura ensayada.

El desarrollo de productos intermediarios o pigmentos (P) se analizó en función del tiempo considerando la siguiente **ecuación 3.8**:

$$\frac{dP}{dt} = kP^n \quad (\text{Ec. 3.8})$$

Donde:

P representa las concentraciones de intermediarios (furosina o HMF) o unidades de absorbancia; n es el orden de reacción y k es la constante de velocidad. El orden de reacción se puede obtener a través de la integral de la **ecuación 3.8**.

3.9. Dependencia de la cinética de generación de intermediarios o de productos pardos con la temperatura.

Para analizar el efecto de la temperatura sobre la cinética de la reacción de Maillard (evaluada por el seguimiento de intermediarios o productos pardos) se empleó la ecuación de Arrhenius (**ecuación 3.9**).

$$k = k_0 \times \exp \left[-\frac{E_a}{RT} \right] \quad (\text{Ec. 3.9})$$

Que en su versión linealizada se expresa como:

$$\ln k = \ln(k_0) - \frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T} \right) \quad (\text{Ec. 3.10})$$

Donde:

k es la constante cinética dependiente de la temperatura, k_0 es un factor pre-exponencial, E_a es la energía de activación expresada en $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$, R es la constante universal de los gases, $8,3143 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ y T es la temperatura absoluta en Kelvin. La E_a de cada sistema se calculó a partir de la pendiente de la gráfica de la ecuación de Arrhenius ($\ln k$ frente a $1/T$).

3.10. Caracterización y estabilidad física de los extractos liofilizados

Para los estudios de estabilidad se emplearon los extractos liofilizados extraídos con solución 15 mM de β -CD, según la **sección 3.5**.

3.10.1. Determinación del contenido de agua en sistemas liofilizados

El contenido de agua de los extractos deshidratados se determinó por diferencia en el peso antes y después del secado en estufas de vacío durante 48 h a 98 °C en presencia de perclorato de magnesio. Estas condiciones aseguran una determinación adecuada de la cantidad de agua en los sistemas y fueron seleccionadas en base a estudios previos (Cardona y *col.*, 1997).

En los sistemas donde se produjo cristalización parcial de la trehalosa como dihidrato, el contenido acuoso de la fase amorfa (W_A) se calculó utilizando las siguientes ecuaciones:

$$X + Y = 1$$

$$W = X \cdot 0,1 + Y \cdot W_A$$

$$Y \cdot W_A = W - X \cdot 0,1$$

$$W_A = (W - X \cdot 0,1)/(1 - X) \quad \text{(Ec. 3.11)}$$

Donde:

X= fracción en masa de trehalosa cristalina; Y= fracción en masa de trehalosa amorfa;

W= fracción en masa de agua total; W_A = fracción en masa de agua de la fase amorfa;

0,1= fracción en masa de agua del cristal dihidratado.

3.10.2. Isotermas de sorción de agua

Los extractos liofilizados de tomillo, pimienta verde y un control con la matriz de estabilización (trehalosa al 20 % en solución 15 mM de β -ciclodextrina) se colocaron en desecadores de vacío conteniendo soluciones salinas saturadas (LiCl, CH₃COOK, MgCl₂, K₂CO₃, Mg(NO₃)₂, NaCl y KCl₂) que permitieron obtener humedades relativas (HR) de 11, 22, 33, 43, 52, 75 y 84 %, respectivamente, según los requerimientos de cada experimento (Greenspan, 1977). Se determinó el contenido de agua de las muestras (como se describió **sección 3.14.1**) luego de exponer los sistemas a las distintas HR durante 15 días, tiempo al cual se alcanzó la condición de equilibrio (diferencias de peso menores que 0,0005 g).

3.10.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se utilizó un calorímetro diferencial de barrido (DSC) Mettler Toledo 822, AG, Switzerland, con software para análisis térmico Stare SW 8.10. Para evitar fenómenos de distorsión observados al comienzo y final del calentamiento o enfriamiento, las determinaciones se realizaron en todos los casos comenzando el barrido por lo menos 30 °C por debajo de la temperatura esperada para el inicio de una dada transición y finalizando por lo menos a una temperatura 10 °C mayor.

El equipo se calibró con indio (punto de fusión 156,6 °C), plomo (punto de fusión 327,5 °C) y zinc (punto de fusión 419,6 °C). Las muestras se colocaron en crisoles de aluminio (Mettleraluminium pan, 40 μ l) herméticamente cerradas, se pesaron para determinar la masa (8-17 mg por crisol) y se midieron utilizando como referencia un crisol de aluminio vacío y pinchado en todas las mediciones. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado o triplicado y se informó el valor promedio.

3.10.4. Determinación de la temperatura de transición vítrea (T_g)

Las temperaturas de transición vítrea de los sistemas estudiados se determinaron en forma dinámica a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, y a partir de las discontinuidades detectadas en las curvas de flujo de calor versus temperatura. La T_g se consideró como la temperatura a la cual comienza el cambio en el calor específico (valor “*onset*”) que se detecta en el termograma como un corrimiento endotérmico en la línea de base.

Las temperaturas de transición vítrea correspondientes a los extractos acuosos de tomillo y pimienta verde liofilizados (extraídos en solución de β -ciclodextrina) se realizaron sobre el material previamente equilibrado por 15 días a diferentes actividades de agua (a_w) entre 0,11 y 0,75 respectivamente.

3.11. Determinación de compuestos volátiles de los extractos acuosos liofilizados por GC-MS-SPME

Para el análisis de compuestos volátiles, el muestreo del espacio de cabeza es adecuado en especial cuando se lleva a cabo con una técnica de alta capacidad de concentración, como es la microextracción en fase sólida, por sus siglas en inglés, SPME (Bicchi y *col.*, 2012). En estas tesis la metodología aplicada para la identificación de compuestos volátiles en los extractos liofilizados se adaptó de los métodos cromatográficos propuestos por Sgorbini y *col.*, (2015) y por Costa Antunes da Rocha y *col.*, (2014) en los cuales se utilizó cromatografía gaseosa con microextracción en fase sólida acoplada a un detector de masas, por sus siglas en inglés, GC-MS-SPME, para el análisis de distintas pimientos y tomillo.

3.11.1. Procedimiento de microextracción en fase sólida (SPME)

Aproximadamente 450 mg de los extractos liofilizados de cada una de las especias (PV, PN, PB, PJ y To), extraídos en solución acuosa de β -ciclodextrina (15 mM), se colocaron en viales de vidrio de 20 mL. Se llevaron a su volumen original de 2 mL con agua y se sellaron con tapa hermética de metal y silicona. Esta resuspensión en agua posibilita la liberación de los compuestos encapsulados en la matriz compuesta por trehalosa y β -ciclodextrina.

La fibra utilizada para la extracción de los analitos del espacio de cabeza fue de 65 μm de polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB) (SupelcoCo., Bellafonte, PA, USA), la cual fue preconditionada a 250 °C por 5 min. Se realizó una preincubación de 1 min y luego una incubación de 30 min a 50 °C con ciclos de agitación rotativos a 300 rpm durante 5 s con descansos de 2 s. Luego la fibra fue expuesta al espacio de cabeza por 10 min manteniendo las condiciones de incubación constantes. La fibra de PDMS/DVB se introdujo en la línea de inyección del cromatógrafo gaseoso y se desorbió a 250 °C durante 3 min (condiciones detalladas en **sección siguiente 3.11.2**). Finalmente, la fibra se reacondicionó en corriente de helio por 5 min y se preconditionó nuevamente para su reutilización.

3.11.2. Condiciones de análisis por cromatografía GC-MS

Se utilizó un equipo Agilent Technologies 7890B GC, con inyector automático, equipado con una columna cromatográfica Agilent 19091S-433UI (30 m x 250 μm x 0,25 μm), el flujo de gas, helio, fue de 0,8 mL/min con una presión constante de 4,8 psi. El programa de temperatura del horno inició a 60 °C por 2 min, luego se aumentó la temperatura a una velocidad de 3 °C/min hasta llegar a 250 °C, donde se mantuvo

durante 4 min. La desorción de la fibra SPME se realizó en modo *Split* 20:1, a una temperatura de inyección de 250 °C, durante 3 min, con un flujo de helio de 19,8 mL/min y una presión de 5,8 psi. Los compuestos se identificaron mediante la comparación de sus espectros de masas con la biblioteca espectral del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología, por sus siglas en inglés, NIST, de los Estados Unidos.

3.12. Tratamiento de datos

El modelado de los datos experimentales, análisis estadístico y regresiones presentados se realizó a través de los programas GraphPad Prism[®] versión 6.02 (GraphPad[®] Software, Inc.) y Microsoft Excel 2017 (Microsoft[®] Corporation) para Windows 10. Los análisis de superficie de respuesta fueron realizados con el programa Design-Expert[®] versión 11 (Software Stat-Ease, Inc.).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. CAPACIDAD ANTIGLICANTE DE EXTRACTOS DE HIERBAS Y ESPECIAS A TRAVÉS DEL MARCADOR TEMPRANO FUROSINA

Como estudio preliminar se determinó la capacidad antiglicante de los extractos hidroalcohólicos de las especias y hierbas seleccionadas a través de la cuantificación de furosina (ϵ -N-2-furoilmetil-lisina). Este intermediario se genera durante el reordenamiento de Amadori y conduce a la fructosilación de las proteínas por isomerización del producto de condensación de glucosa. Se considera un marcador temprano de la reacción de Maillard, ya que en etapas posteriores se convierte en otros productos intermedios o avanzados decayendo así su concentración global en el sistema (Cueto, 2016; Cardelle-Cobas y Villamiel, 2005; Ruiz *y col.*, 2004; Masatcioglu *y col.*, 2014;).

Los extractos vegetales hidroalcohólicos deshidratados (EX) se resuspendieron en agua a su volumen original para su utilización como inhibidores de la reacción de glicación proteica en sistemas modelo. Los distintos extractos (de las especias y hierbas seleccionadas) se incubaron en presencia de albúmina de suero bovino (BSA) y glucosa (GLU). Se preparó un sistema control conteniendo BSA+GLU sin agregado de extractos. Luego de 7 días de reacción a 55 °C se determinó el contenido de furosina por HPLC en todos los sistemas y se calculó el porcentaje de glicación respecto al control (sistema modelo sin extracto) como se indica en la **sección 3.8**.

En la **Figura 4.1** se representa el porcentaje de glicación, evaluado a través del contenido de furosina, en los sistemas modelo BSA+GLU conteniendo los extractos

vegetales estudiados respecto al sistema control (sin extracto), luego de 7 días de incubación a 55 °C.

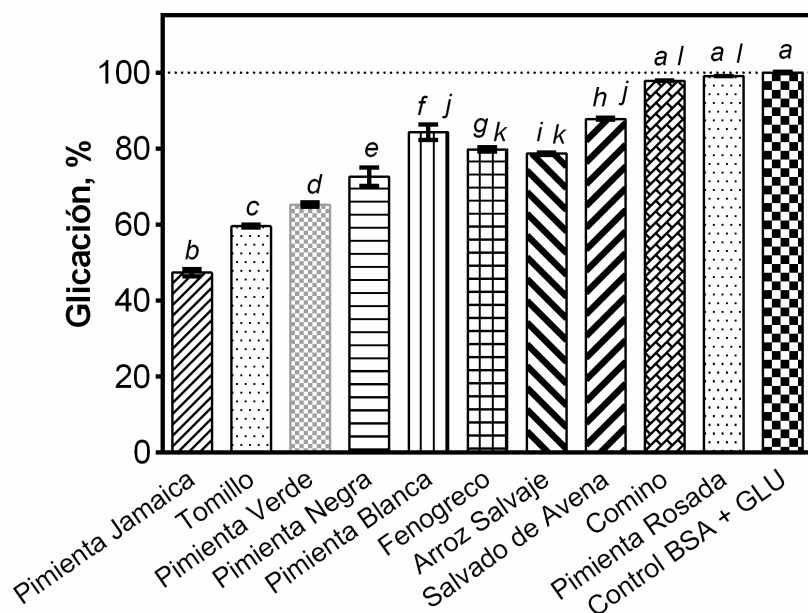


Figura 4.1. Porcentaje de glicación en sistemas modelo BSA+GLU en ausencia (control) y presencia de los extractos estudiados luego de 7 días de incubación a 55 °C. El porcentaje de glicación se calculó relacionando el contenido de furosina (determinado por HPLC) en sistemas modelo BSA+GLU con extracto respecto al control. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (p -value <0,05), letras iguales indican que no hay diferencias significativas (p -value >0,05). Se incluye el desvío estandar para $n = 3$.

El análisis estadístico de ANOVA mostró diferencias significativas (p -value <0,05) entre los sistemas modelo que contenían alguno de los extractos respecto del control para producción de furosina. El mejor efecto inhibitorio se observó para pimienta de Jamaica perteneciente a la especie *Pimenta dioica*, seguido por la especie *Thymus vulgaris* (tomillo) y *Piper nigrum* en sus diferentes estadios de maduración o tratamiento. El orden de inhibición de glicación obtenido fue: pimienta de Jamaica > tomillo > pimienta verde > pimienta negra > fenogreco \geq arroz salvaje > pimienta blanca \geq salvado de avena, mientras que no mostraron diferencias significativas (p -

$value > 0,05$) respecto del control los extractos de comino y pimienta rosa. Por otro lado, los pares pimienta blanca y salvado de avena, fenogreco y arroz salvaje, y pimienta rosa y comino mostraron igual efecto.

Se puede observar que el grano de *Piper nigrum* en su estadio verde (pimienta verde) presenta mayor capacidad de inhibición de la producción de furosina que en su estadio maduro (pimienta negra), así mismo cuando se quita el pericarpio de esta última para obtener pimienta blanca su capacidad de inhibición es aún menor.

Para analizar los aspectos cinéticos, en la **Figura 4.2** se graficó la evolución de la concentración de furosina en el sistema control BSA+GLU, y en dicho sistema en presencia de 3 % (v/v) de los extractos vegetales hidroalcohólicos deshidratados, en función del tiempo y a 55 °C. Las curvas representan la aplicación de un modelo cinético de orden 1, y fueron ajustadas con la ecuación (3.4).

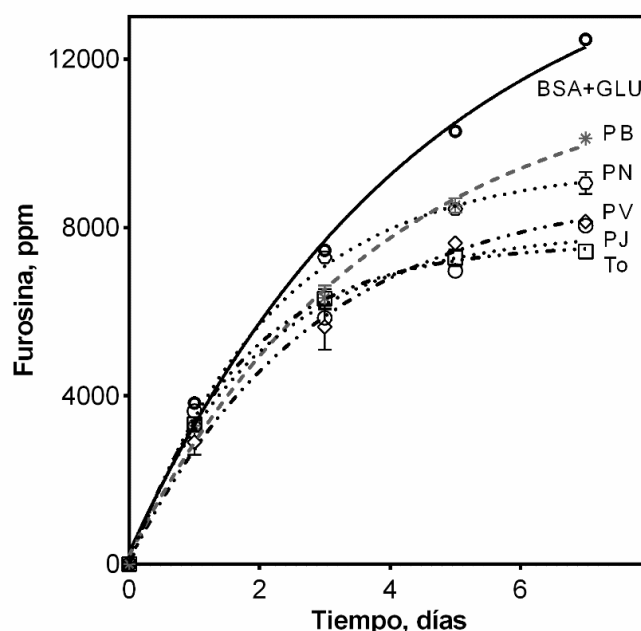


Figura 4.2. Cinética de producción de furosina durante 7 días de incubación a 55 °C en sistemas modelo BSA+GLU en ausencia y presencia de los extractos naturales estudiados. Las curvas se ajustaron con la ecuación de decaimiento exponencial en una fase. Se incluyen los desvíos estándar ($n = 3$).

En la **Tabla 4.1** se muestran las constantes de velocidad (k) y los valores de Plateau obtenidos. En coincidencia con el resultado preliminar obtenido a los 7 días de incubación, a partir de los valores de Plateau, el orden de actividad inhibitoria frente al control fue: pimienta de Jamaica > tomillo > pimienta verde > pimienta negra > pimienta blanca. Todos los ajustes presentaron R^2 mayores que 0,98.

Tabla 4.1. Constantes cinéticas (k), Plateau y coeficientes de determinación (R^2) obtenidos a 55 °C para la producción de furosina en sistemas modelo BSA+GLU en ausencia (control) y presencia de los extractos naturales estudiados, calculadas mediante el ajuste cinético - asociación en una fase-.

Muestras	Constantes cinéticas (k) (1/días)	Plateau	R^2
Control, BSA + GLU	0,22 ± 0,03	15491 ± 272 ^a	0,9951
Pimienta de Jamaica (PJ)	0,50 ± 0,07	7917 ± 223 ^b	0,9867
Tomillo (To)	0,58 ± 0,03	7621 ± 121 ^c	0,9973
Pimienta verde (PV)	0,36 ± 0,05	8928 ± 309 ^d	0,9885
Pimienta negra (PN)	0,46 ± 0,03	9454 ± 191 ^e	0,9973
Pimienta blanca (PB)	0,47 ± 0,04	11787 ± 256 ^f	0,9934

Letras distintas indican diferencias significativas (p -value <0,05) respecto del control BSA+GLU.

En la **Figura 4.3**, se muestra un detalle de la evolución de furosina en el sistema modelo BSA+GLU control y en presencia de 3 % v/v de extracto hidroalcohólico de tomillo. En el eje secundario de ordenadas se graficó el % de inhibición respecto al control. Se puede observar que en los primeros tiempos de reacción (hasta las 24 h) no se manifestó el efecto inhibitorio sobre la reacción de Maillard, pero luego de ese periodo en presencia del extracto decrece la generación de furosina. Este comportamiento será

discutido en la sección siguiente, en el marco del análisis de los fenómenos producidos durante la reacción de glicosilación de las proteínas.

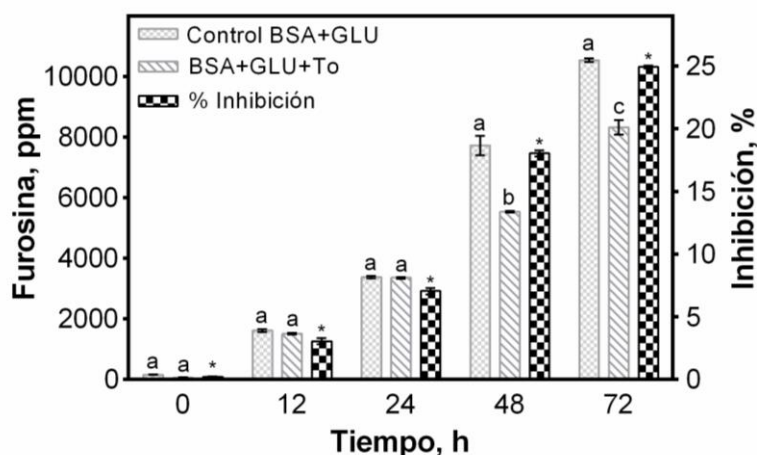


Figura 4.3. Desarrollo de furosina en sistemas modelo BSA+GLU en ausencia (control) o en presencia de 3 % v/v de extracto hidroalcohólico de tomillo en función del tiempo de incubación a 55 °C. Los porcentajes se calcularon en relación con el control BSA+GLU. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (p -value <0,05), letras iguales indican que no hay diferencias significativas (p -value >0,05), * indica no corresponde aplicar ANOVA. Se incluyen los desvíos estándares ($n = 3$).

4.2. RELACIÓN ENTRE LA EVOLUCIÓN DE FUROSINA Y EL CONTENIDO DE POLIFENOLES DE LOS EXTRACTOS

El extracto de tomillo seguido por el de pimienta de Jamaica, presentaron un CPT y actividad antirradicalaria marcadamente superiores al resto de los extractos estudiados. Tal como lo indicó la pérdida de polifenoles totales que ocurre en paralelo a la formación de furosina (**Figura 4.4**), se pudo establecer un paralelismo entre la inhibición de la formación de furosina y el contenido de polifenoles totales, como así también entre éste y la capacidad antirradicalaria.

En las **Figuras 4.4.a a 4.8.a** se presentan los cambios en las concentraciones de furosina y de polifenoles totales, determinados por FC durante el almacenamiento a 55 °C hasta las 72 h para el sistema modelo BSA+GLU en presencia de 3 % (v/v) de extracto hidroalcohólico de tomillo, pimienta de Jamaica, pimienta verde, negra y blanca. En las **Figuras 4.4.b a 4.8.b** podemos ver las rectas de correlaciones lineales, donde el contenido de polifenoles disminuye a medida que la concentración de furosina aumenta durante la reacción.

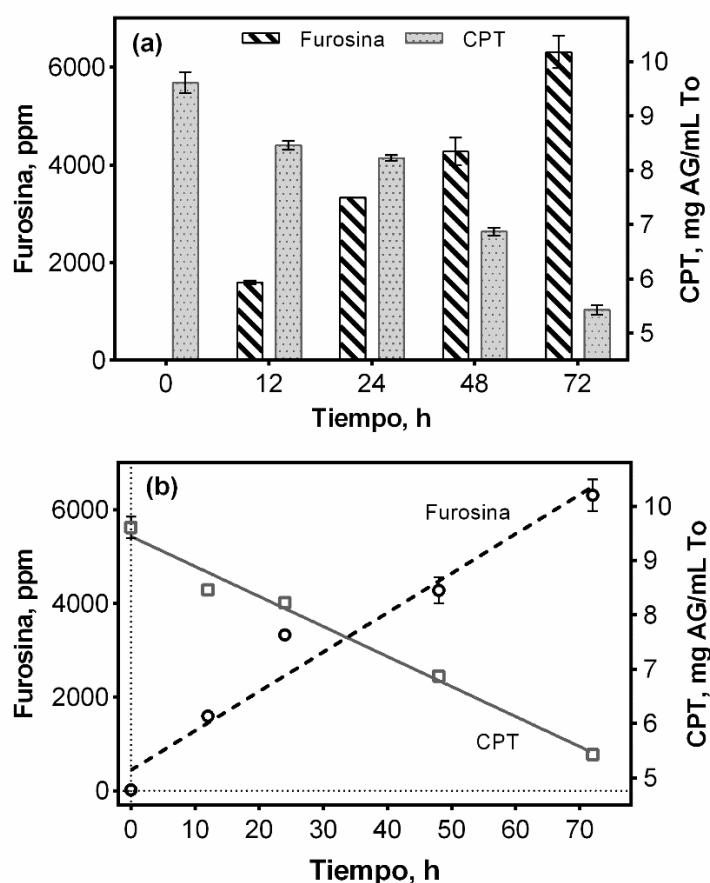


Figura 4.4. Cinética de producción de furosina hasta 72 horas de incubación a 55 °C en muestras de BSA+GLU en presencia de 3 % v/v de extracto hidroalcohólico de tomillo (To). **(a)** Expresa la disminución en el contenido de polifenoles evaluado por FC mientras aumentó la producción de furosina en el sistema modelo. **(b)** Presenta el ajuste por regresión lineal para el decaimiento del contenido de polifenoles a expensas del incremento de furosina. Se incluyen los desvíos estándar ($n = 3$).

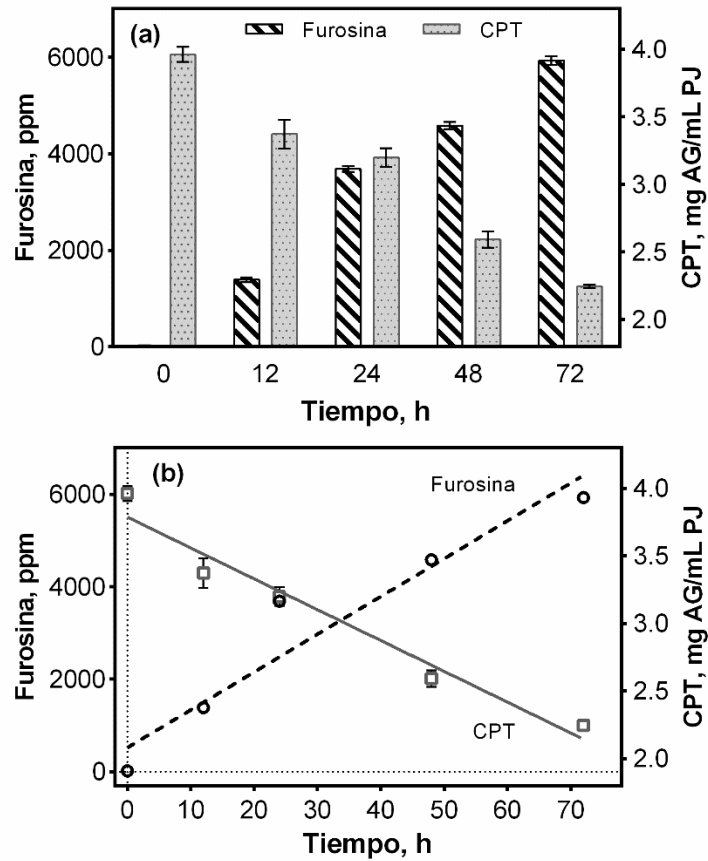


Figura 4.5. Cinética de producción de furosina hasta 72 horas de incubación a 55 °C en muestras de BSA+GLU en presencia de 3 % v/v de extracto hidroalcohólico de pimienta de Jamaica (PJ). (a) Expresa la disminución en el contenido de polifenoles evaluado por FC mientras aumentó la producción de furosina en el sistema modelo. (b) Presenta el ajuste por regresión lineal para el decaimiento del contenido de polifenoles a expensas del incremento de furosina. Se incluyen los desvíos estándar ($n = 3$).

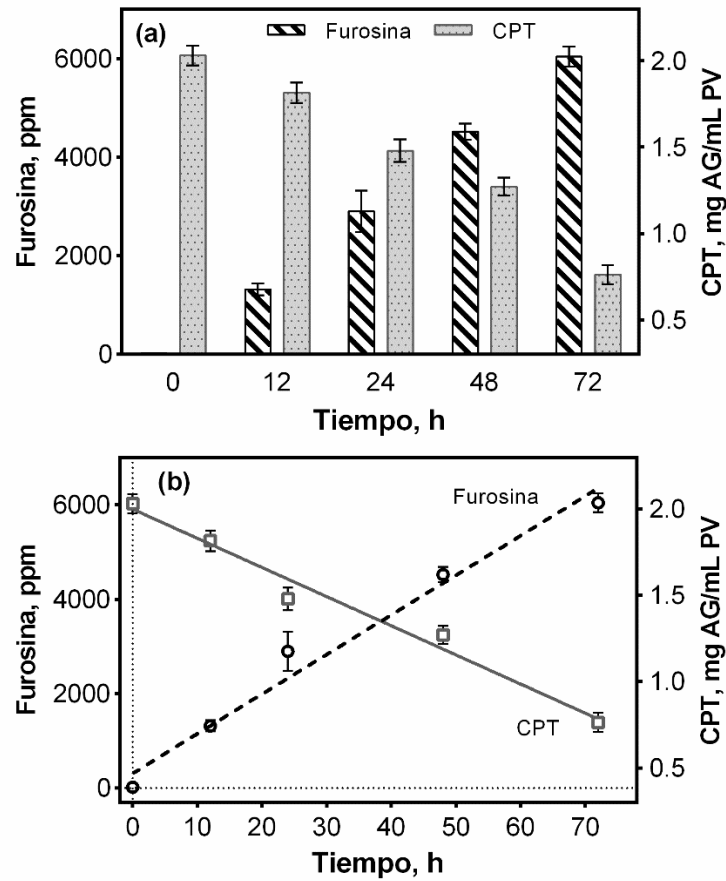


Figura 4.6. Cinética de producción de furosina hasta 72 horas de incubación a 55 °C en muestras de BSA+GLU en presencia de 3 % v/v de extracto hidroalcohólico de pimienta verde (PV). **(a)** Expresa la disminución en el contenido de polifenoles evaluado por FC mientras aumentó la producción de furosina en el sistema modelo. **(b)** Presenta el ajuste por regresión lineal para el decaimiento del contenido de polifenoles a expensas del incremento de furosina. Se incluyen los desvíos estándar ($n = 3$).

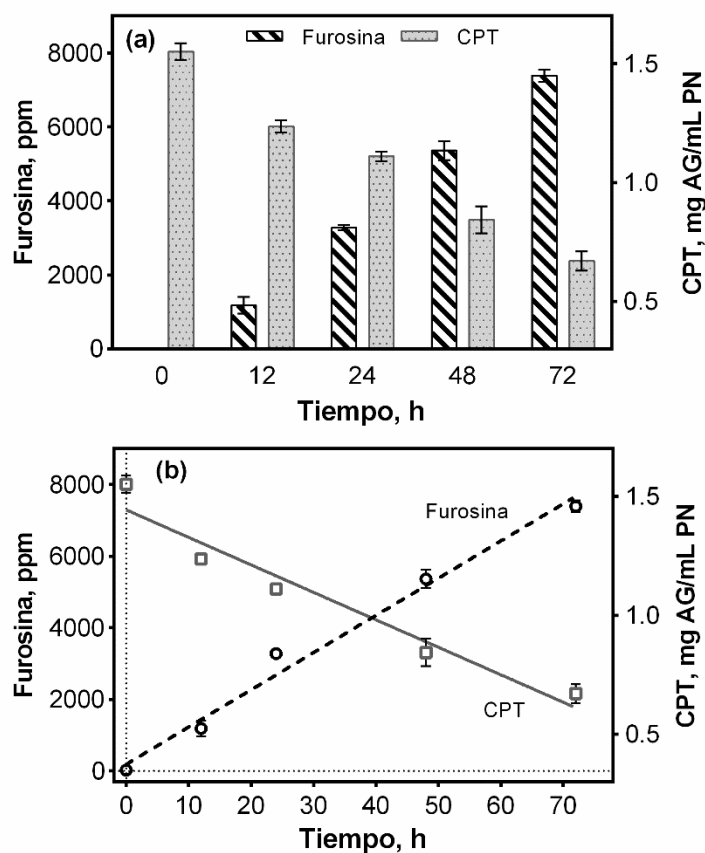


Figura 4.7. Cinética de producción de furosina hasta 72 horas de incubación a 55 °C en muestras de BSA+GLU en presencia de 3 % v/v de extracto hidroalcohólico de pimienta negra (PN). (a) Expresa la disminución en el contenido de polifenoles evaluado por FC mientras aumentó la producción de furosina en el sistema modelo. (b) Presenta el ajuste por regresión lineal para el decaimiento del contenido de polifenoles a expensas del incremento de furosina. Se incluyen los desvíos estándar ($n = 3$).

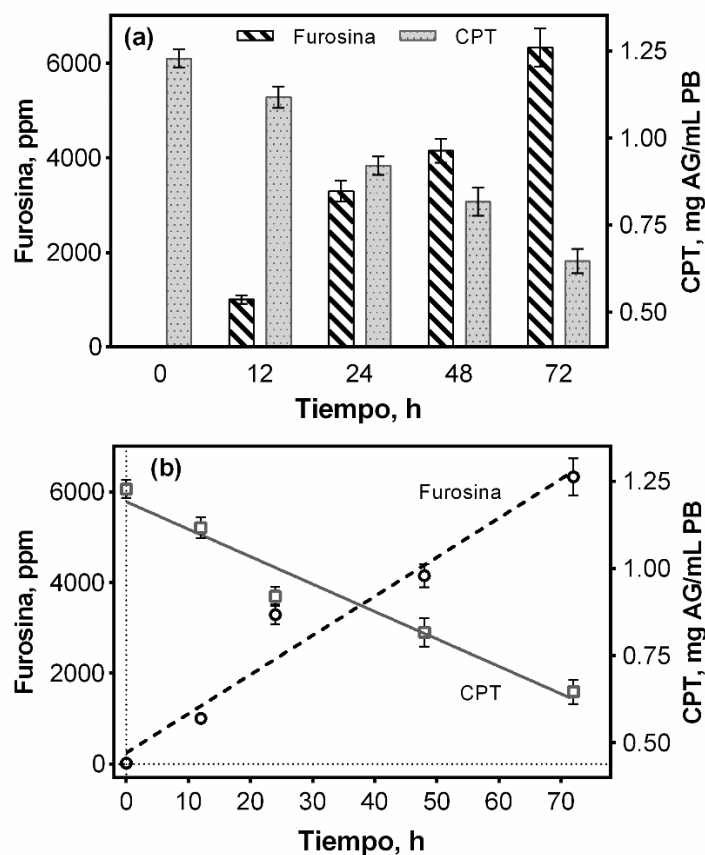


Figura 4.8. Cinética de producción de furosina hasta 72 horas de incubación a 55 °C en muestras de BSA+GLU en presencia de 3 % v/v de extracto hidroalcohólico de pimienta blanca (PB). (a) Expresa la disminución en el contenido de polifenoles evaluado por FC mientras aumentó la producción de furosina en el sistema modelo. (b) Presenta el ajuste por regresión lineal para el decaimiento del contenido de polifenoles a expensas del incremento de furosina. Se incluyen los desvíos estándar ($n = 3$).

Los datos de la correlación entre la actividad antiglicante (evaluada como la inhibición en la producción de furosina) y la reducción aparente del contenido total de polifenoles en los sistemas estudiados, se presentan en la **Tabla 4.2**.

Tabla 4.2. Constantes cinéticas (k) y coeficientes de determinación (R^2) calculadas para la producción de furosina y disminución del contenido total de polifenoles en los sistemas estudiados, en función del tiempo de reacción, hasta 72 h a 55 °C.

Muestras	Constantes cinéticas (k) de Furosina (ppm/hora)	R^2	Constantes cinéticas (k) de CPT [(mg AG/mL)/hora]	R^2
Control BSA+GLU	101,8 ± 9,1	0,9624	-	-
Pimienta de Jamaica (PJ)	81,7 ± 7,8	0,9235	-0,02282 ± 0,0014	0,9519
Tomillo (To)	84,0 ± 6,0	0,9566	-0,05529 ± 0,0021	0,9818
Pimienta verde (PV)	83,8 ± 4,6	0,9739	-0,01690 ± 0,00087	0,9668
Pimienta negra (PN)	85,9 ± 4,4	0,9843	-0,01155 ± 0,00082	0,9381
Pimienta blanca (PB)	86,2 ± 6,2	0,9551	-0,007864 ± 0,00054	0,9431

Esto podría indicar que la eficacia de los compuestos anti-AGEs depende de su capacidad para inhibir reacciones oxidativas (Deetae y *col.*, 2012). Los autores Wu y Yen (2005) informaron que los polifenoles impidieron la formación de AGEs mediante la inhibición del mecanismo de generación de radicales libres durante el proceso de glicosilación, lo que provocó la inhibición de las modificaciones de la proteína glicosilada.

Varios autores estudiaron la prevención de la glicosilación de proteínas *in vitro* mediante extractos vegetales antioxidantes en sistemas similares a los estudiados en este trabajo. Extractos de maíz (Suzuki y *col.*, 2003), de té verde (Nakawaga y *col.*, 2002), de yerba mate (Gugliucci y *col.*, 2009; Lunceford y Gugliucci, 2005) o de tomate (Kiho y

col., 2004) mostraron una actividad inhibidora de la glicación (53 – 64%) similar a la de aminoguanidina 1 mM. Wu y Yen (2005) consideraron que la inhibición de la modificación de proteínas era consecuencia de la inhibición de la generación de radicales libres derivada del proceso de glicación y relacionó dicho efecto sus contenidos de flavonoides.

Los resultados obtenidos fueron consistentes con Dearlove y col. (2008) que demostraron que hojas tomillo (*Thymus vulgaris*), pimienta negra (*Piper nigrum*) y pimienta de Jamaica (*Pimenta dioica*) tenían valores elevados de capacidad de formación de compuestos anti-AGE. Si bien Dearlove y col. (2008) no reportan en sus estudios referencias para pimienta verde y blanca, se puede inferir que estas presentarían un resultado similar por pertenecer a la misma especie, en diferentes estadios de maduración y procesamiento industrial.

Muchas de las investigaciones mencionadas sugieren que la capacidad de los extractos de plantas para inhibir la formación de AGEs están estrechamente relacionadas con las propiedades antioxidantes y la capacidad de estos para secuestrar radicales formados durante la reacción de Maillard, que es uno de los caminos de la glicación (Ramkissoon y col., 2012; Farrukh y Zafar, 2006). Desde este punto de vista, se puede sugerir que los extractos naturales estudiados en esta tesis, que también poseen propiedades antioxidantes, podrían justificar los efectos antiglicantes.

En base a los resultados obtenidos y los numerosos antecedentes científicos reportados se podría sugerir que los extractos de tomillo, pimientos verde, negro, blanco y pimienta de Jamaica, además de sus efectos *in vitro* pueden tener un papel interesante en la formulación de alimentos funcionales y nutraceuticos, ya que aportarían tanto agentes antioxidantes como potenciales reguladores del proceso de glicosilación de proteínas.

4.3. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL EXTRACTO DE TOMILLO SOBRE LA GLICACIÓN A TRAVÉS DE MARCADORES DE DAÑO AVANZADO

Para evaluar el efecto de los extractos sobre las etapas avanzadas de glicación, se investigó la formación de agregados glicosilados de alto peso molecular en los sistemas modelo (BSA+GLU) en presencia o ausencia de 3 % (v/v) de extracto hidroalcohólico de tomillo. Se seleccionó para este estudio el extracto de tomillo por ser el que presentó mayor inhibición en etapas tempranas de la reacción (**Figura 4.9**). Se utilizó la técnica de SDS-PAGE seguido por las tinciones de Coomassie y el reactivo de la reacción de ácido periódico o reactivo de Schiff (PAS), que indica específicamente la presencia de glicoproteínas.

En la **Figura 4.9** podemos observar los geles de poliacrilamida obtenidos, con tinción de BBC (**a**) y reacción de PAS (**b**). En la **Figura 4.9.a** se observa una banda de aproximadamente 66 kDa correspondiente a la BSA, y otra banda de 125 kDa en los sistemas con extracto de tomillo a diferentes tiempos de incubación (24, 48 y 72 h). A mayor tiempo de incubación, en ausencia del extracto hidroalcohólico de tomillo (To), se observaron productos proteicos de alto peso molecular, próximas a los 75 kDa, probablemente debido a la formación de agregados glicosilados de proteínas de alto peso molecular, características de la glicación no enzimática. Sin embargo, en presencia del extracto hidroalcohólico de tomillo (To), la **Figura 4.9.b** muestra que hubo un menor depósito de agregados glicosilados de alto peso molecular en el límite del gel para los tres tiempos estudiados (24, 48 y 72 h), y sólo se observó la banda que corresponde a la BSA de aproximadamente 66 kDa. Estos resultados muestran un potencial efecto protector del extracto sobre la estructura de la proteína ante los cambios inducidos por la temperatura (55 °C) durante la incubación.

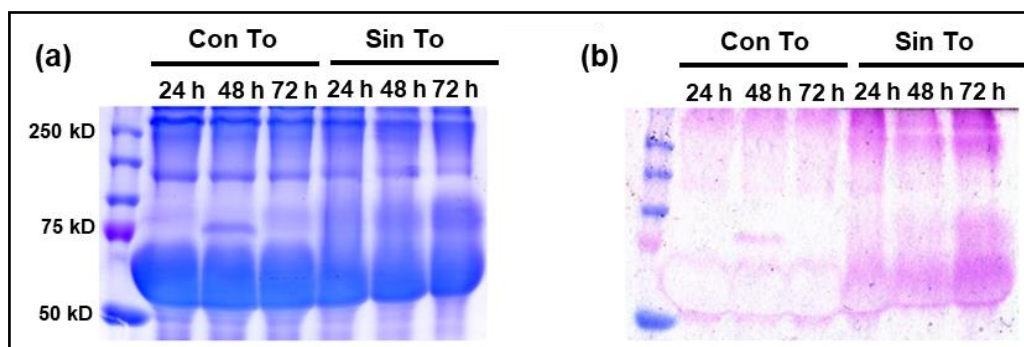


Figura 4.9. SDS-PAGE para identificar proteínas entre 50-250 kDa en los sistemas modelo (BSA+GLU) en ausencia o presencia de 3 % (v/v) de extracto hidroalcohólico de tomillo, que fueron incubados distintos tiempos a 55 °C. **(a)** tinción Coomassie brilliant blue (CBB) y **(b)** tinción con ácido periódico Schiff (PAS).

4.4. CONTENIDO DE POLIFENOLES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS CON DISTINTOS SOLVENTES. EFECTO DE β -CICLODEXTRINA

4.4.1. Extractos en agua-etanol (1:1)

La **Figura 4.10** muestra el contenido de polifenoles totales (CPT) y la capacidad antirradicalaria (DPPH•) de los extractos vegetales extraídos con agua-etanol (1:1).

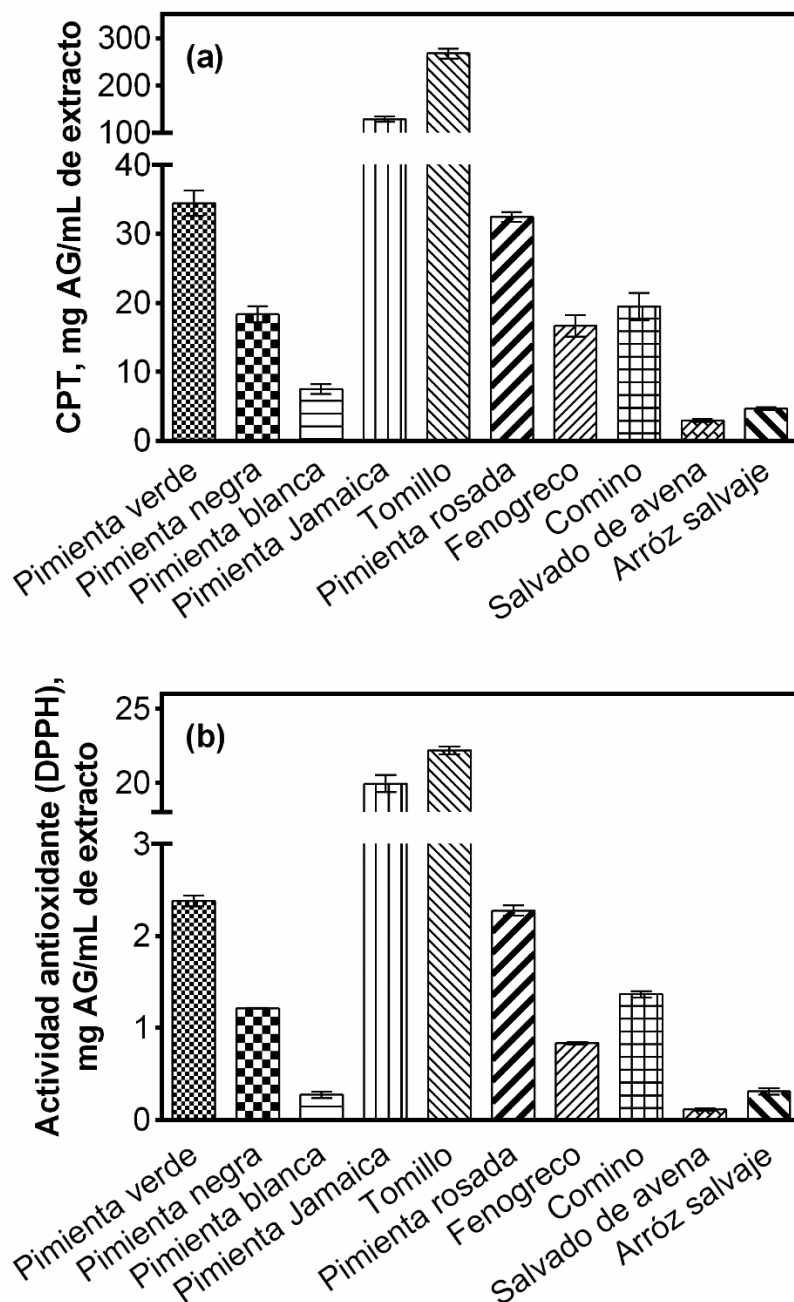


Figura 4.10. Contenido de polifenoles totales (CPT), en (a) y actividad antioxidante medida por la capacidad antirradicalaria (DPPH•) (b), de los extractos vegetales estudiados obtenidos en solución agua-etanol (1:1).

4.4.2. Empleo de β -ciclodextrina como solvente *verde* de extracción

Dada la relación observada entre capacidad antiglicante y contenido de polifenoles, mostrada en las secciones previas, se evaluó la posibilidad de aumentar la concentración

de polifenoles en el extracto empleando soluciones acuosas de β -ciclodextrina como solvente.

Para ello se evaluaron las propiedades de los extractos obtenidos en distintos medios de extracción: agua, agua-etanol (1:1) y soluciones 5 y 15 mM de β -CD.

En la **Figura 4.11** (**a**, **b** y **c**) se muestra el resultado obtenido para contenido de polifenoles totales (**Figura 4.11.a**), capacidad antirradicalaria evaluada por la extinción del radical DPPH• (**Figura 4.11.b**) y poder reductor, evaluado por capacidad reductora de hierro (**Figura 4.11.c**), para los medios mencionados.

Si bien las soluciones de β -CD fueron menos eficientes que la mezcla agua-etanol (1:1), las soluciones de β -CD 5 y 15 mM permitieron duplicar y triplicar, respectivamente, el contenido de polifenoles totales que se extrajeron en agua pura. Para la capacidad antirradicalaria el efecto de la β -CD tuvo un efecto menos marcado, pero aumentó entre un 25 y 50 % para las soluciones 5 mM y 15 mM, respectivamente, con respecto a la extracción en agua. Para el poder reductor la extracción con β -CD tuvo una eficiencia menor, ya que el aumento máximo fue de un 15 %.

Estos resultados son de interés en aquellos casos en los que se quiera evitar el empleo de etanol en el solvente de extracción.

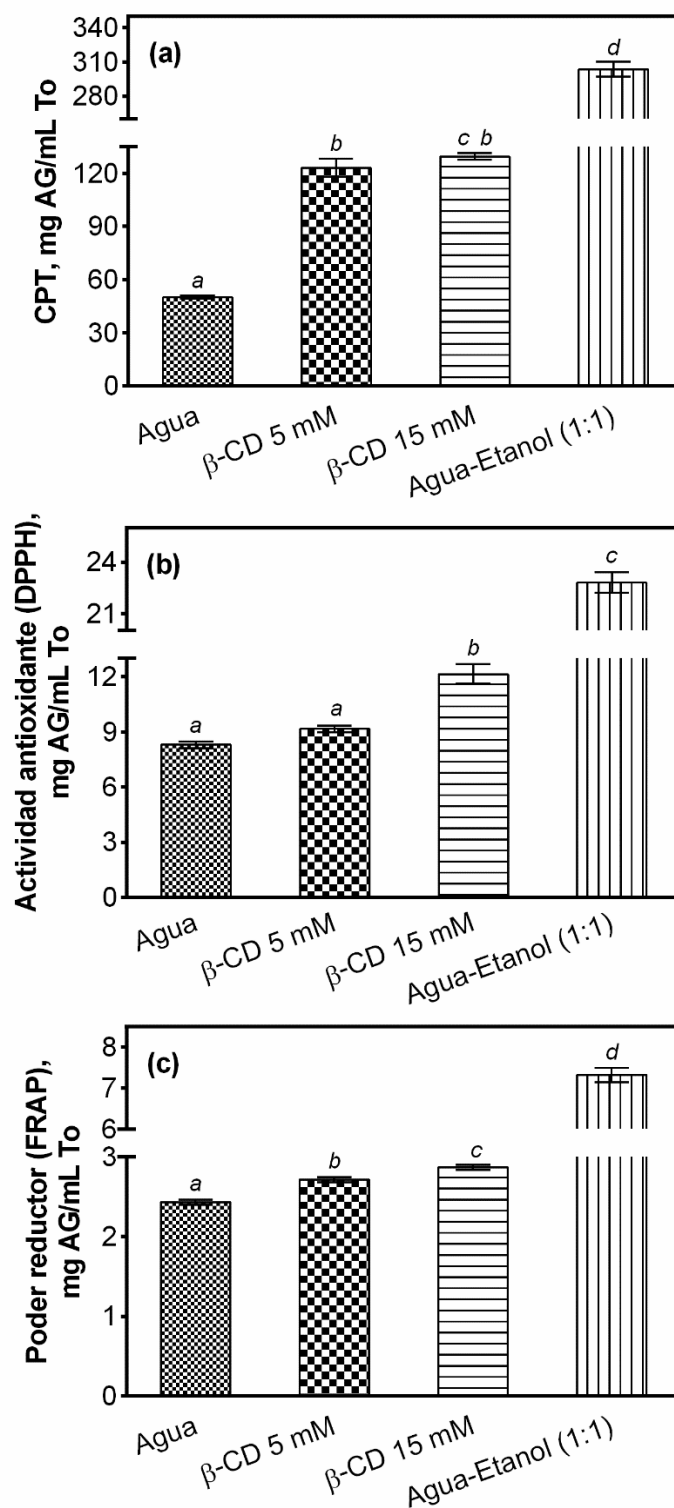


Figura 4.11 (a) Contenido de polifenoles totales (CPT), (b) capacidad antioxidante determinada por ensayo del radical libre DPPH• y (c) por el poder reductor de hierro (FRAP) de extractos de tomillo obtenidos utilizando los solventes de extracción agua, β -ciclodextrina (β -CD) 15 mM y agua-etanol (1:1). Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (p -value $< 0,05$), letras iguales indican que no hay diferencias significativas (p -value $> 0,05$). Se incluyen los desvíos estándar ($n = 3$).

Además, como muestra la **Figura 4.12**, tanto la capacidad antirradicalaria como el poder reductor obtenidos con los diferentes solventes (**Figura 4.11**) correlacionaron con el contenido de polifenoles totales.

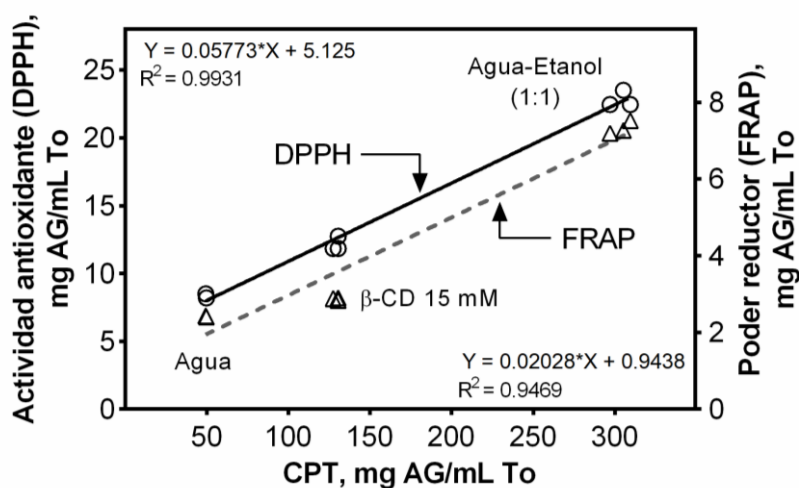


Figura 4.12. Correlación entre el contenido de polifenoles totales (CPT) y la capacidad antioxidante determinada por ensayo del radical libre DPPH y por el poder reductor de hierro (FRAP) para extractos de tomillo obtenidos empleando como solventes de extracción agua, β -ciclodextrina (β -CD) 15 mM y agua-etanol (1:1).

4.5. OPTIMIZACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS DE TOMILLO Y PIMIENTA VERDE MEDIANTE SUPERFICIE DE MULTIRRESPUESTA (SMR)

Dados los resultados obtenidos para la inhibición del marcador temprano de la reacción, furosina, y de contenido de polifenoles y capacidad antioxidante con distintos solventes, se decidió profundizar en el estudio de los efectos antioxidantes, antiglicantes y antipardeo, empleando como modelos dos de los extractos que mostraron mejores características para los fines buscados: tomillo y pimienta verde (una hierba y una especia).

Para evitar el empleo de etanol en el solvente de extracción, se realizó la extracción de compuestos funcionales de ambos vegetales asistida por ultrasonido empleando β -ciclodextrina como agente coadyuvante en la extracción. Se ajustaron las condiciones de extracción (concentración de β -CD, temperatura y tiempo) para optimizar tanto la concentración de polifenoles como la capacidad antioxidante y el poder reductor. Se emplearon para ello superficies multirrespuesta, para luego verificar la actividad antiglicante.

4.5.1. Tomillo

La **Tabla 4.3** muestra los valores de las variables independientes (concentración de β -CD, tiempo de sonicación y temperatura de extracción) empleadas en SMR para optimizar el contenido de polifenoles totales (CPT) y capacidad antioxidante, evaluada mediante el ensayo de poder reductor (FRAP) y la actividad antirradicalaria (determinada por DPPH•) del extracto acuoso de tomillo.

El experimento N°1 (concentración de β -CD 7,5 mM, tiempo de sonicación de 7,7 min y temperatura de extracción de 35 °C) proporcionó el contenido de polifenoles totales más alto: 199,6 mg AG/mL y el poder reductor del hierro más alto: 3,4 mg AG/mL. El experimento N° 3 (concentración de β -CD 0 mM, tiempo de sonicación de 7,7 min y temperatura de extracción de 20 °C) proporcionó el menor contenido de polifenoles totales: 126,8 mg AG/mL.

Tabla 4.3. Variables independientes basadas en un diseño Box-Behnken para el análisis de superficie de multirrespuesta para optimizar la extracción con soluciones acuosas de β -ciclodextrina de compuestos funcionales de tomillo asistida por ultrasonido. Las variables dependientes fueron contenido total de polifenoles y actividad antioxidante (poder reductor y actividad antirradicalaria).

N° de experimento	Código y decodificación de variables independientes (Condiciones de extracción)			Respuestas a las variables		
	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁	Y ₂	Y ₃
				Contenido total de polifenoles (CPT)	Actividad antirradicalaria (DPPH•)	Poder reductor de hierro (FRAP)
	Concentración de β -CD (mM)	Tiempo de sonicación (min)	Temperatura de extracción (°C)	(mg AG/mL de extracto de tomillo)		
1	(0) 7,5	(0) 7,7	(0) 35	199,6 ± 0,3	13,3 ± 0,5	3,36 ± 0,04
2	(-1) 0	(1) 15	(0) 35	166,5 ± 0,9	12,7 ± 0,8	2,14 ± 0,04
3	(-1) 0	(0) 7,7	(-1) 20	126,8 ± 0,6	9,2 ± 0,3	1,08 ± 0,02
4	(1) 15	(0) 7,7	(-1) 20	169,8 ± 0,5	11,6 ± 0,8	2,5 ± 0,1
5	(-1) 0	(0) 7,7	(1) 50	180,2 ± 0,7	14,67 ± 0,05	2,54 ± 0,07
6	(0) 7,5	(1) 15	(1) 50	156,2 ± 0,9	12,21 ± 0,06	2,03 ± 0,04
7	(-1) 0	(-1) 0,5	(0) 35	156,2 ± 0,6	16,1 ± 0,2	1,13 ± 0,07
8	(0) 7,5	(-1) 0,5	(1) 50	165,4 ± 0,5	15,5 ± 0,4	2,35 ± 0,01
9	(0) 7,5	(0) 7,7	(0) 35	171,9 ± 0,8	14,6 ± 0,2	3,04 ± 0,03
10	(1) 15	(0) 7,7	(1) 50	159,0 ± 0,9	13,6 ± 0,4	2,83 ± 0,01
11	(0) 7,5	(1) 15	(-1) 20	132,83 ± 0,07	8,86 ± 0,06	1,43 ± 0,01
12	(1) 15	(-1) 0,5	(0) 35	177,6 ± 0,9	15,0 ± 0,4	2,72 ± 0,03
13	(0) 7,5	(-1) 0,5	(-1) 20	127,0 ± 0,4	12,1 ± 0,7	1,04 ± 0,05
14	(0) 7,5	(0) 7,7	(0) 35	172,6 ± 0,6	15,0 ± 0,4	3,06 ± 0,03
15	(1) 15	(1) 15	(0) 35	184,3 ± 0,6	13,93 ± 0,08	2,21 ± 0,05

Se expresa la media de los valores y su desviación estándar ($n = 3$).

Con el experimento N° 7 (concentración de β -CD 0 mM, tiempo de tratamiento con ultrasonido de 0,5 min y temperatura de extracción de 35 °C) se obtuvo la actividad antioxidante más alta: 16,1 mg AG/mL y el experimento N° 11 (concentración de β -CD 7,5 mM, tiempo de tratamiento con ultrasonido de 15 min y temperatura de extracción 20 °C) arrojó la menor actividad antioxidante: 8,9 mg AG/mL. El experimento N° 13 (concentración de β -CD 7,5 mM, tiempo de sonicación de 0,5 min y temperatura de extracción de 20 °C) proporcionó el menor poder reductor de hierro: 1,0 mg AG/mL.

El análisis de varianza ANOVA presentado en la **Tabla 4.4** muestra que los valores experimentales de todas las respuestas (CPT, DPPH•, FRAP) se pueden ajustar usando un modelo polinomial cuadrático (p -value <0,0001). El F -value, de 33,67; 60,16 y 235,98 obtenido para el contenido de polifenoles totales, la actividad antioxidante y el poder reductor de hierro, respectivamente, de los extractos acuosos de tomillo, sugirieren que la importancia del modelo era mayor, con un nivel de confianza de 95 %. En la **Tabla 4.4** se observan los valores para la prueba de falta de ajuste (*Lack of fit*) y el valor del error puro (*Pure error*) los cuales indican la reproducibilidad del modelo para los datos experimentales.

El efecto de los factores de extracción X_1 (concentración de β -CD), X_2 (tiempo de sonicación) y X_3 (temperatura de extracción) fueron analizados para cada factor de respuesta (**Tabla 4.3**). La importancia de cada coeficiente fue determinada en función de los F -value y p -value, teniendo en cuenta que un F -value alto con un p -value más bajo siempre conduce a una correspondencia más significativa entre varias variables independientes (Chen y col., 2015).

Tabla 4.4. Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo polinomial cuadrático ajustado para la optimización de los parámetros de extracción (concentración de β -CD, tiempo de sonicación y temperatura de extracción) de compuestos funcionales de tomillo.

Source	Contenido total de polifenoles (R ² = 0,8965)					Actividad antirradical DPPH• (R ² = 0,9393)					Poder reductor de hierro, FRAP (R ² = 0,9862)				
	SS	DF	MS	F-value	p-value	SS	DF	MS	F-value	p-value	SS	DF	MS	F-value	p-value
Modelo	16598,36	9	1844,26	33,67	< 0,0001	186,34	9	20,70	60,16	< 0,0001	26,21	9	2,91	235,98	< 0,0001
Lack of fit	405,73	3	135,24	2,86	0,0521	2,12	3	0,71	2,28	0,0979	0,077	3	0,026	2,32	0,0366*
Pure error	1511,55	32	47,24			9,92	32	0,31			0,26	32	0,008042		

SS, sum of squares. DF, degree of freedom. MS, mean square. Nivel de significancia = $p < 0,05$; * $p < 0,01$.

4.5.1.1. Análisis de superficie de multirrespuesta para el contenido total de polifenolespor FC.

La siguiente ecuación de regresión en los niveles codificados (**Ec. 4.1**) se generó sólo con los términos significativos, $p\text{-value} < 0,05$, no se consideraron los términos no significativos para analizar el efecto de cada variable independiente sobre la extracción de polifenoles de los extractos acuosos de tomillo.

$$Y_1(\text{CPT, mg AG/mL To}) = 181,36 + 7,63X_1 + 13,06X_3 - 16,06X_1X_3 - 11,92X_2^2 - 24,09X_3^2 \quad (\text{Ec. 4.1})$$

El polinomio cuadrático exhibe las relaciones entre los factores de extracción y el contenido de polifenoles totales que tuvieron un coeficiente de regresión R^2 de 0,8965, (**Tabla 4.4**), siendo este valor de R^2 adecuado para la aplicación de este tipo de modelo (Nipornram y *col.*, 2018; Ribeiro Santos Rezende y *col.*, 2017; Chen y *col.*, 2015).

Las variables X_1 , X_3 , X_1X_3 , X_2^2 y X_3^2 fueron significativas ($p\text{-value} < 0,05$). Sin embargo, X_2 , X_1X_2 , X_2X_3 y X_1^2 no fueron significativas para un $p\text{-value} > 0,05$. La combinación de las variables X_1X_3 mostró un efecto antagónico entre la concentración de β -CD y la temperatura de extracción para la extracción de polifenoles.

La **Figura 4.13** muestra la interacción entre las variables independientes y sus efectos sobre la extracción de polifenoles. Es importante señalar que cuando el tiempo de sonicación (variable X_2) se fijó en 5,9 min (que corresponde al valor del óptimo), el CPT más alto se observó a concentraciones intermedias de β -CD (variable X_1) y a

temperaturas intermedias de extracción (variable X_3), como se puede observar en la **Figura 4.13.a**, de acuerdo con el análisis de regresión (Ecuación 4.1). La combinación de estas variables (X_1X_3) mostró un efecto antagónico para la extracción de polifenoles. Sin embargo, el incremento en la concentración de β -CD a temperaturas de extracción medias condujo a un aumento en el contenido total de polifenoles.

A la concentración óptima de β -CD (15 mM), el contenido total de polifenoles aumentó con el tiempo de sonicación hasta los 15 min cuando se emplearon temperaturas medias de extracción (**Figura 4.13.b**).

Cuando la temperatura (X_3) se fijó en su valor óptimo, 36,6 °C, la concentración de β -CD (X_1) y el tiempo de sonicación (X_2) tuvieron un efecto menor, como se observa en la superficie plana mostrada en la **Figura 4.13.c**.

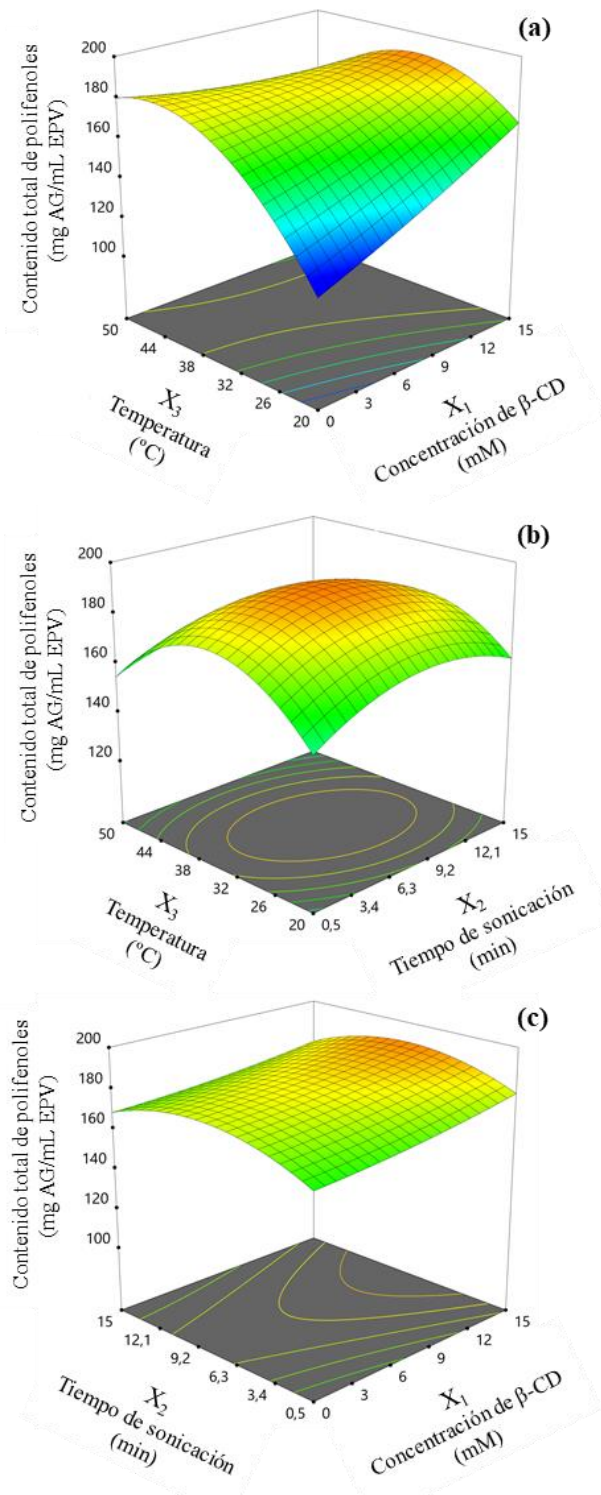


Figura 4.13. Gráficas de superficie de respuesta de las variables independientes para el contenido total de polifenoles de los extractos de tomillo (CPT, mg AG/mL) mostrando el máximo para la combinación de variables correspondientes. Se indica el CPT como una función de: **(a)** la temperatura de extracción y la concentración de β -CD usando un tiempo de sonicación constante de 5,9 minutos; **(b)** temperatura y tiempo de sonicación usando una concentración constante de β -CD 15 mM; **(c)** tiempo de sonicación y concentración de β -CD usando temperatura constante de 36,6 °C.

4.5.1.2 Análisis de superficie de multirrespuesta para antioxidantes de acción antirradicalaria por ensayo de radical libre DPPH•.

La **Tabla 4.4** muestra los resultados de la aplicación de la ecuación (**Ec. 4.2**) polinómica cuadrática para la actividad antioxidante y los parámetros de extracción: concentración de β -CD, tiempo de sonicación y temperatura de extracción. El valor de regresión R^2 de 0,9393 es aceptable y demostró la fiabilidad del modelo del modelo aplicado (Nipornram y *col.*, 2018; Ribeiro Santos Rezende y *col.*, 2017; Chen y *col.*, 2015).

La ecuación (4.2) de regresión generada con los niveles codificados teniendo en cuenta solo los términos significativos, p -value <0,05, para la actividad antioxidante de los extractos acuosos de tomillo se presenta a continuación:

$$Y_2(\text{DPPH, mg AG/mL To}) = 14,27 - 1,37X_2 - 1,77X_3 + 0,60X_1X_2 - 0,86X_1X_3 - 2,14X_3^2 \quad (\text{Ec. 4.2})$$

Del análisis del modelo aplicado se observó que las variables X_2 , X_3 , X_1X_2 , X_1X_3 y X_3^2 fueron los parámetros más significativos para la combinación de factores que maximizaron la extracción de compuestos con actividad antioxidante a partir de extractos acuosos de tomillo. La combinación de las variables X_1X_2 presentaron efecto sinérgico y las variables X_1X_3 presentaron efecto antagónico sobre la actividad antioxidante, mientras que X_1 , X_2X_3 , X_1^2 y X_2^2 tuvieron menos efecto sobre la actividad antioxidante.

En la **Figura 4.14** se muestran los gráficos de superficie de respuesta obtenidos para las relaciones entre las variables de extracción estudiadas y la actividad antioxidante antirradicalaria, evaluada por degradación del radical libre DPPH•.

La **Figura 4.14.a** representala interacción entre la concentración de β -CD y la temperatura de extracción sobre la actividad antioxidante, cuando el tiempo de tratamiento con ultrasonido permanece constante en 5,9 minutos. La actividad antirradical se incrementó con el aumentó la temperatura de extracción a bajas concentraciones de β -CD. La mayor degradación del radical libre DPPH• se observó a una concentración 2,5 mM de β -CD y a una temperatura de extracción de 44 °C.

En la **Figura 4.14.b** se muestra la relación entre la temperatura de extracción y el tiempo de sonicación cuando la concentración de β -CD permanece constante en 15mM. La actividad antirradical DPPH• se incrementó con el aumento de las temperaturas de extracción y fue independiente del tiempo de sonicación, de acuerdo con el análisis de regresión (**Ecuación 4.2**). La combinación de las variables (X_2X_3) no mostró efecto sinérgico sobre la actividad antioxidante. Sin embargo, el tratamiento a temperaturas superiores a 44 °C redujo la actividad antirradicalaria probablemente debido a la degradación de compuestos bioactivos presentes en los extractos acuosos de tomillo.

La **Figura 4.14.c** representa la actividad antioxidante a temperatura constante de 36,6 °C. Se observa que ésta disminuyó con el aumento del tiempo de sonicación y la concentración de β -CD.

La **Figura 4.14 (a, b y c)** muestra que la capacidad antioxidante se vio afectada por el aumento del tiempo de sonicación y por las temperaturas de extracción, probablemente debido a la labilidad de compuestos bioactivos presentes en los extractos acuosos de tomillo (Parmar y *col.*, 2015).

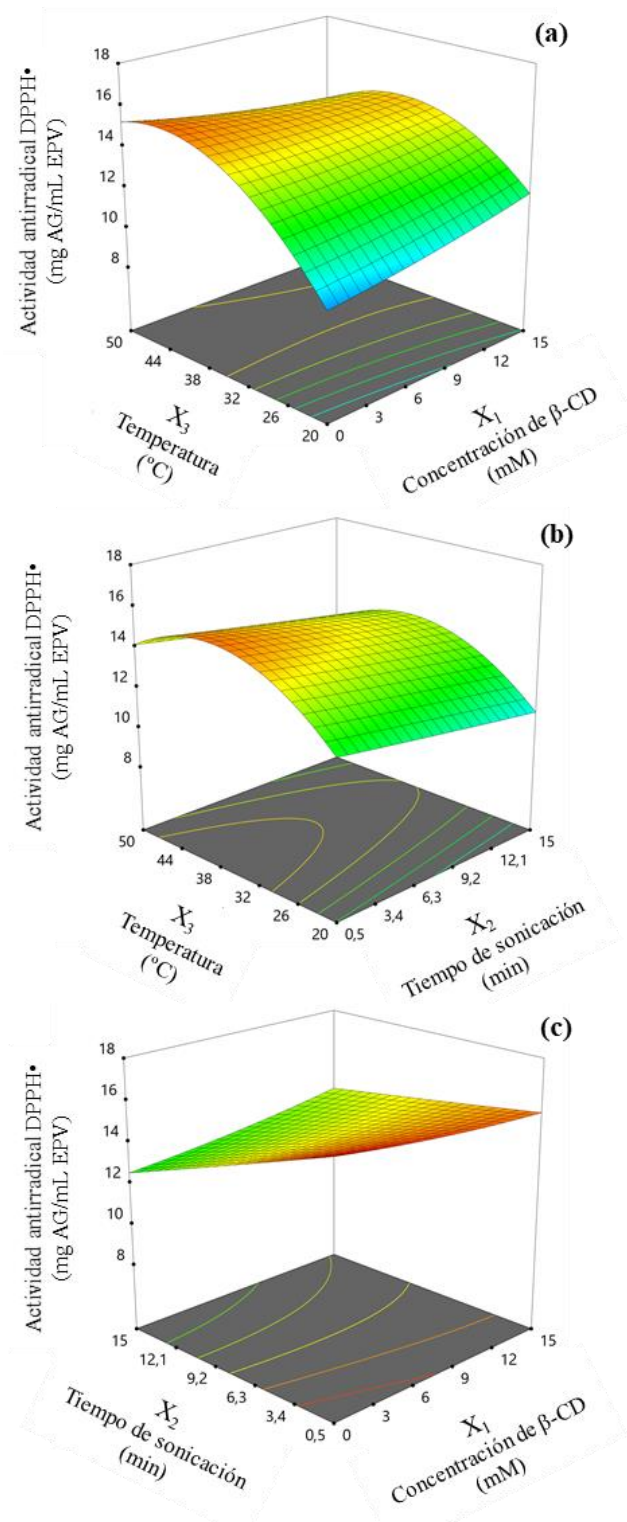


Figura 4.14. Gráficas de superficie de respuesta de las variables independientes para la actividad antioxidante (AO), como degradación del radical DPPH• en mg AG/mL de extracto de tomillo. AO como una función de: **(a)** la temperatura de extracción y la concentración de β-CD usando un tiempo de sonicación constante de 5,9 minutos; **(b)** temperatura y tiempo de sonicación usando una concentración constante de β-CD 15 mM; **(c)** tiempo de sonicación y concentración de β-CD usando temperatura constante de 36,6 °C.

4.5.1.3. Análisis de superficie de multirrespuesta para capacidad antioxidante del extracto de tomillo debida a su poder reductor, medida por el ensayo FRAP.

Los resultados que se muestran en la **Tabla 4.4** indican que la capacidad antioxidante de los extractos acuosos de tomillo, debida al poder reductor y medida por el ensayo FRAP y las variables de extracción siguieron una relación polinomial cuadrática, con un coeficiente de regresión R^2 de 0,9862. La **ecuación (4.3)** para las variables que resultaron significativas, $p\text{-value} < 0,05$, se presenta a continuación:

$$Y_3(\text{FRAP, mg AG/mL To}) = 3,15 + 0,42X_1 + 0,070X_2 + 0,47X_3 - 0,38X_1X_2 - 0,28X_1X_3 - 0,18X_2X_3 - 0,29X_1^2 - 0,81X_2^2 - 0,63X_3^2 \quad (\text{Ec. 4.3})$$

Todas las variables independientes fueron significativas, $p\text{-value} < 0,05$, para el poder reductor de hierro; además, la combinación de las variables X_1X_2 , X_1X_3 y X_2X_3 mostraron efecto antagónico.

En la **Figura 4.15** se representa la relación entre el poder reductor y las variables de extracción estudiadas: concentración de β -CD (X_1), tiempo de sonicación (X_2) y temperatura de extracción (X_3). Los valores de FRAP del extracto acuoso de tomillo aumentaron utilizando altas concentraciones de β -CD y temperaturas de extracción medias, cuando el tiempo de sonicación permaneció constante en 5,9 min (**Figura 4.15.a**). El FRAP también se incrementó con altas concentraciones de β -CD y con tiempos medios de sonicación, cuando la temperatura permaneció constante a 36,6 °C (**Figura 4.15.b**).

De acuerdo con estos resultados, la **Figura 4.15.c** muestra que el poder reductor se incrementó a un tiempo medio de sonicación y a temperatura de extracción media utilizando una solución 15 mM de β -CD. Estos resultados experimentales confirmaron la validez del modelo aplicado para predecir los valores de FRAP (**Ecuación 4.3**). El mayor valor de poder reductor se obtuvo cuando la concentración de β -CD fue 7,5 mM, la temperatura de extracción fue de 35 °C y el tiempo de sonicación fue 7,7 min, como se informa en la **Tabla 4.3**.

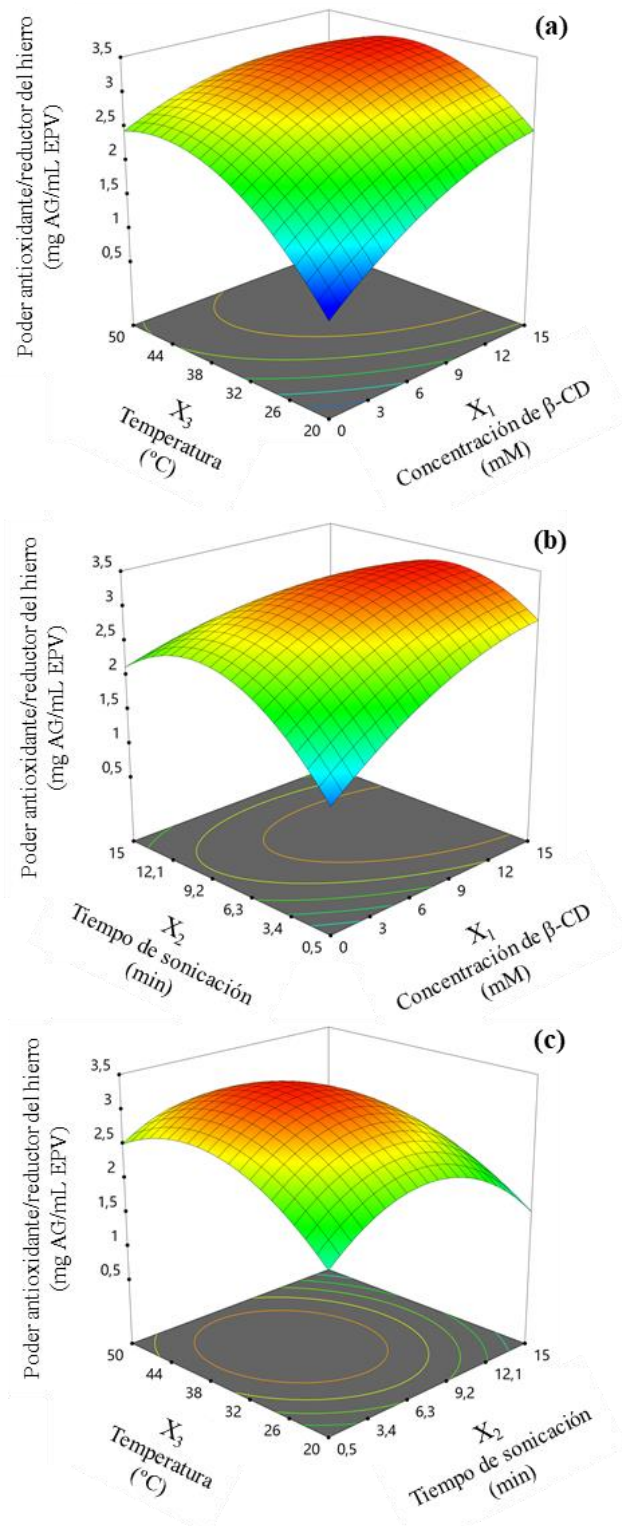


Figura 4.15. Gráficas de superficie de respuesta de variables independientes para el poder reductor de hierro (FRAP), en mg AG/mL de extracto de tomillo que muestra el máximo para la combinación de variables correspondientes. *FRAP* como una función de: **(a)** la temperatura de extracción y la concentración de β -CD usando un tiempo de sonicación constante de 5,9 min; **(b)** tiempo de sonicación y concentración de β -CD usando temperatura constante de 36,6 °C; **(c)** temperatura y tiempo de sonicación usando una concentración constante de β -CD 15 mM.

4.5.1.4. Parámetros optimizados para la extracción de bioactivos de tomillo empleando soluciones acuosas de β -ciclodextrina

Optimización por función deseabilidad

La función de Deseabilidad, aplicada a una optimización numérica asigna un puntaje a un conjunto de respuestas y elige la configuración de factores para maximizar ese puntaje. Este enfoque permite obtener los valores combinados de todas las variables óptimas que maximicen las respuestas, al tiempo que se satisfacen las restricciones del modelo.

La Deseabilidad general se utilizó para analizar las condiciones operativas que condujeron a maximizar las variables de respuesta en el proceso de extracción optimizado de compuestos bioactivos de tomillo. La Deseabilidad global máxima fue de 0,875 y se alcanzó cuando las condiciones del proceso de extracción fueron 15 mM de concentración de β -ciclodextrina, 5,9 min de tratamiento con ultrasonido y una temperatura de extracción de 36,6 °C. Por lo tanto, el uso de estas condiciones experimentales conduciría a la obtención de extractos con concentraciones predicha según el modelo de 189,3 mg AG/mL de polifenoles determinado por FC, 14,8 mg AG/mL de actividad antioxidante determinado por radical libre DPPH• y 3,3 mg AG/mL de poder reductor de hierro según la técnica FRAP.

Validación experimental del ajuste obtenido por el modelo de MRS

Los valores experimentales optimizados se compararon con los predichos usando la diferencia porcentual (% DP) para verificar la validez del modelo. En la **Tabla 4.5**, se observan los valores óptimos predichos y los experimentales donde observamos un 6,1

% de diferencia para CPT, 4,7 % para la capacidad antioxidante y 2,4 % para el poder reductor de hierro.

Tabla 4.5. Valores predichos y experimentales para las condiciones optimizadas.

Variable dependiente	Valores predichos	Valores experimentales	Diferencia porcentual (% DP)
CPT (mg AG/mL)	189,3	178 ± 1	6,1
DPPH• (mg AG/mL)	14,8	14,2 ± 0,5	4,7
FRAP (mg AG/mL)	3,3	3,2 ± 0,1	2,4

CPT, contenido total de polifenoles. DPPH•, actividad antioxidante antirradical. FRAP, capacidad antioxidante debida al poder reductor. % DP, diferencia porcentual. Se expresa la media de los valores y su desviación estándar ($n = 3$).

Las diferencias porcentuales (2,4 a 6,1 %) se consideran bajas en la región deseada donde las respuestas se maximizan según lo informado por Ribeiro Santos Rezende y *col.*, (2017) estos resultados prueban la utilidad y la validez de utilizar una planificación experimental como SMR y el enfoque presentado en la utilización de la función Deseabilidad para optimizar las variables con múltiples factores de respuestas. Este modelo permitió el estudio de las condiciones experimentales optimizadas para obtener los mejores rendimientos de extracción de compuestos bioactivos con mayor actividad antioxidante a partir de extracto acuoso de tomillo (To).

4.5.2. Pimienta verde

La **Tabla 4.6** muestra los valores de las variables independientes (concentración de β -CD, tiempo de sonicación y temperatura de extracción) empleadas en SMR para optimizar los máximos contenidos total de polifenoles, poder reductor/antioxidante del hierro y actividad antioxidante del extracto acuoso de pimienta verde.

El experimento N° 9 (concentración de β -CD 15 mM, tiempo de sonicación 7,7 min y temperatura de extracción de 50 °C) proporcionó el contenido total de polifenoles más alto: 25,4 mg AG/mL PV y el experimento N° 5 (concentración de β -CD 0 mM, tiempo de sonicación 7,7 min y temperatura de extracción de 50 °C) proporcionó el menor contenido total de polifenoles 20,7 mg AG/mL PV.

En el experimento N° 6 (concentración de β -CD 15 mM, tiempo de sonicación 15 min y temperatura de extracción de 35 °C) se obtuvo la actividad antioxidante más alta: 3,1 mg AG/mL PV y el experimento N° 2 (concentración de β -CD 0 mM, tiempo de sonicación 7,7 min y temperatura de extracción 20 °C) arrojó la menor actividad antioxidante: 2,5 mg AG/mL PV y produjo el menor poder reductor: 0,33 mg AG/mL PV. El experimento N° 11 (concentración de β -CD 7,5 mM, tiempo de sonicación 7,7 min y temperatura de extracción de 35 °C) arrojó el mayor poder reductor de hierro: 0,50 mg AG/mL PV.

Tabla 4.6. Valores de las variables independientes basados en un diseño Box-Behnken para el análisis de superficie de multirrespuesta, donde se optimizó la extracción con β -ciclodextrina de compuestos funcionales de pimienta verde asistida por ultrasonido. Contenido total de polifenoles, poder reductor y actividad antioxidante antirradicalaria de los extractos acuosos de pimienta verde.

N° de experimento	Código y decodificación de variables independientes (Condiciones de extracción)			Respuestas a las variables		
	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁ Contenido total de polifenoles (CPT)	Y ₂ Actividad antirradicalaria (DPPH•)	Y ₃ Poder reductor de hierro (FRAP)
	Concentración de β -CD (mM)	Tiempo de sonicación (min)	Temperatura de extracción (°C)	(mg AG/mLVP)		
1	(0) 7,5	(-1) 0,5	(1) 50	21,4 ± 0,3	2,64 ± 0,06	0,43 ± 0,03
2	(-1) 0	(0) 7,7	(-1) 20	20,3 ± 0,3	2,48 ± 0,03	0,33 ± 0,04
3	(-1) 0	(1) 15	(0) 35	20,6 ± 0,5	2,84 ± 0,04	0,49 ± 0,02
4	(1) 15	(0) 7,7	(-1) 20	22,14 ± 0,02	2,52 ± 0,01	0,45 ± 0,04
5	(-1) 0	(0) 7,7	(1) 50	20,7 ± 0,01	2,50 ± 0,04	0,42 ± 0,01
6	(1) 15	(1) 15	(0) 35	24,37 ± 0,04	3,06 ± 0,02	0,46 ± 0,04
7	(0) 7,5	(1) 15	(-1) 20	20,18 ± 0,07	2,58 ± 0,06	0,40 ± 0,01
8	(1) 15	(-1) 0,5	(0) 35	24,0 ± 0,5	3,01 ± 0,06	0,48 ± 0,08
9	(1) 15	(0) 7,7	(1) 50	25,4 ± 0,2	2,90 ± 0,05	0,39 ± 0,01
10	(0) 7,5	(-1) 0,5	(-1) 20	19,42 ± 0,07	2,53 ± 0,01	0,40 ± 0,03
11	(0) 7,5	(0) 7,7	(0) 35	21,8 ± 0,1	2,97 ± 0,04	0,51 ± 0,02
12	(-1) 0	(-1) 0,5	(0) 35	20,88 ± 0,05	2,66 ± 0,01	0,36 ± 0,02
13	(0) 7,5	(0) 7,7	(0) 35	21,4 ± 0,3	3,04 ± 0,05	0,42 ± 0,08
14	(0) 7,5	(0) 7,7	(0) 35	21,4 ± 0,3	2,67 ± 0,02	0,40 ± 0,08
15	(0) 7,5	(1) 15	(1) 50	20,8 ± 0,1	2,55 ± 0,05	0,48 ± 0,09

Se expresa la media de los valores y su desviación estándar ($n = 3$).

El análisis de varianza ANOVA presentado en la **Tabla 4.7** muestra que los valores experimentales de todas las respuestas (CPT, DPPH•, FRAP) se pueden ajustar usando un modelo polinomial cuadrático ($p\text{-value} < 0,0001$). El $F\text{-value}$, de 173,39, 20,24 y 16,65 para el contenido total de polifenoles, la actividad antioxidante y el poder reductor de los extractos acuosos de pimienta verde, sugirieron que la importancia del modelo era mayor, con un nivel de confianza de 95 %. En la **Tabla 4.7** se observan los valores para la prueba de falta de ajuste (*Lack of fit*) y el valor del error puro (*Pure error*) los cuales indican la reproducibilidad del modelo para los datos experimentales.

El efecto de los factores de extracción X_1 (concentración de β -CD), X_2 (tiempo de sonicación) y X_3 (temperatura de extracción) fueron analizados para cada factor de respuesta (**Tabla 4.6**). La importancia de cada coeficiente fue determinada en función de los $F\text{-value}$ y $p\text{-value}$, teniendo en cuenta que un $F\text{-value}$ alto con un $p\text{-value}$ más bajo siempre conduce a una correspondencia más significativa entre varias variables independientes (Chen y col., 2015).

Tabla 4.7. Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo polinomial cuadráticos ajustado para la optimización de los parámetros de extracción (concentración de β -CD, tiempo de sonicación y temperatura de extracción) de compuestos funcionales de pimienta verde.

Source	Contenido total de polifenoles ($R^2 = 0,9781$)					Actividad antiradical DPPH• ($R^2 = 0,8988$)					Poder reductor de hierro ($R^2 = 0,8607$)				
	SS	DF	MS	F-value	p-value	SS	DF	MS	F-value	p-value	SS	DF	MS	F-value	p-value
Modelo	119,59	9	13,29	173,39	< 0,0001	1,64	9	0,18	20,24	< 0,0001	0,085	9	0,000946	16,65	< 0,0001
Lack of fit	0,53	3	0,18	2,64	0,0661	0,067	3	0,022	2,87	0,0519	0,000422	3	0,000141	2,87	0,0514
Pure error	2,15	32	0,067			0,25	32	0,000778			0,016	32	0,0000489		

SS, sum of squares. DF, degree of freedom. MS, mean square. Nivel de significancia = $p < 0,05$.

4.5.2.1. Análisis de superficie de multirrespuesta para el contenido total de polifenoles (CPT) por FC

Al igual que para el caso de los extractos de tomillo, la ecuación de regresión en los niveles codificados (4.4) se generó solo con los términos significativos, p -value <0,05 sin considerar los términos no significativos para analizar el efecto de cada variable independiente sobre la extracción de polifenoles de los extractos acuosos de pimienta verde, según la siguiente ecuación:

$$Y_1(\text{CPT, mg AG/mL PV}) = 21,53 + 1,69X_1 + 0,77X_3 + 0,72X_1X_3 - 0,35X_2X_3 + 1,31X_1^2 + 0,37X_2^2 + 0,73X_3^2 \quad (\text{Ec. 4.4})$$

El polinomio cuadrático exhibe las relaciones entre los factores de extracción y el contenido total de polifenoles que tuvo un coeficiente de regresión R^2 de 0,9781, **Tabla 4.7**, siendo este valor de R^2 adecuado para la aplicación de este modelo (Nipornram y col., 2018; Ribeiro Santos Rezende y col., 2017; Chen y col., 2015).

Las variables X_1 , X_3 , X_1X_3 , X_2X_3 , X_1^2 , X_2^2 y X_3^2 fueron significativas p -value <0,05. Sin embargo, las variables X_2 y X_1X_2 no fueron significativas debido a un p -value >0,05. La combinación de las variables X_1X_3 mostró un efecto sinérgico entre la concentración de β -CD y la temperatura de extracción para la extracción de polifenoles, un comportamiento antagónico se observó para la combinación de las variables X_2X_3 , tiempo de sonicación y temperatura de extracción.

La **Figura 4.16** muestra la interacción entre las variables independientes y sus efectos sobre la extracción de polifenoles. El contenido total de polifenoles es mayor cuando se utilizó la mayor concentración de β -CD (variable X_1) y tiempos intermedios de sonicación (variable X_2), aunque esta última variable presentó amplio rango de acción como se observa en la **Figura 4.16.a**, cuando la temperatura de extracción (variable X_3) permaneció constante en 41 °C. Este fenómeno también se ve reflejado en el análisis de regresión (**Ecuación 4.4**), que no presentó efecto sinérgico entre las variables X_1X_2 , debido a un p -value $>0,05$.

Es importante señalar que el mayor CTP se observó a altas concentraciones de β -CD (variable X_1) y a altas temperatura de extracción (variable X_3), cuando el tiempo de sonicación (variable X_2) permaneció constante en 5 min como se puede observar en la **Figura 4.16.b**, y de acuerdo con el análisis de regresión (Ecuación 4.4) la combinación de estas variables (X_1X_3) mostró un efecto sinérgico en la extracción de polifenoles, siendo su p -value $<0,05$.

El contenido total de polifenoles aumentó cuando se utilizaron tiempos intermedios de sonicación (variable X_2) y temperaturas de extracción (variable X_3) mayores que 41 °C, dejando fija la concentración de β -CD en 15 mM como se observa en la **Figura 4.16.c**. Este fenómeno se evidencia en el análisis de regresión (**Ecuación 4.4**), donde las variables X_2X_3 presentaron un efecto antagónico con un p -value $<0,05$.

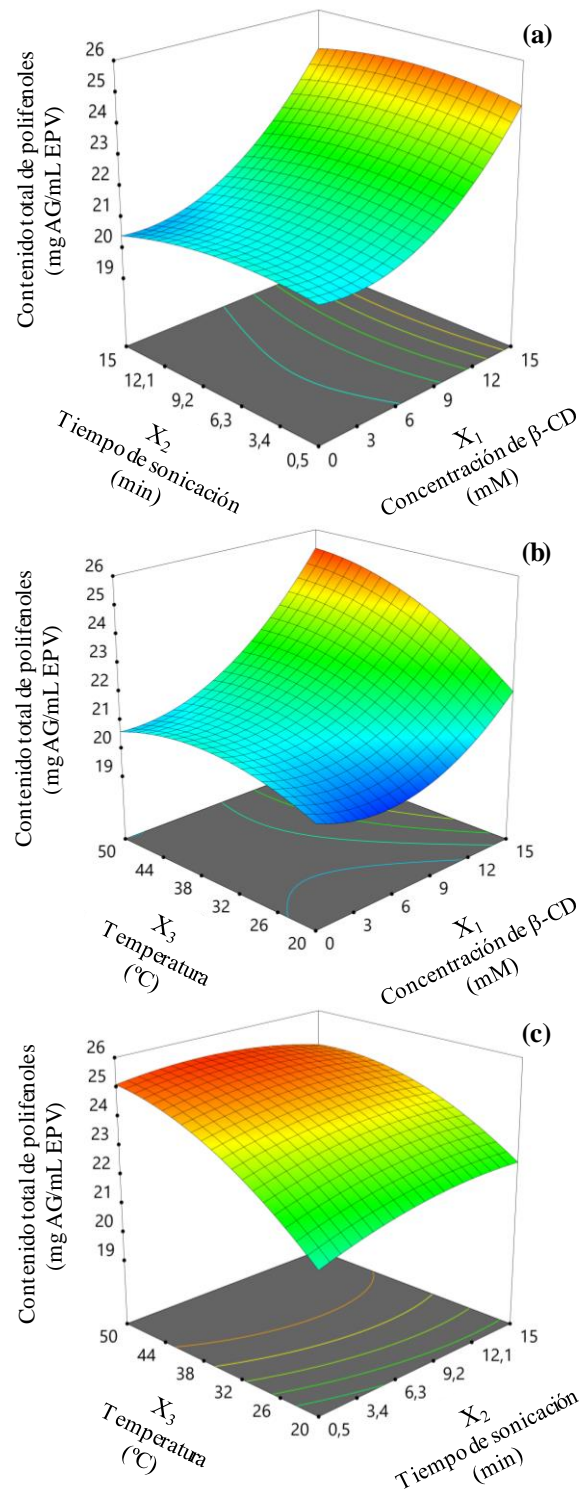


Figura 4.16. Gráficas de superficie de respuesta de las variables independientes para el contenido total de polifenoles de extractos de pimienta verde (PV) (CPT, mg AG/mL PV) mostrando el máximo para la combinación de variables correspondientes. CPT como una función de: **(a)** el tiempo de sonicación (min) y la concentración de β -CD (mM) fijando la temperatura constante en 41 $^{\circ}$ C; **(b)** la temperatura y la concentración de β -CD (mM) fijando el tiempo de sonicación en 5 min; **(c)** temperatura y tiempo de sonicación usando constante la concentración de β -CD en 15 mM.

4.5.2.2. Análisis de superficie de multirrespuesta para la actividad antirradical DPPH•

La **Tabla 4.7** muestra los resultados de la aplicación de la **ecuación (4.5)** polinómica cuadrática para la actividad antioxidante evaluada por radical libre DPPH• y los parámetros de extracción: concentración de β -CD (variable X_1), tiempo de sonicación (variable X_2) y temperatura de extracción (variable X_3). El valor obtenido de regresión R^2 de 0,8988 es aceptable y demostró la fiabilidad del modelo aplicado (Nipornram y *col.*, 2018; Ribeiro Santos Rezende y *col.*, 2017; Chen y *col.*, 2015).

La **ecuación (4.5)** de regresión fue generada con los niveles codificados teniendo en cuenta solo los términos significativos, p -value <0,05, para la actividad antioxidante de los extractos acuosos de pimienta verde se presenta a continuación:

$$Y_2(\text{DPPH, mg AG/mL PV}) = 2,90 + 0,13X_1 + 0,059X_3 + 0,093X_1X_3 - 0,30X_3^2$$

(Ec. 4.5)

El análisis estadístico del modelo aplicado mostró que las variables independientes X_1 , X_3 , X_1X_3 , y X_3^2 fueron los parámetros más significativos para la combinación de factores que permitieron la extracción de compuestos con actividad antioxidante de los extractos de pimiento verde. La combinación de las variables X_1X_3 presentó un efecto sinérgico en la actividad antioxidante, mientras que las variables X_2 , X_1X_2 , X_2X_3 , X_1^2 and X_2^2 tuvieron menos efecto sobre la actividad antioxidante evaluada a través del radical libre DPPH•.

En la **Figura 4.17** se presentan los gráficos de superficie de respuesta obtenidos para las relaciones entre las variables de extracción estudiadas y la actividad antioxidante (evaluada como degradación del radical libre DPPH•). La **Figura 4.17.a** representa el efecto sobre la actividad antioxidante presentado por la interacción entre la temperatura de extracción y la concentración de β -CD, cuando el tiempo de sonicación se mantuvo constante en 5 min. La actividad antirradicalaria aumentó a temperaturas media de extracción y alta concentración de β -CD. La mayor degradación del radical libre DPPH• se observó a la mayor concentración de β -CD (15 mM) y a la temperatura de extracción media (41 °C).

La **Figura 4.17.b** muestra la relación entre la temperatura de extracción y el tiempo de sonicación cuando la concentración de β -CD permaneció constante en 15 mM. La actividad antioxidante se incrementó con la temperatura de extracción (variable X_3) y fue independiente del tiempo de sonicación (X_2), según el análisis de regresión (**Ec. 4.5**). La combinación de las variables X_1X_2 y X_2X_3 mostró efecto no sinérgico sobre la actividad antioxidante. Sin embargo, el tratamiento de calentamiento a temperaturas superiores a 41 °C redujo la actividad antirradicalaria probablemente debido a la degradación de los compuestos bioactivos presentes en los extractos de pimienta verde. Cuando se fijó la temperatura de extracción en 41 °C la actividad antioxidante se mantuvo constante a una concentración alta de β -CD (variable X_1) y con el aumento del tiempo de sonicación (variable X_2) (**Figura 4.17.c**). La **Figura 4.17 (a, b y c)** muestra que la capacidad antioxidante no se vio afectada al aumentar el tiempo de sonicación, como también se puede ver en la ecuación de regresión (**Ecuación 4.5**). Sin embargo, la capacidad antioxidante se vio afectada por la temperatura de extracción y la concentración de β -CD probablemente debido a la labilidad de los compuestos bioactivos en los extractos (Parmar y *col.*, 2015).

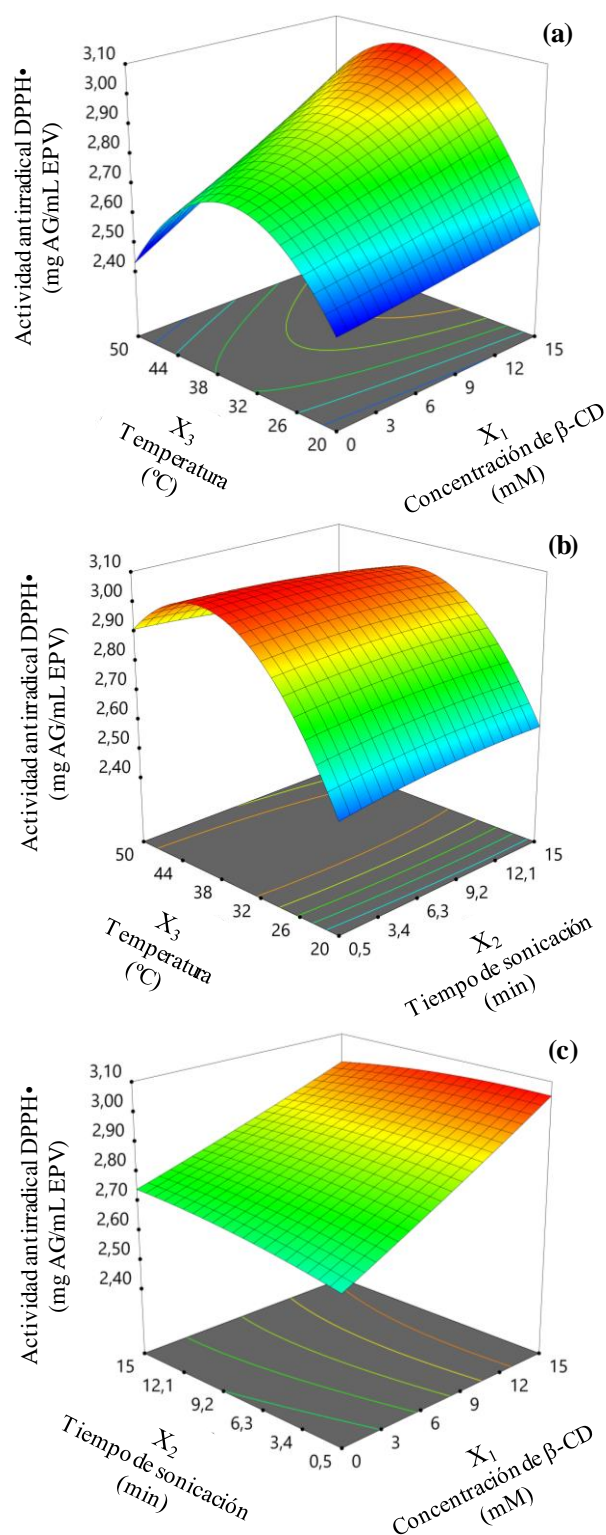


Figura 4.17. Gráficos de superficie de respuesta de las variables independientes para la actividad antioxidante (AO), evaluada como la degradación del radical libre DPPH• en mg AG/mL PV, de extracto de pimienta verde. AO en función de: **(a)** la temperatura de extracción y la concentración de β-CD utilizando un tiempo de sonicación fijo de 5 min; **(b)** temperatura y tiempo de sonicación utilizando una concentración constante de β-CD 15 mM; **(c)** tiempo de sonicación y concentración de β-CD utilizando temperatura constante a 41 ° C.

4.5.2.3. Análisis de superficie de multirrespuesta para la capacidad antioxidante, determinada por poder reductor de hierro (FRAP)

Los resultados que se muestran en la **Tabla 4.7** indican que el poder reductor de hierro y los parámetros de extracción siguieron una relación cuadrática, con un coeficiente de regresión ($R^2 = 0,8607$).

La ecuación polinomial cuadrática para los niveles codificados teniendo en cuenta solo los términos significativos, *p-value* <0,05, para la extracción de compuestos de pimienta verde con actividad ante la valoración de FRAP se presenta a continuación:

$$Y_3(\text{FRAP, mg AG/mL PV}) = 0,44 + 0,024X_1 + 0,019X_2 + 0,019X_3 - 0,038X_1X_2 - 0,039X_1X_3 + 0,019X_2^2 - 0,031X_3^2 \quad (\text{Ec. 4.6})$$

Todas las variables independientes fueron significativas para el poder reductor de hierro y la combinación de las variables X_1X_2 y X_1X_3 mostraron efecto antagónico, esto se observa en el signo negativo sobre la combinación de variables y opuesto al signo de las mismas variables en los correspondientes términos lineales.

En la **Figura 4.18** se representa la relación entre la capacidad antioxidante basada en el poder reductor de hierro y las variables de extracción estudiadas: concentración de β -CD (variable X_1), tiempo de sonicación (variable X_2) y temperatura de extracción (variable X_3). El poder de reductor de hierro (FRAP) del extracto de pimienta verde aumentó usando altos tiempos de sonicación y bajas concentraciones de soluciones de β -CD, cuando la temperatura si fijo en 41 °C (**Figura 4.18.a**). El FRAP también aumentó

usando soluciones concentradas de β -CD y temperaturas medias a bajas, mientras en tiempo de sonicación permaneció constante en 5 min (**Figura 4.18.b**). De acuerdo con los resultados, la **Figura 18.c** muestra que el poder de reductor aumentó a temperatura media a baja y a bajo tiempo de sonicación cuando la concentración de β -CD se fijó en 15 mM. Estos resultados experimentales confirmaron la validez del modelo aplicado para predecir el poder reductor de los extractos como se puede ver en las **Figuras 4.18 (a, b y c)** y en la ecuación 4.6.

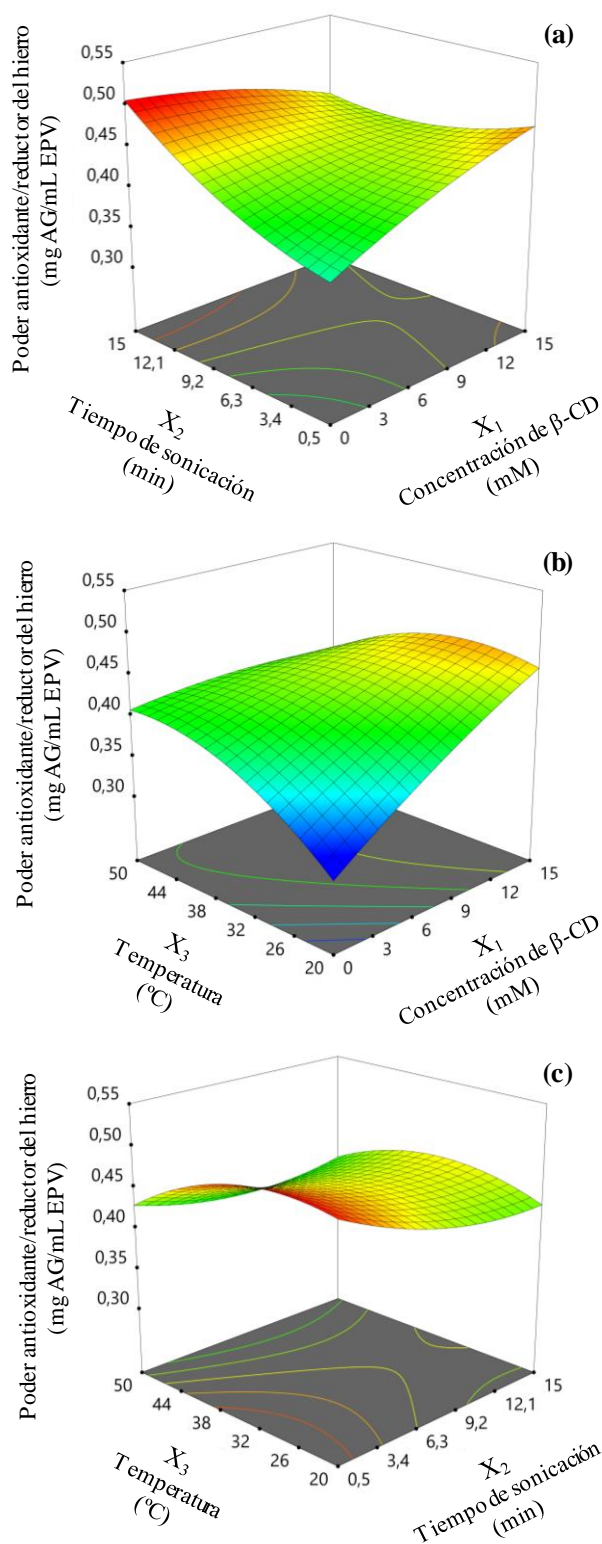


Figura 4.18. Gráficos de superficie de respuesta de variables independientes para el poder reductor de hierro (FRAP), en mg AG/mL PV, de extracto de pimienta verde exhibiendo los máximos para la combinación de variables. FRAP en función de: (a) el tiempo de sonicación y la concentración de β -CD utilizando la temperatura constante en 41 °C; (b) la temperatura y la concentración de β -CD utilizando el tiempo de sonicación constante en 5 min; (c) la temperatura y el tiempo de sonicación utilizando una concentración constante de 15 mM de β -CD.

4.5.2.4. Parámetros optimizados para la obtención de extractos funcionales (antioxidantes) de pimienta verde empleando β -ciclodextrina

Optimización por función Deseabilidad

La Deseabilidad global máxima fue de 0,957 y se alcanzó cuando las condiciones del proceso de extracción fueron 15 mM de β -ciclodextrina, 5 min de sonicación y una temperatura de extracción de 41 °C. Por lo tanto, el uso de estas condiciones experimentales conduciría a la obtención de extractos con concentraciones predichas según el modelo de 24,9 mg AG/mL PV de polifenoles determinado por FC, 3,1 mg AG/mL PV de actividad antioxidante determinado por radical libre DPPH• y 0,5 mg AG/mL PV de poder reductor de hierro según la técnica FRAP.

Validación experimental del ajuste obtenido por el modelo de SMR

Los valores experimentales optimizados se compararon con los predichos usando la diferencia porcentual (% DP) para verificar la validez del modelo. En la **Tabla 4.8**, se observan los valores óptimos predichos y los experimentales donde observamos un 9,3 % de diferencia para CPT, 7,4 % para la capacidad antioxidante y 6,7 % para el poder reductor de hierro.

Tabla 4.8. Valores predichos y experimentales para las condiciones optimizadas.

Variabes dependientes	Valores predichos	Valores experimentales	Diferencia porcentual (% DP)
CPT (mg AG/mL PV)	24,9	26,2 \pm 1,2	9,3
DPPH• (mg AG/mL PV)	3,1	2,8 \pm 0,6	7,4
FRAP (mg AG/mL PV)	0,5	0,42 \pm 0,05	6,7

CPT, contenido total de polifenoles. DPPH•, actividad antioxidante. FRAP, poder reductor/antioxidante de hierro. % DP, diferencia porcentual. Se expresa la media de los valores y su desviación estándar ($n = 3$).

Las diferencias porcentuales (6,7 a 9,3 %) se consideran bajas en la región deseada donde las respuestas se maximizan según lo informado por Ribeiro Santos Rezende y *col.*, (2017) estos resultados prueban la utilidad y la validez de utilizar una planificación experimental como SMR y el enfoque presentado en la utilización de la función Deseabilidad para optimizar las variables con múltiples factores de respuestas. Este modelo permitió el estudio de las condiciones experimentales optimizadas para obtener los mejores rendimientos de extracción de compuestos con funcionalidad con mayor actividad antioxidante a partir de extractos acuosos de pimienta verde (PV).

4.5.3. Resumen del efecto de las variables de extracción

De los resultados obtenidos podemos concluir que la presencia de β -CD, el tiempo de tratamiento con ultrasonido y la temperatura de extracción afectan significativamente la eficiencia de extracción de los bioactivos de interés.

Tanto en el caso de los extractos de tomillo como de los de pimienta verde, si bien una alta temperatura de extracción puede aumentar el rendimiento del contenido de polifenoles, debido a un aumento de su solubilidad, que facilita la difusión de estos compuestos, estas condiciones pueden promover la degradación de los mismos, reduciendo así la capacidad antioxidante global (Sogi y *col.*, 2013).

Para ambos extractos, los resultados de las **secciones 4.5.1 y 4.5.2** permiten establecer que las concentraciones más altas de β -ciclodextrina asociadas con la extracción asistida por ultrasonido admiten la aplicación de mayores temperaturas con el fin de aumentar el rendimiento de extracción de polifenoles debido probablemente al efecto protector de los bioactivos por la complejación β -ciclodextrina-ligando (Gao y *col.*, 2016; Magnusdottier y *col.*, 2002).

En el caso de tomillo el tratamiento a temperaturas superiores a 44 °C redujo la actividad antirradicalaria (aunque no el contenido de polifenoles totales), probablemente debido a la degradación de compuestos bioactivos presentes en los extractos acuosos de tomillo, mientras que en los extractos de pimienta la actividad antirradicalaria aumentó a temperaturas medias de extracción y alta concentración de β -CD. Para ambos vegetales la mayor degradación del radical libre DPPH• se observó a la mayor concentración de β -CD (15 mM) y a la temperatura de extracción media (41 °C).

La actividad antioxidante determinada por ensayo con radical libre DPPH• y el poder reductor determinado por *FRAP*, permiten medir la actividad antioxidante total a través de diferentes mecanismos. Si bien no siempre se puede esperar una relación directa entre estos dos parámetros (dos Santos y col., 2012), las condiciones de máxima potencia antioxidante por acción reductora y las de los contenidos máximos de polifenoles son coincidentes, probablemente debido al poder reductor de los polifenoles.

Las diferentes respuestas para el contenido de polifenoles totales, la actividad antioxidante y el poder reductor a las variables de extracción estudiadas son esperables, debido a que en su determinación están involucradas reacciones químicas de diferente naturaleza e intervienen distintos tipos de compuestos presentes en el extracto, que reaccionan en forma diferente frente a dichos ensayos. La función Deseabilidad permitió integrar las variables para maximizar las respuestas deseadas de las reacciones estudiadas.

4.6. EFECTO DE EXTRACTOS DE HIERBAS Y ESPECIAS SOBRE LA INHIBICIÓN DE LA GLICACIÓN EVALUADA A TRAVÉS DEL INDICADOR INTERMEDIO HIDROXIMETILFURFURAL (HMF)

El hidroximetilfurfural (HMF) es un aldehído furánico que se forma en los alimentos durante el procesado térmico a través de la reacción de Maillard y de la deshidratación de azúcares en condiciones ácidas (Kroh, 1994; Ames, 1992). El HMF también es una molécula multifuncional que contiene un anillo de furano, un grupo carbonilo, y un grupo hidroxilicoalílico que puede formar base de Schiff con aminas y participa en reacciones de adición de Michael en presencia de grupos nucleofílicos (Morales, 2009). Se puede considerar que es un indicador de etapas intermedias de la reacción.

El contenido de HMF de los alimentos está relacionado principalmente con el proceso térmico aplicado, por lo tanto, se utiliza también como marcador de seguimiento de dicho tratamiento (Rada-Mendoza y *col.*, 2004; Morales y Jiménez-Pérez, 2001; Ibarz y *col.*, 2000; Gökmen y Acar, 1999). Además, la formación de HMF depende de la actividad de agua y del pH de los alimentos (Morales, 2009; Ameer y *col.*, 2007). Al igual que furosina es considerado un marcador temprano de la reacción de Maillard, en etapas posteriores ambos se convierten en otros productos intermediarios o avanzados decayendo así su concentración global en el sistema (Cueto, 2016; Masatcioglu y *col.*, 2014; Cardelle-Cobas y Villamiel, 2005; Ruiz y *col.*, 2004).

4.6.1. Estudio de la formación de HMF a temperaturas moderadas

Para este estudio se seleccionaron los extractos vegetales que fueron más efectivos para inhibir la formación de furosina (PJ, To, PV, PN, PB) (**sección 3.7.3**). Los extractos se obtuvieron empleando β -CD como solvente, en las condiciones optimizadas. Se

lío-filizaron y luego se resuspendieron en agua a volumen original para su utilización. La actividad antiglicante se siguió evaluando la formación de HMF en sistemas modelo BSA+GLU tratados a 55 °C. Se usaron como control sistemas BSA+GLU y BSA+GLU+ β -CD.

En la **Figura 4.19 (a, b, c y d)** se representan los valores de concentración de HMF, para los distintos extractos y los controles, evaluados por HPLC utilizando la recta de calibración correspondiente al analito en estudio (ver **sección 3.7.3**). En todos los gráficos se presentan los controles BSA+GLU y BSA+GLU+ β -CD, que muestran diferencias significativas (p -value <0,05) entre ambos sistemas. Esto indica que la presencia de β -CD, posee cierta capacidad de inhibir la producción de HMF en las condiciones experimentales ensayadas. Por este motivo se consideró el control BSA+GLU+ β -CD como referencia para evaluar la capacidad de los extractos de inhibir la producción de HMF.

La presencia de los extractos acuosos de pimienta de Jamaica (PJ) y de tomillo (To) mostraron efecto inhibitorio para la producción de HMF, con valores máximos menores que 0,2 ppm, respecto del control, que mostró valores próximos a 0,4 ppm, como se observa en la **Figura 4.19.a** Los extractos de pimienta verde (PV), tuvieron un efecto inhibitorio menor (**Figura 4.19.b**), mientras que los extractos de pimienta blanca (PB) y negra no presentaron diferencias significativas respecto del control (p -value >0,05), según se observa en las **Figuras 4.19, (c) y (d)**, respectivamente.

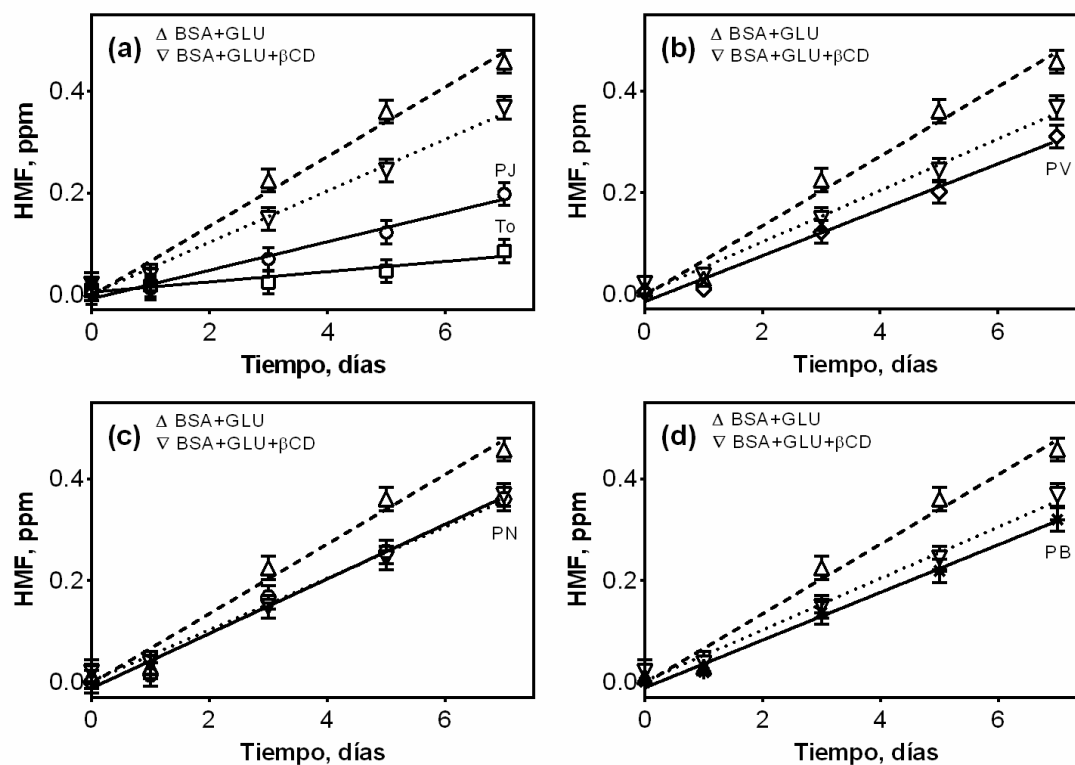


Figura 4.19. Formación de HMF en sistemas modelo BSA+GLU en ausencia y presencia de los extractos estudiados en función del tiempo de reacción a 55 °C. En línea rayada, se presenta el sistema control BSA+GLU y en línea punteada el sistema control BSA+GLU+ β -CD. (a) Efecto de extracto de pimienta de Jamiaca (PJ) y tomillo (To), (b) efecto de extracto de pimienta verde (PV), (c) efecto de extracto de pimienta negra (PN), (d) efecto de extracto de pimienta blanca (PB).

Los resultados obtenidos al graficar concentración de HMF en función del tiempo se analizaron aplicando el modelo lineal de orden 0, del cual se obtuvieron las constantes cinéticas (k). El orden de actividad inhibitoria de los extractos acuosos frente al control con β -CD según sus constantes cinéticas (k) fue: tomillo > pimienta de Jamaica > pimienta verde > pimienta blanca, todos los ajustes presentaron R^2 mayores que 0,98; pimienta negra no presentó diferencias significativas respecto del control con β -CD (Tabla 4.9).

Tabla 4.9. Constantes cinéticas (k) y coeficiente de determinación (R^2) obtenidos por ajuste lineal para la producción de HMF en función del tiempo de reacción a 55 °C. Sistemas modelo BSA+GLU en ausencia y presencia de los extractos estudiados.

Muestras	Constantes cinéticas (k) (ppm HMF/días)	R^2
Control BSA+GLU	0,068 ± 0,005 ^a	0,983
Control BSA+GLU+β-CD	0,051 ± 0,003 ^b	0,999
Pimienta de Jamaica (PJ)	0,028 ± 0,002 ^c	0,984
Tomillo (To)	0,010 ± 0,002 ^d	0,981
Pimienta verde (PV)	0,045 ± 0,003 ^e	0,986
Pimienta negra (PN)	0,054 ± 0,003 ^b	0,987
Pimienta blanca (PB)	0,047 ± 0,002 ^f	0,993

Letras distintas indican diferencias significativas (p -value <0,05) respecto del control BSA+GLU+ β-CD.

Como se observó en la **Figura 4.19**, la presencia de β-ciclodextrina en el sistema BSA+GLU (sin extracto) inhibió el desarrollo de HMF, fenómeno que podría explicarse por la capacidad de formación de complejos de la β-CD. La ciclodextrina podría, por un lado, captar intermediarios de la reacción de Maillard, retardando la producción de HMF. Por otro lado, en los sistemas conteniendo los extractos que fueron obtenidos con β-CD como solvente, la ciclodextrina podría liberar compuestos activos, atrapados por encapsulación molecular durante el proceso de extracción y en su posterior liofilización, que limitan el desarrollo de HMF. Por lo tanto, la actividad inhibitoria de los extractos podría explicarse por un mecanismo simultaneo de liberación de activos y captación de intermediarios de la reacción de Maillard.

Este fenómeno de inclusión molecular por parte de β -CD se ha reportado en numerosos documentos y es de aplicación en la industria de los alimentos y farmacéutica (Vikas y *col.*, 2018; Fenyvesi y *col.*, 2016; Bina y Vyas, 2015; Ratnasooriya y Rupasinghe, 2012, Li y *col.*, 2010). Se conocen productos en los cuales β -CD se encuentra encapsulando vitaminas (Vitamina E, C) y ácidos grasos omega-3, omega-6 y omega-9 evitando su oxidación y actuando como agente protector ante los mecanismos conocidos de deterioro. También es conocida la aplicación como agente captador de colesterol formando un complejo de inclusión con este y permitiendo el desarrollo de productos reducidos en colesterol (Ahn y Kwak, 1999).

4.6.2. Estudio de la formación de HMF a altas temperaturas

Dado el efecto inhibitorio de la formación de HMF observado para los extractos de tomillo y de las pimientas a 55 °C, se consideró hacer un estudio acelerado a altas temperaturas de reacción, para lo cual se seleccionaron las temperaturas de 70, 80 y 90 °C, con el fin de conocer la energía de activación a través de la ecuación de Arrhenius (Hamzalıoğlu y Gökmen, 2018).

En las **Figuras 4.20 a 4.24** se grafica la concentración de HMF, en ppm, en función del tiempo, en horas, para los sistemas control y en presencia de los extractos acuosos de tomillo (**Figura 4.20**), pimienta de Jamaica (**Figura 4.21**), pimienta verde (**Figura 4.22**), pimienta negra (**Figura 4.23**) y pimienta blanca (**Figura 4.24**). En todas ellas se muestran los resultados a las temperaturas de 70, 80 y 90 °C.

Todos los sistemas siguieron una cinética correspondiente a un orden 0 hasta las 4 h de reacción, los gráficos de Arrhenius se muestran para cada sistema en las **Figuras 4.20 a 4.24 (d)**, correspondientes.

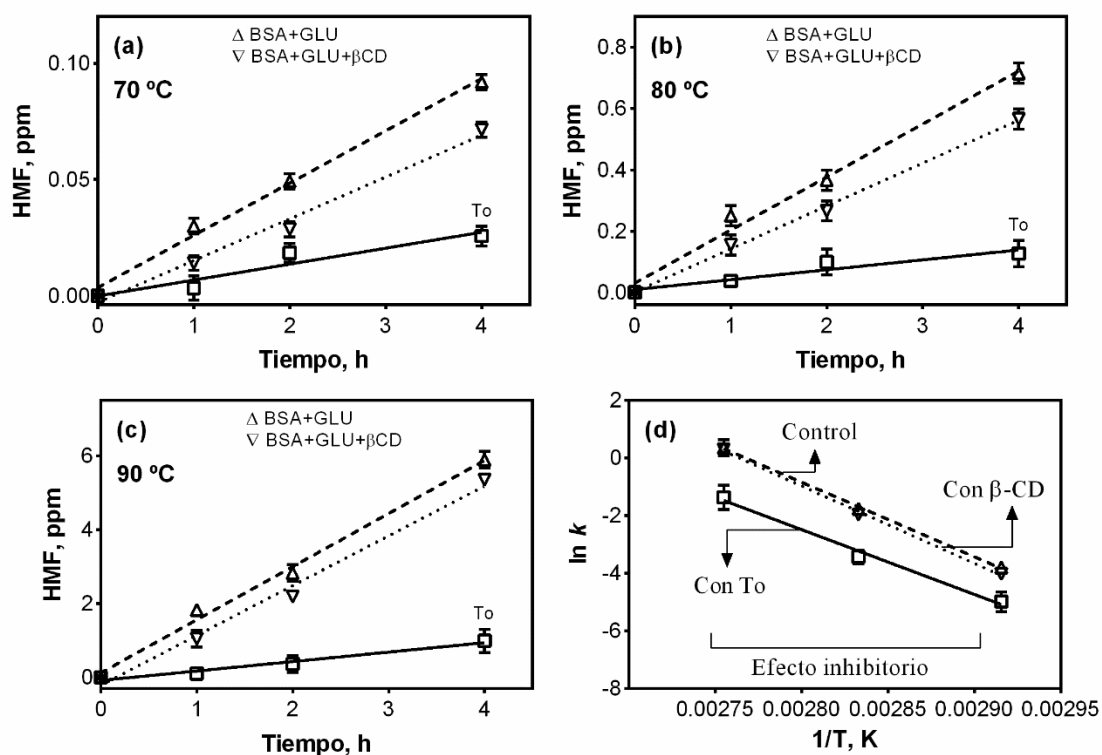


Figura 4.20. Formación de HMF en sistemas modelo BSA+GLU en ausencia y presencia de extracto de tomillo (To) en función del tiempo de reacción (en horas) a 70 (a), 80 (b) y 90 °C (c). En línea rayada, se presenta el sistema control BSA+GLU y en línea punteada el sistema control BSA+GLU+β-CD. (d) Gráficas de Arrhenius correspondientes.

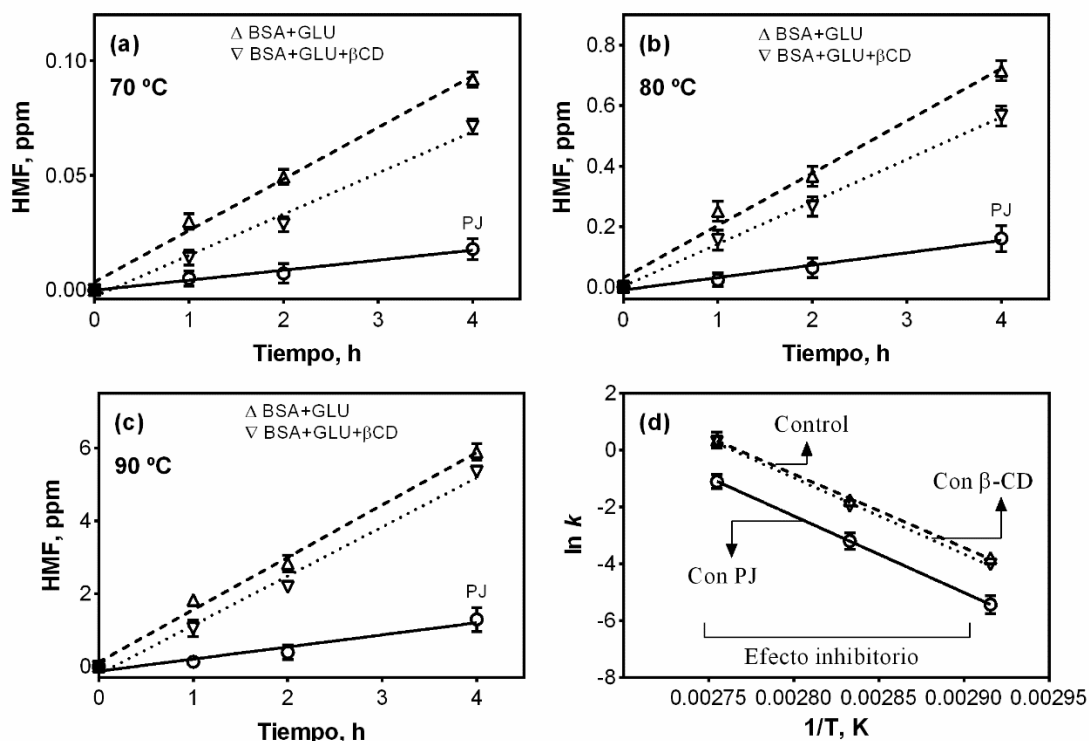


Figura 4.21. Formación de HMF en sistemas modelo BSA+GLU en ausencia y presencia de extracto de pimienta de Jamaica (PJ) en función del tiempo de reacción (en horas) a 70 (a), 80 (b) y 90 °C (c). En línea rayada, se presenta el sistema control BSA+GLU y en línea punteada el sistema control BSA+GLU+β-CD. (d) Gráficas de Arrhenius correspondientes.

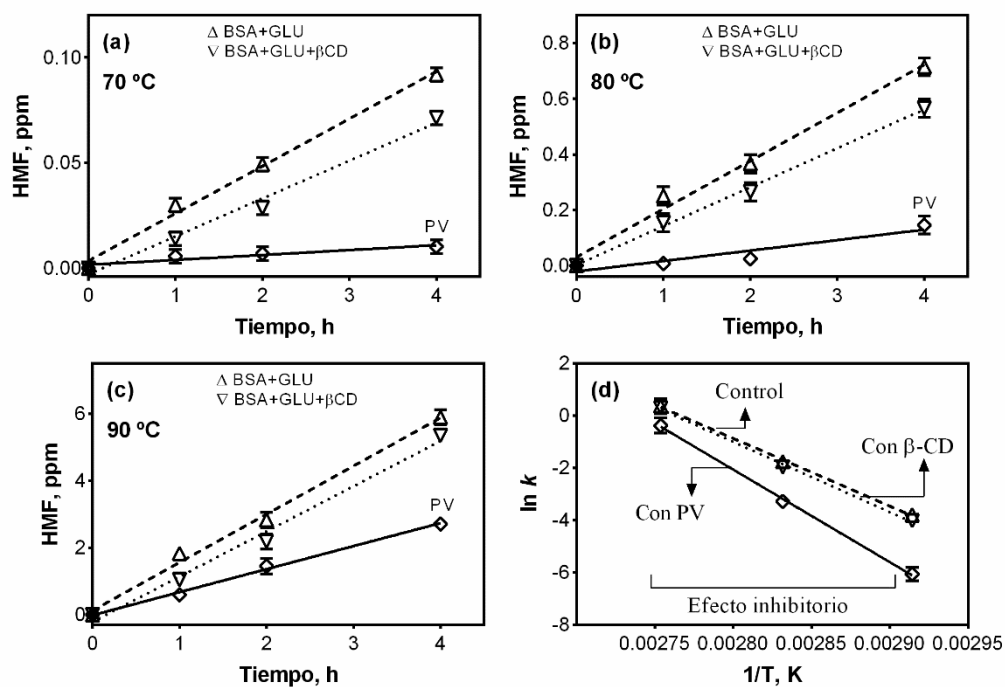


Figura 4.22. Formación de HMF en sistemas modelo BSA+GLU en ausencia y presencia de extracto de pimienta verde (PV) en función del tiempo de reacción (en horas) a 70 (a), 80 (b) y 90 °C (c). En línea rayada, se presenta el sistema control BSA+GLU y en línea punteada el sistema control BSA+GLU+β-CD. (d) Gráficas de Arrhenius correspondientes.

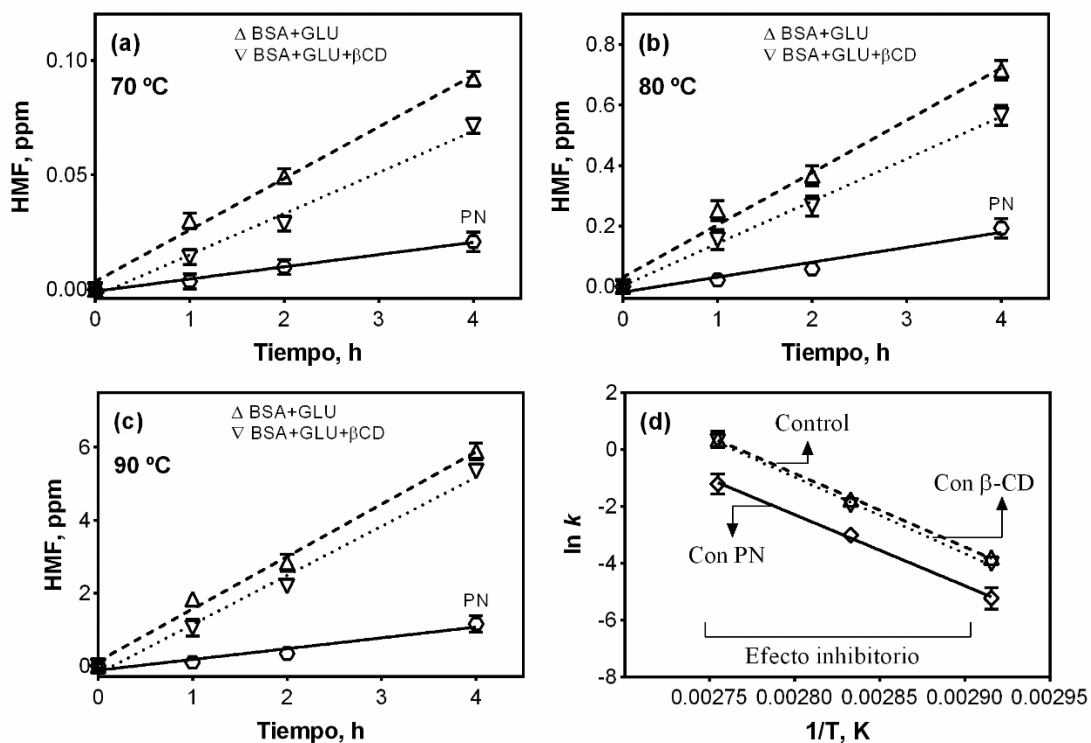


Figura 4.23. Formación de HMF en sistemas modelo BSA+GLU en ausencia y presencia de extracto de pimienta negra (PN) en función del tiempo de reacción (en horas) a 70 (a), 80 (b) y 90 °C (c). En línea rayada, se presenta el sistema control BSA+GLU y en línea punteada el sistema control BSA+GLU+β-CD. (d) Gráficas de Arrhenius correspondientes.

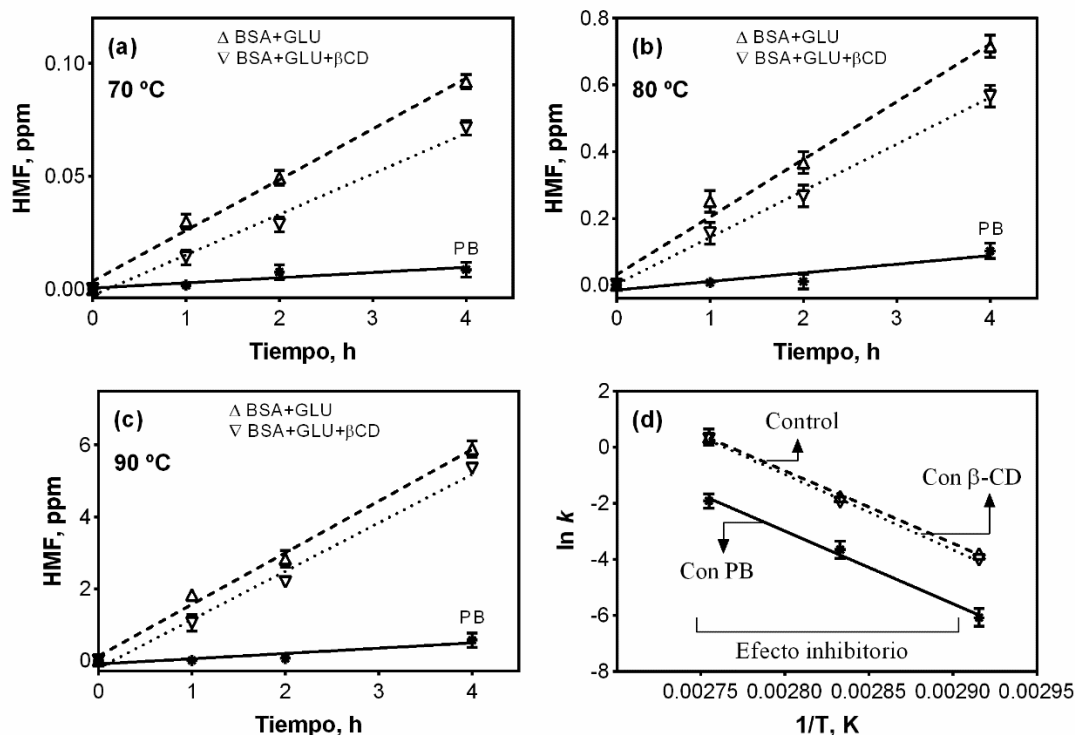


Figura 4.24. Formación de HMF en sistemas modelo BSA+GLU en ausencia y presencia de extracto de pimienta blanca (PB) en función del tiempo de reacción (en horas) a 70 (a), 80 (b) y 90 °C (c). En línea rayada, se presenta el sistema control BSA+GLU y en línea punteada el sistema control BSA+GLU+β-CD. (d) Gráficas de Arrhenius correspondientes.

4.6.3. Cálculos de Arrhenius a partir de las constantes cinéticas de formación de HMF.

En las Figuras 4.20 a 4.24 (d), se representó, la dependencia de la constante de reacción con la temperatura a través de la ecuación de Arrhenius para los sistemas modelo control y con extractos acuosos estudiados. Estos gráficos permiten observar cómo la presencia de los extractos afectó las constantes de velocidad. Se puede observar que To, PJ, PB y PN muestran un efecto inhibitorio en todo el rango de temperaturas estudiado mientras que PV solo es efectivo a la menor temperatura (70 °C). Es probable que en PV el principio activo se degrade o sea más sensible a las temperaturas más altas.

En la **Tabla 4.10** se presentan los valores de las constantes de velocidad (k) de orden 0 para las reacciones de formación de HMF. Además, se muestran las energías de activación calculadas.

La mayor labilidad de PV se manifiesta por una mayor E_a . Por otro lado, la baja E_a del sistema conteniendo el extracto de tomillo lo hace más efectivo a altas temperaturas.

Todos los sistemas siguieron una cinética correspondiente a un orden 0 de reacción, los gráficos de Arrhenius se mostraron para cada sistema en las **Figuras 4.20 a 4.24 (d)**, correspondientes.

Como se indicó en la **sección 4.6.2**, los datos se ajustaron a una cinética de orden 0 hasta las 4 h de reacción, y a tiempos más largos se observó una pendiente menor, sin alcanzar un *plateau*. En la **Figura 4.25** se graficó el contenido de HMF generado a las 4 y 6 h de reacción a 80 °C (**Figura 4.25.a**) y 90 °C (**Figura 4.25.b**), para los sistemas control y en presencia de los extractos estudiados donde se observa el aumento del contenido de HMF a las 6 h de reacción y cómo este se ve favorecido a mayor temperatura (90 °C). Los extractos continuaron presentando efecto inhibitorio en estas condiciones extremas. Sin embargo, como puede verse en la **Figura 4.25.b**, a las 6 h de reacción a 90 °C la presencia de β -CD en el sistema modelo deja de inhibir el desarrollo de HMF, que sí fue observado a tiempos y temperaturas menores.

El tiempo y la temperatura empleados aparentemente provocaron interacciones en el complejo huésped-hospedador formado por β -CD con sus ligandos donde se vería interrumpido el proceso de liberación y/o protección de activos, o captación de intermediarios de la reacción de generación de HMF, mecanismo que fue presentado y discutido con antelación en esta tesis y reportado por otros autores (Gao y *col.*, 2016; Fenyvesi y *col.*, 2016).

Tabla 4.10. Constantes cinéticas (k) y coeficiente de determinación (R^2) obtenidos por ajuste lineal para la producción de HMF a 70, 80 y 90 °C en los sistemas modelo control y en presencia de los extractos estudiados. Se indica también la energía de activación calculada a partir de la ecuación de Arrhenius.

Muestras	Temperatura	Constantes cinéticas (k) (ppm HMF/días)	R^2	Energía de activación (kJ/mol)
Control BSA+GLU	70	0,0225 ± 0,0013 ^a	0,993	215,2 ± 0,1 ^{a*}
	80	0,173 ± 0,014 ^c	0,987	
	90	1,438 ± 0,082 ^e	0,994	
Control BSA+GLU +β-CD	70	0,0180 ± 0,0014 ^b	0,988	223,3 ± 0,2 ^{b*}
	80	0,1400 ± 0,0051 ^d	0,998	
	90	1,348 ± 0,099 ^f	0,989	
Pimienta de Jamaica (PJ)	70	0,00437 ± 0,00041 ^g	0,983	224,4 ± 0,1 ^{c*}
	80	0,0411 ± 0,0039 ⁱ	0,983	
	90	0,333 ± 0,054 ^h	0,950	
Tomillo (To)	70	0,0069 ± 0,0015 ^o	0,916	187,1 ± 0,3 ^{d*}
	80	0,0323 ± 0,0072 ^p	0,910	
	90	0,256 ± 0,032 ^q	0,971	
Pimienta verde (PV)	70	0,00233 ± 0,00061 ^r	0,880	294,2 ± 0,3 ^{e*}
	80	0,0376 ± 0,0097 ^s	0,882	
	90	0,687 ± 0,030 ^t	0,996	
Pimienta negra (PN)	70	0,00534 ± 0,00031 ^u	0,993	208,2 ± 0,2 ^{f*}
	80	0,0494 ± 0,0080 ^v	0,951	
	90	0,297 ± 0,051 ^w	0,944	
Pimienta blanca (PB)	70	0,00230 ± 0,00071 ^x	0,880	215,7 ± 0,2 ^{g*}
	80	0,0259 ± 0,0081 ^y	0,888	
	90	0,1471 ± 0,0451 ^z	0,870	

Letras distintas indican diferencias significativas (p -value <0,05) respecto del control BSA+GLU+β-CD tratados a igual temperatura. * Los valores de E_a de los sistemas presentan diferencias significativas (p -value <0,05) y los valores corresponden al los mostrados en las Figuras 4.20 a 4.24.

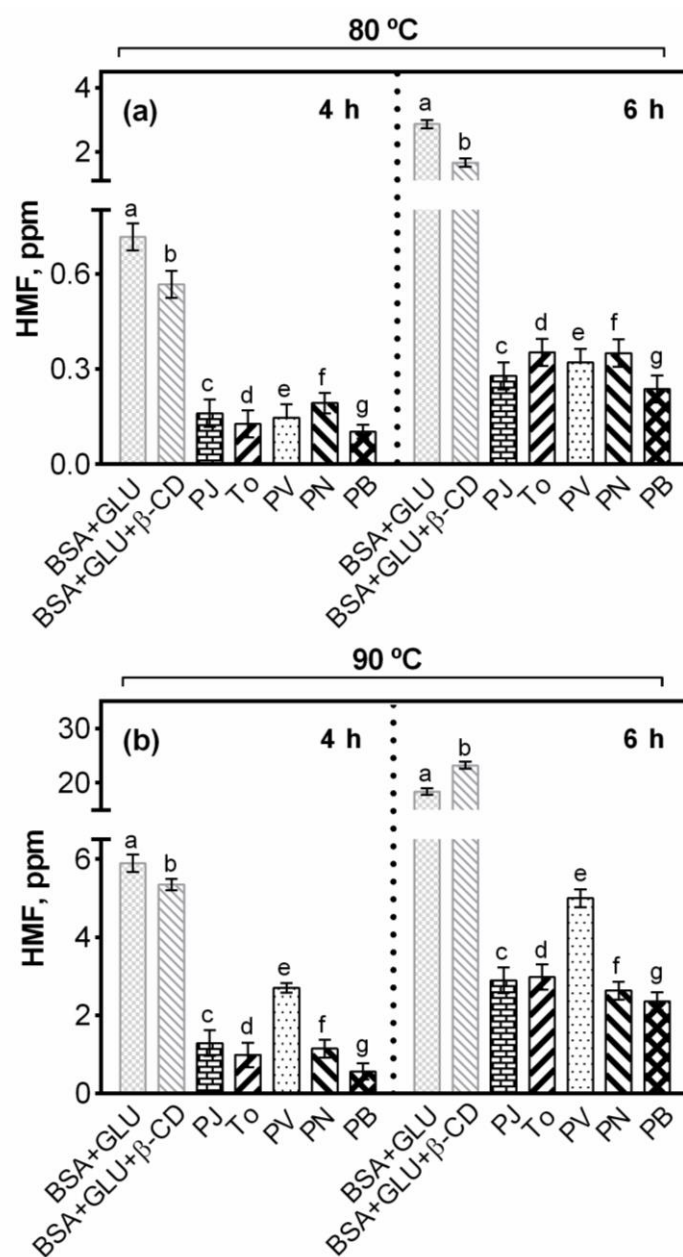


Figura 4.25. Cuantificación de HMF a 4 h (a la izquierda) y 6 h (a la derecha) de reacción a 80 °C en (a) y 90 °C en (b). Las barras grises corresponden a los controles y las barras negras a los sistemas modelo BSA+GLU en presencia de los distintos extractos: pimienta de Jamaica (PJ), tomillo (To), pimientas: verde (PV), negra (PN) y blanca (PB).

4.7. EFECTIVIDAD DEL EXTRACTO ACUOSO DE TOMILLO CON CAPACIDAD ANTIOXIDANTE OPTIMIZADA PARA INHIBIR EL PARDEAMIENTO NO ENZIMÁTICO

El extracto acuoso de tomillo (To) obtenido en presencia de β -ciclodextrina bajo las condiciones optimizadas por el modelo de SMR en base a su capacidad antioxidante, fue evaluado a fin de conocer su potencial capacidad antiglicante.

La generación de productos pardos en los sistemas control (BSA+GLUy BSA+GLU+ β -CD) y aquellos conteniendo 3 % (v/v) extracto acuoso de To se evaluó siguiendo la absorbancia a 420 nm. La absorción UV a 420 nm se usa generalmente para analizar la producción de productos finales de la reacción de Maillard (Yu y *col.*, 2017; Hong y *col.*, 2015; Wang y *col.*, 2013; Rangsansarid y *col.*, 2008). Los cambios en la absorbancia a dicha longitud de onda pueden reflejar la tasa de pardeamiento y se pueden usar para estudiar la cinética de la reacción (Zhu y *col.*, 2018; Yu y *col.*, 2017).

En la **Figura 4.26 (a y b)**, se representan los valores obtenidos a los diferentes tiempos y temperaturas en que se estudió la reacción. Los sistemas control presentados en la **Figura 4.26.a** tuvieron patrones de absorbancia similares en todas las condiciones, lo que indica que, a diferencia de lo observado para HMF, la presencia de β -CD en la solución no tuvo efecto sobre la producción de productos pardos. Por lo tanto, la diferencia en la absorbancia se atribuyó a la presencia de To.

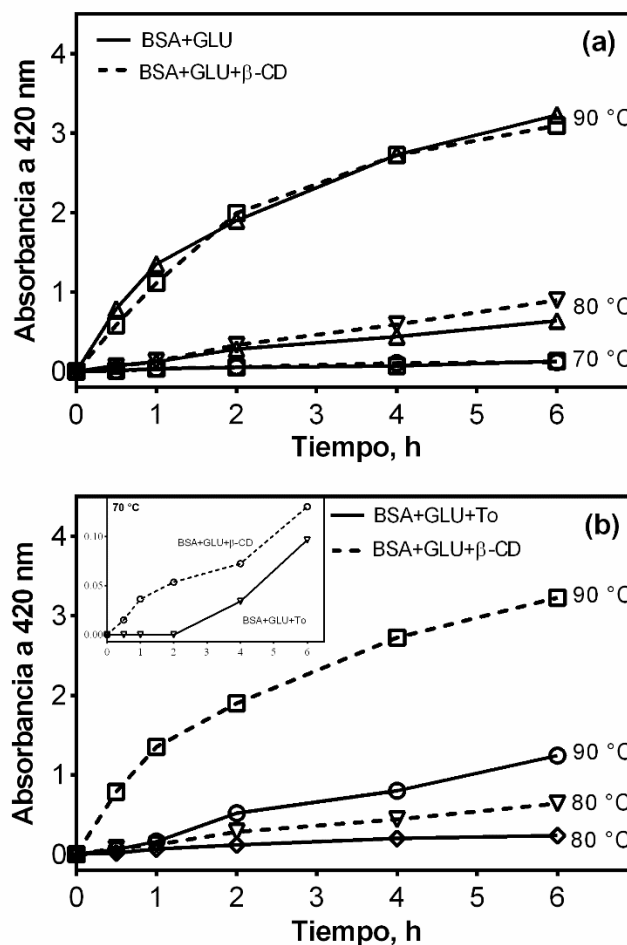


Figura 4.26. Cinética de cambio de color por reacción de Maillard, evaluado por absorbancia a 420 nm en función del tiempo para diferentes temperaturas. **(a)** Sistemas control con y sin β -CD. **(b)** Sistema control con β -CD y sistemas BSA+GLU en presencia de extracto de tomillo. El gráfico inserto muestra la cinética de reacción a 70 °C. Los valores de absorbancia están multiplicados por el factor de dilución.

El aumento de la temperatura y el tiempo de reacción favorecieron la producción de productos pardos tanto en el sistema control como en los sistemas con To, sin embargo en presencia del extracto la producción de productos pardos fue menor que en el control especialmente en los sistemas tratados a 90 °C. Otros autores han informado que los compuestos bioactivos presentes en extractos naturales pueden interactuar con reactivos y productos de la reacción de Maillard cambiando su cinética (Yu y col., 2017; Zhou y col., 2016).

Particularmente el timol, uno de los principales compuestos activos del tomillo, se sabe que ejerce su acción antimicrobiana a través de las proteínas de la membrana mediante enlaces puentes de hidrógeno y uniones hidrofóbicas, cambiando así la permeabilidad de las membranas microbianas (Burt, 2004). Este tipo de interacciones no covalentes entre compuestos bioactivos y proteínas probablemente pueda explicar la inhibición de la producción de productos pardos en presencia de To.

La producción de productos pardos en función del tiempo de reacción se ajustó a una cinética de reacción de orden cero, consistente con datos reportados previamente por otros autores para sistemas similares, pero con diferentes aminoácidos y azúcares (Yu y *col.*, 2017; Rangsansarid y *col.*, 2008; Ajandouz y *col.*, 2001). La dependencia de la constante de reacción con la temperatura se determinó usando la ecuación de Arrhenius como se describió en la **sección 3.9**.

En la **Figura 4.27** se observa la representación de la ecuación de Arrhenius, que guarda una dependencia lineal, con un $R^2 > 0,90$, para los sistemas modelo control (BSA+GLU y BSA+GLU+ β -CD) y para el sistema en presencia de To (GLU+BSA+To).

La E_a calculada a partir de la pendiente de cada ajuste lineal se utilizó para describir la dependencia de la reacción de pardeamiento no enzimático respecto de la temperatura.

El extracto acuoso de tomillo afectó la cinética de generación de productos pardos lo que se manifestó por una disminución de la energía de activación respecto al control, lo que indica una menor dependencia con la temperatura.

Como se observa en la **Figura 4.27**, y como consecuencia del efecto de los extractos de disminuir la E_a , el efecto inhibitorio sobre la producción de productos pardos se evidenció a altas temperaturas. Si bien la química que subyace a la reacción de Maillard

es muy compleja, el enfoque de cinética global con el cálculo de E_a demostró ser una herramienta útil para estudiar el efecto del To sobre la reacción de Maillard. En particular, permite explicar que, paradójicamente, una disminución de la E_a conduce a una inhibición de la reacción a altas temperaturas.

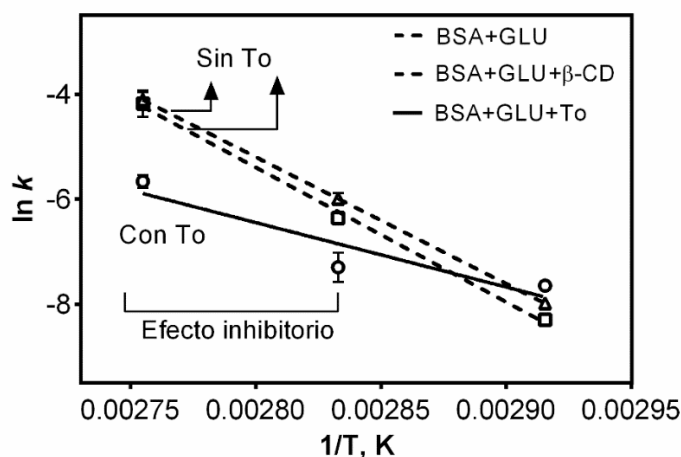


Figura 4.27. Comparación de los ajustes a través de la ecuación de Arrhenius para los sistemas modelo control (BSA+GLU; BSA+GLU+ β -CD) y en presencia del extracto acuoso de tomillo (BSA+GLU+To). Se presenta el $\ln k$ (constante cinética de reacción) en función de la inversa de la temperatura expresada en K.

El ajuste lineal obtenido para los sistemas fue: $Y = -24126 \cdot X + 62,36$ para BSA+GLU; $Y = -25611 \cdot X + 66,32$ para BSA+GLU+ β -CD e $Y = -12268 \cdot X + 27,91$ para BSA+GLU+To, los coeficientes de Pearson se presentan en la **Tabla 4.11**.

La E_a calculada a partir de la pendiente de cada ajuste lineal se utilizó para describir la dependencia de la reacción de pardeamiento no enzimático respecto de la temperatura. Los valores de las constantes cinéticas (k) y de la E_a para la formación de productos pardos a partir de los sistemas BSA+GLU; BSA+GLU+ β -CD y BSA+GLU+To a 70, 80 y 90 °C se presentan en la **Tabla 4.11**.

Tabla 4.11. Valores de las constantes cinéticas (k) para la reacción de Maillard a 70, 80 y 90 °C, la energía de activación (E_a) y los coeficientes de Pearson calculados para los sistemas modelo control (sin extracto) y en presencia de tomillo.

Sistemas	Constantes cinéticas (k) (absorbancia/hora)			Energía de activación (kJ/mol)	Coeficiente de Pearson (R^2)
	Temperatura de reacción (°C)				
	70	80	90		
BSA+GLU	0,0003423	0,002504	0,0165	201 ± 6	0,9901
BSA+GLU+β-CD	0,0002499	0,001746	0,01534	213 ± 7	0,9977
BSA+GLU+To	0,00048	0,00068	0,003488	103 ± 3	0,9010

Los valores de E_a de los sistemas control con y sin β-CD no presentaron diferencias significativas (p -value <0,001), como se discutió previamente en la **Figura 4.26**.

4.8. ANÁLISIS INTEGRAL DE LOS RESULTADOS

Varios autores han destacado la alta concentración de polifenoles y la capacidad de eliminación de radicales libres *in vitro* de los extractos de pimienta en grano. Algunos de los compuestos fenólicos de mayor capacidad antioxidante se pierden durante la preparación de la pimienta negra, por lo que muchos autores sugieren preferentemente el uso de la especia fresca y sus extractos como conservante y potencial agente funcional (Chatterjee y col., 2007). En general, tanto la pimienta blanca como la negra poseen actividad antioxidante, siendo la pimienta negra más eficaz que la pimienta blanca para eliminar radicales libres y ROS (Agbor y col., 2006). Dicha propiedad de la pimienta negra está relacionada con su mayor contenido de polifenoles y la maduración, así como también el procesamiento es un posible factor que provoque la reducción del contenido de polifenoles.

Si bien diferentes partes de la planta de comino, *Syzygium cumini*, tienen un marcado efecto antioxidante y se emplean en Asia y Brasil como agentes hipoglucemiantes,

antifúngicos y bacteriostáticos, dos Santos *y col.* (2018) demostraron que disminuyen la oxidación de LDL *in vitro* pero no exhiben efectos antiglicantes. Por lo tanto, estos resultados están de acuerdo con la baja eficiencia demostrada por los extractos de comino para inhibir la formación de intermediarios de la reacción de Maillard.

Abeyssekera *y col.* (2018) observaron una interesante actividad antiglicante del fenogreco (determinada por inhibición de la formación de compuestos fluorescentes en sistemas con albúmina bovina y glucosa). Según los resultados del presente trabajo, en comparación con las pimientos verde y negra y el tomillo, su capacidad antiglicante (medida por su capacidad de inhibir furosina) tuvo un efecto intermedio entre ellos y la pimienta blanca, y mejor desempeño que el salvado de arroz y el arroz salvaje. De estos últimos, está documentada su alta actividad antioxidante, pero no hay trabajos sobre su capacidad antiglicante. Según los resultados obtenidos, estos materiales no tendrían un efecto antiglicante relevante.

En las **Figuras 4.28** y **4.29** se resumen los resultados obtenidos que muestran el efecto de los extractos de tomillo (To), pimienta de Jamaica (PJ), pimienta verde (PV), pimienta negra (PN) y pimienta blanca (PB), sobre la producción de furosina y de HMF a los 7 días de reacción a 55 °C. Se graficó la producción de intermediarios versus el contenido de polifenoles totales (CPT) y la capacidad antioxidante determinada por ensayo del radical libre DPPH.

En la **Figura 4.28**, las rectas mostradas corresponden al ajuste lineal para CPT: $Y = -0,08262 * X + 798,2$ ($R^2 = 0,6189$) y para DPPH•: $Y = -0,008048 * X + 78,05$ ($R^2 = 0,5970$). Se observa que la producción de furosina fue menor cuanto mayor fue el contenido de polifenoles totales y cuanto mayor fue la actividad antioxidante antirradicalaria.

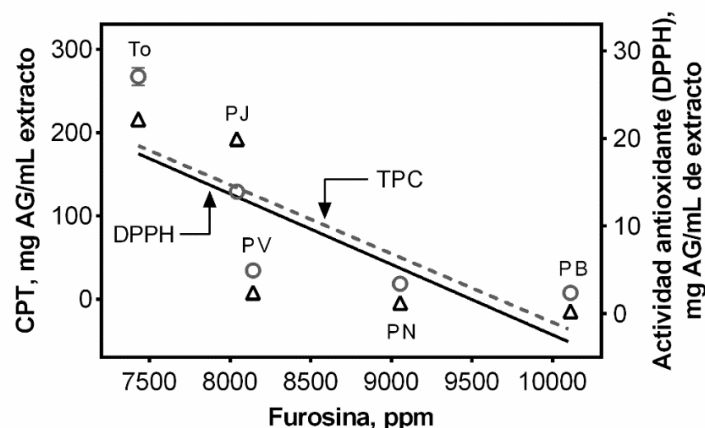


Figura 4.28. Correlación de la producción de furosina a los 7 días de reacción a 55 °C versus contenido de polifenoles totales (CPT) y capacidad antioxidante determinadas por ensayo del radical libre DPPH• en los sistemas modelo BSA+GLU en presencia de los extractos de tomillo (To), pimienta de Jamaica (PJ), pimienta verde (PV), pimienta negra (PN) y pimienta blanca (PB) obtenidos en agua-etanol (1:1).

De la misma manera en la **Figura 4.29** se evidencia el mismo comportamiento para la producción de HMF. Las rectas muestradas en la **Figura 4.29** corresponden al ajuste lineal para CPT: $Y = -960,1 \cdot X + 336,1$ ($R^2 = 0,9616$) y para DPPH: $Y = -91,68 \cdot X + 32,57$ ($R^2 = 0,8913$).

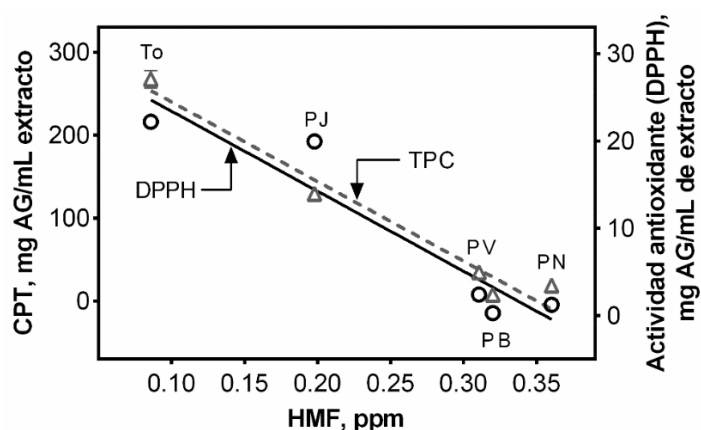


Figura 4.29. Correlación de la producción de HMF a los 7 días de reacción a 55 °C versus contenido de polifenoles totales (CPT) y capacidad antioxidante determinadas por ensayo del radical libre DPPH en los sistemas modelo BSA+GLU en presencia de los extractos acuosos de tomillo (To), pimienta de Jamaica (PJ), pimienta verde (PV), pimienta negra (PN) y pimienta blanca (PB).

Luego de este análisis global de resultados, se puede observar que los extractos que contenían mayor concentración de polifenoles fueron los que presentaron mejor efecto para inhibición la formación de los intermediarios furosina y HMF.

Dado el vínculo mencionado en la introducción (**sección 1.1.3**) entre la glicación y la oxidación, planteamos la hipótesis de que los extractos con capacidad antioxidante podrían poseer actividad antiglicante. Esto hace posible proponer la prevención de la glicosilación de proteínas inhibiendo la generación de radicales libres mediante el empleo de extractos de vegetales antioxidantes.

La **Figura 4.30** muestra el esquema de formación de AGEs. Los inhibidores de glicación y oxidación podrían actuar en cada una de las vías que conducen a su formación. Los marcadores evaluados en esta tesis permitieron confirmar las vías de inhibición donde actuarían los extractos que resultaron activos, indicadas con (E) .

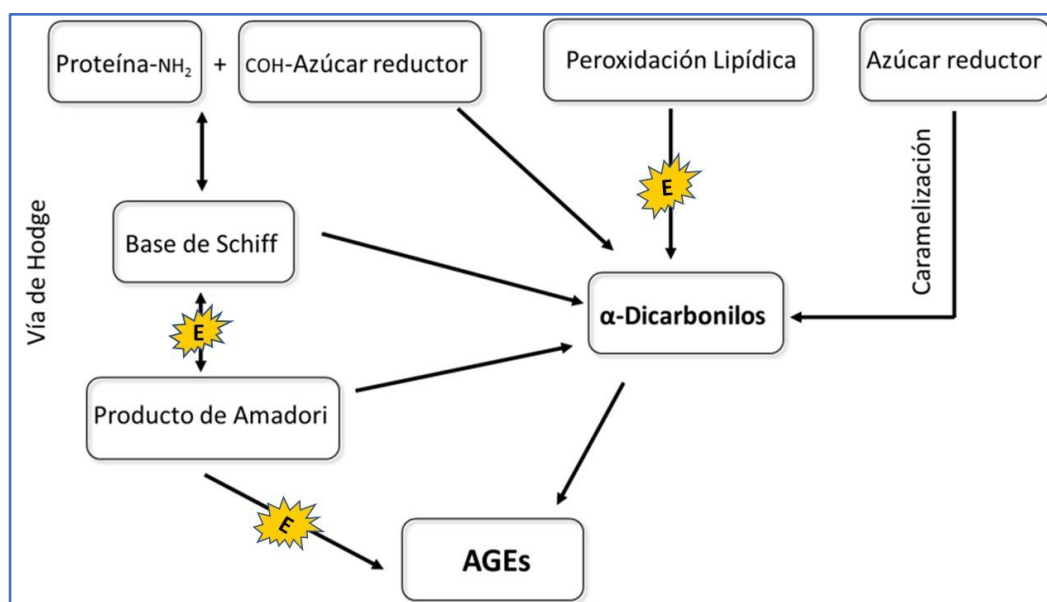


Figura 4.30. Esquema de las distintas vías de formación de AGEs, donde se indican los sitios de acción potenciales de los extractos activos (E).

Sin embargo, no se puede descartar que puedan tener efecto sobre las otras vías. De acuerdo con trabajos recientes (Yeh y col., 2017), no hay una conclusión definitiva con respecto al mecanismo de acción de las capacidades antiglicantes de compuestos polifenólicos. Muchos estudios han encontrado que la combinación de dos o más de ellos exhiben mejores funciones antiglicantes que uno solo. Por otro lado, las aplicaciones farmacológicas aún requieren más estudios para probar si los resultados experimentales *in vitro* realmente reflejan la situación *in vivo*. Además, hay que tener en cuenta que los polifenoles tienden a tener bajos índices de utilización biológicos e interacciones con múltiples componentes de la dieta.

4.9. PERFIL DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN LOS EXTRACTOS LIOFILIZADOS

Además de los compuestos responsables de la capacidad antioxidante y antiglicante que se extrajeron en los medios hidroalcohólicos o acuosos empleados, se detectó una amplia variedad de volátiles en el espacio cabeza de los liofilizados resuspendidos (ver **sección 3.11**), a través de SPME acoplado a GC/MS. En la **Tabla 4.12** se listan los compuestos identificados en los distintos extractos. Es interesante destacar la gran cantidad de componentes de la fracción volátil. Están constituidos principalmente por alcoholes, terpenoides y también compuestos fenólicos. Algunos de ellos, como el α y β -pineno, 3-careno, 4-tujanol, o-cimeno, β -bisaboleno y β -cariofileno y γ -terpineno están presentes en todos los extractos, aunque muchos en proporciones muy bajas. Cabe destacar que, a pesar de la baja solubilidad en agua de algunos de estos componentes, su carácter anfifílico (como se discutió en la **sección 1.4**), sumado al hecho de haber realizado la extracción con β -CD favorecieron que se hayan podido retener en los extractos.

Tabla 4.12. Perfil de compuestos volátiles en los extractos acuosos liofilizados de las pimientas (verde, negra, blanca, de Jamaica) y del tomillo determinados por GC-MS-SPME.

Nº	Compuestos	Extracto acuoso liofilizado				
		PV	PN	PB	PJ	To
1	(+)-Epi- β -santaleno (caroteno, terpeno)	X		X		
2	α -Copaeno (sesquiterpeno)	X	X			
3	(E)- β -Farneseno (sesquiterpeno)	X				
4	α -Felandreno (monoterpeno cíclico)	X	X	X	X	
5	α -Pinoeno (monoterpenoide bicíclico)	X	X	X	X	X
6	α -Terpineno (terpeno)	X	X			X
7	1-Pentanol (alcohol)					X
8	2-Propanamina, 2-metil- (amina primaria)	X	X			X
9	3-Careno (monoterpeno bicíclico)	X	X	X	X	X
10	3-Pentenol (alcohol insaturado)	X	X	X		
11	4-Terpineol (alcohol monoterpénico)	X	X	X		X
12	4-Tujanol (sabineno hidrato, monoterpeno)	X	X	X	X	X
13	8-Hidroxi-p-cimeno (alcohol aromático)	X				
14	Benzaldehído (aldehído aromático)				X	
15	Borneol (alcohol terpénico)	X				
16	Camfeno (monoterpeno bicíclico)	X				
17	Carvacrol (fenol monoterpenoide)	X		X	X	
18	Cis-2-Pinenol (verbenol, alcohol monoterpénico bicíclico)					X
19	Cis-2-p-Menten-1-ol (alcohol cíclico insaturado)		X			
20	Cis-Anetol (éter insaturado aromático)				X	
21	Cis-Carveol (alcohol monoterpenoide)			X		X
22	Cis-Geraniol (alcohol monoterpenoide)					X
23	Cis-Metilisoeugenol (fenilpropeno, guayacol sustituido)		X		X	
24	Cis-Pinen-3-ol (alcohol monoterpénico)		X			
25	Cis-Pinocarveol (alcohol terpénico)			X		
26	Cis-p-Ment-2-en-1-ol (alcohol terpénico)	X				
27	Cis-p-Ment-2-en-1-ol (alcohol terpénico)		X			
28	Cis-Verbenol (alcohol monoterpénico)		X		X	X
29	Cis- α -Bergamoteno (furanocumarina)	X	X		X	X
30	Cis- α -Bergamoteno (furanocumarina)	X	X			
31	Cis- α -Bisaboleno (sesquiterpeno)	X				
32	Cis- β -Terpineol (alcohol monoterpénico)	X				
33	Cubebol (sesquiterpeno con grupo alcohol)	X	X			X

Nº	Compuestos	Extracto acuoso liofilizado				
		PV	PN	PB	PJ	To
34	D-Limoneno (terpeno con grupo alcohol)	X	X	X	X	
35	Estragol (éter aromático, isómero de anetol)				X	X
36	Eucaliptol (cineol, óxido)			X	X	
37	Eucarvona (monoterpeno con grupo carbonilo)	X		X		
38	Eugenol (2 metoxi 4-fenol)	X			X	X
39	Eugenolmetiléter (fenilpropeno)		X	X		X
40	Heptanal (aldehído)				X	
41	Hexanal (aldehído)				X	
42	L-Camfor (terpenoide con grupo aldehído)	X		X		
43	Limonaketone (terpenoide con grupo cetona)	X				
44	Ment-2-en-1-ol (trans-p) (alcohol terpénico)				X	X
45	Ment-2-en-1-ol- trans-para (alcohol terpénico)	X				
46	Metileugenol (fenil propeno, éter metílico del eugenol)	X			X	
47	n-Hexanol (alcohol)					X
48	Nonanal (aldehído)				X	
49	n-Pentanol (alcohol)	X	X		X	X
50	o-Cimeno (alquilbenceno)	X	X	X	X	X
51	p-Cimeno (alquilbenceno)			X		
52	Fenol, 2,4-bis(1,1-dimetiletil)-5-metil-	X	X	X		
53	Fenol, 2-metoxi-4-(1-propenil)-				X	
54	Fenol, 2-metoxi-4-(2-propenil)-		X			
55	Fenol, 2-metoxi-6-propenil-	X				
56	Fenol, 3-metil-5-(1-metiletil)-, metilcarbamato-	X				
57	Fenol, 3-fenoxi-	X	X		X	X
58	Fenol, 4-(2-propenil)-				X	
59	Fenol, m-fenoxi	X	X			
60	Piperitona (cetona monoterpénica)	X	X	X		
61	p-Ment-1,8-dieno (limoneno, terpenoide)				X	
62	p-Ment-2,8-dien-1-ol, cis (terpenoide)		X			
63	Sabineno (monoterpeno, isómero de α y β tujeno)	X			X	X
64	Timol (terpeno fenólico)					X
65	Timolmetileter (terpeno fenólico)	X				
66	Trans, trans-farnesol (alcohol sesquiterpénico acíclico)	X				
67	Trans-Piperitol (alcohol cíclico)	X	X			
68	Trans-Verbenol (alcohol monoterpénico)			X		X

Nº	Compuestos	Extracto acuoso liofilizado				
		PV	PN	PB	PJ	To
69	Trans- α -Bisaboleno (sesquiterpeno)	X				
70	Trans- γ -Bisaboleno (sesquiterpeno)	X				
71	Zingibereno (sesquiterpeno)			X	X	X
72	α -Amorfenoleno (sesquiterpeno bicíclico)	X				
73	α -Cariofileno (sesquiterpeno bicíclico)	X				
74	α -Cariofileno (sesquiterpeno bicíclico)	X		X		
75	α -Curcumeno (sesquiterpeno)	X	X			
76	α -Guaieno (sesquiterpeno)	X				
77	α -Gurjuneno (sesquiterpeno)	X	X			
78	α -Metilbutanal (aldehído)				X	
79	α -Muuroleno (sesquiterpeno)		X			X
80	α -Felandreno-8-ol (terpeno)	X		X		
81	α -Pinocarvona (monoterpenoide bicíclico)	X	X	X		X
82	α -Pinocarvona (monoterpenoide bicíclico)		X			
83	α -Terpineol (alcohol monoterpénico)	X			X	X
84	α -Terpinoleno (terpeno)	X				
85	α -Tujeno (monoterpeno)	X			X	X
86	β -Bisaboleno (sesquiterpeno)	X	X	X	X	X
87	β -Cariofileno (sesquiterpeno bicíclico)	X	X	X	X	X
88	β -Cis-Ocimene (monoterpeno)	X				
89	β -Copaeno (sesquiterpeno tricíclico)		X			X
90	β -Cimeno (alquilbenceno, monoterpeno)			X		
91	β -Elemeno (sesquiterpeno)		X			X
92	β -Eudesmeno (o selineno, sesquiterpeno)	X				
93	β -Linalool (alcohol terpénico)		X	X	X	X
94	β -Metilbutanal (aldehído)				X	
95	β -Ocimeno (monoterpeno)				X	
96	β -Pineno (terpeno, alqueno)			X	X	X
97	β -Terpineno (terpeno)			X		X
98	β -Tujeno (monoterpeno)	X	X			X
99	γ -Amorfenoleno (sesquiterpeno)	X				
100	γ -Muuroleno (sesquiterpeno)	X	X			X
101	γ -Terpineno (terpeno)	X	X	X	X	X
102	δ -Cedrol (alcohol sesquiterpénico)		X			X
103	δ -Elemeno (sesquiterpeno)	X	X			X

En la **Tabla 4.13** se listan los componentes mayoritarios de cada sistema, considerando solo aquellos que, expresados en % de la fracción volátil, superan el 1 %, de manera de distinguir los principales componentes de cada extracto. Se destacan en negrita los principales compuestos: limoneno en pimienta verde, cariofileno en pimientos negra, blanca y tomillo, y metil-eugenol en pimienta de Jamaica, que son los esperables según los datos de bibliografía indicados en la **Tabla 1.1** (en **sección 1.4**).

Tabla 4.13. Principales componentes de la fracción volátil de los extractos estudiados, expresados como % del área total de volátiles del espacio cabeza (determinado por CG-MS).

Compuestos	Extracto				
	PV	PN	PB	PJ	To
Limoneno	22	-	8	-	-
β -cariofileno	15	49	21	5	45
3-careno	11	0,5	15	0,7	0,5
+Sabineno	9	3	0,5	0,6	6
4-terpineol	4	5	3	2	6
α -copaeno	0,5	4	0,2	0,2	1
δ 3-carene	11	0,5	15	0,7	0,5
β -linalool	3	1	4	1	1
Metil-eugenol	0,5	1	1	47	1
Eugenol	-	-	-	15	0,2
β -Pino	-	-	2	7	1
Eucaliptol	-	-	1	6	-
D-silvestreno	-	6	-	3	7
Timol	-	-	-	-	2

Todos los componentes mostrados en la **Tabla 4.13** son terpenos de uso cosmético o farmacéutico, tienen impacto en el flavor y la mayoría tiene propiedades antiinflamatorias, además de antioxidantes. Muchos son descongestivos de vías respiratorias (terpineol, β -pineno) o de la piel (sabineno) o bien son asiolíticos (β -linalool), antisépticos (eugenol, cariofileno) o antifúngicos (metil-eugenol). De ellos el timol y el eugenol tienen grupos fenólicos. Por lo tanto, en paralelo a las actividades antioxidante y antiglicantes estudiadas podrían tener efectos complementarios aportando algunas de sus propiedades funcionales beneficiosas.

De hecho, se ha demostrado que el tratamiento con pimienta negra inhibe o bloquea radicales libres y las especies reactivas del oxígeno, influye positivamente en la acción de moléculas y enzimas antioxidantes *in vitro*, y reduce la peroxidación lipídica *in vivo* (Srinivasan, 2007). Parte de estos efectos se atribuyeron a algunos componentes insolubles en agua.

4.10. ESTABILIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS CON CAPACIDAD ANTIGLICANTE Y ANTIOXIDANTE

4.10.1. Temperaturas de transición vítrea (T_g)

Las muestras de tomillo y pimienta verde obtenidas en soluciones acuosas de β -CD y liofilizadas empleando trehalosa como excipiente y equilibradas a las diferentes humedades relativas presentaron transiciones vítreas. Los valores de T_g obtenidos se muestran en la **Tabla 4.14**. Tal como se esperaba, disminuyeron al aumentar la humedad relativa, reflejando el efecto plastificante del agua, y en consecuencia el aumento de movilidad de los componentes amorfos (Fitzpatrick y *col.*, 2007).

Tabla 4.14. Temperaturas de transición vítrea determinadas para los extractos estudiados, liofilizados en presencia de trehalosa y almacenados a diferentes humedades relativas (HR) a 25 °C.

Extracto acuoso	Humedad relativa, % HR	T_g^* (°C)	ΔC_p (J/g·K)	% Cristalinidad
Tomillo	11	40	0,967	0
	22	25	0,858	0
	33	13	0,619	0
	44	-3	0,380	42
	54	-31	0,219	47
	75	-58	0,270	51
Pimienta verde	11	43	0,712	0
	22	22	0,518	0
	33	20	0,505	0
	44	4	0,360	68
	54	-34	0,271	65
	75	-59	0,107	63

T_g , Transición vítrea; ΔC_p , Capacidad calorífica. * Todos los valores de temperatura tienen un intervalo de confianza de ± 1 °C.

Mazzobre y *col.*, (1997) reportaron que la trehalosa como matriz de encapsulación presentó efecto protector de materiales con actividad biológica cuando se almacenó por debajo de 43 % de HR, a 25 °C, condición en la cual la trehalosa se encuentra en estado vítreo. Bajo estas condiciones exhibió óptima capacidad de protección de moléculas funcionales. A valores de HR superiores a 43 %, consistente con el estado de líquido sobreenfriado, se inicia el proceso de cristalización, exhibiendo cambios microestructurales irreversibles (Buera y *col.*, 2005; Mazzobre y *col.*, 2001; Mazzobre y Buera, 1999).

4.10.2. Condiciones críticas de estabilidad

Las condiciones críticas (contenido de agua crítico y actividad de agua crítica correspondiente) para evaluar la estabilidad de los polvos liofilizados se han determinado combinando los datos de la temperatura de transición vítrea en función del contenido de agua con la isoterma de adsorción de agua. Bajo dichas condiciones la temperatura de transición vítrea debe coincidir con la temperatura de almacenamiento (Porrás-Saavedra y *col.*, 2019; Descamps y *col.*, 2013; Haque y Roos, 2004a, 2004b; Jouppila y *col.*, 1997).

Para establecer los valores críticos de conservación de los extractos liofilizados de tomillo y pimienta verde, se representaron las isotermas de adsorción a 25 ° C en el mismo gráfico que las temperaturas de transición vítrea (**Figura 4.31**).

La isoterma obtenida para trehalosa amorfa (**Figura 4.31**), muestra que la adsorción de agua aumentó con la humedad relativa, observándose a partir de 43 % de HR, un *Plateau* que se corresponde con la cristalización del azúcar. La isoterma obtenida para trehalosa pura está de acuerdo con datos publicados por otros autores (Roe y Labuza, 2005; Iglesias y *col.*, 1997).

Los sistemas con tomillo y pimienta verde presentaron igual comportamiento que el sistema de trehalosa pura hasta 33 % de HR, y a HR superiores retuvieron mayor cantidad de agua para cualquiera de las humedades relativas estudiadas, siendo aún mayor el contenido acuoso en el sistema con tomillo (**Figura 4.31**). Según se informó en la **Tabla 4.14**, la cristalización de trehalosa no fue completa en esos sistemas y el agua adsorbida se debe a las regiones amorfas. Probablemente interacciones de los componentes aportados por estos vegetales con el agua o con las moléculas del azúcar retrasaron la cristalización, modificando el contenido acuoso final del sistema con respecto al sistema puro (Harnkarnsujarit y Charoenrein, 2011; Buera y *col.*, 2005).

Si se define la temperatura de almacenamiento a 25 °C el valor de a_w crítico para los sistemas estudiados se puede obtener trazando una línea horizontal correspondiente a dicha temperatura seleccionada hasta la curva de T_g y luego obteniendo los datos de a_w y contenido de agua para este valor de T_g . Según se observa en la **Figura 4.31**, la a_w fue cercana a 0,22, y el contenido crítico de agua fue de 7 % (b. s.) para ambos sistemas.

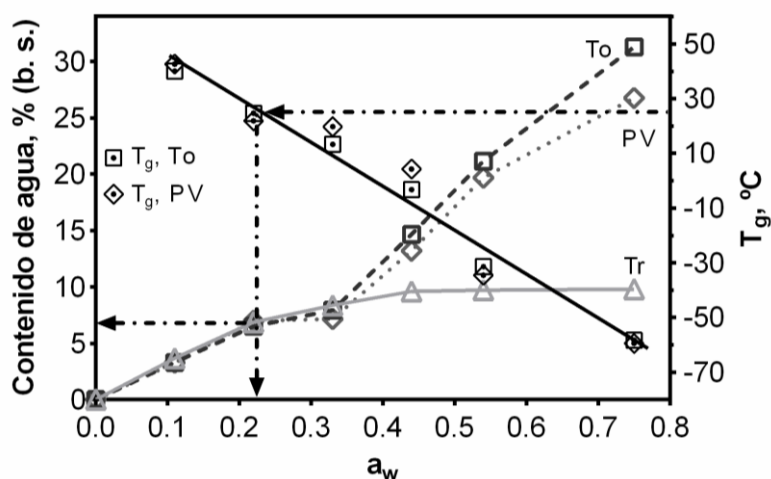


Figura 4.31. Isotermas de adsorción de agua a 25 °C y temperaturas de transición vítrea para la matriz de trehalosa pura (**Tr**), y los extractos de tomillo (**To**) y de pimienta verde (**PV**) liofilizados en trehalosa. Las condiciones críticas para el almacenamiento a 25 °C se obtuvieron como se indica en la figura mediante líneas de puntos y rayas. Los intervalos de confianza del 95 % son menores que el tamaño de los símbolos.

4.10.3. Estabilidad de los polvos liofilizados en relación al fenómeno de la transición vítrea

Varios autores han demostrado que existen relaciones entre los cambios en las propiedades físicas de los materiales como colapso estructural, pegajosidad y cambios de color (Acevedo y col., 2006; Haque y col., 2006; Patterson y col., 2005; Roos y Karel, 1992) y su funcionalidad química (Agudelo-Laverde y col. 2013; Pék y col., 2010; Badii y col., 2005; Kim y col., 2003).

Con el fin de conocer y correlacionar los cambios físicos con la estabilidad de los extractos de tomillo y pimienta verde liofilizados, en la **Figura 4.32, a y b**, respectivamente, se graficó la capacidad antioxidante (evaluada por la capacidad antirradical libre DPPH•), luego de su almacenamiento por 15 días a diferentes a_w (en el rango de 0,11 a 0,75) en función de $T-T_g$, donde T es la temperatura de almacenamiento, 25 °C. Esta variable ($T-T_g$) incluye tanto el efecto de la temperatura como del contenido de agua, que se refleja en el valor de T_g (Badii y col., 2005), y se relaciona con la movilidad molecular. Durante dicho almacenamiento se observaron cambios en la coloración de los extractos liofilizados, que se registraron también en la **Figura 4.33** a través de la variable $L_0^*-L^*$ (el aumento de este valor indica oscurecimiento del material).

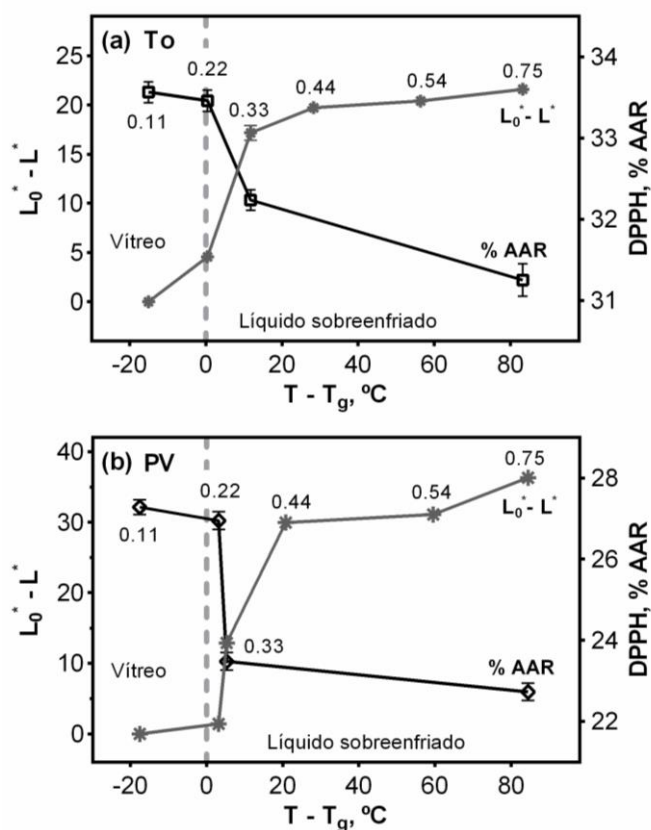


Figura 4.32. Cambios de la luminosidad ($L_0^*-L^*$) y la actividad antioxidante evaluados como porcentaje de actividad antirradical DPPH•, en los extractos liofilizados de: **(a)** tomillo (To) y **(b)** pimienta verde (PV), almacenados durante 15 días a diferentes valores de a_w (indicados en cada punto), en función de $T-T_g$. Los intervalos de confianza del 95 % se encuentran debajo del tamaño de los símbolos.

Hasta alcanzar las condiciones críticas para 25 °C (a_w 0,22 y contenido de agua 7 % b.s.), correspondientes a sistemas amorfos, tanto la capacidad antioxidante de los extractos liofilizados de To y PV como los valores de $(L_o^* - L^*)$ se mantuvieron en su valor original. Cuando se sobrepasaron dichas condiciones críticas, se apreciaron cambios físicos importantes (colapso estructural) y oscurecimiento del material, como se observa en la **Figura 4.33 y 4.34**, acompañados por la disminución de las propiedades funcionales antioxidantes medidas por AAR.

En la zona de a_w de 0,33 a 0,44 se observaron fuertes cambios en la luminosidad del material aumentando el oscurecimiento del mismo hasta a_w de 0,44 y permaneciendo constante hasta a_w de 0,75 (**Figuras 4.33 y 4.34**).

En las **Figuras 4.32 a y b** se puede observar que luego del cambio drástico cercano a las condiciones críticas, a valores de $a_w > 0,43$ no se observaron cambios notables de capacidad antioxidante o luminosidad. Es importante resaltar que a $a_w \geq 0,43$ ocurre la cristalización del dihidrato de trehalosa, que requiere 10 % de contenido acuoso. Como muestra la **Tabla 4.13**, el % de cristalinidad fue elevado a partir a_w 0,43, con poca variación a valores mayores de a_w . La cristalización acentúa los efectos físicos negativos que se manifiestan a partir de la transición vítrea. De esta manera, ambos fenómenos, el de la transición vítrea y el de cristalización modulan la estabilidad de los liofilizados.

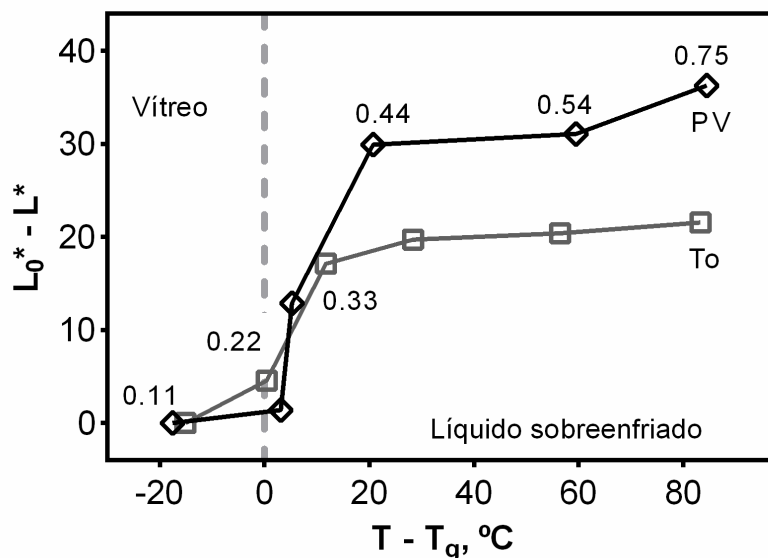


Figura 4.33. Cambio de luminosidad ($L_0^* - L^*$) de los extractos de tomillo (To) y de pimienta verde (PV) liofilizados almacenados durante 15 días a diferentes valores de a_w (indicados en cada punto), en función de $T - T_g$. Los intervalos de confianza del 95 % se han trazado y se encuentran debajo de los símbolos.

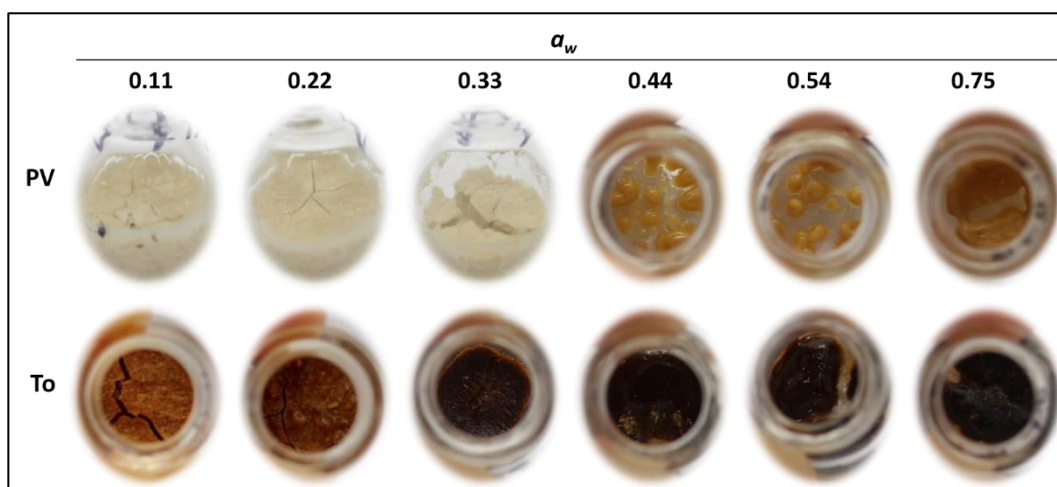


Figura 4.34. Imágenes de los extractos liofilizados de pimienta verde (PV) y tomillo (To) almacenados 15 días a 25 °C en actividades de agua (a_w) entre 0,11 y 0,75, obtenidas según la sección 3.7.5, sobre las cuales se realizó el análisis de las variables de color.

Dados los cambios observados en una de las funciones de color (**Figuras 4.32 a y b**), se realizó un análisis más profundo de los cambios cromáticos. Las **Figuras 4.35, a y b**, muestran el cambio de las coordenadas cromáticas a^* y b^* y el cromatismo C^* . Estas variables

presentaron el mismo comportamiento que el observado para el cambio en capacidad antioxidante y luminosidad analizados en la **Figura 4.32, a y b**, indicando que se encuentran gobernados por las mismas condiciones críticas, tal como observaron otros autores para varios sistemas y propiedades físicas y químicas (Silalai y *col.*, 2016).

En la **Figura 4.35, a y b**, se observa que en ambos extractos, PV y To, las variables cromáticas no cambiaron hasta a_w 0,22 y por encima de este valor sufrieron cambios importantes. Para el extracto de tomillo ocurrió una disminución de las coordenadas cromáticas analizadas (a^* , y b^*) y el croma, C^* . Esto puede explicarse dado que el color final de los extractos fue sumamente oscuro, y habían perdido cromaticidad.

En el extracto de pimienta verde, en cambio, tanto las coordenadas a^* y b^* como el croma aumentaron. En este caso, la coloración inicial fue más tenue que en el To, y a partir de a_w 0,22 la variable a^* aumentó indicando un cambio hacia tonalidades rojas. La variable b^* aumentó reflejando tonos amarillos más intensos. La variable C^* presentó la misma tendencia que las coordenadas a^* y b^* , ya que representa el cambio cromático global (Dawson y Acton, 2018; Belović y *col.*, 2014).

El análisis de las funciones de color (L^* , a^* , b^* y C^*) indicó que la reflectancia se puede considerar una herramienta útil para analizar la estabilidad de los sistemas liofilizados representando una forma práctica y no destructiva.

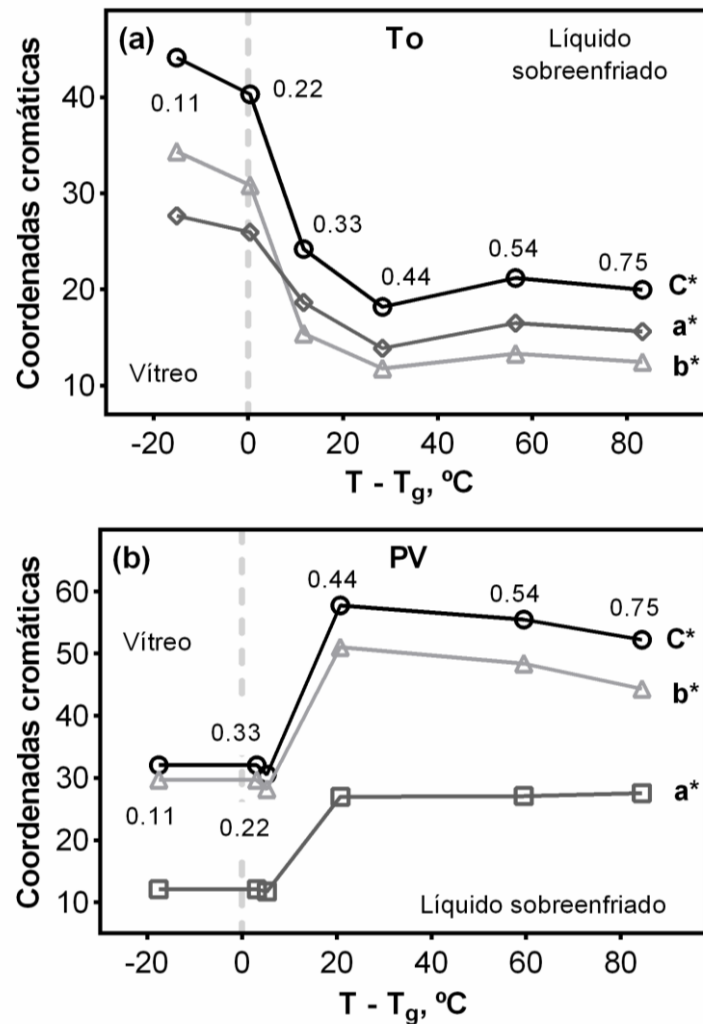


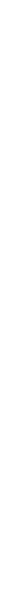
Figura 4.35. Cambios de coordenadas cromáticas a^* , b^* y el cromá (C^*), (a) de los extractos de tomillo (To) y (b) de pimienta verde (PV), almacenados durante 15 días a diferentes valores de a_w (indicados en cada punto), en función de $T - T_g$. Los intervalos de confianza del 95 % se han trazado y se encuentran debajo de los símbolos.

Por debajo de $T - T_g$, estado vítreo, los cambios se ven retrasados por la baja movilidad molecular presentada por el material, pero a valores de $T - T_g$ positivos los cambios se ven acelerados debido a la mayor movilidad del sistema. En los casos analizados, el inicio del oscurecimiento coincidió con el cambio de estado a líquido sobreenfriado, estado en el cual la movilidad molecular es mayor (Porrás-Saavedra y *col.*, 2019). Esto nos indica que los cambios en los sistemas se producen a diferentes velocidades según el estado en que

se encuentre el material, como han reportado otros autores (Li y *col.*, 2018; Rahman, 2006; Shamblin y Zografi, 1998; Karel y *col.*, 1994; Slade y Levine, 1991;).

Los fenómenos de cambios de color observados (**Figura 4.34**) probablemente se debieron a la agregación y colapso estructural del material con la incorporación de agua en su estructura que ocurre cuando éstos se encuentran almacenados en la zona de a_w crítica y próximo a la zona de transición de estado vítreo a líquido sobreenfriado (donde la humedad relativa es aproximadamente del 7 %). A la condición en la cual comienza la cristalización de trehalosa (utilizada como matriz de soporte) los compuestos con actividad funcional quedan expuestos y sufren deterioro (Porrás-Saavedra y *col.*, 2019; Agudelo-Laverde y *col.*, 2013; Pankaj y *col.*, 2013; Patras y *col.* 2011; Roos y Karel, 1991).

CONCLUSIONES



5. CONCLUSIONES

En los últimos años se observó una creciente búsqueda de productos naturales con capacidad antioxidante y antiglicante de potencial aplicación en la industria de los alimentos, la farmacéutica, los nutraceuticos y la cosmética, que puedan reemplazar el uso de productos sintéticos de amplio uso en la actualidad. En este trabajo de tesis se abordó la demanda de bioactivos con capacidad antioxidante y antiglicante desde la perspectiva de una química limpia y libre de solventes orgánicos combinada con nuevas tecnologías *-eco-friendly and green solvent-* para la optimización de la extracción de biomoléculas con las funcionalidades deseadas.

- ✚ El contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos empleando soluciones de agua-etanol fue mayor que cuando se empleó agua o soluciones acuosas de β -CD como solventes.

- ✚ La cantidad de compuestos bioactivos de tomillo y de pimienta verde extraídos utilizando soluciones acuosas de β -CD optimizadas fue mayor que la cantidad obtenida usando agua como disolvente de extracción. Además, la β -CD mejoró la solubilidad y estabilidad de los compuestos naturales de interés. Estos resultados son importantes para el desarrollo de tecnologías emergentes de extracción *verde* que utilizan la técnica asistida por ultrasonido asociada a solventes ecológicos

- ✚ La extracción de compuestos bioactivos de tomillo y pimienta verde basada en soluciones acuosas de β -CD y asistida por ultrasonido fue optimizada utilizando la metodología de superficie de multirrespuesta (SMR). El modelo polinómico

cuadrático fue ajustado adecuadamente debido al bajo valor de error absoluto obtenido al comparar los valores predichos con los valores observados.

- ✚ Las condiciones óptimas para la extracción de compuestos funcionales de tomillo se alcanzaron cuando se utilizó una concentración de β -CD 15 mM, 5,9 minutos de tratamiento con ultrasonido y una temperatura de extracción de 36,6 °C. En estas condiciones de extracción se obtienen extractos acuosos con 189,3 mg AG/mL de polifenoles totales, 14,8 mg AG/mL de capacidad antioxidante evaluada por radical libre DPPH• y 3,3 mg AG/mL de poder reductor de hierro, FRAP.

- ✚ Las condiciones óptimas para la extracción de compuestos funcionales de pimienta verde se alcanzaron cuando se utilizó una concentración de β -CD 15 mM, 5 minutos de sonicado y una temperatura de extracción de 41 °C. En estas condiciones de extracción se obtienen extractos acuosos con 24,9 mg AG/mL de polifenoles totales, 3,1 mg AG/mL de capacidad antioxidante evaluada por radical libre DPPH• y 0,5 mg AG/mL de poder reductor de hierro, FRAP.

- ✚ La cuantificación de furosina, como marcador temprano de la glicación de las proteínas, sobre el sistema modelo BSA-glucosa a 55 °C en presencia de los múltiples extractos hidroalcohólicos analizados, de especias, hierbas e ingredientes analizados, mostró que la actividad antiglicante resultante fue en el siguiente orden: pimienta de Jamaica > tomillo > pimienta verde > pimienta negra > fenogreco \geq arroz salvaje > pimienta blanca \geq salvado de avena, mientras que no presentaron actividad significativa los extractos de comino y pimienta rosa.

- ✚ La actividad antiglicante del extracto hidroalcohólico de tomillo evaluado por cuantificación del marcador temprano furosina se confirmó a través de la inhibición de la glicación de proteínas en etapas avanzadas mediante la tinción específica para glicoproteínas con ácido periódico Schiff (PAS) sobre geles de poliacrilamida.
- ✚ La presencia de β -CD afectó la reacción de Maillard, siendo HMF un marcador adecuado para su seguimiento en etapas intermedias. El efecto de la β -CD no se detectó al evaluar etapas avanzadas a través de la absorbancia a 420 nm.
- ✚ Los extractos de tomillo y pimientos verde, negra, blanca y de Jamaica en soluciones de β -CD modificaron la cinética de la formación de HMF, sin afectar su dependencia con la temperatura. De manera que pudieron ejercer el efecto inhibitor en todo el rango de temperaturas estudiado.
- ✚ Los extractos acuosos de tomillo con capacidad antioxidante, en cambio, produjeron, en etapas avanzadas de la reacción un aumento de la dependencia de la cinética de generación de productos pardos con la temperatura. Las energías de activación relativas de los sistemas con y sin extracto permitieron una fuerte inhibición de la reacción de Maillard a altas temperaturas (90 °C). Estos resultados permiten proponer la aplicación de extractos acuosos de tomillo en base a β -CD con capacidad antioxidante como agentes anti-pardeo a altas temperaturas.
- ✚ La estabilización de los extractos por liofilización permitió estabilizarlos y disponer de ellos en forma práctica. Los resultados obtenidos presentados demostraron la importancia de caracterizar física y químicamente los materiales

para poder establecer las condiciones críticas de almacenamiento con el fin de brindar estabilidad fisicoquímica a las moléculas de interés, preservando su funcionalidad. La estabilidad de dichos materiales se encuentra sujeta al tiempo y la temperatura de exposición en una a_w determinada.

- ✚ La transición vítrea provocó modificaciones físicas que se manifestaron en aspectos estructurales y en la disminución de la capacidad antioxidante y se acentuaron cuando ocurrió el fenómeno de cristalización.
- ✚ Las modificaciones físicas se manifestaron en cambios de las funciones de color que a su vez correlacionaron con la pérdida de capacidad antioxidante. De esta manera, las mediciones de reflectancia representan una forma práctica y no destructiva para evaluar la estabilidad de los extractos liofilizados.
- ✚ La utilización de soluciones de β -CD en la extracción permitió extraer muchos compuestos volátiles no polares, con potenciales efectos complementarios a los solubles en agua.
- ✚ La combinación de las actividades antiglicantes y antioxidantes de uno o más extractos merece ser investigado más a fondo, a fin de aprovechar los posibles efectos sinérgicos de los mismos.
- ✚ Los estudios realizados permiten diseñar sistemas de extracción y procedimientos analíticos y los resultados obtenidos lograron establecer conclusiones que beneficiarán y promoverán la aplicación efectiva de aditivos innovadores de origen natural en reemplazo de los sintéticos de amplio uso industrial en la actualidad.

- ✚ Los resultados demostraron que la capacidad antioxidante correlacionó con la inhibición de varias etapas de la reacción de Maillard. El hecho de que los antioxidantes hayan sido efectivos como inhibidores de la generación de intermediarios de Maillard indica que los caminos oxidativos que llevan a la formación de productos pardos tienen una importante influencia, y debe tenerse en cuenta además de la vía tradicional de generación de intermediarios a través del reordenamiento de Amadori.

BIBLIOGRAFÍA



6. BIBLIOGRAFÍA

- Abeysekera, W.K.S.M, Abayarathna, U.P.T.C., Premakumara, G.A.S., Jayasooriya M.C.N. & Abeysekera, W.P.K.M. (2018). Anti-glycation and glycation reversing potential of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seed extract. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 3(2), 1-5.
- Acevedo, N., Schebor, C. & Buera, M.P. (2006). Water-solids interactions, matrix structural properties and the rate of non-enzymatic browning. *Journal of Food Engineering*, 77, 1108–1115.
- Agbor, G.A., Vinson, J.A., Oben, J.E. & Ngogang, J.Y. (2006). Comparative analysis of the in vitro antioxidant activity of white and black pepper. *Nutrition Research*, 26, 659 – 663.
- Agudelo-Laverde, L.M., Schebor, C. & Buera, M.P. (2013). Water content effect on the chromatic attributes of dehydrated strawberries during storage, as evaluated by image analysis. *LWT - Food Science and Technology*, 52, 157-162.
- Agudelo-Laverde, M.L. (2012). Interacciones agua-sólido en frutas liofilizadas y sus consecuencias sobre aspectos estructurales, atributos cromáticos y distribución espacial de la luz. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. <http://digital.bl.fcen.uba.ar>.
- Aguilera, J. & Stanley, D. (1999). Microstructural principles of food processing and engineering. Lancaster: Aspen Publishers, EEUU.
- Ahmad, N., Fazal, H., Haider Abbasi, B., Farooq, S., Ali, M. & Ali Khan, M. (2012). Biological role of *piper nigrum* L. (Black pepper): A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2 (3 SUPPL.). *Asian Pacific Tropical Biomedical Magazine*, 1945–1953.
- Ahmed, N. (2005). Advanced glycation end products role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 67, 3–21.
- Ahn, J. A. & Kwak, H.S. (1999). Optimizing cholesterol removal in cream using β -cyclodextrin and response surface methodology. *Journal of Food Science*, 64(4), 629-632.
- Ajandouz, E. H., Tchiakpe, L. S., Dalle Ore, F., Benajiba, A. & Puigserver A. (2001).

- Effects of pH on caramelization and Maillard reaction kinetics in fructose-lysine model systems. *Journal of Food Science*, 66 (7), 926–931.
- Ali A.M.A. & ElNour, M. (2012). Antioxidant activity, total phenolic, flavonoid and tannin contents of callus and seeds extracts of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum L.*) *International Journal of Science and Research*, 3, 1268-1272.
- Ames, J.M. (1992). The Maillard reaction. In: Biochemistry of food proteins (Hudson, B.J.F., ed.), vol. 4, chapter 4. London: Elsevier Applied Science, London, England, pp. 99-153.
- Ameur, L.A., Mathieu, O., Lalanne, V., Trystram, G. & Birlouez Aragon, I. (2007). Comparison of the effects of sucrose and hexose chromatography. *Journal of Chromatography A*, 847, 69-74.
- Ameur, L.A., Trystram, G. & Birlouez-Aragon, I. (2006). Accumulation of 5-Hydroxymethyl-2-Furfural in cookies during the backing process: Validation of an extraction method. *Food Chemistry*, 98 (4), 790–796.
- Anese, M., Quarta, B. & Frias, J. (2011). Modelling the effect of asparaginase in reducing acrylamide formation in biscuits. *Food Chemistry*, 126 (2), 435–40.
- Asamarai, A.M., Addis, P.B., Epley, R.J. & Krick, T.P. (1996). Wild rice hull antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44 (1), 126–130.
- Assiri, A.M.A., Khaled, E., Abulreesh, H.H. & Ramadan, M.F. (2016). Bioactive compounds of cold-pressed thyme (*Thymus vulgaris*) Oil with antioxidant and antimicrobial properties. *Journal of Oleo Science*, 65 (8), 629–640.
- Astray, G., Gonzalez-Barreiro, C., Mejuto, J.C., Rial-Otero, R. & Simal-Gándara, J. (2009). A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloids*, 23 (7), 1631–1640.
- Astray, G., Mejuto, J.C., Morales, J., Rial-Otero, R. & Simal-Gándara, J. (2010). Factors controlling flavors binding constants to cyclodextrins and their applications in foods. *Food Research International*, 43 (4), 1212–1218.
- Avery, N.C. & Bailey, A.J. (2006). The effects of the Maillard reaction on the physical properties and cell interactions of collagen. *Pathologie Biologie*, 54, 387–395.
- Badii, F., Mac Naughtan, W. & Farhat, I.A. (2005). Enthalpy relaxation of gelatin in the

- glassy state. *International Journal of Biological Macromolecules*, 36 (4), 263-269.
- Balaban, M.O. (2008). Quantifying nonhomogeneous colors in agricultural materials Part I: Method development. *Journal of Food Science*, 73 (9), 431–437.
- Balasundram, N., Kalyana S. & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99 (1), 191–203.
- Bandyopadhyay, C., Narayan, V.S. & Variyar, P.S. (1990). Phenolics of green pepper berries (*Piper nigrum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 1696–1699.
- Barba, F.J., Zhu, Z., Koubaa, M., Sant’Ana, A.S. & Orlie, V. (2016). Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 49, 96-109.
- Basch, E., Ulbricht, C., Kuo, G., Szapary, P. & Smith, M. (2003). Therapeutic applications of fenugreek. *Alternative Medicine Review*, 8(1), 20-27.
- Belović, M.M., Mastilović, J.S. & Kevrešan Ž.S. (2014). Change of surface colour parameters during storage of paprika (*Capsicum annuum* L.), *Food and Feed Research*, 41 (2), 85-92.
- Benayad, Z., Gómez-Cordovés, C. & Es-Saf, N.E. (2014). Characterization of flavonoid glycosides from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) crude seeds by HPLC–DAD–ESI/MS analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 20668-20685.
- Benzie, I.F.F. & Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of ‘antioxidant power’: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239 (1), 70–76.
- Beseni, B.K., Bagla, V.P., Njanje, I., Matsebalela, T.M., Mampuru, L. & Mokgotho, M.P. (2017). Antioxidant, antiglycation, and hypoglycaemic effect of seriphium plumosum crude plant extracts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2017.
- Bicchi, C., Cordero, C., Liberto, E. Sgorbini, B. & Rubiolo, P. (2012). Headspace sampling in flavor and fragrance field, in: *J. Pawliszyn, L. Mondello, P. Dugo (Eds.), Com-prehensive Sampling and Sample Preparation, vol. 4, Elsevier,*

-
- Academic Press, Oxford, UK. pp. 1–25.*
- Bina, G. & Vyas, A. (2015). A comprehensive review on cyclodextrin-based carriers for delivery of chemotherapeutic cytotoxic anticancer drugs. *BioMedical Research International*, vol. 2015, 1-15.
- Bonat, C.G., Ghanem, A. & Su Ling Brooks, M. (2015). Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from haskap berries (*Lonicera Caerulea* L.) using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 27, 449–455.
- Box, G.E.P. & Behnken, D.W. (1960). Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, 2, 455–475.
- Brewer, M. S. (2011). Natural antioxidants: Sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10 (4), 221–247.
- Briones, V. & Aguilera, J.M. (2005). Image analysis of changes in surface color of chocolate. *Food Research International*, 38(1), 87-94.
- Briones, V. & Aguilera, J.M. (2005). Image analysis of changes in surface color of chocolate. *Food Research International*, 38 (1), 87–94.
- Buera, M.P., Hough, G., Martinez, E. & Resnick, S. (1991). Colorimetric, spectrophotometric and sensory color measurements of dulce de leche. *Anales de la Asociación de Química Argentina*.
- Buera, M.P., Schebor, C. & Elizalde, B. (2005). Effects of carbohydrate crystallization on stability of dehydrated foods and ingredient formulations. *Journal of Food Engineering*, 67, (1–2), 157-165.
- Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223–253.
- Bustos, M.C, Agudelo-Laverde, L.M. & Mazzobre, F. (2014). The relationship between antibrowning, anti-Radical and reducing capacity of Brassica and Allium extracts. *International Journal of Food Science & Technology*, 3, 82–92.
- Bustos, M.C., Mazzobre, M.F. & Buera, M.P. (2015). Stabilization of refrigerated avocado pulp: Effect of Allium and Brassica extracts on enzymatic browning. *LWT - Food Science and Technology*, 61 (1), 89–97.

- Capanoglu, E., Beekwilder, J., Boyacioglu, D., De Vos, R.C. & Hall, R.D. (2010). The effect of industrial food processing on potentially health-beneficial tomato antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50 (10), 919–930.
- Cardelle-Cobas, A. & Villamiel, M. (2005). Evaluación del pardeamiento no enzimático en alimentos derivados de cereales. *Alimentación, Nutrición y Salud*, 12 (3), 91-100.
- Cardona, S., Schebor, C., Buera, M., Karel, M. & Chirife, J. (1997). Thermal stability of invertase in reduced-moisture amorphous matrices in relation to glassy state and trehalose crystallization. *Journal of Food Science*, 62 (1), 105-112.
- Cazzola, R. & Benvenuto, C. (2014). Diabetes: Oxidative stress and dietary antioxidants. *Chapter 9: Antioxidant Spices and Herbs Used in Diabetes. Academic Press*, 89-97.
- Chaillou, L.L. & Nazareno, M.A. (2006). New method to determine antioxidant activity of polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (22), 8397–8402.
- Chao, J., Wang, H., Zhao, W., Zhang, M. & Zhang, L. (2012). Investigation of the inclusion behavior of chlorogenic acid with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50 (1), 277–82.
- Chatterjee, S., Niaz, Z., Gautam, S., Adhikari, S. Variyar, P.S. & Sharma, A. (2007). Antioxidant activity of some phenolic constituents from green pepper (*Piper nigrum L.*) and fresh nutmeg mace (*Myristica fragrans*). *Food Chemistry*, 101, 2, 515-523.
- Chemat, F., Vian, M.A. & Cravotto, G. (2012). Green extraction of natural products: Concept and principles. *International Journal of Molecular Sciences*, 13 (7), 8615–8627.
- Chen, M., Zhao, Y. & Yu, S. (2015). Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses. *Food Chemistry*, 172, 543–550.
- Chen, P., Kuo, W., Chiang, C., Chiou, H., Hsieh, Y. & Chu, S. (2006). Black rice anthocyanins inhibit cancer cells invasion via repressions of MMPs and u-PA expression. *Chemico-Biological Interactions*, 163, 218-229.
- Chen, X., Chen, R., Guo, Z., Li, C. & Li, P. (2007). The preparation and stability of the

- inclusion complex of astaxanthin with β -cyclodextrin. *Food Chemistry*, 101, 1580–1584.
- Chinchansure, A.A., Korwar, A.M., Kulkarni, M.J. & Joshi, S.P. (2015). Recent development of plant products with anti-glycation activity: A review. *Royal Society of Chemistry, RSC Advances*, 5 (39), 31113–31138.
- Chuyen, N.V. (1998). Maillard reaction and food processing. Application aspects. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 434, 213-235.
- Costa Antunes da Rocha, B., Kawaseb, K.Y.F. & Vieira Coelho, G.L. (2014). Comparison of SPME and SFE for the determination of volatile constituents in *Thymus vulgaris* L. Lamiaceae. *International Journal of Engineering & Technology*, 14 (06), 35-43.
- Crews, C. & Castle, L. 2007. A Review of the occurrence, formation and analysis of furan in heat-processed foods. *Trends in Food Science and Technology*, 18 (7), 365–372.
- Cueto, M.A. (2016). Transformaciones físico-químicas de granos de maíz en la elaboración de laminados y extrudados para el desayuno. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires. pp. 1–253.
- Dawson, P.L. & Acton, J.C. (2018). Impact of proteins on food color. Proteins in food processing (*Second Edition*). *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*, 599-638.
- De La Torre, J.E., Gassara, F., Kouassi, A.P., Kaur Brar, S. & Belkacemi, K. (2017). Spice use in food: Properties and benefits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57 (6), 1078–88.
- Dearlove, R.P., Greenspan, P., Hartle, D.K., Swanson, R.B. & Hargrove, J.L. (2008). Inhibition of protein glycation by extracts of culinary herbs and spices. *Journal of Medicinal Food*, 11 (2), 275–281.
- Deepak, V., Kalishwaralal, K., Ramkumarpandian, S., Venkatesh Babu, S., Senthilkumar, S. R. & Sangiliyandi G. (2008). Optimization of media composition for nattokinase production by bacillus subtilis using response surface methodology. *Bioresource Technology*, 99 (17), 8170–74.
- Deetae, P., Parichanon, P., Trakunleewatthana, P., Chanseetis, C. & Lertsiri, S. (2012).

- Antioxidant and anti-glycation properties of thai herbal teas in comparison with conventional teas. *Food Chemistry*, 133 (3), 953–959.
- Degen, J., Hellwig, M., & Henle, T. (2012). 1,2-Dicarbonyl compounds in commonly consumed foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 7071–7079.
- del Valle, E.M.M. (2004). Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*, 39 (9), 1033–1046.
- Delgado-Andrade, C., Rufián-Henares, J.A. & Morales, F.J. (2007b). Lysine availability is diminished in commercial fibre-enriched breakfast cereals. *Food Chemistry*, 100 (2), 725–731.
- Delgado-Andrade, C., Seiquer, I., Navarro, M.P. & Morales, F.J. (2007a). Maillard reaction indicators in diets usually consumed by adolescent population. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51, 341-351.
- Derringer, G. & Suich, R. (1980). Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of Quality Technology*, 12 (4), 214–19.
- Descamps, N., Palzer, S., Roos, Y.H. & Fitzpatrick, J.J. (2013). Glass transition and flowability/caking behaviour of maltodextrin DE 21. *Journal of Food Engineering*, 119, 809–813.
- Diamanti, A.C., Igoumenidis, P.E., Mourtzinis, I., Yannakopoulou, K. & Karathanos, V.T. (2017). Green extraction of polyphenols from whole pomegranate fruit using cyclodextrins. *Food Chemistry*, 214, 61–66.
- dos Santos, C., Buera, M.P. & Mazzobre, M.F. (2012). Influence of ligand structure and water interactions on the physical properties of β -cyclodextrins complexes. *Food Chemistry*, 132 (4), 2030–2036.
- dos Santos, M.M., Prestes, A.S., de Macedo, G.T., Ecker, A., Barcelos, R.P., Boligon, A.A., Souza, D., de Bem, A.F., da Rocha, J.B.T. & Barbosa, N.V. (2018). *Syzygium cumini* leaf extract inhibits LDL oxidation, but does not protect the lipoprotein from glycation. *Journal of Ethnopharmacology*, 210, 69–79.
- Dugan, L.R. (1980). Natural antioxidants. In *Autoxidation in Food and Biological Systems pp. 261-282 (Eds Simic, M. G. & Karel, M.) New York: Plenum Press.*
- Faist, V. & Erbersdobler, H.F. (2001). Metabolic transit and in vivo effects of

- melanoidins and precursor compounds deriving from the Maillard reaction. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 45, 1–12.
- Fallico, B., Zappalà, M., Arena, E. & Verzera, A. (2004). Effects of conditioning on HMF content in unifloral honeys. *Food Chemistry*, 85 (2), 305–13.
- Farroni, A. & Buera, M.P. (2012). Colour and surface fluorescence development and their relationship with Maillard reaction markers as influenced by structural changes during cornflakes production. *Food Chemistry*, 135 (3), 1685–1691.
- Farrukh, A., Iqbal, A. & Zafar, M. (2006). Antioxidant and free radical scavenging properties of twelve traditionally used indian medicinal plants. *Turkish Journal of Biology*, 30, 177–183.
- Fennema, O. R. (1996). *Food Chemistry (3rd ed.)*, Marcel Dekker, New York.
- Fenyvesi, E., Vikmon, M. & Szente, L. (2016). Cyclodextrins in food technology and human nutrition: Benefits and limitations, critical reviews in *Food Science and Nutrition*, 56, 1981–2004.
- Fernández-Artigas, P., Guerra-Hernández, E. & García-Villanova, B. (1999). Browning indicators in model systems and baby cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (7), 2872–2878.
- Fitzpatrick, J.J., Hodnett, M., Twomey, M., Cerqueira, P.S.M., O'Flynn, J. & Roos, Y.H. (2007). Glass transition and the flowability and caking of powders containing amorphous lactose. *Powder Technology*, 178 (2), 119–128.
- Food and Drug Administration (FDA). (1987). Sulfinting agents: Proposal to revoke GRAS status for use on “Fresh” potatoes served or sold unpackaged and unlabeled to consumers. *Federal Register*, 52 (237), 46,968-46,978.
- Franco, R.R., da Silva Carvalho, D., Francielle Borges, R.M., Benatti Justino, A., Cappato Guerra Silva, H., Gomes Peixoto, L., & Salmen Espindola, F. (2018). Antioxidant and anti-glycation capacities of some medicinal plants and their potential inhibitory against digestive enzymes related to type 2 diabetes mellitus. *Journal of Ethnopharmacology*, 215, 140–146.
- Fuentes, M., Olmos, P. & Santos, J.L. (2015). Productos finales de glicación avanzada (AGEs) y su importancia en enfermedades crónicas relacionadas con la nutrición. *Revista Chilena de Endocrinología y Diabetes*, 8 (2), 70–77.

- Gao, F., Zhou, T., Hu, Y., Lan, L., Vander Heyden, Y., Crommen, J., Lu, G. & Fan, G. (2016). Cyclodextrin-based ultrasonic-assisted microwave extraction and HPLC-PDA-ESI-ITMS separation and identification of hydrophilic and hydrophobic components of polygonum cuspidatum: A green, rapid and effective process. *Industrial Crops and Products*, 80, 59–69.
- Giardino, I., Fard, A.K., Hatchell, D.L. & Brownlee, M. (1998). Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation, and oxidant-induced apoptosis. *Diabetes*, 47, 1114–1120.
- Gökmen, V. & Acar, J. (1999). Simultaneous determination of 5-hydroxymethylfurfural and patulin in apple juice by reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 25, 847(1-2), 69-74.
- Gonzalez, R. & Woods, R. (1992). Digital imaging processing. *Boston, USA: Addison-Wesley Longman Publishing Co. Inc.*
- Gould, A. Naidoo, C., Kruger, D. & Candy, G. (2011). The role of advanced glycation end products in the hyperinflammatory response of diabetic wounds: general review. *Wound Healing Southern Africa*, 4, 25-28.
- Granato, D., Katayama, F.C.U. & Castro, I.A. (2010). Assessing the association between phenolic compounds and the antioxidant activity of brazilian red wines using chemometrics. *LWT - Food Science and Technology*, 43 (10), 1542–1549.
- Greenspan, L. (1977). Humidity fixed-points of binary saturated aqueous-solutions. *Journal of Research of the National Bureau of Standards Section a-Physics and Chemistry*, 81(1), 89-96.
- Gugliucci, A., Bastos, D.H., Schulze, J. & Souza, M.F. (2009). Caffeic and chlorogenic acids in *Ilex paraguariensis* extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. *Fitoterapia*, 80(6), 339-44.
- Hamzalıoğlu, A. & Gökmen, V. (2018). Investigation and kinetic evaluation of the reactions of hydroxymethylfurfural with amino and thiol groups of amino acids. *Food Chemistry*, 240 (1), 354-360.
- Haque, M. & Roos, Y. (2004a). Water sorption and plasticization behavior of spray dried lactose/protein mixtures. *Journal of Food Science*, 69 (8), 384–391.
- Haque, M.K. & Roos, Y. (2004b). Water plasticization and crystallization of lactose in

- spraydried lactose/protein mixtures. *Journal of Food Science*, 69 (1), 23–29.
- Haque, M.K., Kawai, K. & Suzuki, T. (2006). Glass transition and enthalpy relaxation of amorphous lactose glass. *Carbohydrate Research*, 341 (11), 1884–1889.
- Harnkarnsujarit, N. & Charoenrein, S. (2011). Effect of water activity on sugar crystallization and β -carotene stability of freeze-dried mango powder. *Journal of Food Engineering*, 105 (4), 592-598.
- Hodge, J.E. (1953). Chemistry of browning reactions in model systems". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1, 928–943.
- Hong, X., Meng, J. & Lu, R.R. (2015). Improvement of ACE inhibitory activity of casein hydrolysate by maillard reaction with xylose. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95 (1), 66–71.
- Hu, L., Zhang, H., Song, W., Gu, D. & Hu, Q. (2012). Investigation of inclusion complex of cilnidipine with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Carbohydrate Polymers*, 6, 90 (4), 1719-1724.
- Hussein, J., Teshale, C. & Jemal, M. (2011). Assesment of the antimicrobial effects of some ethiopian aromatic spice and herb hydrosols. *International Journal of Pharmacology*, 7 (5), 635–40.
- Hyun, J.W. & Chung, H.S. (2004). Cyanidin and malvidin from *Oryza sativa* cv. heugjinjubyeo mediate cytotoxicity against human monocytic leukemia cells by arrest of G2/M phase and induction of apoptosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2213-2217.
- Ibarz, A., Pagán, J. & Garza, S. (2000). Kinetic models of nonenzymatic browning in apple puree. *Journal of Science and Food Agriculture*, 80 (8), 1162-1168.
- Iglesias, H.A., Chirife, J. & Buera, M.P. (1997). Water sorption isotherm of amorphous trehalose. *Journal of Science and Food Agriculture*, 75, 183-186.
- Jayas, D.S., Paliwal, J. & Visen, N. S. (2000). Multi-layer neural networks for image analysis of agricultural products. *Journal of Agricultural and Engineering Research*, 77 (2), 119–128.
- Jia, N., Baohua, K., Qian, L., Xinping, D. & Xiufang, X. (2012). Antioxidant activity of black currant (*Ribes Nigrum L.*) extract and its inhibitory effect on lipid and

- protein oxidation of pork patties during chilled storage. *Meat Science*, 91 (4), 533–539.
- Jouppila, K., Kansikas, J. & Roos, Y.H. (1997). Glass transition, water plasticization, and lactose crystallization in skim milk powder. *Journal of Dairy Science*, 80 (12), 3152–3160.
- Karel, M., Anglea, S., Buera, P., Karmas, R., Levi, G. & Roos, Y. (1994). Stability-related transitions of amorphous foods. *Thermochimica Acta*, 246, 249–269.
- Kaur, R., Dhakad, M.S., Goyal, R. & Kumar, R. (2016). Emergence of non-albicans candida species and antifungal resistance in intensive care unit patients. *Indian Journal of Microbiology Research*, 3(4), 398-400.
- Kazeem, M.I., Akanji, M.A., Hafizur Rahman, M. & Choudhary, M.I. (2012). Antiglixylation, antioxidant and toxicological potential of polyphenol extracts of alligator pepper, ginger and nutmeg from Nigeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(9), 727-732.
- Kfoury, M., Auezova, L. Ruellan, S., Greige-Gerges, H. & Fourmentin, S. (2015). Complexation of estragole as pure compound and as main component of basil and tarragon essential oils with cyclodextrins. *Carbohydrate Polymers*, 118, 156–164.
- Kiho, T., Usui, S., Hirano, K., Aizawa, K. & Inakuma, T. (2004). Tomato paste fraction inhibiting the formation of advanced glycation endproducts. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 68, 200-205.
- Kim, M.J., Kim, C.Y. & Inshik P. (2005). Prevention of enzymatic browning of pear by onion extract. *Food Chemistry*, 89 (2), 181–84.
- Kim, Y.J., Hagiwara, T., Kawai, K., Suzuki, T. & Takai, R. (2003). Kinetic process of enthalpy relaxation of glassy starch and effect of physical aging upon its water vapor permeability property. *Carbohydrate Polymers*, 53 (1), 289-296.
- Kocadağlı, T. (2016). Investigation and kinetic modelling of α -dicarbonyl compound formation in foods. Graduate School of Science and Engineering of Hacettepe University. Tesis Doctoral. pp. 159.
- Komiyama, M. & Bender, M. (1978). Cyclodextrin Chemistry. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Alemania- Nueva York , USA*.

- Koschinsky, T., He, C.J., Mitsuhashi, T., Bucala, R., Liu, R., Buenting, C., Heitmann, K. & Vlassara, H. (1997). Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): An environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94 (12), 6474-6479.
- Kotsiou, K., Tasioula-Margari, M., Capuano, E. & Fogliano, V. (2011). Effect of standard phenolic compounds and olive oil phenolic extracts on acrylamide formation in an emulsion system. *Food Chemistry*, 124 (1), 242–247.
- Kroh, L.W. (1994). Caramelisation in food and beverages. *Food Chemistry*, 51 (4), 373–379.
- Kuehl, R.O. & Kuehl, R.O. (2000). Design of experiments: Statistical principles of research design and analysis. *Duxbury/Thomson Learning, Pacific Grove, CA*.
- Kuliscic, T., Radonic, A. & Milos, M. (2005). Paper antioxidant properties of thyme (*Thymus Vulgaris* L.) and wild thyme (*Thymus Serpyllum* L.) essential oils. *Italian Journal of Food Science*, 17, 315–325.
- Labuza, T.P. & Saltmarch, M. (1981). The nonenzymatic browning reaction as affected by water in foods. In: *Water activity: Influence on Food Quality*. New York: Academic Press, pp. 605-50.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lazić, Z.R. (2004). Design of experiments in chemical engineering. A practical Guide. *WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, R. Z. pp. 523*.
- Li, H., Xu, X.Y., Liu, M., Sun, D.Z., & Li, L.W. (2010). Microcalorimetric and spectrographic studies on host–guest interactions of α -, β -, γ - and β -cyclodextrin with resveratrol. *Thermochimica Acta*, 510, 168–172.
- Li, R., Lin, D., Roos, Y.H. & Miao, S. (2018). Glass transition, structural relaxation and stability of spray-dried amorphous food solids: A review. *Drying Technology*, 1-15.
- Lindner, K. & Saenger, W. (1982). Topography of cyclodextrin inclusion complexes. XVI. Cyclic system of hydrogen bonds: Structure of alpha-cyclodextrin hexahydrate, form (II): Comparison with form (I). *Acta Crystallographica, B*, 38, 203–210.

- Liu, Q., Meng, X., Li, Y., Zhao, C.N., Tang, G.I. & Li, H.B. (2017). Antibacterial and antifungal activities of spices. *International Journal of Molecular Sciences*, 18 (6), 1283, 1-62.
- Lo, C.-Y., Hsiao, W.-T. & Chen, X.-Y. (2011). Efficiency of trapping methylglyoxal by phenols and phenolic acids. *Journal of Food Science*, 76, 90–96.
- Loftsson, T., & Duchêne, D. (2007). Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 329 (1–2), 1–11.
- Lopez-Garcia, E., Schulze, M.B., Fung, T.T., Meigs, J.B., Rifai, N., Manson, J.E. & Hu, F.B. (2004). Major dietary patterns are related to plasma concentrations of markers of inflammation and endothelial dysfunction. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80(4), 1029-1035.
- Lunceford, N. & Gugliucci, A. (2005). Ilex paraguariensis extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. *Fitoterapia*, 76 (5), 419-427.
- Magnusdottier, M., Másson, M. & Loftsson, T. 2002. Cyclodextrin S. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 44 (c), 213–218.
- Manou, I., Bouillard, L., Devleeschouwer, M.J. & Barel, A.O. (1998). Evaluation of the preservative properties of origanum elongatum essential oil in topically applied formulation under a challenge test. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 1–18.
- Martín-Diana, A.B., Rico, D. & Barry-Ryan, C. (2008). Green tea extract as a natural antioxidant to extend the shelf-life of fresh-cut lettuce. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(4), 593-603.
- Masatcioglu, M.T., Gökmen, V., Ng P.K.W. & Koxsel, H. (2014). Effects of formulation, extrusion cooking conditions, and CO₂ injection on the formation of acrylamide in corn extrudates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(12), 2562–2568.
- Mathabe, M.C., Nikolova, R.V., Lall, N. & Nyazema, N.Z. (2005). Antibacterial activities of medicinal plants used for the treatment of diarrhea in Limpopo Province, South Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, 105, 286–293.
- Mazzobre, M.F. & Buera, P. (1999). Combined effects of trehalose and cations on the thermal resistance of β -galactosidase in freeze-dried systems. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1473, 337–334.

- Mazzobre, M.F., Buera, M.P. & Chirife, J. (1997). Protective role of trehalose on thermal stability of lactase in relation to its glass and crystal forming properties and effect of delaying crystallization. *LWT – Food Science and Technology*, 30, 324–329.
- Mazzobre, M.F., Soto, G., Aguilera, J.M. & Buera, M.P. (2001). Crystallization kinetics of lactose in systems colyofilized with trehalose. Analysis by differential scanning calorimetry. *Food Research International*, 34, 903–911.
- McAuley, J.A., Kunkel, M.E. & Acton, J. C. (1987). Relationships of available lysine to lignin, color and protein digestibility of selected wheat-based breakfast cereals. *Journal of Food Science*, 52 (6), 1580-1587.
- Medeiros, V., Frédéric Mestdagh, R. & De Meulenaer, B. (2012). Acrylamide formation in fried potato products - present and future, a critical review on mitigation strategies. *Food Chemistry*, 133 (4), 1138–1154.
- Meredith, F.I. & Caster, W.O. (1984) Amino acid content in selected breakfast cereals. *Journal of Food Science*, 49, 1624-1625.
- Miao, S. & Roos, Y.H. (2005). Crystallization kinetics and X-Ray diffraction of crystals formed in amorphous lactose, trehalose, and lactose/trehalose mixtures. *Journal of Food Science*, 70 (5), 350–358.
- Milne, R. & Brownstein, S. (2011). Advanced glycation end products and diabetic retinopathy. *Amino Acids*, 44, 1397–1407.
- Miyata, T., Izuhara, Y., Sakai, H. & Kurokawa, K. (1999). Carbonyl stress: increased carbonyl modification of tissue and cellular proteins in uremia. *Peritoneal Dialysis International*, 19, Suppl 2, S58-61.
- Mnif, S. & Aifa, S. (2015). Cumin (*Cuminum Cyminum* L.) from traditional uses to potential biomedical applications. *Chemistry and Biodiversity*, 12 (5), 733–742.
- Moniruzzaman, M., Parengkuan, L., Yagi, M., Yonei, Y. (2015). Effect of proteins, sugars and extraction methods on the anti-glycation activity of spices. *Glycative Stress Research*, 2 (3), 129-139.
- Monnier, V.M. & Cerami, A. (1981). Nonenzymatic browning in vivo: possible process for aging of long-lived proteins. *Science*, 30, 211 (4481), 491-493.

- Morales, F.J. & Jiménez-Pérez, S. (2001). Hydroxymethylfurfural determination in infant milk-based formulas by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Food Chemistry*, 72 (4), 525–531.
- Morales, F.J. (2009). Hydroxymethylfurfural (HMF) and related compounds. In: *Stadler, R.H., Lineback, D.R. (eds) Process-induced food toxicants: occurrence, formation, mitigation, and health risks. Wiley, New York, pp 135–174.*
- Morimitsu, Y., Yoshida, K., Esaki, S. & Hirota, A. (1995). Protein glycation inhibitors from thyme (*Thymus Vulgaris*). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 59 (11), 2018–2021.
- Muñoz Acevedo, A. (2007). Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol. *Scientia Et Technica XIII* (33).
- Myers, R.H., Montgomery, D.C. & Anderson-Cook, C.M. (2009). Response surface methodology. *John Wiley & Sons, Inc. 3rd ed. United States of America: John Wiley & Sons, Inc.*
- Nadeem, M. & Asad, R. (2012). Cumin (*Cuminum Cyminum*) as a potential source of antioxidants. *Pakistan Journal of Food Sciences*, 22 (2s), 101–107.
- Nakagawa, T., Yokozawa, T., Terasawa, K., Shu, S. & Juneja, L.R. (2002). Protective activity of green tea against free radical and glucose mediated protein damage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2418-2422.
- Nasar-Abbas, S.M. & Kadir Halkman, A. (2004). Antimicrobial effect of water extract of sumac (*Rhus coriaria* L.) on the growth of some food borne bacteria including pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 97, 63–69.
- Navarro Gómez, M. (2017). Estudio in vitro de la capacidad antiglicante y mecanismo de acción de subproductos agroalimentarios. Obtención de un extracto vegetal antiglicante y su evaluación en una matriz alimentaria y modelo celular. *Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia.*
- Nielsen De Almeida, F. (2013). Effects of the Maillard reactions on chemical composition and amino acid digestibility of feed ingredients and on pig growth performance. *Tesis Doctoral. College of the University of Illinois at Urbana-Champaign. pp.177.*

- Nipornram, S., Worasit, T., Rattanatraiwong, P. & Singanusong, R. (2018). Optimization of low power ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from mandarin (*Citrus Reticulata Blanco* Cv. *Sainampueng*) peel. *Food Chemistry*, *241*, 338–345.
- Odjakova, M., Popova, E., Al Sharif, M. & Mironova, R. (2012). Plant-derived agents with anti-glycation. *Glycosylation. Edited by Stefana Petrescu. IntechOpen*.
- Padín, E.V. (2015). Obtención, caracterización y determinación de la actividad antimicrobiana de la oleorresina de las bayas de aguaribay (*Schinus molle* Linn.) *Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Quilmes*.
- Pankaj, B.P., Umezuruike, L.O. & Fahad, A.-J. A.-S. (2013). Colour measurement and analysis in fresh and processed foods: A review. *Food and Bioprocess Technology*, *6*, 36–60.
- Paradiso, V.M., Summo, C., Pasqualone, A. & Caponio, F. (2009). Evaluation of different natural antioxidants as affecting volatile lipid oxidation products related to off-flavours in corn flakes. *Food Chemistry*, *113* (2), 543–49.
- Parmar, I., Sharma, S. & Vasantha Rupasinghe, H. P. (2015). Optimization of β -cyclodextrin-based flavonol extraction from apple pomace using response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology*, *52* (4), 2202–2210.
- Patras, A., Brunton, N.P., Tiwari, B. & Butler, F. (2011). Stability and degradation kinetics of bioactive compounds and colour in strawberry jam during storage. *Food and Bioprocess Technology*, *4*, 1245–1252.
- Patterson, J.E., James, M.B., Forster, A.H., Lancaster, R.W., Butler, J.M. & Rades, T. (2005). The influence of thermal and mechanical preparative techniques on the amorphous state of four poorly soluble compounds. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *94* (9), 1998–2012.
- Pék, Z., Helyes, L. & Lugasi, A. (2010). Color changes and antioxidant content of vine and postharvest-ripened tomato fruits. *HortScience*, *45*(3), 466–468.
- Peng, X, Ma, J., Chen, F. & Wang, M. (2011). Naturally occurring inhibitors against the formation of advanced glycation end-products. *Food & Function*, *2*(6), 289–301.
- Porras-Saavedra, J., Favre, L.C., Alamilla-Beltrána, L., Mazzobre, M.F., Gutiérrez-López, G.F., & Buera, M.P. (2019). Thermal transitions and enthalpic relaxations

- as related to the stability of microencapsulated paprika powders. *Journal of Food Engineering*, 245, 88-95.
- Prasanth, R.V., Ravi, V.K., Varsha, P.V. & Satyam, S. (2014). Review on *Thymus vulgaris* traditional uses and pharmacological properties. *Medicinal & Aromatic Plants*, 03 (03), 1–3.
- Premakumara, G.A.S., Abeysekera, W.K.S.M., Ratnasooriya, W.D., Chandrasekharan, N.V. & Bentota, A.P.. (2013). Antioxidant, anti-amylase and anti-glycation potential of brans of some Sri Lankan traditional and improved rice (*Oryza Sativa L.*) varieties. *Journal of Cereal Science*, 58 (3), 451–456.
- Rada-Mendoza, M., García-Baños, J.L., Millamiel, M. & Olano, A. (2004). Study on nonenzymatic browning in cookies, crackers and breakfast cereals by maltulose and furosine determination. *Journal of Cereal Science*, 39 (2), 167–173.
- Rahman, M.S. (2006). State diagram of foods: Its potential use in food processing and product stability. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 129–141.
- Rai, V., Toure, F., Chitayat, S., Pei, R., Song, F., Li, Q., Zhang, J., Rosario, R., Ramasamy, R., Chazin, W.J. & Schmidt, A.M. (2012). Lysophosphatidic acid targets vascular and oncogenic pathways via RAGE signaling. *Journal of Experimental Medicine*, 209, 2339–2350.
- Ramírez-Jiménez A., Guerra-Hernández E. & García-Villanova, B. (2000). Browning indicators in bread. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 4176.
- Ramírez-Jiménez, A., García-Villanova, B. & Guerra-Hernández, E. (2004). Nonenzymatic browning during storage of infant cereals. *Cereal Chemistry*, 81(3), 399–403.
- Ramkissoon, J.S., Mahomoodally, M.F., Ahmed, N. & Subratty, A.H. (2013). Antioxidant and anti-glycation activities correlates with phenolic composition of tropical medicinal herbs. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 561–569.
- Ramkissoon, J.S., Mahomoodally, M.F., Ahmed, N. & Subratty, A.H. (2012). Relationship between total phenolic content, antioxidant potential, and antiglycation abilities of common culinary herbs and spices. *Journal of Medicinal Food*, 15 (12): 1116–1123.
- Ramos-Hernandez, K.V. & Luevano-Contreras, C. (2017). “Cardiovascular.”

- Universidad de Guanajuato*, 3 (2), 342–346.
- Rangsansarid, J., Cheetangdee, N., Kinoshita, N. & Fukuda, K. (2008). Bovine serum albumin-sugar conjugates through the Maillard reaction: Effects on interfacial behavior and emulsifying ability. *Journal of Oleo Science*, 57 (10), 539–547.
- Rannou, C., Laroque, D., Renault, E., Prosta, C. & Sérot, T. (2016). Mitigation strategies of acrylamide, furans, heterocyclic amines and browning during the Maillard reaction in foods. *Food Research International*, 90, 154-176.
- Ratnasooriya, C.C. & Rupasinghe, H.P. (2012). Extraction of phenolic compounds from grapes and their pomace using β -cyclodextrin. *Food Chemistry*, 134, 625–631.
- Rebey, I., Zakhama, N., Jabri, I. & Marzouk, K. (2012). Polyphenol composition and antioxidant activity of cumin (*Cuminum Cyminum L.*) seed extract under drought. *Journal of Food Science*, 77 (6), 734-739.
- Rekharsky, M.V. & Inoue, Y. (1998). Complexation thermodynamics of cyclodextrins. *Chemical Reviews*, 98, 1875-1917.
- Ribeiro Santos Rezende, Y.R., Pedreira Nogueira, J. & Narain, N. (2017). Comparison and optimization of conventional and ultrasound assisted extraction for bioactive compounds and antioxidant activity from agro-industrial acerola (*Malpighia Emarginata DC*) residue. *LWT - Food Science and Technology*, 85, 158–169.
- Roe, K.D. & T.P. Labuza. (2005). Glass transition and crystallization of amorphous trehalose-sucrose mixtures. *International Journal of Food Properties*, 8 (3), 559-574.
- Roldán, E., Sánchez-Moreno, C., de Ancos, B. & Cano, M.P. (2008). Characterisation of onion (*Allium Cepa L.*) by-products as food ingredients with antioxidant and antibrowning properties. *Food Chemistry*, 108 (3), 907–916.
- Roos, Y. & Karel, M. (1991). Water and molecular weight effects on glass transitions in amorphous carbohydrates and carbohydrate solutions. *Journal of Food Science*, 55 (6), 1676–1681.
- Roos, Y. & Karel, M. (1992). Crystallization of amorphous lactose. *Journal of Food Science*, 57, 775–777.
- Roselló-Soto, E., Barba, F.J., Parniakov, O., Galanakis, C.M., Lebovka, N., Grimi, N. &

- Vorobiev, E. (2015). High voltage electrical discharges, pulsed electric field, and ultrasound assisted extraction of protein and phenolic compounds from olive kernel. *Food and Bioprocess Technology*, 8 (4), 885–894.
- Ruiz, J. C., Guerra-Hernandez, E. & García-Villanova, B. (2004). Furosine is a useful indicator in pre-baked breads. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 366–370.
- Saeed, S. & Tariq, P. (2008). In vitro Antibacterial activity of clove against Gram negative bacteria. *Pakistan Journal of Botany*, 40(5), 2157–2160.
- Salamanca, G., Osorio, T.M.P. & Montoya, L.M. (2010). Elaboración de una bebida funcional de alto valor biológico a base de borojo (Borojoa Patinoi Cuatrec). *Revista Chilena de Nutrición*, 37 (1), 87–96.
- Salazar, R., Arámbula-Villa, G., Hidalgo, F.H. & Zamora, R. (2012). Mitigating effect of piquin pepper (*Capsicum Annuum L.* Var. Aviculare) oleoresin on acrylamide formation in potato and tortilla chips. *LWT - Food Science and Technology*, 48 (2), 261–267.
- Saraswat, M., Yadagiri Reddy, P., Muthenna, P. & Bhanuprakash Reddy, G. (2009). Prevention of non-enzymic glycation of proteins by dietary agents: prospects for alleviating diabetic complications. *British Journal of Nutrition*, 101, 1714–1721.
- Semchyshyn, H.M. & Lishchak, V.I. (2012). Interplay between oxidative and carbonyl stresses: Molecular mechanisms, biological effects and therapeutic strategies of protection. In *Oxidative Stress-Molecular Mechanisms and Biological Effects*, V. I. Lushchak and H. M. Semchyshyn, (Eds.), pp. 15-46, In Tech, Rijeka, Croatia.
- Sgorbini, B., Bicchi, C., Cagliero, C., Cordero, C., Liberto, E. & Rubiolo, P. (2015). Herbs and spices: Characterization and quantitation of biologically-active markers for routine quality control by multiple headspace solid-phase microextraction combined with separative or non-separative analysis. *Journal of Chromatography A*, 1376, 9–17.
- Shamblin, S.L. & Zografi, G. (1998). Enthalpy relaxation in binary amorphous mixtures containing sucrose. *Pharmaceutical Research*, 15, 1828–1834.
- Shan, B., Cai, Y.Z., Sun, M. & Corke, H. (2005). Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of the*

-
- Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7749–7759.
- Shao, X., Chen, H., Zhu, Y., Sedighi, R., Ho, C.-T., & Sang, S. (2014). Essential structural requirements and additive effects for flavonoids to scavenge methylglyoxal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 3202–3210.
- Shilpi, D. & Mishra, S. (2017). Box-Behnken statistical design to optimize preparation of activated carbon from *Limonia Acidissima* shell with desirability approach. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5 (1), 588–600.
- Silalai, N., Sirilert, T., Roos, Y.H., Potes, N. & Devahastin, S. (2016). Role of solids composition on α -relaxation behavior, molecular structure and stability of spray-dried xanthenes encapsulation systems around glass transition. *Journal of Food Engineering*, 174, 85–91.
- Singleton, V.L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventós, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299 (1974), 152–78.
- Sirichai, A., Sompong, W., Meeprom A., Ngamukote, S. & Yibchok-anun, S. (2012). Cinnamic acid and its derivatives inhibit fructose-mediated protein glycation. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 1778-1789.
- Slade, L. & Levine, L. (1991). A food polymer science approach to structure property relationships in aqueous food systems: Nonequilibrium behavior of carbohydrate–water systems. In H. Levine, & L. Slade (Eds.), *Water relationships in food*. New York: Plenum Press.
- Sogi Singh, D., Siddiq, M., Greiby, I. & Dolan, K.D. (2013). Total phenolics, antioxidant activity, and functional properties of ‘Tommy Atkins’ mango peel and kernel as affected by drying methods. *Food Chemistry*, 141 (3), 2649–2655.
- Somoza, V. (2005). Five years of research on health risks and benefits of Maillard reaction products: An update. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49, 663–672.
- Sowbhagya, H.B. (2013). Chemistry, technology, and nutraceutical functions of cumin (*Cuminum Cyminum L*): An overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53 (1), 1–10.
- Sperling, L.H. (2006). In L. H. Sperling (Ed.), *Introduction to physical polymer science*. NJ: John Wiley & Sons, Inc.

- Srinivasan, K. (2006). Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*): A review of health beneficial physiological effects. *Food Reviews International*, 22 (2), 203–224.
- Srinivasan, K. (2007). Black pepper and its pungent principle-piperine: A review of diverse physiological effects, critical reviews. In *Food Science and Nutrition*, 47 (8), 735-748.
- Sumczynski, D., Kotásková, E., Orsavová, A. & Valášek, P. (2017). Contribution of individual phenolics to antioxidant activity and in vitro digestibility of wild rices (*Zizania aquatica* L.). *Food Chemistry*, 218, 107-115.
- Suzuki, R., Okada, Y. & Okuyama, T. (2003). Two flavone C-glycosides from the style of *Zea mays* with glycation inhibitory activity. *Journal of Natural Products*, 66, 564-565.
- Szejtli, J. (1998). Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chemical Reviews*, 2665 (97), 1743–1753.
- Szente, L., & Szejtli, J. (2004). “Cyclodextrins as food ingredients.” *Trends in Food Science & Technology*, 15 (3–4), 137–142.
- Talmaciu, A.I., Volf, I. & Popa, V.I. (2015). A comparative analysis of the ‘green’ techniques applied for polyphenols extraction from bioresources. *Chemistry and Biodiversity*, 12 (11), 1635–1651.
- Teng J., Hu, X., Tao, N. & Wang, M. (2018). Impact and inhibitory mechanism of phenolic compounds on the formation of toxic Maillard reaction products in food. *Frontiers of Agricultural Science and Engineering*, 5(3), 321–329.
- Thornalley, P.J. (2003). Use of aminoguanidine (*Pimagedine*) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 419, 31–40.
- Thornalley, P.J. (2005). Dicarbonyl intermediates in the Maillard reaction. *Ann. N.Y. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1043, 111–117.
- Thornton, D.J., Carlstedt, I., Howard, M., Devine, P.L., Price, M.R. & Sheehan, J.K. (1996). Respiratory mucins: Identification of core proteins and glycoforms. *Biochemical Journal*, 316, 967–975.
- Uribarri, J., Cai, W. & Sandu, O. (2005). Diet-derived advanced glycation end products

- are major contributors to the body's AGE pool and induce inflammation in healthy subjects. *Ann. NY. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1043, 461–466.
- van Boekel, M.A.J.S. & Zia-ur-Rehman. (1987). Determination of HMF in heated milk by HPLC. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 41(4), 297-306.
- Variyar, P.S., Pendharkar, M.B., Banerjee, A. & Bandyopadhyay, C. (1988). Blackening of green pepper berries. *Phytochemistry*, 27, 715–718.
- Verzija, N., DeGroot, J., Oldehinkel, E., Bank, R.A., Thorpe, S.R., Baynes, J.W., Bayliss, M.T., Bijlsma, J.W., Lafeber, F.P., & Tekoppele, J.M.. (2000). Age-related accumulation of Maillard reaction products in human articular cartilage collagen. *Biochemical Journal*, 350 (Pt 2), 381–387.
- Vikas, Y., Sandeep, K., Braham, D., Manjusha, C. & Vikas, B. (2018). Cyclodextrin complexes: An approach to improve the physicochemical properties of drugs and applications of cyclodextrin complexes. *Asian Journal of Pharmaceutics, (Suppl)*, 12 (2) S394.
- Vistoli, G., De Maddis, D., Cipak, A., Zarkovic, N., Carini, M. & Aldini, G. (2013). Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): An overview of their mechanisms of formation. *Free Radical Research*, 47, 3–27.
- Viuda-Martos, M., Fernandez-Lopez, J. & Perez-Alvarez, J.A., (2010). Pomegranate and its many functional components as related to human health: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 635-654.
- Vlassara, H. & Uribarri, J. (2013). Advanced glycation end products (AGE) and diabetes: Cause, effect, or both. *Current Diabetes Reports*, 14(1) 453.
- Vösgen, B. & Herrmann, K. (1980). Flavonglykoside von pfeffer (*Piper nigrum* L.), gewürznelken (*Syzygium aromaticum* L.) und piment (*Pimenta dioica* L.), *Z. Lebensmittel Untersuch Forsch*, 170, 204–7.
- Wakte, P.S., Sachin, B.S., Patil, A.A., Mohato, D.M. Band, T.H., & Shinde, D.B. (2011). Optimization of microwave, ultra-sonic and supercritical carbon dioxide assisted extraction techniques for curcumin from curcuma longa. *Separation and Purification Technology*, 79 (1), 50–55.
- Wang, W.Q., Bao, Y.H. & Chen, Y. (2013). Characteristics and antioxidant activity of

- water-soluble Maillard reaction products from interactions in a whey protein isolate and sugars system. *Food Chemistry*, 139 (1–4), 355–361.
- Wojdyło, A., Oszmiański, J. & Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105 (3), 940–949.
- Wu, C.-H. & Yen, G.C. (2005). Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the formation of advanced glycation end products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (8), 3167–73.
- Wu, K., Zhang, W., Addis, P.B., Epley, R.J., Salih, A.M. & Lehrfeld, J. (1994). Antioxidant properties of wild rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42 (1), 34–37.
- Yalayan, V.A., Wnorowski, A. & Perez Locas, C. (2003). Why asparagine needs carbohydrates to generate acrylamide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1753–1757.
- Yan, N., Du, Y., Liu, X., Chu, C., Shi, J., Zhang, H., Liu, Y. & Zhang, Z. (2018). Morphological characteristics, nutrients, and bioactive compounds of *Zizania latifolia*, and health benefits of its seeds. *Molecules*, 23, 1561-1577.
- Yawadio R., Tanimori, S. & Morita, N. (2007). Identification of phenolic compounds isolated from pigmented rices and their aldose reductase inhibitory activities. *Food Chemistry*, 101(4), 1616-1625.
- Yaylayan, V.A. (2003). Recent advances in the chemistry of strecker degradation and Amadori rearrangement: Implications to aroma and color formation. *Food Science and Technology Research*, 9, 1–6.
- Yeh, W.J., Hsia, S.M., Lee, W.H. & Wu, C.H. (2017). Polyphenols with antiglycation activity and mechanisms of action: A review of recent findings. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25, 84-92.
- Yim, H.-S., Kang, S.-O., Hah, Y.-C., Boon Chock, P. & Yim, M.B. (1995). Free radicals generated during the glycation reaction of amino acids by methylglyoxal. *The Journal of Biological Chemistry*, 270, 28228 –28233.
- Yu, A.N., Zhou, Y.Y. & Yang, Y.N. (2017). Kinetics of browning and correlations between browning degree and pyrazine compounds in L-ascorbic acid/acidic amino acid model systems. *Food Chemistry*, 221, 1678–84.

- Zamora, R., Delgado, R.M. & Hidalgo, F.J. (2011). Strecker aldehydes and α -keto acids, produced by carbonyl-amine reactions, contribute to the formation of acrylamide. *Food Chemistry*, 128(2), 465-70.
- Zanoni, B., Peri, C. & Bruno, D. (1995). Modelling of browning kinetics of bread crust during baking. *LWT - Food Science and Technology*, 28 (6), 604–609.
- Zhang, L. & Lokeshwara, B.L. (2012). Medicinal properties of the Jamaican pepper plant *pimenta dioica* and allspice. *Current Drug Targets*, 13, 1900-1906.
- Zhang, M., Guo, B., Zhang, R., Chi, J., We, Z., Xu, Z., Zhang, Y. & Tang, X. (2006). Separation, purification and identification of antioxidant compositions in black rice. *Agricultural Sciences in China*, 5, 431-440.
- Zhang, Y., Ma, H., Liu, W., Yuan, T., & Seeram, N.P. (2015). New antiglycative compounds from cumin (*Cuminum Cyminum*) spice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63 (46), 10097–10102.
- Zhou, Y.-Y., Li, Y. & Yu, A.-N. (2016). The effects of reactants ratios, reaction temperatures and times on Maillard reaction products of the L-ascorbic acid/L-glutamic acid system. *Food Science and Technology*, 36(2), 1–7.
- Zhu, R.-G., Cheng, H., Li, L., Erichsen, H.R., Petersen, M.A., Soerensen, J. & Skibsted, L.H. (2018). Temperature effect on formation of advanced glycation end products in infant formula milk powder. *International Dairy Journal*, 77, 1–9.

ANEXOS



ANEXOS
Anexo I. Publicaciones generadas durante la presente tesis
I.a. Publicaciones en revistas internacionales con referato

Porras-Saavedra, J.* , Favre, L.C.* , Alamilla-Beltrána, L., Mazzobre, M.F., Gutiérrez-López, G.F. & Buera, M.P. (2019). Thermal transitions and enthalpic relaxations as related to the stability of microencapsulated paprika powders. *Journal of Food Engineering*, 245, 88-95. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.10.010>

* These authors have contributed equally to this work. International collaboration.

Favre, L.C., dos Santos, C., López-Fernández, M.P., Mazzobre, M.F. & Buera, M.P. (2018). Optimization of β -Cyclodextrin-based Extraction of Antioxidant and Anti-browning Activities from Thyme Leaves by Response Surface Methodology. *Food Chemistry*, 265, 86-95. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.078>.

Moyano, L., Correa, M.D., Favre, L.C., Rodríguez, F.S., Maldonado, S., López-Fernández, M.P. (2018). Activation of Nucleases, PCD, and Mobilization of Reserves in the *Araucaria angustifolia* Megagametophyte During Germination. *Frontiers in PlantScience*, 9, 1-13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01275>.

I.b. Publicaciones en actas de reuniones científicas nacionales e internacionales

Entre los años 2015 y 2018.

2018. Rolandelli, G.; Favre, L. C.; dos Santos, C.; Mazzobre, M. F.; Farroni, A. E.; Buera, M. P. Póster: **Optimización de la extracción de compuestos bioactivos de harina de marlo de maíz morado mediante Metodología de Superficie de Respuesta**. VII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2018). Córdoba, Argentina.

2018. Pabon Mendoza, M. I.; Favre, L. C.; Mazzobre, M. F.; dos Santos Ferreira, C.; Buera, M. P. **Estudio de las propiedades antioxidantes de extractos de Caléndula *Officinalis* obtenidos por extracción asistida por ultrasonido**. VII

- Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2018). Córdoba, Argentina.
2018. Guido Rolandelli; **Leonardo C. Favre**; Sergio Pérez Burillo; M. Florencia Mazzobre; Abel E. Farroni; José Á. Rufián Henares; M. del Pilar Buera. Póster y Oral: **Residuos de la producción industrial de aceite de jojoba: revalorización de compuestos bioactivos con potencial capacidad antioxidante**. Foro de la Alimentación, la Nutrición y La Salud (FANUS 2018). Potencial de los residuos de la producción primaria y de la industrialización de alimentos como fuentes de sustancias bioactivas. Buenos Aires, Argentina.
2018. **Favre, L. C.**; dos Santos, C. López-Fernández, M. P. Buera, M. del P. Póster: **Optimización de la Extracción Asistida por Ultrasonido de Bioactivos de Tomillo por Metodología de Superficie de Respuesta**. Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas (CLICAP 2018). San Rafael, Mendoza, Argentina. ISBN 978-987-46333-1-6.
2018. López-Fernández, M. P.; **Favre, L. C.**; Rodríguez, S. D.; Busch, V. M.; María D. Correa; Buera, M. del P. Póster: **Caracterización de las Propiedades Térmicas y Funcionales del Almidón de Quinoa Proveniente del Noroeste Argentino**. Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas (CLICAP 2018). San Rafael, Mendoza, Argentina. ISBN 978-987-46333-1-6.
2017. **Favre, L. C.**; López-Fernandez, M. Paula; dos Santos, C.; Mazzobre, M. F.; Rufián-Henares, J. A.; Buera, M. P. Póster: **Ultrasound Assisted Molecular Encapsulation of Anti-glycation and Antioxidant Thyme Components in β -Cyclodextrin**. São Paulo School of Advanced Sciences on Reverse Engineering of Processed Foods. Campinas, Brasil.
2017. **Favre, L. C.**; López-Fernández, M. P.; Pérez Burillo, S.; Mazzobre, M. F.; Rufián Henares, J. A.; Buera, M. P. Póster: **Actividad Anti-glicante y Contenido de Polifenoles en Extractos de Tomillo**. XI versión del Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos (CIBIA 2017). Valparaíso, Chile.
2017. **Favre, L. C.**; dos Santos, C.; López-Fernández, M. P.; Mazzobre, M. F.; Buera, M. P. Póster: **Encapsulación Molecular de Componentes de Tomillo en β -**

-
- Ciclodextrina Asistida por Ultrasonido.** XI versión del Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos (CIBIA 2017). Valparaíso, Chile.
2017. López-Fernández, M. P.; Busch, V. M.; Favre, L. C.; Maldonado, S. B.; Buera M. P. Póster: **Obtención, Caracterización Térmica y Evaluación del Comportamiento Reológico de Nanocristales de Almidón de Quinoa.** XI versión del Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos (CIBIA 2017). Valparaíso, Chile.
2017. Favre, L. C.; López-Fernández, M. P.; dos Santos, C.; Mazzobre, M. F.; Buera, M. del Pilar. **Extracción Asistida por Ultrasonido y Encapsulación Molecular en β -Ciclodextrina de Bioactivos de Tomillo.** XIX Congreso y XXXVII Reunión Anual de La Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, Santa Fe, Argentina.
2017. Correa, M. D.; Moyano, L.; Rodríguez, F.; Favre, L. C.; Maldonado, S. B.; Buera, M. del P.; López-Fernández, M. P. **Investigación Sobre la Muerte Celular en el Protalo de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze en Semillas Post-germinadas.** XIX Congreso y XXXVII Reunión Anual de La Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, Santa Fe, Argentina.
2016. Favre, L. C.; Rodríguez, S. D.; Mazzobre, M. F.; Buera, M. P. Póster: **Relaciones entre Opacidad, Coeficientes de Dispersión de la Luz Durante el Secado de Rodajas de Papa por Convección.** VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2016). Córdoba, Argentina.
2016. Sancio, M.; Favre, L. C.; López-Fernández, M. P.; Rodríguez, S. D.; Buera, M. P. Póster: **Detección de Adulteraciones en Harina de Quinoa con Harina de Trigo Mediante Espectroscopía Infrarroja y Quimiometría.** VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2016). Córdoba, Argentina.
2016. López-Fernández, M. P.; Rodríguez, S. D.; Favre, L. C.; Maldonado, S. B.; Buera, M. P. Póster: **Identificación y Análisis de la Enzima GBSS en 5 Ecotipos de Quinoa y su Relación con el Contenido de Amilosa.** VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, (CICYTAC 2016). Córdoba, Argentina.

2015. **Favre, L. C.**; Chesini, M.; Aleu, H. H.; Broggi, L. E.; Tesouro, R.; Lound, L. H.
Póster: **Inactivación Térmica de Tres Serotipos de *Salmonella* en Albúmina de Huevo Deshidratada.** VII Simposio Internacional de Innovación y Desarrollo de Alimentos. X Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos (INNOVA-CIBIA 2015). Montevideo, Uruguay.
2015. **Favre, L. C.**; Porras-Saavedra, J.; Mazzobre, M. F.; Alamilla, L.; Buera, M. P.
Póster: **Estudio Comparativo de las Características Físicas de Formulaciones de Oleorresina de Pimentón Secadas por Spray o por Liofilización.** Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas (CLICAP 2015). San Rafael, Mendoza, Argentina. ISBN 978-987-575-119-4.