

73931

BOIERO, MARIA LAURA

Estudio del efectc, p

2014

73931



Crear... Crear... Crecer...

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS,
FÍSICO-QUÍMICA Y NATURALES.

**ESTUDIO DEL EFECTO PROTECTOR DE CAROTENOIDES
MICROENCAPSULADOS SOBRE ALTERACIONES QUÍMICAS,
FOTOQUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS EN PRODUCTOS
LÁCTEOS**

por

María Laura Boiero

Tesis presentada para la obtención del Grado de Doctor en Ciencias
Químicas

Director: Dr. Norman Andino García

Co-Director: Dra. Mariana Angélica Montenegro

Río Cuarto, Abril 2014.

73931

MFN:
Clasif:
T.898

**ESTUDIO DEL EFECTO PROTECTOR DE CAROTENOIDES
MICROENCAPSULADOS SOBRE ALTERACIONES QUÍMICAS,
FOTOQUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS EN PRODUCTOS
LÁCTEOS**

por

María Laura Boiero



Dr. Norman Andino García

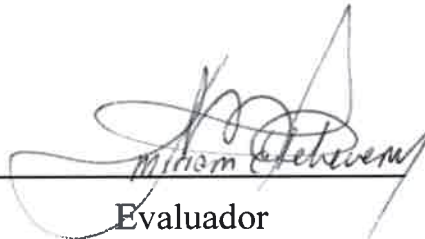
Director



Dra. Mariana Angélica Montenegro

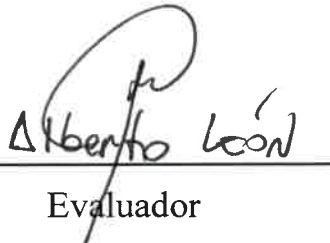
Co-Director

Aprobada por:



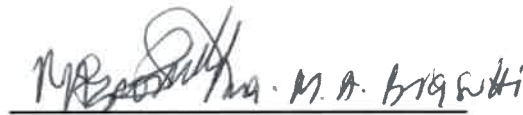
miroslav

Evaluador



Alberto León

Evaluador



M. A. Braganti

Evaluador

Rio Cuarto, Abril de 2014

DEDICATORIA

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

A todos los que de una manera u otra realizaron un aporte a este trabajo de tesis,

A mi Director Dr. Norman A. García, quien me brindó su predisposición y apoyo, además de su calidez y sencillez como persona.

A mi Co-directora Dra. Mariana A. Montenegro, por confiar y creer en mí, y ser mi guía en la formación científica, apoyándome y alentandome en todo momento. Además personalmente, por su cariño y su amistad.

A la Mg. Silvia Moyano por su entera predisposición y constante aporte de su conocimiento.

A compañeras de laboratorio Virginia, Romina, Noelia, Nadia, por todos los momentos compartidos, y por el apoyo que me han brindado día a día.

A Bernardo, por la predisposición y bondad que lo caracteriza, y por haberme ayudado en parte del desarrollo de esta tesis.

A mis amigos, Romina, Jaqueline, Carola, Federico, que forman parte de mi vida, por acompañarme y apoyarme siempre, apuntándome en momentos difíciles.

A mi madre y hermanos, por haber formado la persona que hoy soy, por haberme alentado y apoyado a transitar el camino profesional que elegí.

A los Miembros de la Comisión de Tesis, Los Dres. Alicia Biasutti, Miriam Etcheverry y Alberto León, por los aportes y el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

A Cecilia Challier, por haberme acompañado y ayudado miles de veces.

A la Universidad Tecnológica Nacional-Facultad Regional Villa María, por haberme brindado el lugar de trabajo, y apoyo para la realización de cursos y congresos.

A la Universidad Tecnológica Nacional, Ministerio de Ciencia y Tecnología de Córdoba, y CONICET, por el apoyo financiero e institucional.

A todos, GRACIAS.

RESUMEN

Las modificaciones en la calidad química y microbiológica de la leche y otros productos lácteos están relacionadas a diferentes factores. Las alteraciones nutricionales pueden ser causadas por especies reactivas las cuales producen oxidación de proteínas, lípidos, vitaminas, entre otros componentes. Mientras que las organolépticas involucran pérdidas del flavor por la generación de compuestos volátiles de aroma indeseado, debido principalmente al desarrollo de microorganismos y a procesos oxidativos.

Si bien, los alimentos contienen preservantes naturales, en muchos casos se pierden durante el procesamiento y almacenamiento, por lo que deben ser adicionados de manera exógena. La tendencia actual, es la de emplear conservantes naturales.

Los carotenoides son eficientes antioxidantes naturales, ya que impiden la formación de especies reactivas de oxígeno o disminuyen su concentración, protegiendo a compuestos biológicos de la acción nociva de dichas especies. Sin embargo, por su estructura química reactiva e hidrofóbica, en el presente trabajo se empleó el proceso de microencapsulación, como una forma de estabilizar y vehicular los carotenoides en medios acuosos, sin alterar la capacidad antioxidante.

En este trabajo, se evaluó el efecto protector de carotenoides microencapsulados en polímeros comestibles sobre las alteraciones nutricionales (vitaminas, lípidos y proteínas) y organolépticas (desarrollo de off-flavor y microorganismos) en leche, durante el almacenamiento en refrigeración y expuesto a iluminación.

Para ello se preparó carotenoides microencapsulados empleando goma arábica como material de pared. Los microencapsulados y la cápsula vacía, se adicionaron a leche almacenada a temperatura de refrigeración y se estudió el efecto protector frente a la oxidación de vitaminas, específicamente Ribofavina, que además actúa como sensibilizador. Es decir, es capaz de absorber luz y generar especies de estado excitado, que continúan el proceso oxidativo. Se evaluó además, el efecto fotoprotector de la adición de los microencapsulados sobre la oxidación de lípidos (en diferentes estadios de desarrollo oxidativo) y proteínas, comparado con un control mantenido en oscuridad.

Por otra parte, se estudió el efecto protector de los compuestos naturales sobre alteraciones organolépticas de leche. Para ello se evaluó si los carotenoides y goma arábica, ambos sin encapsular, poseen actividad antimicrobiana sobre el desarrollo de

microorganismos de referencia empleados para su estudio *in vitro*. Finalmente, se estudió si los carotenoides microencapsulados poseen actividad antimicrobiana sobre el crecimiento de microorganismos posibles contaminantes de leche.

En cuanto al efecto protector sobre la degradación oxidativa de la leche, se comprobó que β -caroteno microencapsulado en goma arábica y el material de pared de la cápsula, ejercieron una reducción del 30 % de la fotodegradación de Riboflavina, entre un 35 y 55% en la oxidación fotoinducida de lípidos por la goma arábica y un 25 % de reducción de generación de compuestos volátiles generadores de off-flavours. Además, se demostró que los carotenoides puros, microencapsulados y el material de pared, poseen un efecto bacteriostático sobre el crecimiento de microorganismos de referencia y aislados de leche cruda.

En base a los resultados obtenidos, se puede concluir que tanto los carotenoides microencapsulados, como el material de pared goma arábica, ejercen un efecto protector sobre las alteraciones químicas, fotoquímicas y microbiológicas en leche. Esto sustenta que la incorporación de compuestos naturales en productos lácteos, disminuye o retarda el deterioro durante el periodo de almacenamiento.

ABSTRACT

Chemical and microbiological quality's changes in milk and dairy products are related to different factors. Nutritional's alterations may be caused by reactive species which produce oxidation of proteins, lipids, vitamins, among other components. While organoleptic alterations involve flavor losses by the generation of undesirable flavor volatiles, mainly due to the microorganism's growth and oxidative processes.

Although, foods contain natural preservatives in many cases are lost during processing and storage, so they must be added exogenously. The current trend is to use natural preservatives.

Carotenoids are efficient natural antioxidants, because they prevent the formation of reactive oxygen species or reduce its concentration, protecting biological compounds from harmful effects of these species. However, due to chemical reactive structure and hydrophobic, at the present work microencapsulation process was used as a way of stabilizing and carrying carotenoids in aqueous media, without modify its antioxidant capacity.

In this study, was evaluated the protective effect of carotenoids microencapsulated in edible polymers over nutritional alterations (vitamins, lipids and proteins) and organoleptic (development of off-flavor and microorganisms growth) in milk during refrigerated storage and exposed to light is evaluated.

For this microencapsulated carotenoid using gum arabic as wall material, were prepared. Microencapsulated and the empty capsule, were added to milk stored at refrigeration temperature and the protective effect against vitamins's oxidation were studied, specifically on Ribofavina, which also acts as a sensitizer. That means, it is capable of absorbing light and generating excited state species, which continue the oxidative process. It was also evaluated the photoprotective effect of microencapsulated added in milk, on lipid oxidation (at different stages of oxidative development) and proteins, compared to a control maintained in darkness.

Moreover, the protective effect of natural compounds on organoleptics changes from milk was studied. This assesses whether carotenoids and acacia, both unencapsulated possess antimicrobial activity on the development of reference organisms used for in vitro study. Finally, it was evaluate whether microencapsulated

carotenoids have antimicrobial activity against the growth of milk contaminating microorganisms.

About the protector effect over milk's oxidative degradation, It was proved that microencapsulated carotenoid in gum arabic and the wall material, exerted a 30% reduction of Riboflavin's fotodegradation, between a 35 and 55 % in fotoinduced lipid's oxidation by the gum Arabic and 25% of reduction of volatile compounds production off flavour generators. It was further demonstrated that carotenoids pure and microencapsulated and also the wall material, had a bacteriostatic effect on growth of reference and isolated from raw milk microorganisms.

Based on these results, It can be concluded that as microencapsulated carotenoid as wall material gum arabic, exert a protector effect on the chemical, photochemical and microbiological alterations in milk. This supports the incorporations of natural compounds in dairy products, decreases or slow deterioration during storage period.

Índice

	Página
Resumen	V
Abstract	VII
Índice	VIII
Índice de Tablas	XV
Índice de figuras	XVI
Abreviaturas y símbolos	XIX
CAPÍTULO 1. Introducción	1
1. Introducción General y Objetivos	1
2. Bibliografía	4
CAPÍTULO 2. Degradaciones Químicas, Fotoquímicas y Microbiológicas	6
1. OXIDACIÓN POR ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	6
<i>1.1. Oxígeno y sus Derivados.</i>	7
1.1.1. Radical Anión Superóxido, $O_2^{\bullet-}$	8
1.1.2. Radical Hidroxilo, HO^{\bullet}	9
1.1.3. Peróxido de Hidrógeno, H_2O_2	9
1.1.4. Oxígeno Molecular Singulete, $O_2(^1\Delta_g)$	10
1.1.4.1. Fotosensibilización	11
1.1.4.2. Mecanismos de Fotosensibilización	13
1.2. Antioxidantes	15
1.2.1. Antioxidantes enzimáticos	16
1.2.1.1. Superóxido Dismutasa	16
1.2.1.2. Catalasa	16
1.2.1.3. Glutación Peroxidasa	17
1.2.2. Antioxidantes No-enzimáticos	17
1.2.2.1. Vitamina C	17
1.2.2.2. Vitamina E	18

1.2.2.3. <i>Carotenoides</i>	18
2. DEGRADACIÓN MICROBIANA	19
2.1. <i>Desarrollo microbiano</i>	20
2.2. <i>Conservación</i>	24
2.3. <i>Capacidad Antimicrobiana</i>	25
2.3.1. <i>Agente Antimicrobiano</i>	26
3. CONCLUSIÓN	30
4. BIBLIOGRAFÍA	30
CAPÍTULO 3. Características, Propiedades y Funciones de Carotenoides y Goma Arábica	38
1. CAROTENOIDES	38
1.1 <i>Estructura Química</i>	38
1.2 <i>Estructura Electrónica y Espectroscópica.</i>	39
1.3 <i>Propiedades Biológicas</i>	40
1.3.1. <i>Actividad Provitamina A</i>	40
1.3.2. <i>Funciones Inmune.</i>	41
1.4 <i>Propiedades Fisicoquímicas</i>	41
1.5 <i>Actividad Antioxidante</i>	42
1.5.1. <i>Interacción de CAR con radicales libres</i>	42
1.5.2. <i>Reacción de CAR con Radical Peroxilo</i>	43
1.5.3. <i>Desactivación de Oxígeno Singulete</i>	44
1.6 <i>Actividad Prooxidante</i>	46
1.7 <i>Interacción con otros Antioxidantes</i>	47
1.8 <i>Actividad Antimicrobiana</i>	48
1.9 <i>Microencapsulación de Carotenoides</i>	50
1.9.1. <i>Métodos de Microencapsulación</i>	50
1.9.1.1. <i>Secado por Aspersión</i>	51
1.9.2. <i>Materiales de Pared</i>	52
2. GOMA ARÁBIGA	54
2.1. <i>Composición y Estructura Química</i>	54
2.2. <i>Propiedades Biológicas</i>	59

2.2.1.	<i>Propiedades Emulsificantes</i>	60
2.2.2.	<i>Propiedades Farmacológicas</i>	60
2.2.3.	<i>Actividad Antioxidante</i>	63
2.2.4.	<i>Actividad Antimicrobiana</i>	64
3.	BIBLIOGRAFÍA	65
CAPÍTULO 4.	Capacidad Antioxidante De Carotenoides	80
	Microencapsulados	
1.	INTRODUCCIÓN	80
1.1.	<i>Métodos de Determinación de Actividad Antioxidante</i>	81
1.1.1.	<i>Ensayos Basados en TAH</i>	84
1.1.2.	<i>Ensayos Basados en TE</i>	84
1.1.3.	<i>Ensayos de Desactivación de Especies Radicalarias de Oxígeno</i>	87
1.1.4.	<i>Desactivación de Especies Excitadas No Radicalarias.</i>	88
1.1.4.1.	<i>Generación y Desactivación de $O_2(^1\Delta_g)$</i>	88
1.1.4.2.	<i>Generación y Desactivación de Estados Tripletas Excitados de Sensibilizadores</i>	92
2.	OBJETIVOS	94
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	94
3.1.	<i>Reactivos</i>	94
3.2.	<i>Microencapsulación de Carotenoides</i>	94
3.3.	<i>Desactivación de Especies Radicalarias</i>	95
3.3.1.	<i>Desactivación del Radical HO^\bullet</i>	95
3.3.2.	<i>Desactivación del Radical Anión Superóxido $O_2^{\bullet-}$</i>	96
3.4.	<i>Desactivación de Especies No Radicalarias</i>	97
3.4.1.	<i>Reactividad de GA Frente a $O_2(^1\Delta_g)$</i>	97
3.4.2.	<i>Desactivación de Triplete de RF</i>	97
3.5.	<i>Análisis estadístico</i>	98
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	98
4.1.	<i>Desactivación de Especies Radicalarias</i>	98
4.1.1.	<i>Desactivación del Radical Hidroxilo HO^\bullet</i>	98

4.2.1.	<i>Desactivación del Radical Anión Superóxido $O_2^{\bullet-}$</i>	99
4.2.	<i>Desactivación de Especies No Radicalarias</i>	102
4.2.1.	<i>Reactividad de GA frente a $O_2(^1\Delta_g)$</i>	102
4.2.2.	<i>Desactivación de Triplete de RF</i>	104
5.	CONCLUSIÓN	107
6.	BIBLIOGRAFÍA	107
CAPÍTULO 5.	Capacidad Protectora de β-Caroteno Microencapsulado	115
Sobre Degradaciones Fotoinducidas en Leche		
1.	INTRODUCCIÓN	115
1.1.	<i>Propiedades Espectroscópicas de RF</i>	116
1.2.	<i>Mecanismos de Fotosensibilización por RF</i>	117
1.3.	<i>Oxidación de Compuestos Biológicos</i>	120
1.3.1.	<i>Vitaminas</i>	120
1.3.2.	<i>Lípidos</i>	122
1.3.3.	<i>Aminoácidos, Péptidos y Proteínas</i>	125
1.4.	<i>Estrategias Antioxidantes</i>	126
2.	OBJETIVOS	127
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	127
3.1.	<i>Reactivos</i>	127
3.2.	<i>Ensayo de Fotooxidación de Leche</i>	127
3.2.1.	<i>Preparación de Muestras</i>	127
3.2.2.	<i>Muestras</i>	128
3.3.	<i>Fotooxidación de RF en Leche</i>	128
3.3.1.	<i>Cinética I con adición de GA</i>	128
3.3.2.	<i>Cinética II con adición de Bc-GA</i>	129
3.4.	<i>Determinación de Oxidación Lipídica en Leche</i>	130
3.4.1.	<i>Extracción de la fracción lipídica</i>	130
3.4.2.	<i>Determinación de Sustancias Reactivas con Ácido Tiobarbitúrico (TBARs)</i>	131
3.4.2.1.	<i>Determinación del Número de Peróxidos en Lípidos</i>	132
3.4.2.2.	<i>Determinación de la Composición de Ácidos Grasos</i>	133

<i>Total de Leche</i>	
3.4.2.3. <i>Determinación de Compuestos Volátiles en Leche</i>	134
3.4.3. <i>Fotooxidación de Proteínas</i>	135
3.4.3.1. <i>Cuantificación de Proteínas en Leche</i>	135
3.4.3.2. <i>Electroforesis en Geles de Poliacrilamida</i>	136
3.5. <i>Análisis Estadístico</i>	138
4. RESULTADOS	138
4.1. <i>Fotoprotección de Riboflavina en Leche</i>	138
4.1.1. <i>Mecanismos de Fotoprotección de RF en Leche</i>	142
4.2. <i>Fotoprotección de Lípidos en Leche</i>	144
4.2.1. <i>Determinación de Sustancias Reactivas con Ácido Tiobarbitúrico (TBARs)</i>	144
4.2.2. <i>Determinación del Número de Peróxidos en Lípidos</i>	145
4.2.3. <i>Determinación de Ácidos Grasos Total de Leche</i>	147
4.2.4. <i>Determinación de Compuestos Volátiles en Leche</i>	151
4.3. <i>Oxidación de Proteínas Fotoinducida</i>	158
4.3.1. <i>Fotoprotección de Proteínas en Leche</i>	161
4.3.1.1. <i>Identificación de Proteínas</i>	162
5. CONCLUSIÓN	169
6. BIBLIOGRAFÍA	170
CAPÍTULO 6. Actividad Antimicrobiana de Carotenoides Microencapsulados, Frente a Microorganismos de Referencia y Aislados de Leche.	183
1. INTRODUCCIÓN	183
1.1. <i>Preservantes Químicos</i>	183
1.1.1. <i>Ácidos Orgánicos Débiles</i>	183
1.1.2. <i>Peróxido de Hidrógeno</i>	184
1.1.3. <i>Agentes Quelantes</i>	184
1.2. <i>Preservantes Naturales</i>	185
1.2.1. <i>Pequeñas Biomoléculas Orgánicas</i>	185
1.2.2. <i>Péptidos y Proteínas Perturbadoras de Membrana</i>	185
1.2.3. <i>Perturbadores de Pared Celular</i>	185

1.3.	<i>Leche Cruda</i>	186
1.4.	<i>Métodos para Determinar la Microflora Bacteriana en Leche Cruda</i>	190
1.5.	<i>Preservación de la Calidad Microbiológica y Nutricional de la Leche</i>	191
2.	OBJETIVOS	193
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	193
3.1.	<i>Carotenoides</i>	193
3.2.	<i>Reactivos</i>	194
3.3.	<i>Medios de Cultivo</i>	194
3.3.1.	<i>Composición de Medios de Cultivos</i>	194
3.4.	<i>Microorganismos de Referencia</i>	195
3.5.	<i>Aislamiento y Caracterización de Microorganismos de Leche Cruda</i>	196
3.5.1.	<i>Caracterización Genotípica de los Aislamientos</i>	196
3.5.1.1.	<i>Amplificación y Secuenciación del Gen 16S ARNr</i>	196
3.6.	<i>Determinación de Actividad Antimicrobiana por Difusión en Agar</i>	197
3.6.1.	<i>Actividad Antimicrobiana de Carotenoides Puros</i>	198
3.6.2.	<i>AAM de Carotenoides Microencapsulados</i>	199
3.7.	<i>Determinación Actividad Antimicrobiana por Reducción de Velocidad de Crecimiento Microbiano</i>	199
3.7.1.	<i>Actividad Antimicrobiana de Carotenoides Microencapsulados Frente a Cepas de Referencia en Caldo Nutritivo</i>	200
3.7.2.	<i>Actividad Antimicrobiana de Carotenoides Microencapsulados, Frente a Cepas de Referencia en Leche</i>	200
3.8.	<i>Actividad Antimicrobiana de Carotenoides Microencapsulados Frente a Microorganismos Aislados en Leche</i>	201
3.9.	<i>Análisis Estadístico de los Resultados</i>	201
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	201
4.1.	<i>Aislamiento y Caracterización de Microorganismos de Leche</i>	201

	<i>Cruda.</i>	
4.2.	<i>Actividad Antimicrobiana de Carotenoides Puros</i>	206
4.3.	<i>Actividad Antimicrobiana de Carotenoides microencapsulados y Cápsula Vacía Frente a Cepas de Referencia.</i>	209
4.3.1.	<i>Determinación de Actividad Antimicrobiana por Método de Difusión en Agar</i>	209
4.3.2.	<i>Determinación de Actividad Antimicrobiana por Reducción de la Velocidad de Crecimiento</i>	213
4.3.2.1.	<i>Actividad Antimicrobiana en Caldo Nutritivo</i>	213
4.3.2.2.	<i>Actividad Antimicrobiana en Leche</i>	215
4.4.	<i>Actividad Antimicrobiana de Carotenoides Microencapsulados Frente a Microorganismos Aislados en Leche</i>	218
4.4.1.	<i>Actividad Antimicrobiana Frente a Gordonia spp.</i>	219
4.4.2.	<i>Actividad Antimicrobiana Frente a Enterobacter spp.</i>	220
4.4.3.	<i>Actividad Antimicrobiana Frente a Enterococcus spp.</i>	220
4.4.4.	<i>Actividad Antimicrobiana Frente a Pseudomonas spp. (no identificada por PCR)</i>	221
5.	CONCLUSIÓN	226
6.	REFERENCIAS	227
CAPÍTULO 7.	CONCLUSIONES GENERALES	242

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 3.1. Composición química y propiedades características de gomas provenientes de <i>Acacia senegal</i> y <i>Acacia seyal</i> .	55
Tabla 3.2. Contenido de aminoácidos de GA.	56
Tabla 4.1. Ensayos empleados para la determinación de la AAO y AAR.	83
Tabla 4.2. % Desactivación máximo y actividad antioxidante equivalente a SOD.	100
Tabla 5.1. Constantes de velocidad de segundo orden, para la desactivación del estado triplete excitado de riboflavina a 25 °C.	121
Tabla 5.2. Constante de velocidad observada de la fotodegradación de RF (k_{obs}) en leche, con y sin GA adicionada.	142
Tabla 5.3. Composición de ácidos grasos de leche en polvo entera, con y sin adición de GA, expuesta a 0 y 120 h de iluminación.	148
Tabla 5.4. Compuestos volátiles (%) determinados en leche, con y sin adición de GA, almacenada a 4 °C, en condiciones de luz (0 y 120 h) y en oscuridad.	153
Tabla 5.5. Porcentaje de Inhibición de volátiles generados a las 40 h de almacenamiento expuesto a luz fluorescente a 4 °C, por la adición de GA y Bc-GA, respecto de L Luz.	157
Tabla 5.6. Clasificación y composición de las proteínas de la leche.	159
Tabla 5.7. Porcentaje de fotoprotección (%FP) de GA y Bc-GA, frente al consumo de proteínas lácticas, en función de tiempo de exposición a iluminación.	167
Tabla 6.1. Microflora inicial, contaminante de leche cruda.	187
Tabla 6.2. Pruebas de Identificación de m.o. aislados de leche cruda.	202
Tabla 6.3. Identificación de aislamientos de leche cruda.	203
Tabla 6.4. Concentraciones inhibitorias mínima de Carotenoides en (μM), diámetro de halo de inhibición en (mm) en Agar Müeller-Hinton.	208
Tabla 6.5. Velocidad de crecimiento y porcentaje de reducción de <i>Bs</i> y <i>Ps</i> , en CN y leche.	217
Tabla 6.6. Velocidad de crecimiento de microorganismos aislados ($\mu \pm \text{SD}$ (h^{-1})), con y sin adición de GA y BcGA, con sus respectivos porcentajes de reducción de la velocidad de crecimiento (%R).	223

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 2.1. Orbitales moleculares para O ₂ en estado fundamental $^3\Sigma_g^-$.	7
Figura 2.2. Distribución de electrones en orbitales moleculares π^* en la molécula de oxígeno para el estado triplete fundamental y los estados singulete excitados de menor energía.	10
Figura 2.3. Diagrama de Jablonsky para las transiciones entre estados electrónicos de la molécula de S.	12
Figura 2.4. Esquema de mecanismos de fotosensibilización Tipo I y Tipo II.	15
Figura 3.1. Estructura isoprenoide y tetraterpenoide.	39
Figura 3.2. Estructura de carotenoides y apocarotenoides.	39
Figura 3.3. Mecanismo de desactivación de O ₂ ($^1\Delta_g$) por carotenoides.	45
Figura 3.4. Estructura química de CAR bixina y norbixina.	49
Figura 3.5. Estructura tipo Wattle blossom de la fracción alto peso molecular de goma de <i>Acacia Senegal</i> .	58
Figura 3.6. Representación esquemática de la estructura del complejo AGP de GA.	59
Figura 4.1. Señal típica de la fosforescencia de O ₂ ($^1\Delta_g$).	91
Figura 4.2. Arreglo experimental para la aplicación de la técnica de LFP.	93
Figura 4.3. % de Desactivación del radical HO [•] por Bc-GA, Apo8-GA, Apo12-GA y GA-MC-	99
Figura 4.4. % de Desactivación del radical O ₂ ^{-•} por: A) MC (BcGA, Apo8-GA, Apo12-GA y GA-MC), B) SOD.	100
Figura 4.5. Consumo de oxígeno en fotosensibilización de MB conteniendo (○) GA 8,4 μM y (■) His 1,4 mM.	103
Figura 4.6. Espectros de absorción de transiente observados después de la excitación láser a 355 nm de RF (34 μM) en MeOH-H ₂ O (50:50) saturada con N ₂ .	104
Figura 4.7. A) Decaimientos a 720 nm para RF en agua en función de la concentración de GA, a) 0 μM, b) 7μM, c) 14 μM. B) Relación lineal de k _{RF} con la concentración de GA.	105
Figura 4.8. Espectros de absorción de transiente registrados a 2, 6 y 60 μs después del pulso en láser a 355 nm de RF (34 μM) y GA 14 μM en MeOH-H ₂ O (50:50) saturada con N ₂ .	106
Figura 5.1. Estructura química de RF.	116

Figura 5.2. Espectros de absorción y emisión normalizados de RF en buffer fosfato pH 7,4.	117
Figura 5.3. Formación fotoinducida de estados excitados de RF.	117
Figura 5.4. Esquema de peroxidación lipídica de ácidos grasos insaturados.	124
Figura 5.5. Marcador de Peso Molecular de Proteínas no teñido, Thermo Scientific.	137
Figura 5.6. Cromatogramas de RF en leche con y sin adición de GA, almacenada a 4 °C, a las 0 y 60 hs de iluminación, determinados por HPLC con detector fluorescencia (FLD) a λ_{ex} 453 nm y λ_{em} 580 nm.	138
Figura 5.7. Cromatogramas que muestran el pico de RF en leche con y sin adición de Bc-GA, almacenada a 4 °C, a las 0 y 120 h de iluminación, determinado por HPLC y detector DAD a 270 nm.	139
Figura 5.8. (A) Espectro de absorción del fotoproducto formado por RF durante la exposición a la luz a 4 °C, en leche. (B) Perfiles cinéticos mostrados por el área del pico fotoproducto generado en función del tiempo de iluminación, con y sin adición de Bc-GA.	140
Figura 5.9. Cinéticas de primer orden de la degradación de RF en leche en polvo reconstituida almacenada a 4 °C, bajo condiciones de luz y oscuridad. A) Con adición de GA, B) Con adición de Bc-GA.	141
Figura 5.10. Espectros de emisión de la lámpara fluorescente y de absorción de RF, GA y Bc-GA en las concentraciones empleadas en los experimentos de fotooxidación de leche.	143
Figura 5.11. Concentración de TBARs, (mg MDA/Kg muestra) en leche con y sin adición de GA (A), a diferentes intervalos de tiempo de exposición a condiciones de luz y oscuridad a 4 °C durante 7 días.	144
Figura 5.12. (A) Número de peróxidos, expresados como meq de O ₂ /Kg lípido, extraídos de leche con y sin adición de GA, almacenada a 4 °C durante 7 días, bajo condiciones de luz y oscuridad. (B) Porcentaje de inhibición de formación de POVs en lípidos extraído de leche con GA adicionada, respecto de leche sin adición, en condiciones de iluminación.	146
Figura 5.13. Cinética de formación de volátiles (%) de, (A) pentanal, (B) hexanal, (C) heptanal, (D) dimetil disulfuro, producidos en leche con y sin adición de GA, expuesta a luz y oscuridad, durante 7 días a 4 °C.	155
Figura 5.14. Cinética de formación de volátiles (%) de, (A) pentanal, (B) hexanal, (C) heptanal, (D) dimetil disulfuro, producidos en leche con y sin adición de Bc-GA, expuesta a luz y oscuridad, durante 7 días a 4 °C.	156
Figura 5.15. Perfiles proteico de muestras de leche en polvo reconstituida expuesta a luz fluorescente a 4 °C, (A) Leche t ₀ y t ₁ , (B) Leche t ₀ y t ₃ .	161
Figura 5.16. Cinética individual de proteínas de leche, expuesta a luz fluorescente a 4 °C. Cada gráfico representa el porcentaje relativo de áreas, a cada tiempo respecto de tiempo cero (t/t ₀) resultante de un promedio de dos ensayos independientes de SDS-PAGE.	165
Figura 6.1. AAM determinada por difusión en agar, por CAR puros frente a A) <i>Bacillus subtilis</i> , B) <i>Micrococcus luteus</i> , C) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	207
Figura 6.2. Capacidad antimicrobiana de Bc-GA frente a los m.o. (A) <i>Bs</i> , (B) <i>Mc</i> y (C) <i>Ps</i> .	209

Figura 6.3. Capacidad antimicrobiana de Apo8-GA frente a los m.o. (A) <i>Bs</i> , (B) <i>Mc</i> y (C) <i>Ps</i> .	210
Figura 6.4. Capacidad antimicrobiana de Apo12-GA Frente a los m.o. (A) <i>Bs</i> ,(B) <i>Mc</i> y (C) <i>Ps</i> .	211
Figura 6.5. Control negativo del diluyente y control positivo de las cepas, frente al antibiótico Sulfato de Polimixina.	212
Figura 6.6. Curva de crecimiento de (A) <i>Bs</i> en CN a 37 °C, con y sin adición de GA, y (B) <i>Ps</i> en CN a 4 °C, con y sin la adición de GA.	214
Figura 6.7. Curva de crecimiento de <i>Bs</i> en leche, a 37 °C con y sin adición de (A) GA y (B) Bc-GA.	215
Figura 6.8. Curva de crecimiento de <i>Ps</i> en leche, a 4 °C con y sin adición de (A) GA y (B) Bc-GA.	216
Figura 6.9. Curva de crecimiento de <i>GO</i> en leche, a 4 °C con y sin adición de (A) GA y (B) Bc-GA.	219
Figura 6.10. Curva de crecimiento de <i>EB</i> en leche, a 4 °C con y sin adición de (A) GA y (B) Bc-GA.	220
Figura 6.11. Curva de crecimiento de <i>EC</i> en leche, a 4 °C con y sin adición de (A) GA y (B) Bc-GA.	221
Figura 6.12. Curva de crecimiento de <i>Ps</i> en leche, a 4 °C con y sin adición de (A) GA y (B) Bc-GA.	222
Figura 6.13. Representación esquemática de la envoltura celular de bacteria Gram positiva y Gram negativa.	225

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AA	Ácido ascórbico
AAE_{sod}	Actividad antioxidante equivalente a SOD
AAM	Actividad antimicrobiana
AAO	Actividad antioxidante
AAPH	Hidrocloruro de 2,2'-azobis(2- amidinopropano)
AAR	Actividad Antirradicalaria
AC	Agar Cetrimide
AG	Arabinogalactano
AG	Ácidos grasos
AGP	Complejo Arabinogalactano-Proteína
AGP	Agar glucosa-peptona de caseína
AOx	Antioxidante
Apo₁₂	β -apo-12'-carotenal
Apo₁₂	12'apo- β -carotenal
Apo₁₂-GA	β -apo-12'-carotenal microencapsulado con GA
Apo₈	β -apo-8'-carotenal
Apo₈	8'apo- β -carotenal
Apo₈-GA	β -apo-8'-carotenal microencapsulado con GA
ARA	Ácido araquidónico
ART	Agar de Recuento total
Asc^{•-}	Radical semidehidroascorbato
AscH⁻	Anión ascorbato
AscH[•]	Radical libre tricarbonilo ascorbato
Asta	Astaxantina
BAL	Bacterias ácido lácticas
BC	β -caroteno
Bc-GA	β -caroteno microencapsulado con GA
Bix	Bixina
BP	Buffer fosfato

Bs	<i>Bacillus subtilis</i>
BSA	Albúmina sérica Bovina
Canta	Cantaxantina
CAR	Carotenoides
CAR MC	Carotenoides microencapsulados
CAR^{•+}	Radical catión carotenoide
CAR-OO[•]	Radical carotenoide peroxilo
CES	Cruce entre sistemas
CHA	Clorhidrato de hidroxilamina
CI	Conversión Interna
Cis	Cisteína
d.e.c.	Doble enlace conjugado
DE	Dextrosa equivalente
DF	Diformazan
DGGE	Electroforesis en gel desnaturalizante en gradiente
DHA	Ácido docosahexaenoico
DoR	2-desoxirribosa
DPPH	Desactivación del Radical Libre Estable 2,2-difenil-1-picrilhidracilo
EB	<i>Enterobacter spp.</i>
EC	<i>Enterococcus spp.</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EM	Eficiencia de microencapsulación
EPA	Ácido eicosapentanoico
ERNS	Especies reactivas de nitrógeno
EROS	Especies reactivas de oxígeno
ESR	Resonancia de espín electrón
ETA	Enfermedades transmitidas por alimentos
F	Compuestos fenólicos
FC	Fosfatidil colina
FCR	Contenido de Fenoles Totales por Reactivo Folin-Ciocalteu
Fca	Fenilalanina

FRAP	Poder Antioxidante Reductor de Ión Férrico
g	Tiempo degeneración
GA	Goma arábica
GA-MC	Microcápsula de GA vacía
GO	<i>Gordonia spp.</i>
GP	Glicoproteína
GPs	Enzima glutatión peroxidasa dependiente de selenio
GSH	Glutatión tripéptido
GST	Enzima glutatión-S-transferasa independiente de selenio
H₂O₂	Peróxido de Hidrógeno
His	Histidina
His	Histidina
HO•	Radical hidroxilo
Ig	Inmunoglobulina
IRC	Insuficiencia renal crónica
k_{CES}	Constante unimolecular de cruce entre sistemas
KF	KF Streptococcus Agar Base
k_{fos}	Constates de velocidad de desactivación unimolecular por fosforescencia
k_{NR}	Constates de velocidad de desactivación unimolecular por vías no radiativa
k_q	Constade de velocidad de desactivación física
k_r	Constade de velocidad de desactivación reactiva
k_{TE}	Constante bimolecular de transferencia de energía
LFP	Técnica de Láser Flash Fotólisis
Lic	Licopeno
m.o.	Microorganismos
MB	Azul de metileno
MC	Microcápsula
Mc	<i>Micrococcus luteus</i>
MD	Maltodextrina
Met	Metionina

MF	Monoformazan
MH	Agar Müller-Hinton
MPM	Marcador de peso molecular
MUFA	Ácidos grasos monoinsaturados
NBT	Nitro azul de tetrazolium
O₂^{•-}	Radical anión superóxido
ONOO	Peroxinitrito
ORAC	Capacidad de Absorción de Radical Oxígeno
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
Prot 50	Proteína de alrededor de 50 KDa que no ha sido identificada
Ps	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
PUFA-LC	Ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga
Q	Sustrato desactivador o quencher
R[•]	Radical alquilo
RF	Riboflavina
RF⁻	Riboflavina forma aniónica
RFH	Riboflavina forma neutra
RFH₂⁺	Riboflavina forma catiónica
RO[•]	Radical alcoxilo
ROO[•]	Radical peroxilo
S	Sensibilizador
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
SFA	Ácidos grasos saturados
SOD	Superóxido dismutasa
TAG	Triacilgliceroles
TAH	Transferencia de un átomo de hidrógeno
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
t_d	Tiempo de duplicación
TE	Transferencia de electrones
TEAC	Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox
TGFbeta1	Factor de crecimiento transformante beta 1

TGGE	Electroforesis en gel con gradiente de temperatura
Tir	Tirosina
TRAP	Parámetro Antioxidante de Captura de Radical Total
Trp	Triptófano
TRPD	Detección de fosforescencia resuelta en el tiempo
TTGE	Electroforesis en gel de temperatura temporal
TX	6-hidroxi-2,5,7,8-tetramethylcroman-2-ácido carboxílico, Trolox
UFC/ml	Unidades formadoras de colonia por mililitro
Vit A	Vitamina A
%D	Porcentaje de desactivación
%FP	Porcentaje de fotoprotección
%R	Porcentaje de reducción de la velocidad de crecimiento
μ	Velocidad de crecimiento microbiano
τ_{Δ}	Tiempo de vida de oxígeno singulete
κ-cn	κ -caseína
α-La	α -lactoalbúmina
β-Lg	β -lactoglobulina
α_{s1}-cn	α_{s1} -caseína
τ_T	Tiempo de vida del triplete del sensibilizador
$\alpha_y\beta$-cn	α_{s2} - y β -caseínas
$^1O_2, O_2(^1\Delta_g)$	Oxígeno molecular en su primer estado singulete excitado
1S_0	Sensibilizador en estado fundamental
1S_1	Sensibilizador en estado singulete excitado
3CAR	Estado triplete excitado del carotenoide
$^3O_2, O_2(^3\Sigma_g^-)$	Oxígeno molecular en estado fundamental
$^3RF^*$	Estado triplete excitado de Riboflavina
$^3S^*$	Estado triplete excitado del sensibilizador
3S_1	Sensibilizador en estado triplete excitado

PARTE I.

Fundamentos Teóricos

CAPÍTULO 1

Introducción General y Objetivos

1. INTRODUCCIÓN

Los alimentos pueden ser degradados tanto por oxidaciones químicas como por acción microbiológica, produciendo alteraciones nutricionales y organolépticas, que ocasionan pérdidas del “flavour” (sabor y aroma) y la calidad total del producto. Dichas alteraciones suelen producirse durante la exposición a la luz, al aire, a elevadas temperaturas, a presencia de ciertos metales y el almacenamiento prolongado.

Las alteraciones nutricionales, pueden ser causadas por Especies Reactivas de Oxígeno (EROS), tales como radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxilo (HO^{\bullet}), y oxígeno molecular singulete ($O_2(^1\Delta_g)$), las cuales actúan sobre sustratos como proteínas, lípidos y vitaminas, causando su oxidación, desnaturalización e incluso pérdida de funcionalidad, y en consecuencia disminuyendo la calidad nutricional de los alimentos. Específicamente para leche y sus derivados, la generación de EROS puede ser inducida por la interacción entre uno de sus componentes pigmentados naturales, riboflavina (RF), luz y oxígeno, mediante un proceso conocido como fotosensibilización [1,2].

A su vez, dado que la leche y los productos lácteos son alimentos con una matriz compleja, ricos en sustancias nutritivas, como proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas y sales, se convierten en blancos susceptibles para ambos tipos de alteraciones, siendo las organolépticas, aquellas que ocurren principalmente por el crecimiento de microorganismos. Éste, se ve favorecido por la temperatura de almacenamiento, seleccionada con el fin de prologar la vida útil del alimento. El desarrollo microbiano produce alteraciones organolépticas, que involucran la generación de off-flavor (sabor y aroma desagradable) asociadas a la generación de compuestos volátiles de aroma indeseado, con la consecuente disminución del valor nutricional [3].

Muchos alimentos, entre ellos la leche y sus derivados, poseen sistemas de protección natural contra las degradaciones oxidativas y microbiológica. Dichos sistemas de protección están asociados a la presencia de componentes minoritarios con actividad biológica tales como enzimas, carotenoides (CAR) y vitaminas tanto liposolubles (A, E, D) como hidrosolubles (C, B₁, B₂, B₆, B₁₂, ác. pantoténico, niacina, biotina y ác. fólico). Sin embargo, en muchos casos, estos componentes "protectores" son perdidos durante el procesamiento y almacenamiento de los productos alimenticios. Por esta razón, se requieren medidas especiales para prevenirlo, entre las que se encuentran, remoción de oxígeno, uso de envase con materiales barrera o adición exógena de compuestos con capacidad antioxidante y antimicrobiana.

La tendencia actual es la del empleo de preservadores (antioxidantes, antimicrobianos) de origen natural, debido a los posibles efectos perjudiciales presentados por los compuestos sintéticos, tradicionalmente utilizados en la industria de alimentos con este fin. En tal sentido, los CAR son pigmentos naturales con importantes propiedades biológicas entre las que se destacan su actividad antioxidante (AAO), ya que son eficientes desactivadores de EROS, protegiendo a compuestos biológicos de la acción dañina de dichas especies [4-7]. Sin embargo, debido a su estructura química altamente reactiva e hidrofóbica, una manera de estabilizarlos y solubilizarlos en matrices acuosas para su empleo como antioxidantes (AOx) en medios biológicos es la microencapsulación con biopolímeros. Comúnmente, para su adición en alimentos, se utilizan polisacáridos comestibles, tales como goma arábiga (GA), maltodextrinas, etc. generando una pared que recubre y protege al CAR. Además, los mismos AOx, podrían ejercer un efecto antimicrobiano, causando la inhibición o reducción del desarrollo microbiológico en el alimento, tal como se ha visto previamente, en numerosos estudios que demuestran el efecto benéfico de la adición de diferentes compuestos naturales con actividad antimicrobiana (AAM) [8-11].

El *objetivo general* de este trabajo de tesis, fue evaluar el efecto protector de carotenoides microencapsulados (CAR MC) en polímeros comestibles sobre las alteraciones nutricionales, (específicamente en la degradación de vitaminas, lípidos y proteínas) y organolépticas (desarrollo de microorganismos y producción de flavor

indeseable) en leche durante el almacenamiento en refrigeración y expuesto a iluminación.

En una *primera etapa* de la tesis, se realizó el estudio de la actividad antioxidante y antimicrobiana de carotenoides puros y microencapsulados en el polímero comestible goma arábica.

En una *segunda etapa*, se estudiaron las alteraciones nutricionales de muestras de leche, almacenadas bajo refrigeración e iluminación. Específicamente se evaluó la estabilidad de RF, la generación de compuestos volátiles, y la oxidación de proteínas, a través de diferentes técnicas analíticas.

En la *tercera y última etapa*, se evaluó la actividad antimicrobiana de la adición de los microencapsulados en goma arábica, sobre la velocidad de crecimiento de microorganismos de referencia y aislados de leche, como posibles contaminantes de la misma.

El presente texto descriptivo del trabajo de tesis se ha dividido para su presentación, en tres partes:

- **Parte I. Fundamentos Teóricos**, que está conformada por tres capítulos: *Capítulo 1, Introducción General*, donde se plantea el problema y la hipótesis que condujeron al desarrollo de este estudio. El *Capítulo 2, Fundamentos Teóricos*, en el cual se presenta una revisión bibliográfica de la oxidación causada por EROS y la degradación microbológica, en sistemas biológicos y alimentos. Por último, el *Capítulo 3, Características, Propiedades y Funciones de Carotenoides y Goma Arábica*, donde se realiza una descripción detallada de las características que poseen β -caroteno y goma arábica.

- **Parte II. Resultados Experimentales**, la cual consta de tres capítulos. En el *Capítulo 4, Capacidad Antioxidante de Carotenoides Microencapsulados*, se presenta el estudio de la actividad antirradicalaria de carotenoides microencapsulados en goma arábica y el material de pared, en soluciones acuosas, de especies radicalarias de oxígeno como, $O_2^{\cdot-}$ y HO^{\cdot} , y se determinó la capacidad antioxidante de goma arábica, a través de la desactivación de

especies excitadas como $O_2(^1\Delta_g)$ y el estado triplete excitado de riboflavina, ($^3RF^*$).

En el *Capítulo 5, Efecto Protector de Carotenoides Microencapsulados sobre las Degradaciones Fotoinducidas en Leche*, se presenta el efecto protector de la adición de β -caroteno microencapsulado en goma arábica, frente a la degradación de RF, lípidos, y proteínas, desencadenada por un mecanismo fotoinducido.

El *Capítulo 6, Actividad Antimicrobiana de Carotenoides Microencapsulados, frente a Microorganismos de Referencia y Aislados de Leche*, se trata de un estudio sobre la capacidad antimicrobiana que ejerce la adición de β -caroteno microencapsulado en goma arábica y la microápsula vacía, frente al desarrollo de microorganismos mesófilos y psicrótrofos, que pueden crecer en leche, durante el almacenamiento.

- **Parte III. Conclusiones.** Se trata del *Capítulo 7*, donde se presentan las Conclusiones Generales de la tesis.

2. BIBLIOGRAFÍA

1. Spikes, J.D. 1989. Photosensitization. *The Science of Photobiology*. Ed. Smith, K.C., 2ª edición. Plenum Press, New York. Capítulo 3, 79-110.
2. Foote, C.S., Weslwer, S. 1964. *Journal American Chemical Society*. 86, 3879.
3. Karatapanis, A.E., Badeka, A.V, Riganakos, K.A., Savvaidis, I.N., Kontominas, M.G. 2006. Changes in flavour volatiles of whole pasteurized milk as affected by packaging material and storage time. *International Dairy Journal*. 16, 750-761.
4. Liebler, D.C. 1993. Antioxidant Reactions of Carotenoids. *Annals New York Academy Science*. 691, 20-31.
5. Montenegro, M.A., Nazareno, M.A., Durantini, E.N., Borsarelli, C.D. 2001. Singlet Oxygen Quenching Ability of Carotenoids in a Reverse Micelle Membrane Mimetic System. *Photochemistry and Photobiology*. 75, 353-361.

6. Montenegro, M.A., Rios de O, A., Mercadante, A.Z., Borsarelli, C.D. 2004. Model Studies on the Photosensitized Isomerization of Bixin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 52, 367-373.
7. Palozza, P., Krinsky, N.I. 1992. Antioxidant Effects of Carotenoids in Vivo and in Vitro. *Method Enzymology*. 213, 403-420.
8. Serra, A.T., Matias, A.A., Nunes, V.M., Leitão, M.C., Brito, D., Bronze, R., Silva, S., Pires, A., Crespo, M.T., San Romão, M.V., Duarte, C.M. 2008. In vitro evaluation of olive- and grape-based natural extracts as potential preservatives for food. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 9, 311-319.
9. Tajkarimi, M.M., Ibrahima, S.A., Cliver, D.O. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*. 21, 1199-1218.
10. Gutiérrez-Larraínzar, M., Rúa, J., Caro, I., De Castro, C., De Arriaga, D., García-Armesto, M.R., Del Valle, P. 2012. Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of natural phenolic compounds against foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Food Control*. 26, 555-563.
11. Da Silva Malheiros, P., Sant'Anna, V., Utpott, M., Brandelli, A. 2012. Antilisterial activity and stability of nanovesicle-encapsulated antimicrobial peptide P34 in milk. *Food Control*. 23, 42-47.

CAPÍTULO 2

Degradaciones Químicas, Fotoquímicas y
Microbiológicas**1. OXIDACIÓN POR ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO**

Las EROS, pueden ser diferenciadas en especies radicalarias (tales como $O_2^{\bullet-}$, HO^{\bullet} , radical peroxilo (ROO^{\bullet}), o no radicalarias, tal como, $O_2(^1\Delta_g)$).

A su vez, se ha definido a un radical libre, como moléculas o fragmentos moleculares que contienen uno o más electrones desapareados [1]. La presencia de un electrón desapareado en los radicales libres, convierte a dichas especies en paramagnéticas, y les confiere una elevada reactividad, con una vida media del orden de milisegundos, dependiendo del tipo de radical. La formación de éstos, ocurre por la pérdida de un electrón de una especie no radical, o por la ganancia de un simple electrón de una especie no radicalaria. La ruptura simétrica (por fisión homolítica) de la unión entre dos electrones, genera dos especies, cada una con un electrón desapareado, dando origen a dos radicales libres [2].

Los radicales pueden reaccionar de diversas maneras con otras moléculas, ya sea compartiendo su electrón desapareado para formar una unión covalente, donando su electrón desapareado a otra molécula (radical reductor), o captando un electrón de otra molécula para formar el par (radical oxidante), generalmente todo esto ocurre en reacciones en cadena [3].

A nivel biológico, las EROS pueden ser generadas tanto por causas endógenas, como oxidación mitocondrial, metabolismo del citocromo P450, peroxidasas en peroxisomas, etc., como por causas exógenas, lo que incluye agentes ambientales como carcinógenos no-genotóxicos, o el estrés oxidativo causado por la exposición a compuestos xenobióticos tales como compuestos clorados, iones metálicos (cobre, hierro, cromo, vanadio, cobalto, etc.), radiaciones (RX, UV, visible). Se conoce que las

EROS pueden jugar dos roles en sistemas biológicos, dado que pueden ser potencialmente peligrosas o benéficas para los organismos vivos [4]. Efectos benéficos en bajas concentraciones, involucran respuestas celulares de defensa contra agentes infecciosos. Por el contrario, a altas concentraciones, actúan causando daño a estructuras celulares, tales como lípidos de membranas, proteínas y ácidos nucleicos, lo que se conoce como daño oxidativo [5]. Particularmente en alimentos, las EROS pueden ser generadas por mecanismos enzimáticos, químicos, fotoquímicos, y por irradiación. Las reacciones de las EROS con componentes de los alimentos, producen compuestos volátiles indeseables y carcinógenos, los cuales destruyen nutrientes esenciales, y modifican la funcionalidad de proteínas, lípidos y carbohidratos [6].

El efecto perjudicial de las EROS en alimentos, sistemas biológicos y seres vivos es balanceado por un sistema de defensa antioxidante, endógeno o exógeno, que por desactivación de radicales libres, evita la formación o reduce los daños causados por dichas especies, previniendo el estrés oxidativo y en consecuencia, el desarrollo de enfermedades (cáncer, arteriosclerosis, artritis), que se ha propuesto, son causadas por la acumulación de especies reactivas [7].

1.1. Oxígeno y sus Derivados

El oxígeno atmosférico en su estado fundamental es biradical, posee dos electrones desapareados, localizados cada uno de ellos en un orbital de antienlace π^* (Figura 2.1). Estos dos electrones tienen el mismo número cuántico de espín, es decir, posee espín paralelos.

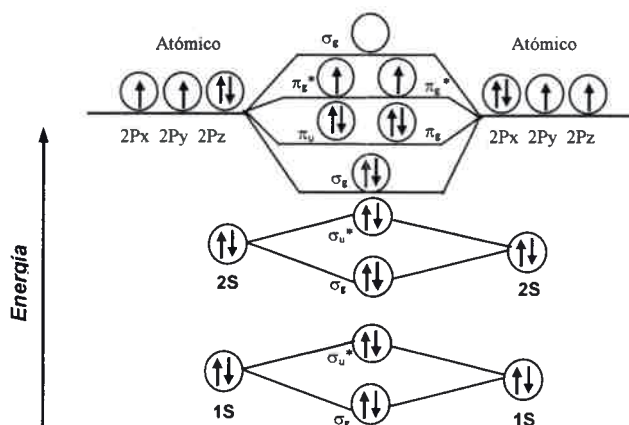


Figura 2.1. Orbitales moleculares para O_2 en estado fundamental $^3\Sigma_g^-$.

De acuerdo con la regla de Hund, esta configuración electrónica corresponde a un estado de multiplicidad de espín triplete. La notación espectroscópica para describir este estado es ${}^3\Sigma_g^-$, donde g (del alemán *gerade*, “par”) indica que el orbital tiene el mismo valor en dos puntos que están en lados opuestos del centro de la molécula y que son equidistantes del centro, Σ representa el valor absoluto del momento angular orbital M_L ; el signo menos a la derecha indica que la función de onda cambia de signo sobre el plano intranuclear. Esta configuración electrónica corresponde al estado de energía basal de la molécula de $O_2({}^3\Sigma_g^-)$.

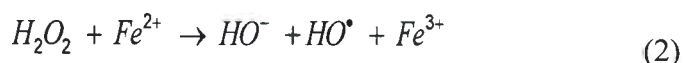
Según el principio de exclusión de Pauli, no puede reaccionar con una molécula, a menos que ésta tenga dos electrones desapareados con espín paralelos opuestos a los suyos, cuya probabilidad es muy baja. Debido a esta restricción de espín, es necesaria la activación del oxígeno en estado triplete para que éste pueda interactuar con moléculas orgánicas, que están en estado singulete. Las diversas formas resultantes de la activación del oxígeno triplete, se muestran a continuación:

1.1.1. Radical Anión Superóxido, $O_2^{\bullet-}$

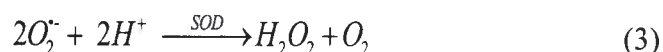
Es generado por la adición de un electrón (reducción) a una molécula de oxígeno en estado fundamental, ec. 1. Este radical no posee suficiente potencial redox para oxidar directamente los sustratos como azúcares, ácidos nucleicos, polipéptidos y lípidos. Sin embargo, a través de procesos enzimáticos o catalizados por metales puede ser transformado en otras EROS [8].



La adición de un electrón al $O_2^{\bullet-}$ (reducción) produce un anión peróxido, O_2^{2-} . Cuando esto ocurre en sistemas biológicos, se obtiene la forma protonada, que es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El H_2O_2 en presencia de iones ferrosos, Fe^{2+} , mediante la reacción de Fenton, puede generar radicales HO^\bullet altamente reactivos, ec. 2.



Adicionalmente, el radical $O_2^{\bullet -}$ puede generar H_2O_2 y O_2 mediante una reacción de dismutación espontánea o catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD) ec. 3.



1.1.3. Radical Hidroxilo, HO^{\bullet}

Este radical es altamente reactivo, con un tiempo de vida media en solución acuosa menor que 1 ns [9]. Debido a esto, cuando es producido *in vivo*, reacciona próximo a su sitio de formación. Tiene la capacidad de abstraer un electrón desde una gran variedad de moléculas orgánicas e inorgánicas.

El HO^{\bullet} puede ser generado a través de una variedad de mecanismos: 1) Radiaciones ionizantes de alta energía, las cuales causan descomposición de H_2O , resultando en la formación de HO^{\bullet} y átomos de hidrógeno. 2) Una conocida reacción entre el peróxido de hidrógeno y el radical superóxido a través de la que se genera HO^{\bullet} , es la Haber-Weiss (ec. 4) [10]. Esta reacción es lenta, pero se ve potenciada por la presencia de metales de transición como hierro o cobre [1]. 3) Por descomposición fotolítica de alquil hidroperóxidos.



Sin embargo, la mayoría de los radicales HO^{\bullet} generados *in vivo* provienen de la ruptura del H_2O_2 de acuerdo a la reacción de Fenton (ec. 2), catalizada por metales como Cu^+ , Fe^{2+} o Co^{2+} , entre otros [11,12].

El HO^{\bullet} puede llevar a cabo las siguientes reacciones: abstracción de hidrógeno (reacciones con alcoholes y fosfolípidos), adición (reacciones con anillo de estructuras aromáticas), y transferencia de electrones (reacciones con compuestos orgánicos e inorgánicos) [1].

1.1.4. Peróxido de Hidrógeno, H_2O_2

El H_2O_2 es uno de los oxidantes más fuertes presentes en aguas naturales y en medios biológicos. Es formado cuando el oxígeno acepta dos electrones. La mayor parte

del H₂O₂ proviene de la dismutación del O₂^{•-} (ec. 3), aunque también es producido por algunas oxidasas confinadas en vesículas como lisosomas, peroxisomas, y a nivel celular [1]. Incluso, puede ser generado por el metabolismo de numerosos microorganismos (tales como *Streptococcus sangis*, *S. mitior*, *Pneumococcus* spp.), como mecanismo de control, para inhibir el crecimiento de bacterias incapaces de degradarlo [13,14].

El peróxido de hidrógeno, por sí solo no resulta tóxico en concentraciones fisiológicas, sin embargo, a través de la reacción de Haber-Weiss (ec. 4), es convertido en una especie altamente citotóxica, como el radical HO[•]. También tiene efectos en la salud humana, por ejemplo, elevadas concentraciones en solución acuosa puede estimular daños en la vista y otros órganos.

1.1.5. Oxígeno Molecular Singulete, O₂(¹Δ_g)

Cuando el oxígeno triplete O₂(³Σ_g⁻), adquiere suficiente energía para revertir el spin de uno de sus electrones desapareados, da lugar a la formación de dos estados excitados singulete (¹Δ_g) y (¹Σ_g⁺), en los que ambos electrones poseen espines opuestos, Figura 2.2 [15]. La excitación directa de O₂(³Σ_g⁻) para producir O₂(¹Δ_g) es prohibida por espín. Sin embargo, éste puede ser formado químicamente, enzimáticamente, por descomposición de hidroperóxidos o fotoquímicamente, por un proceso conocido como Fotosensibilización [16-20].

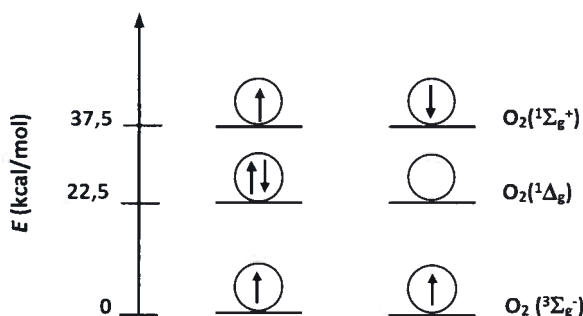


Figura 2.2. Distribución de electrones en orbitales moleculares π* en la molécula de oxígeno para el estado triplete fundamental y los estados singulete excitados de menor energía.

En el estado $^1\Delta_g$ los dos electrones apareados ocupan el mismo orbital molecular π^* , y excede en 22,5 kcal/mol al estado triplete basal, mientras que el estado $^1\Sigma_g^+$ con un electrón apareado por orbital π^* excede en 37,5 kcal/mol [15]. Este estado relaja en pocos nanosegundos al estado $^1\Delta_g$, el cual posee un tiempo de vida, τ_Δ , entre micro a milisegundos dependiendo del solvente, ya que la transición $^1\Delta_g \rightarrow ^3\Sigma_g^-$ es prohibida por espín [21].

El $O_2(^1\Delta_g)$ se caracteriza por su elevada reactividad, en comparación con el oxígeno triplete, y a diferencia de éste, reacciona directamente sobre las dobles uniones de sustratos, causando su oxidación, sin la formación de radicales libres.

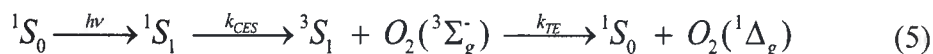
1.1.5.1. Fotosensibilización

Es uno de los mecanismos a través del cual, se genera $O_2(^1\Delta_g)$. En 1931, Kaustky y col. [22], demostraron que la fotooxidación de un colorante, en presencia de oxígeno, causa la oxidación de un compuesto orgánico físicamente separado del sensibilizador. Concluyeron que la energía luminosa absorbida por el colorante fue transferida al oxígeno, produciendo oxígeno molecular activado, que ataca al compuesto orgánico, causando su oxidación.

Como se mencionó anteriormente, la excitación directa de $O_2(^3\Sigma_g^-)$ para producir $O_2(^1\Delta_g)$ es prohibida por espín. Sin embargo, la formación indirecta de $O_2(^1\Delta_g)$ es posible a través de un mecanismo de transferencia de energía.

Diferentes compuestos químicos denominados sensibilizadores (S) tales como RF, clorofila, mioglobina, en alimentos pueden absorber energía de la luz y transferirla al oxígeno triplete para formar $O_2(^1\Delta_g)$ en sistemas biológicos [23]. El sensibilizador en estado fundamental (1S_0) puede absorber luz muy rápidamente, en picosegundos, y pasar al estado singulete excitado, muy inestable (1S_1). Este (1S_1) tenderá a retornar a su estado fundamental inmediatamente, a través de conversión interna (CI), o emisión de luz (fluorescencia), o bien podrá pasar al estado triplete excitado (3S_1) por cruce entre sistemas (CES), el cual puede regresar al estado fundamental por emisión de fosforescencia, Figura 2.3.

El mecanismo fotoquímico de transferencia de energía para la formación de $O_2(^1\Delta_g)$ en presencia de un S, luz y oxígeno triplete se muestra en la ec. 5.



En esta ecuación, k_{CES} corresponde a la constante unimolecular de cruce entre sistemas del sensibilizador y k_{TE} se refiere a la constante bimolecular de transferencia de energía.

Luego de este proceso, el S retorna a su estado electrónico fundamental 1S_0 , actuando así de forma catalítica para la generación de $O_2({}^1\Delta_g)$ mediante la re-absorción de luz. El proceso de transferencia de energía es favorable ya que el momento de espín total se conserva, y es altamente eficiente si la energía de 3S_1 es mayor que la de $O_2({}^1\Delta_g)$ (22,5 kcal/mol).

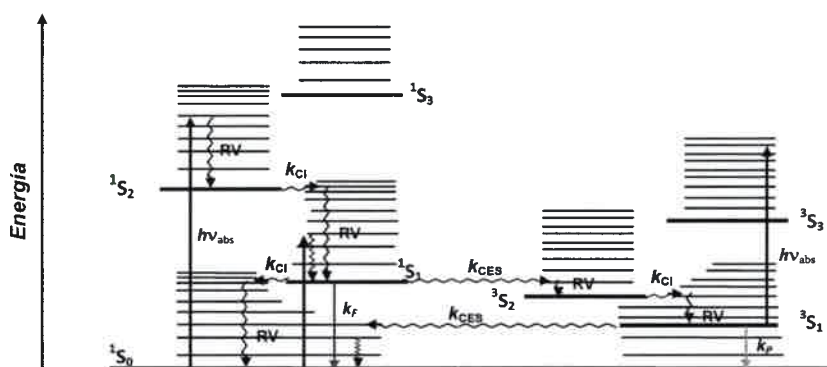


Figura 2.3. Diagrama de Jablonsky para las transiciones entre estados electrónicos de la molécula de S. Las líneas rectas corresponden a transiciones radiativas, mientras que las líneas curvas corresponden a transiciones no radiativas. “ $h\nu_{abs}$ ” absorción de luz, “ k_f ” constante de velocidad de fluorescencia, “ k_p ” constante de velocidad de fosforescencia, “RV” relajación vibracional, “ k_{CI} ” constante de velocidad de conversión interna, “ k_{CES} ” constante de velocidad de cruce entre sistemas [24].

La CI es una transición entre dos niveles vibracionales isoenergéticos de diferentes estados electrónicos de la misma multiplicidad, por ejemplo ${}^1S_1 \rightarrow {}^1S_0$. Debido al mayor solapamiento de las funciones de onda vibracionales entre los estados S_n , la CI entre estados de alta energía es tan rápida (10^{-13} - 10^{-12} s) que los tiempos de vida de esos estados excitados son muy cortos y las transiciones radiativas desde dicho

estado no ocurren. En cambio, debido a la mayor separación de energía entre el estado fundamental y primer estado electrónico excitado, la CI entre $^1S_1 \rightarrow ^1S_0$ es mucho más lenta (10^{-12} - 10^{-6} s) y por lo tanto la emisión de fluorescencia compite con la misma [24].

La fluorescencia es la emisión de radiación entre estados de la misma multiplicidad, por ejemplo la transición $^1S_1 \rightarrow ^1S_0$ es un proceso rápido, con una constante de velocidad en el orden de 10^6 - 10^9 s $^{-1}$. Como la fluorescencia, ocurre desde el estado vibracional más bajo del primer estado excitado ($v_1=0$) (regla de Kasha), la energía de la radiación emitida es menor que la de la radiación absorbida. En consecuencia, los espectros de emisión se encuentran desplazados a longitudes de onda mayores (al rojo) respecto de los espectros de absorción (corrimientos de Stokes) [24].

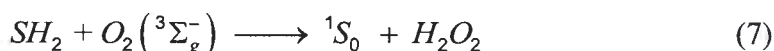
El CES es una transición entre dos niveles vibracionales isoenergéticos de estados electrónicos de diferente multiplicidad, por ejemplo $^1S_1 \rightarrow ^3S_1$. Estos procesos implican un cambio de espín y pueden ocurrir por acoplamiento espín-órbita directo entre el estado 1S_1 y algún estado vibracional superior de 3S_1 o por acoplamiento espín-órbita indirecto entre 1S_1 y 3S_n seguido de una rápida CI $^3S_n \rightarrow ^3S_1$. En general, los CES son más lentos que la CI (10^{-11} - 10^{-6} s para $^1S_1 \rightarrow ^3S_1$, 10^{-7} - 10 s para $^3S_1 \rightarrow ^1S_0$). En consecuencia, el 3S_1 , tiene un tiempo de vida relativamente largo, debido a que la conversión espontánea al estado 1S_0 requiere de otra rotación en el espín, lo cual es una transición prohibida. El decaimiento radiativo de un estado triplete, produce una emisión débil designada como fosforescencia, $^3S_1 \rightarrow ^1S_0$. Este proceso es prohibido por espín, tiene una constante de velocidad pequeña (10^{-2} - 10^4 s $^{-1}$), y ocurre en regiones espectrales más al rojo que la fluorescencia, debido a la menor diferencia de energía entre 3S_1 y 1S_0 [24].

1.1.5.2. Mecanismos de Fotosensibilización

El 3S_1 puede reaccionar con otras moléculas o especies químicas por un proceso de transferencia de electrones o de hidrógeno, generando radicales libres o iones radicales, a través de un mecanismo denominado de Tipo I [18]. Los radicales libres formados en esta etapa, tanto del sensibilizador ($S^{\bullet-}$ o SH^{\bullet}), como del sustrato (Q^{\bullet} y $Q^{\bullet+}$), son especies muy reactivas. En muchos casos, los radicales de sustrato pueden reaccionar con $O_2(^3\Sigma_g^-)$ para dar productos oxidados tales como peróxidos, los cuales

pueden reaccionar posteriormente, para iniciar procesos de autooxidación por reacciones radicalarias en cadenas.

En algunos sistemas el radical semirreducido del sensibilizador (SH^*), puede reaccionar con $O_2(^3\Sigma_g^-)$ para producir 1S_0 y el radical O_2^* o su ácido conjugado, HO_2^* , los cuales pueden reaccionar con algunos tipos de moléculas biológicas [25,26]. Algunos sensibilizadores semireducidos, tales como flavinas, sufren reacciones de dismutación produciendo el estado fundamental y el sensibilizador totalmente reducido ec 6. Esta última especie puede reaccionar con $O_2(^3\Sigma_g^-)$ para dar 1S_0 y H_2O_2 , ec. 7 [18].



El O_2^* , también puede ser producido con baja eficiencia por transferencia de un electrón desde 3S_1 al $O_2(^3\Sigma_g^-)$ [26]. El radical S^{*+} formado en el proceso anterior puede reaccionar con un sustrato reductor para dar 1S_0 y el sustrato semioxidado (ec. 8).



Por último, en algunos casos los radicales del sensibilizador y el sustrato pueden interactuar para producir fotoaductos covalentes [18]:

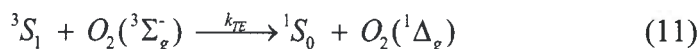


Los procesos tipo I son más eficientes a elevadas concentraciones de sustrato y bajas concentraciones de oxígeno, por la competencia entre ambos por el 3S_1 . Los compuestos fácilmente oxidables, tales como fenoles o aminas, y los fácilmente reducibles como quinonas, tienden a ser fotodegradados por procesos de Tipo I.

En el mecanismo de fotosensibilización de Tipo II, el 3S_1 interactúa con $O_2(^3\Sigma_g^-)$ de dos maneras diferentes. La más significativa involucra la colisión de 3S_1 con $O_2(^3\Sigma_g^-)$, transfiriendo la energía del S al oxígeno, resultando en la generación de $O_2(^1\Delta_g)$ y 1S_1 ,



como se muestra en la ec. 11. La vía alternativa de fotosensibilización involucra una transferencia de electrones desde el 3S_1 al $O_2(^3\Sigma_g^-)$, resultando en la formación $O_2^{\cdot-}$.



La fotosensibilización de Tipo II depende principalmente de la solubilidad y la concentración de $O_2(^3\Sigma_g^-)$ en el medio. Dado que el oxígeno es más soluble en solventes no polares hidrofóbicos que en agua, este mecanismo predominará en medios oleosos. La Figura 2.4 muestra un esquema de los tipos de mecanismos de fotosensibilización.

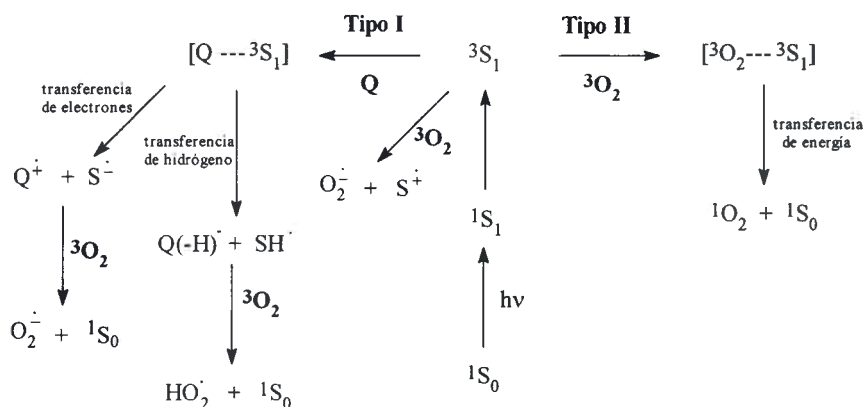


Figura 2.4. Esquema de mecanismos de fotosensibilización Tipo I y Tipo II.

1.2. Antioxidantes

Se define como AOx a cualquier sustancia o acción, que retrasa, previene o elimina el daño oxidativo [27,28]. Entre ellos, se pueden diferenciar los antioxidantes enzimáticos, los cuales son enzimas antioxidantes, como la SOD, catalasa, y peroxidasa, y por otro lado los antioxidantes no-enzimáticos los cuales involucran a compuestos como vitaminas C y E, tioles, flavonoides, CAR, entre otros.

Los AOx pueden actuar a diferentes niveles durante el proceso oxidativo [29]:

1. Disminuyendo concentraciones localizadas de oxígeno.
2. Previniendo la iniciación de la reacción en cadena, desactivando radicales iniciadores, como HO^{\cdot} .

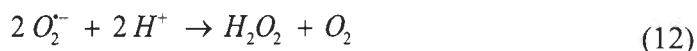
3. Uniéndose a iones metálicos, evitando así la formación de especies iniciadoras, como HO•, Fe²⁺/Fe³⁺/O₂ y/o evitando la descomposición de peróxidos lipídicos.
4. Convirtiendo peróxidos a formas no radicalarias, para evitar su descomposición.
5. Causando ruptura de la reacción en cadena, desactivando radicales intermediarios, tales como radicales peróxido y alcóxido.

Los AOx que actúan mediante los tres primeros mecanismos, son conocidos como AOx preventivos. Aquellos que actúan por el mecanismo 3 o que causan corte de la cadena de propagación, en general no son consumidos durante la reacción.

1.2.1. Antioxidantes Enzimáticos

1.2.1.1. Superóxido Dismutasa

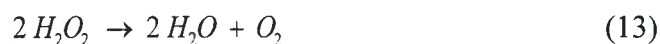
Uno de los antioxidantes enzimáticos más efectivos es la SOD. Esta es una enzima intracelular, que cataliza la dismutación del anión superóxido O₂^{•-} a O₂ y a la especie menos reactivas, H₂O₂, ec. 12 [30].



SOD existe en diversas isoformas (SOD citosólica, mitocondrial y extracelular), que difieren en la naturaleza del centro activo del metal, de los aminoácidos que la constituyen, como también de su número de subunidades, cofactores y otras características [31,32].

1.2.1.2. Catalasa

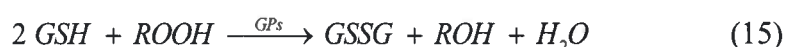
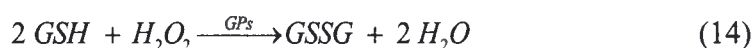
Es una enzima presente en células vegetales, animales, y bacterias aeróbicas. Se localiza en un organelo celular llamado peroxisoma. Esta enzima promueve eficientemente, la conversión de peróxido de hidrógeno a agua y a oxígeno molecular, O₂, ec. 13.



1.2.1.3. Glutación Peroxidasa

Hay dos formas de la enzima glutatión peroxidasa, una de las cuales es independiente de selenio (glutatión-S-transferasa, GST) mientras que la otra es dependiente de selenio (GPs). Estas enzimas difieren en el número de subunidades, la naturaleza de unión al centro activo y sus mecanismos catalíticos. Se conoce que las GPs adicionan dos electrones a los peróxidos, reduciéndolos y formando selenoles. La propiedad antioxidante de estas seleno-enzimas, se basa en eliminar peróxidos como potenciales sustratos de la reacción Fenton.

El sustrato para la reacción catalítica de GPs es el H_2O_2 o peróxido orgánico (ROOH), y los descompone en agua o alcohol, oxidando simultáneamente la Glutatión tripéptido (GSH), con la que actúa en conjunto, ec. 14 y 15.



1.2.2. Antioxidantes No-enzimáticos

1.2.2.1. Vitamina C

La vitamina C o ácido ascórbico (AA), es un muy poderoso AOx que actúa en sistemas acuosos. Este coopera con la vitamina E, para regenerar α -tocoferol desde el radical α -tocoferilo en membranas y lipoproteínas.

La AAO de la vitamina C es ejercida por el ascorbato (AscH^-), que es la forma en la que se encuentra la vitamina a pH fisiológico. El AscH^- actúa como dador de e^- , que reacciona con radicales para producir el radical libre tricarbonilo ascorbato (AscH^\bullet), estabilizado por resonancia. El producto de oxidación de ascorbato generalmente se encuentra no protonado, como radical semidehidroascorbato Asc^\bullet , con una pobre reactividad, por lo que es considerado como terminal, incluso es una buena medida del grado de estrés oxidativo en sistemas biológicos [33].

La vitamina C puede reducir o prevenir la peroxidación lipídica inducida por el H_2O_2 y la formación de desoxiguanosina-OH, actuando como antioxidante [34]. Sin embargo, algunos autores han determinado potenciales efectos colaterales pro-oxidantes ante la ingesta de altas dosis de dicha vitamina [35].

1.2.2.2. Vitamina E

Es una vitamina liposoluble que existe en 8 formas diferentes. La forma más activa es el α -tocoferol, siendo un poderoso AOx biológico, fundamentalmente unido a membranas celulares [36]. Su principal función antioxidante es la protección contra la peroxidación lipídica [37].

Estudios recientes, sugieren que α -tocoferol actúa junto con AA, en un proceso cíclico. Durante la reacción antioxidante, el α -tocoferol es convertido en radical α -tocoferilo por donación de un hidrógeno lábil a un lípido, o un radical peroxilo. Este radical α -tocoferilo puede ser luego reducido a la forma original de α -tocoferol, por acción del AA [33].

Se ha demostrado que la ingesta de vitamina E, reduce la incidencia de cáncer colon-rectal induciendo la apoptosis de células cancerosas. El efecto protector de esta vitamina, es resultado de la inhibición de la formación de radicales libres y activación de endonucleasas [38]. Dado que la vitamina C regenera la vitamina E, se ha propuesto que la adición de vitamina E, potencia el efecto protector de vitamina C, frente al daño oxidativo [39].

1.2.2.3. Carotenoides

Los CAR, son un grupo de pigmentos liposolubles, que otorgan coloración amarilla, naranja y/o roja en frutas y vegetales. Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, principalmente en flores, frutos, algas, plantas, insectos, aves, peces y crustáceos [40]. La actividad biológica que presentan, está determinada básicamente por su estructura y conformación química. β -caroteno (BC), es uno de los CAR más abundantes en alimentos [12].

Los CAR fueron ampliamente estudiados por muchos años, debido a sus diversas funciones, en fotoquímica, fotobiología y fotomedicina. En la actualidad, hay un renovado interés, atribuido a la capacidad de CAR de reducir el riesgo de ciertas enfermedades, tales como cáncer, y otras que se cree que son iniciadas por radicales libres, como aterosclerosis, cataratas, degeneración macular, esclerosis múltiples, etc.

Estudios recientes, demuestran que las funciones AOx de CAR están asociadas a la capacidad para cortar cadenas de propagación y desactivar físicamente el $O_2(^1\Delta_g)$ sin degradación [41,42], la reactividad química de CAR y BC con radicales libres, como el

HO• y el O₂•⁻ [12], y la prevención de la peroxidación lipídica desactivando el radical ROO• [43], son las acciones de dichos compuestos que permiten proteger a células y organismos de la fotooxidación. Además de las conocidas propiedades AOx de CAR, han sido recientemente descubiertos numerosos efectos biológicos inesperados, como en la regulación de genes y en la comunicación funcional, a lo que estaría atribuida la actividad antitumoral de CAR [44,45]. A su vez, ensayos en cultivos de líneas celulares han permitido demostrar la reducción de factores o causas del estrés oxidativo [46]. Un reciente desarrollo para evaluar la AAO, es el empleo de sistemas de Ensayo Antioxidante basado en Células [47]. Li y col. [48], emplearon células de músculo cardíaco de ratas H9c2, dado que la muerte celular cardíaca es resultado de estrés oxidativo, por isquemia y reperfusión, jugando un importante rol en la patogénesis de disfunciones coronarias. Este estudio ha probado que los CAR pueden proteger a células H9c2 de la muerte celular inducida por H₂O₂, a través de la actividad de caspasas-3 (enzima que se cree es clave en el proceso de muerte celular) y MMP-2 (que ha sido reconocido como importante marcador para la salud cardíaca) [49].

La actividad antioxidante de CAR, es una consecuencia de la capacidad del extenso sistema de dobles enlaces conjugados, presente en su estructura, para deslocalizar electrones no apareados [50]. Aspectos estructurales y químicos de los CAR serán abordados en el Capítulo 3 de la presente tesis.

2. DEGRADACIÓN MICROBIANA

Los sistemas biológicos por su compleja composición química son susceptibles a sufrir una serie de transformaciones, que no sólo modifican sus características originales, sino que llegan a producir su deterioro. En dichas transformaciones, se incluyen reacciones químicas, bioquímicas, y principalmente, procesos microbianos. En particular en los alimentos, el desarrollo de microorganismos (m.o.), puede causar daños físicos, cambios químicos, tales como oxidación, cambios de color o aparición de sabor y olor desagradables [51]. De allí radica, la importancia de entender y conocer los principios biológicos, de la flora microbiana en su hábitat natural y sus respectivas funciones.

Es necesario saber qué m.o. están asociados con un alimento particular en su estado natural, y cuales no son habituales para dicho alimento. Además, los mismos pueden ser vehículos potenciales para la transmisión de diversos m.o. y de metabolitos de origen microbiano, muchos de los cuales son patógenos para el hombre, motivo por el cual se hace indispensable disponer de metodologías que permitan garantizar la inocuidad de los productos destinados al consumo humano y animal [52]. Esta metodología es proporcionada por la Microbiología de los Alimentos.

2.1. Desarrollo microbiano

El crecimiento de los m.o. se encuentra íntimamente ligado a la presencia de agua. A partir de los nutrientes disueltos en esta, los m.o. forman su material celular y obtienen energía. Los requerimientos de los distintos m.o. en cuanto a la composición del medio, y a las demás condiciones ambientales son muy variables. Estos requerimientos se detallan a continuación:

Fuentes de carbono y energía. Los organismos que obtienen su energía a través de la fotosíntesis o de la oxidación de compuestos inorgánicos, se denominan *autótrofos* y son capaces de utilizar el anhídrido carbónico como fuente principal de carbono, reduciéndolo a CO₂. Todos los demás organismos obtienen el carbono celular principalmente a partir de nutrientes orgánicos. Estos son *heterótrofos* y utilizan los compuestos orgánicos, generalmente, tanto como fuente de carbono, como de energía; es decir, en parte se asimilan en forma de sustancia celular, y en parte se oxidan para la obtención de energía. Las sustancias naturales más abundantes en cantidad sobre la tierra, son los polisacáridos celulosa y almidón. Muchos m.o. son capaces de utilizar el componente monomérico de estos polímeros, la glucosa. No obstante, todas las demás sustancias orgánicas de origen natural, también pueden ser utilizadas y degradadas por los m.o. Existen otros m.o. que poseen mayores requerimientos nutricionales, y se denominan *exigentes* [53].

Azufre y nitrógeno. Ambos elementos se encuentran en la célula predominantemente en forma reducida, como grupos sulfhidrilo o amino. La mayoría de los m.o. son capaces de captar estos elementos en su forma oxidada y de reducirlos hasta sulfato y nitrato. La fuente de nitrógeno más común es la sal de amonio. Algunos procariontes son capaces de reducir el nitrógeno molecular (N₂). Otros m.o. necesitan

aminoácidos, esto es, fuentes de nitrógeno que lo contengan ya en forma orgánica. Tampoco todos los m.o. son capaces de reducir el sulfato; algunos requieren sulfuro de hidrogeno y otros cisteína como fuente de azufre [53].

Oxígeno. El oxígeno se encuentra a disposición de las células en forma de agua. Está contenido además en el anhídrido carbónico y en muchos compuestos orgánicos. Muchos m.o. necesitan además O₂. La función principal del O₂ es la deceptor final de electrones en la respiración aeróbica; el O₂ se reduce entonces a agua. Con respecto a la relación con el oxígeno, se diferencian como mínimo tres grupos de organismos: los *organismos aeróbicos obligados o estrictos*, solo pueden obtener energía mediante la respiración y necesitan O₂. Los *organismos anaeróbicos obligados* solo pueden crecer en un medio sin O₂, ya que este resulta tóxico para ellos. Los *organismos anaeróbicos facultativos*, crecen tanto en presencia como en ausencia de O₂. Entre ellos, hay que distinguir dos tipos: las bacterias del ácido láctico, aunque pueden crecer en presencia del oxígeno atmosférico, no pueden utilizarlo, sino que obtienen la energía exclusivamente por fermentación; son *aerotolerantes*. Otras bacterias anaeróbicas facultativas (*Enterobacteriaceae*) y muchas levaduras pueden obtener energía tanto por respiración (en presencia de O₂) como por fermentación (en ausencia de O₂). Muchas, sino la mayoría, de las bacterias aeróbicas son microaerófilas, esto es, necesitan O₂ para la obtención de energía, pero no toleran la presión parcial del aire (0,20 bar), sino tan solo entre 0,01 a 0,03 bar [53].

Temperatura. Los microorganismos presentan distintos comportamientos en cuanto a las temperaturas de incubación que requieren. La mayoría de las bacterias del suelo o del agua son *mesófilas*: tienen su tasa máxima de crecimiento entre los 20 °C y los 42 °C. Los organismos *termotolerantes* son los que todavía pueden crecer a temperaturas superiores a 50 °C (*Methylococcus capsulatus*). Las bacterias *termófilas* crecen a temperaturas superiores a los 40 °C con una tasa máxima y tienen el límite superior a los 70 °C (por ejemplo *Bacillus stearothermophilus*, *Thermoactinomyces vulgaris*). Se denominan organismos *termófilos extremos*, a aquellos que tienen su óptimo de crecimiento por encima de los 65 °C (como por ejemplo *Thermus aquaticus*, *Sulfolobus*); algunos de ellos pueden crecer a temperaturas por encima de los 70°C (varias especies del genero *Bacillus* y *Clostridium*). Al otro extremo de la escala de temperaturas se encuentran los *psicrófilos*, organismos entre los que predominan

algunas bacterias marinas (bacterias luminiscentes) y las bacterias del hierro (*Gallionella*); tienen su tasa óptima de crecimiento por debajo de los $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. También hay *psicrotrofos* o *psicrotolerantes*, que son aquellos capaces de crecer a temperaturas bajas, menor a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, como por ejemplo, *Listeria monocitógenes*, capaz de crecer a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en alimentos refrigerados [53].

Concentración de iones Hidrógeno. Los iones H^+ y OH^- son los iones más móviles de todos, por lo que pequeñas modificaciones en su concentración tienen grandes consecuencias en el desarrollo microbiano. La mayoría de los organismos se desarrolla óptimamente cuando los iones H^+ y OH^- están aproximadamente en igual concentración (pH 7,0). Muchas bacterias, prefieren valores de pH superiores, un medio ligeramente alcalino, por ejemplo: los nitrificantes, los rizobios, los actinomicetos, las bacterias degradadoras de la urea. Tan solo pocas bacterias son ácido tolerantes (lactobacilos, *Acetobacter*, *Sarcina ventriculi*) o acidófilas (*Thiobacillus*). [53].

Fisiología del crecimiento. Se entiende por crecimiento el incremento de materia viva, el incremento en el número de células y de la masa celular. La tasa de crecimiento, es una medida de la modificación del número de células o de la masa celular en una unidad de tiempo. En los m.o. unicelulares el crecimiento consiste en un incremento en el número de células. La célula bacteriana se multiplica por división binaria. Inicialmente la célula duplica su tamaño. A continuación se divide en dos células hijas, que tienen el mismo tamaño que la célula madre. El intervalo de tiempo para la duplicación del número de células se denomina tiempo de generación. El tiempo necesario para la duplicación de la masa celular, se denomina tiempo de duplicación. Si consideramos que el número de células y la masa celular se duplican a lo largo de un mismo lapso de tiempo, el tiempo de generación (g) es igual al tiempo de duplicación (t_d). El valor recíproco, $1/g$ se denomina velocidad de crecimiento (μ); sus dimensiones son h^{-1} .

El crecimiento de un cultivo bacteriano se ve claramente en la representación gráfica, cuando se expresan los logaritmos del número de células viables o unidades formadoras de colonias frente al tiempo. Una curva de crecimiento típica tiene un aspecto sigmoidal y permite diferenciar varias *Fases de crecimiento* que se presentan regularmente de una forma más o menos acusada: fase de latencia (o fase lag), fase exponencial (logarítmica), fase estacionaria y fase de muerte [53].

Fase de latencia. Abarca el lapso de tiempo entre la inoculación y el momento en que se alcanza la tasa de división máxima. La duración de la fase de latencia depende sobre todo del cultivo previo, de la edad del inoculo, así como de lo apropiado que sea el medio de cultivo. Si el inoculo procede de un cultivo previo viejo (fase estacionaria de crecimiento) la célula tiene que adaptarse primero, a las nuevas condiciones de crecimiento mediante la síntesis de RNA, ribosomas y enzimas. Si las fuentes de energía y de carbono del nuevo caldo de cultivo se diferencian de las del cultivo previo, la adaptación a las nuevas condiciones, va ligada frecuentemente a una nueva síntesis de enzimas que no eran necesarios en el cultivo previo y que no habrán sido sintetizados. La formación de los nuevos enzimas esta inducida por el nuevo sustrato.

Fase exponencial. La fase de crecimiento exponencial o logarítmico (fase log), se caracteriza por un tiempo de generación constante y mínimo. El tiempo de generación durante la fase log es un parámetro específico de cada especie bacteriana y dependiente del medio. En muchas bacterias el tamaño celular y el contenido en proteínas de la célula es constante durante la fase log; el cultivo está compuesto hasta cierto punto por "células estándar". Si este comportamiento está claramente demostrado y el número de células, proteína y masa seca aumenta con las mismas tasas, entonces puede seguirse el crecimiento midiendo una de estas magnitudes. Pero en muchos casos en un cultivo discontinuo las células se modifican durante el crecimiento exponencial, ya que el ambiente también se modifica continuamente, desciende la concentración de sustrato, aumenta la densidad celular y se acumulan productos metabólicos. Debido a la relativa constancia del tiempo de generación durante la fase log, esta resulta idónea para la determinación de la tasa de crecimiento.

Para el estudio de la influencia de factores ambientales (pH, potencial redox, temperatura, aireación o semejantes), así como, la capacidad de utilizar diversos sustratos se sigue el incremento del número de células, o bien de la turbidez (extinción) durante el crecimiento exponencial.

Fase estacionaria. La fase estacionaria se instaura cuando las células ya no crecen. La velocidad de crecimiento es dependiente de la concentración de sustrato; como consecuencia, al disminuir la concentración de sustrato ya aparece una disminución de la tasa de crecimiento antes de su total consumo. La transición de la fase exponencial a la estacionaria tiene lugar de manera paulatina. Además de la

disminución de sustrato, la densidad de población, la presión parcial de O₂ baja y la acumulación de productos metabólicos tóxicos pueden hacer disminuir la tasa de crecimiento e introducirla fase estacionaria. En la fase estacionaria pueden utilizarse aún materiales de reserva, descomponerse parte de los ribosomas y sintetizarse enzimas. Los procesos aislados dependen del factor que limite el crecimiento. Sólo las células muy sensibles mueren rápidamente. Siempre que pueda obtenerse energía necesaria por respiración de materiales de reserva o proteínas las bacterias permanecen largo tiempo vivas.

En muchos procesos microbianos de producción conducentes a la formación de un metabolito secundario (por ej. penicilina) la fase estacionaria es la verdadera fase de producción.

Fase de muerte. La fase de muerte y las causas de la muerte de las células bacterianas en soluciones nutritivas normales, han sido poco estudiadas. Relativamente claras son las condiciones cuando se acumulan ácidos. El número de células viables puede descender exponencialmente. En ciertas circunstancias, las células pueden lisarse por acción de las propias enzimas, causando lo que se denomina autólisis.

2.2. Conservación

El desarrollo microbiano puede producir numerosas modificaciones en la composición química y en el flavor de los alimentos, y con ello, causar disminución o pérdida la calidad y aceptabilidad de los mismos por el consumidor.

Las alteraciones organolépticas involucran pérdidas del flavor asociadas a la generación de compuestos volátiles de aroma indeseado, debido principalmente al desarrollo de m.o. y a procesos oxidativos [54]. Los m.o. pueden sintetizar flavors como metabolitos secundarios durante la fermentación de nutrientes, tales como azúcares y aminoácidos. Una gran variedad de compuestos son generados y resultan responsables del aroma de los productos alimenticios, tales como alcoholes, aldehídos, ésteres, dicarbonilos, ácidos grasos de cadena corta, metil cetonas, lactonas, compuestos fenólicos y sulfuros [55]. Compuestos volátiles azufrados, tales como dimetilsulfuro y dimetidisulfuro, son producidos por la degradación de componentes conteniendo azufre, tales como aminoácidos cisteína o cistina, estando relacionado principalmente a bacterias Gram negativas, causantes de deterioro de alimentos. Algunas de estas



bacterias pertenecen a los géneros *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp., *Enterobacter* spp., entre otras [56].

Los alimentos no sólo son deteriorados por m.o. alterantes, que causan su putrefacción, sino que también pueden ser contaminados por m.o. productores de toxinas, que causan importantes intoxicación en los consumidores. Las bacterias más importantes productoras de toxinas son *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus*, algunas cepas de *Staphylococcus* spp. También, algunos hongos producen micotoxinas, siendo la aflatoxina, producida por *Aspergillus flavus*, la más conocida.

Debido a las degradaciones que sufren los productos orgánicos alimenticios y las consecuencias que generan, es necesario emplear diferentes medidas para conservar y mantener la calidad de los mismos. Entre los métodos de conservación se pueden distinguir los procesos físicos (por ejemplo, esterilización por calor o por filtración, irradiación, descenso de temperatura) y los procesos químicos (que incluyen acidificación, salazón, ahumado). Para la conservación de algunos alimentos, ha sido necesaria la adición de ciertos conservantes químicos, tales como ácido sórbico, ácido benzoico o fórmico. Sin embargo, en la actualidad, por el mayor conocimiento de que causan efectos adversos, está comenzando a emplearse compuestos naturales.

2.3. Capacidad Antimicrobiana

La mayoría de los productos alimenticios son perecederos por naturaleza, por lo que requieren protección del deterioro durante su preparación, almacenamiento y distribución para prolongar su vida útil. Otros factores tales como: la demanda de alimentos mínimamente procesados, la supuesta relación entre el uso excesivo de antibióticos, el desarrollo de resistencia a múltiples drogas en los m.o., y la emergencia de patógenos, ha focalizado la atención en la conservación de los alimentos. La protección de los mismos frente a m.o. alterantes y patógenos, puede realizarse por varios métodos, incluyendo manipulación aséptica para prevenir o minimizar el ingreso de los mismos, eliminación por métodos físicos, a través de lavado, centrifugación o filtración, destrucción por calor, gas o irradiación, e inhibición del crecimiento por refrigeración, o congelación. Existen otras técnicas de preparación alternativas, tales como luz pulsada, altas presiones, campos eléctricos y magnéticos pulsados, irradiación,

y adición de ingredientes naturales antimicrobianos, que están siendo usadas o investigadas para su aplicación a productos alimenticios [57-61].

Un amplio rango de compuestos químicos de grado alimentario, han sido adicionados durante la elaboración de alimentos, para extender la vida útil estabilizando cambios químicos, previniendo o inhibiendo el desarrollo de microorganismos. Agentes antimicrobianos tradicionales o naturales, con uso potencial como conservantes secundarios, fueron recientemente empleados [62,63] y en los EE.UU, se está comenzando a reglamentar su aplicación [64]. Esto ha llevado a los investigadores y elaboradores de alimentos a buscar nuevos aditivos alimentarios naturales con amplio espectro antimicrobiano [65].

La preservación de alimentos se remonta a la época prehistórica. Los potenciales beneficios de vegetales comestibles, así como sus fitoquímicos, en la preservación de alimentos y en la mejora de la calidad organoléptica de ciertos alimentos tradicionales, han sido practicados por siglos. Documentación sobre el temprano uso de hierbas y especies como preservantes antimicrobianos, se remontan al 1550 aC, cuando los egipcios usaban canela, comino y romero para la preservación de alimentos [66,67]. Existe evidencia científica de la potencial preservación de alimentos en los comienzos del siglo XIX. La actividad antimicrobiana informada por primera vez, fue de aceite de canela contra esporas de *Bacillus antracis* [66]. En 1918, se observó la capacidad de extractos acuosos y alcohólicos de canela molida para preservar salsa de tomate. Fabian, y col. [68] encontraron que la canela inhibe el desarrollo microbiano en una relación 1:50. En la actualidad, el incremento en la demanda de alimentos mínimamente procesados y la necesidad de extender su durabilidad, ha revivido el interés de la exploración de estos agentes antimicrobianos naturales.

2.3.1. Agente Antimicrobiano

Un agente antimicrobiano es una sustancia química que mata o inhibe el desarrollo de microorganismos. Dicha sustancia puede ser sintética o natural.

Los agentes que matan organismos se denominan “cidas”, con un prefijo que indica la clase de organismo al que matan. De este modo, se conocen los agentes *bactericidas*, *fungicidas* y *alguicidas*, entre otros. Los agentes que no matan, sino que solamente inhiben el crecimiento del organismo, se los llama “estáticos”, así podemos

hablar de *bacteriostáticos*, *fungistáticos*, y *algistáticos*. La diferencia entre un agente cida y un estático, es a menudo arbitraria, dado que un agente puede ser cida a altas concentraciones y estático a concentraciones menores.

Los antimicrobianos o conservadores pueden tener al menos tres tipos de acción sobre el m.o. [69]:

- Inhibición de la biosíntesis de los ácidos nucleicos o de la pared celular.
- Daño a la integridad de las membranas.
- Interferencia con la gran variedad de procesos metabólicos esenciales.

La AAM de estos aditivos se debe porque atacan la pared celular, membrana celular, enzimas metabólicas, la síntesis de proteína y el sistema génico. Cada uno de estos puntos, son esenciales para el desarrollo celular, por lo tanto si uno es atacado o inactivado la velocidad de crecimiento del m.o. se ve minimizada [70].

Se pueden observar tres clases diferentes de efectos, cuando se adiciona un agente antimicrobiano a un cultivo bacteriano que se desarrolla exponencialmente: Un efecto *bacteriostático* se observa cuando el crecimiento se inhibe, pero no hay acción de matar. Estos agentes suelen inhibir la síntesis de proteínas. Los agentes *bactericidas* evitan la proliferación e inducen muerte, pero no tiene lugar la lisis o ruptura celular. Y por último, los agentes *bacteriolíticos* que inducen la muerte por lisis celular, lo que se observa como una disminución en el número de células en la turbidez.

Los agentes antimicrobianos pueden variar en su toxicidad selectiva. Algunos actúan de modo no selectivo y tienen efectos sobre todo tipos de células. Otros son mucho más selectivos y tóxicos para los m.o. que para las células de los tejidos.

El uso de antimicrobianos (preservantes) es una práctica común en la industria de los alimentos, por muchos años se han utilizado antimicrobianos sintetizados químicamente (que en algunos casos han causado daño en la salud de los consumidores, si se utilizan a grandes dosis o como en el caso de los sulfitos), redundando en un rechazo por parte de los consumidores de productos procesados, por lo cual ha surgido la necesidad de buscar otras opciones. En esta búsqueda se han encontrado nuevos agentes antimicrobianos de origen natural, como sustitutos de los tradicionalmente utilizados [69].

Algunos antimicrobianos naturales se obtienen principalmente de hierbas, plantas, y especias. Lo más difícil es extraer, purificar, estabilizar e incorporar dicho antimicrobiano al alimento sin afectar su calidad sensorial y seguridad [71].

Muchos alimentos contienen compuestos naturales con AAM. En estado natural, estos compuestos pueden desempeñar el papel de prolongadores de la vida útil de los alimentos. Incluso muchos de ellos han sido estudiados por su potencial como antimicrobianos alimentarios directos. El uso de aditivos alimentarios de origen natural, implica el aislamiento, purificación, estabilización e incorporación de dichos compuestos a los alimentos con fines antimicrobianos, sin que ello afecte negativamente a las características sensoriales, nutritivas y a su garantía sanitaria. Esto tiene que lograrse manteniendo los costos de formulación, procesamiento o comercialización. Los sistemas antimicrobianos naturales pueden clasificarse por su origen:

1. Origen animal, incluye proteínas, enzimas líticas tales como lisozima, hidrolasas tales como lipasas y proteasas [72] y polisacáridos como el quitosano [73].
2. Origen vegetal, incluye compuestos fenólicos provenientes de cortezas, tallos, hojas, flores, ácidos orgánicos presentes en frutos y fitoalexinas producidas en plantas [73].
3. Origen microbiano, incluye compuestos producidos por microorganismos.

En muchos casos los antimicrobianos pueden no tener ningún efecto hasta que se rebasa una concentración crítica. Es por ello que comúnmente se determina la concentración inhibitoria mínima (CIM), definida como la más baja concentración de agente antimicrobiano, que previene el crecimiento visible del microorganismo en estudio, bajo condiciones definidas [74]. Se puede realizar a través de dilución en caldo o en agar, realizando diluciones seriadas, que contienen geométricamente concentraciones crecientes del agente antimicrobiano. En prácticas clínicas, este parámetro *in vitro*, es empleado para clasificar el m.o. evaluado, como: clínicamente susceptible, intermedio, o resistente a la droga testada. Diferentes organizaciones, como Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) de USA [75], y el Comité Europeo de Ensayos de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST) [76], publican estándares interpretativos para la clasificación de los resultados. La principal ventaja de esta técnica es que permite obtener un resultado cuantitativo, y la evaluación de un consistente número de bacterias, ya que se emplea un gran volumen de inóculo inicial.

La principal desventaja del método de macrodilución, es la tediosa preparación manual de las diluciones del antimicrobiano, el gran volumen de espacio y material, y la posibilidad de cometer errores en la preparación de las soluciones. Cabe destacar, que a diferencia del ensayo de antibióticos, cuando los agentes antimicrobianos evaluados son de origen natural, los resultados no son tan simples de clasificar. Davidson y Parish [77], mencionan que para la aplicación de los métodos “in vitro”, deben controlarse los demás factores que puedan intervenir en la respuesta del m.o. (temperatura, pH, actividad de agua, nutrientes) y señalan que uno de los factores es el propio m.o., es decir depende del tipo, género, especie y cepa del organismo en prueba. El número inicial de células utilizadas durante los ensayos con el antimicrobiano debe ser consistente para asegurar que los resultados sean reproducibles. En el caso de los antimicrobianos naturales Zaika [78], señala que el medio en que se prueba su eficacia, la especie, aceite o extracto a evaluar y el microorganismo afectan significativamente los resultados de las pruebas.

La estabilidad de algunos alimentos en contra del ataque de m.o., es debido a la presencia de ciertas sustancias naturalmente, que han mostrado poseer AAM. Algunas especies aromáticas poseen aceites esenciales con AAM. Entre ellos, eugenol en clavo, alicina en ajo, aldehído cinámico y eugenol en canela, alil isotiocianato en mostaza, eugenol y timol en salvia, y carvacrol y timol en orégano [79]. La leche de vaca contiene numerosas sustancias antimicrobianas, incluyendo transferrina, conglutinina y el sistema lactoperoxidasa. El huevo contiene lisozima. Derivados de ácidos hidroxicinámicos (p-cumárico, felúrico, ácido cafeico, y ácido clorogénico) fueron encontrados en frutas, verduras, té, melazas, y otras fuentes vegetales, demostraron actividad antibacteriana y en algunos casos, antifúngica [80]. Algunos compuestos fenólicos tales como resveratrol, hidroxitirosol, oleuropeina, quercetina y un número de ácidos fenólicos presentaron la capacidad de inhibir el crecimiento de varios m.o. patógenos [81-83]. La quercetina, presente en uvas y vino tinto, confiere muchos efectos benéficos entre ellos, ha demostrado AAM contra patógenos humanos [84].

3. CONCLUSIÓN

Como ha sido anteriormente desarrollado, los alimentos pueden ser degradados tanto por oxidaciones químicas como por acción microbiológica, produciendo alteraciones nutricionales y organolépticas que ocasionan pérdidas del “*flavour*” (sabor y aroma) y la calidad total del producto, por ello es de suma importancia desarrollar una metodología para prevenir o reducir las mismas, y poder asegurar la inocuidad y calidad de los alimentos que consumimos.

4. BIBLIOGRAFÍA

1. Halliwell, B., Gutteridge, J. 1989. Free radicals in Biology and Medicine. Eds. Halliwell, B. and Gutteridge, J., 2nd ed. Oxford University Press, New York.
2. Madhavi, D.L., Deshpande, S.S., Salunkhe, D.K. 1996. Food Antioxidant: technological, toxicological and health aspects. Marcel Dekker, Inc. USA, New York.
3. Halliwell, B. 1991. Free radicals and food additives. Eds. Aruoma, O.I. and Halliwell, B. Taylor and Francis, London, 11.
4. Ziegler, R.G., 1989. A review of epidemiologic that carotenoids reduce the risk of Cancer. *Journal Nutrition*. 119, 116-122.
5. Bendich, 1994. Recent Advances in Clinical Research Involving Carotenoids, *Pure & Applied Chemistry*. 66, 1017-1024.
6. Choe, E., Min, D.B. 2005. Chemistry and Reactions of Reactive Oxygen Species in Foods. *Journal of Food Science*. 70, 142-159.
7. Halliwell, J.M.C. 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. 3er ed. Oxford University Press.
8. Spitteller, G. 2001. Lipid peroxidation in aging and age dependant diseases. *Experimental Gerodontology*. 36, 1425-1457.
9. Burton, G.; Joyce, A., Keith Ingold, U. 1983. Is vitamin E the only lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes?. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 221, 281-290.

10. Haber, F., Weiss, J. 1934. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceedings of The Royal Society of London Ser. A.* 147, 332-351.
11. Fenton, H., Jackson, H. 1899. The oxidation of polyhydric alcohols in the presence of iron. *Journal of The Chemical Society.* 75, 1-11.
12. Burton G., Ingold, K.U. 1984. Beta-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science.* 224, 4649, 569-573.
13. Ryan, C.S., Kleinberg, I. 1995. Bacteria in human mouths involved in the production and utilization of hydrogen peroxide. *Archives of Oral Biology.* 40, 753-763.
14. Pericone, C.D., Overweg, K., Hermans, P.W., Weiser, J.N. 2000. Inhibitory and Bactericidal Effects of Hydrogen Peroxide Production by *Streptococcus pneumoniae* on Other Inhabitants of the Upper Respiratory Tract. *Infection and Immunity.* 68, 3990-3997.
15. Braun, A.M., Maurette, M.T., Oliveros, E. 1986. *Technologie Photochimique.* Presses Polytechniques Romandes CH-1015 Lausanne.
16. Khan, A.U., Kasha, M. 1963. Red Chemiluminescence of Molecular Oxygen in Aqueous Solution. *Journal of Chemical Physics.* 39, 2105-2106.
17. Foote, C.S., Weslwer, S. 1964. *Journal American Chemical Society.* 86, 3879.
18. Spikes, J.D. 1989. Photosensitization. *The Science of Photobiology*, Ed. Smith, K.C., 2ª edición. Plenum Press, New York. Capítulo 3, 79-110.
19. Foote, S.C. 1968. *Science.* 162. 3858, 963.
20. Nonell, S. 1988. Photosensitized Production and Physico-Chemical Properties of Singlet Molecular Oxygen O₂ (1Δg) in Systems of Biological Importance. Steady-State and Time-Resolved Near-IR Phosphorescence Studies. Tesis Doctoral. Max-Planck-Institut Mülheim a.d. Ruhr y referencias allí citadas.
21. Kearns, D.R. 1971. Physical and Chemical Properties of Singlet Molecular Oxygen. *Chemical Reviews.* 71, 395-427, y referencias allí citadas.
22. Kautsky, H., de Bruijn, H. 1931. The Explanation of the Inhibition of Photoluminescence of Fluorescent Systems by Oxygen: The Formation of Active, Diffusing Oxygen Molecules by Sensitization. *Naturwissenschaften.* 19, 1043-1043.

23. Foote, C.S., Denny, R.W. 1968. Chemistry of singlet oxygen quenching by β -carotene. *Journal American Chemical Society*. 90, 6232-6238.
24. Baltrop, J.A., Coyle, J.D. 1975. Principles of Photochemistry. John Wiley & Sons, Great Britain.
25. Foote, C.S. 1979. Photosensitized Oxidation and Singlet Oxygen: Consequences in Biological Systems. Ed. Pryor WA. Free Radicals in Biology. 2. NY: Academic Press, 35-56.
26. Rodgers, M.A. J., Powers, E.L. 1981. Oxygen and Oxy- Radicals in Chemistry and Biology. Ed. Academic press, New York.
27. Britton, G. 1995. Structure and Properties of Carotenoids in Relation to Function. *FASEB Journal*. 9, 1551-1558.
28. Halliwell B. 2007. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*. 35, 1147-1150.
29. Olson, J.A. 1989. Biological action of carotenoids. *The Journal of Nutrition*. 119, 1, 94-5.
30. Mc Cord, J.M., Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*. 244, 60409-60455.
31. Garrido, M.A. 2007. El peróxido de hidrógeno como mediador en el proceso de contracción-relajación. Estudios in vitro e in vivo. Tesis doctoral. Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina. Universidad de Alcalá.
32. Segura-Campos, M., Guerrero, L.C., Betancur Ancona, D. 2013. Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias. Omni-science.
33. Kojo, S. 2004. Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress, *Current Medicinal Chemistry*. 11, 1041-1064.
34. Tsou, T.C., Chen, C.L., Liu, T.Y., Yang, J.L. 1996. Induction of 8 hydrodehydroxyguanosine in DNA by chromium (III) plus hydrogen peroxide and its prevention by scavengers. *Carcinogenesis*. 17, 103-108.
35. Zhao, M.J., Jung, L. 1995. Kinetics of the competitive degradation of deoxyribose and other molecules by hydroxyl radicals produced by the fenton reaction in the presence of ascorbic acid. *Free Radical Research*. 23, 229-243.

36. Burton, G.W., Ingold, K.U. 1989. Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant, *Annals of the New York Academy Science*. 570, 7-22,
37. Pryor, W.A. 2000. Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials, *Free Radical Biological Medicine*. 28, 141-164.
38. Greemberg, E.R., Baron, J.A., Tosteson, T.D., Freeman, H.D., Beck, G.J., Bond, J.H. 1994. Clinical-trial of antioxidants vitamins to prevent colorectal adenoma. *New England Journal of Medicine*. 331, 141-147.
39. Dreher, D., Junod, A.F. 1996. Role of oxygen free radicals in cáncer development, *European Journal of Cancer*. 32 A, 30-38.
40. Krisnky, N.I. 1982. The science of Photomedicine. Eds. Regan, J.D. and Parrish, J.A. Plenum, New York. 397.
41. Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. 1995. Carotenoids. Vol 1A: Isolation and Analysis. Eds. Britton, G., Liaaen-Jensens, S., Pfander, H. Birkhäuser Verlag, Basel. y referencias allí citadas.
42. Tinkler, J.H., Böhm, F., Schalch, W., Truscott, T.G. 1994. Dietary carotenoids protect human cells from damage. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B. Biol.* 26, 283-285.
43. Packer, L. 1993. Antioxidant action of carotenoids in vitro and in vivo protection against oxidation of human low-density lipoproteins. *Annals New York Academy Science*. 691, 48-60.
44. Bertram J.S. 1999. Carotenoids and gene regulation. *Nutritional Review*. 57, 182-191.
45. Singh, D.K., Lippman, S.M. 1998. Cancer chemoprevention. Part 1: retinoids and carotenoids and other classic antioxidants. *New York Oncology*. 12, 1643-1658.
46. Srinivasan, M., Sudheer, A.R., Pillai, K.R., Kumar, P.R., Sudhakaran, P.R., Menon, V.P. 2007. Lycopene as a natural protector against c-radiation induced DNA damage, lipid peroxidation and antioxidant status in primary culture of isolated rat hepatocytes in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1770, 659-665.
47. Wolfe, K.L., Liu, R.H. 2007. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55, 8896-8907.

48. Li, H., Denga, Z., Liub, R., Loewenc, S., Tsao, R. 2013. Carotenoid compositions of coloured tomato cultivars and contribution to antioxidant activities and protection against H₂O₂-induced cell death in H9c2. *Food Chemistry*. 136, 878-888.
49. Busti, C., Falcinelli, E., Momi, S., Gresele, P. 2010. Matrix metalloproteinases and peripheral arterial disease. *Internal and Emergency Medicine*. 5, 13-25.
50. Mortensen, A., Skibsted, L.H., Truscott, T.G. 2001. The interaction of dietary carotenoids with radical species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 385, 13-19.
51. Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J.B., Christensen, A.B., Michael, G., 2002. Food spoiled interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 78, 79-97.
52. James, M.J. 2000. *Modern Food Microbiology*. 6th edition. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland. ISBN 0-8342-1671-X.
53. Schlegel Hans-Günter. 1997. Ed. Omega, S.A., Barcelona. ISBN 84-282-1030-6. y referencias allí citadas.
54. Karatapanis, A.E., Badeka, A.V., Riganakos, K.A., Savvaidis, I.N., Kontominas, M.G. 2006. Changes in flavour volatiles of whole pasteurized milk as affected by packaging material and storage time. *International Dairy Journal*. 16, 750-761.
55. Longo, M.A., Sanromán, M.A. 2006. Production of Food Aroma Compounds: Microbial and Enzymatic Methodologies. Production of Food Aroma Compounds. *Food Technology and Biotechnology*. 44, 335-353 y referencias allí citadas.
56. Schfler, C., Sren Molin, Wilkins, K. 1997. Volatile metabolites from some gram-negative bacteria. *Chemosphere*. 35, 1487-1495.
57. Ward, S.M., Delaquis, P.J., Holley, R.A., Mazza, G. 1998. Inhibition of spoilage and pathogenic bacteria on agar and pre-cooked roasted beef by volatile horseradish distillates. *Food Research*. 31, 19-26.

58. Calderon-Miranda, M.L., Barbosa-Canovas, G.V., Swanson, B.G. 1999a. Inactivation of *Listeria innocua* in skim milk by pulsed electric fields and nisin. *International Journal of Food Microbiology*. 51, 19-30.
59. Calderon-Miranda, M.L., Barbosa-Canovas, G.V., Swanson, B.G. 1999b. Inactivation of *Listeria innocua* in liquid whole egg by pulsed electric fields and nisin. *International Journal of Food Microbiology*. 51, 7-17.
60. San Martin, M., Harte, F.M., Lelieveld, H., Barbosa-Canovas, G.V., Swanson, B.G. 2001. Inactivation effect of an 18-T pulsed magnetic field combined with other technologies on *E. coli*. *Innovative Food Science and Emerging*. 2, 273-277.
61. Lado, B.H., Yousef, A.E. 2002. Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms. *Microbes and Infection*. 4, 433-440.
62. Branen, A.L. 1983. Introduction to use of antimicrobials. Eds. Davidson, P.M., Branen, A.L. *Antimicrobials in Foods*. Marcel Dekker, Inc., New York, NY. 1-9.
63. Naidu, A.S. 2000. *Natural Food Antimicrobial Systems*. CRC Press, Boca Raton, FL 818.
64. Davidson, P.M., Harrison, M.A. 2002. Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers, and other process controls. *Food Technology*. 56, 69-78.
65. Marino, M., Bersani, C., Comi, G. 1999. Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. *Journal of Food Protection*. 62, 1017-1023.
66. Webb, H.A., Tanner, W.F. 1944. Effect of spices and flavoring materials on growth yeasts. *Food Research*. 10, 273-282.
67. Hirasu, K., Takemasa, M. 1998. *Antimicrobial and antioxidant properties of spices. Spice science and technology*. Marcel Dekker Inc. New York. 163-200.
68. Fabian F.W., Krehl C.F., Little N.W. 1939. The role of spices in pickled food spoliage. *Food Research*. 4, 269.
69. Nychas, G.J.E., P.N., Skandamis, C.C., Tassou. 2003. Antimicrobials from herbs and spices. *Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods*. Ed. Roller, S. CRC Press. Washington, D.C. Capítulo 9, 177-199.

70. Davidson, P.M. 2001. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. *Food Microbiology: Fundamentals and frontiers*. Eds. Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. 2nd Edition. ASM Press. Washington D.C. 593-628.
71. Beuchat, L.R., Golden, D.A. 1989. Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technology*. 43, 134-142.
72. Beuchat, L.R. 2001. Control of foodborne pathogens and spoilage microorganisms by naturally occurring antimicrobials. *Microbial Food Contamination*. Eds. Wilson, C.L., Droby, S. CRC Press. London, UK. Capítulo 11, 149-169.
73. Davidson, P.M., Zivanovic, S. 2003. The use of natural antimicrobials. In: *Food Preservation Techniques*. Eds. Zeuthen, P., Bogh-Sorensen, L. Woodhead, Cambridge, UK, 5-30.
74. Wiegand, I., Hilpert, K., Hancock, R.E. 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*. 3, 2.
75. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; sixteenth informational supplement. CLSI document M100-S16CLSI, Wayne, PA. 2006.
76. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). 2003. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection*. 9, 9-15,
77. Davison, P.M., Parish, M.E. 1989. Methods for testing the efficacy of foods antimicrobials. *Food Technology*. 43, 1, 148-155.
78. Zaika, L. 1988. Spices and herbs: Their antimicrobial activity and its determination. *Journal of Food Safety*. 9, 97-118.
79. Shelef, L.A. 1983. Antimicrobial effects of spices. *Journal of Food Safety*. 6, 29-4.
80. James, M. 2000. *Modern Food Microbiology*. Ed. Sesma, J. Aspen Publishers, Inc. Sixth Edition. Library of Congress Catalog Card Number: 99-054735. ISBN 0-8342-1671-X

81. Aziz, N.H., Farag, S.E., Mousa, L.A.A., Abo-Zaid, M.A. 1998. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios Journal*. 93, 43-54.
82. Bisignano, G., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Crisafi, G., Uccella, N., Saija, A. 1999. On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 51, 971-974.
83. Papadopoulou, C., Soulti, K., Roussis, I.G. 2005. Potential antimicrobial activity of red and white wine extracts against strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. *Food Technology and Biotechnology*. 43, 41-46.
84. Aziz, N.H., Farag, S.E., Mousa, L.A.A., Abo-Zaid, M.A. 1998. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios*. 93, 43-54.

CAPÍTULO 3

Características, Propiedades y Funciones de Carotenoides y Goma Arábica

1. CAROTENOIDES

Los CAR son pigmentos naturales biosintetizados por algas, plantas superiores, y algunos microorganismos. Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, principalmente en plantas, flores, frutos, algas, peces y crustáceos, entre otros. Por sus funciones, son considerados compuestos indispensables para la vida, dado que están relacionados directamente con la fotosíntesis (captación de luz, fotoprotección, disipación de exceso de energía, etc.) [1,2].

1.1 Estructura Química

Químicamente, la mayoría de los CAR son tetraterpenoides, compuestos de 40 átomos de carbono formados por ocho unidades isoprenoides unidas de forma que la secuencia se invierte en el centro de la molécula, como se observa en la Figura 3.1. Es decir, la unión de dichas unidades es “cabeza-cola”, excepto en el centro de la molécula, donde es “cabeza-cabeza”. Debido a ello, los dos grupos metilo centrales de la cadena poliénica están separados por seis átomos de carbono, mientras que el resto están separados por cinco. La formación de un extenso sistema de dobles enlaces conjugados es el atributo que les confiere sus propiedades y funciones especiales [3]. La estructura básica de los CAR puede ser modificada de varias maneras, tales como, ciclización, migración de dobles enlaces, introducción de grupos sustituyentes, hidrogenación parcial, deshidrogenación, acortamiento o extensión de la cadena, rearrreglo, isomerización o combinaciones de estos, resultando en un gran número de estructuras químicas. Los *apocarotenoides*, son CAR que han sufridos escisiones, por lo que poseen un esqueleto de menos de 40 átomos de carbono. Algunos ejemplos, son el apo-

8'-carotenal y el apo-12'-carotenal, que corresponden a escisiones del BC en el C8' y C12', respectivamente, Figura 3.2.

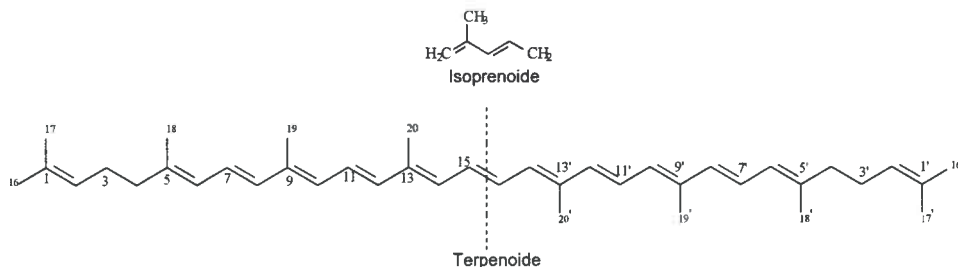


Figura 3.1. Estructura isoprenoide y tetraterpenoide.

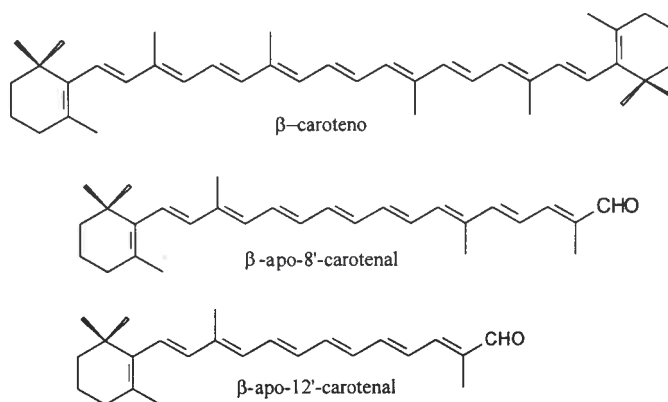


Figura 3.2. Estructura de carotenoides y apocarotenoides.

Los CAR, en función de los elementos químicos presentes en sus moléculas, pueden dividirse en dos grandes grupos: *carotenos*, que son hidrocarburos, como el BC, y las *xantofilas*, que contienen átomos de oxígeno. Debido a la presencia del sistema de dobles enlaces conjugados (d.e.c.), podrían existir en teoría muchos isómeros geométricos de cada CAR. Sin embargo, debido a impedimentos estéricos, sólo algunos son estables [1]. La mayoría de los carotenoides en la naturaleza, existen principalmente en su configuración más estable *todo-trans* (todo-E), pudiendo darse algunos casos particulares en la configuración *cis* como por ejemplo, bixina presente como (9'Z)-bixina en las semilla de *Bixa orellana* [4] y su derivado diácido, norbixina.

1.2 Estructura Electrónica y Espectroscópica

El sistema de d.e.c. constituye el cromóforo que absorbe luz principalmente entre 400-500 nm, dando a los CAR sus atractivos colores y provee el espectro de

absorción UV-Visible que sirve como base para su identificación y cuantificación. En el caso de los CAR la transición relevante es la $\pi \rightarrow \pi^*$, en la que uno de los electrones π enlazantes del sistema de d.e.c. es promovido al orbital antielazante π_g^* desocupado. Los electrones π están ampliamente deslocalizados, y el estado excitado es de baja energía, por lo que la energía requerida para la transición es pequeña y corresponde a la región visible en el rango de 400-500 nm.

1.3 Propiedades Biológicas

En el sistema fotosintético, su función es producir el efecto antena, como agente protector de la oxidación fotosensibilizada para disminuir la energía de excitación del estado triplete de la clorofila y $O_2 (^1\Delta_g)$.

1.3.1. Actividad Provitamina A

La principal función fisiológica de algunos CAR, especialmente del BC es su acción como precursor de la vitamina A. El retinol o vitamina A, es una vitamina liposoluble, que cumple un papel central en el proceso de la visión, el crecimiento, el mantenimiento de los tejidos epiteliales y el sistema inmunológico [3]. Su deficiencia nutricional ocasiona ceguera nocturna y la muerte prematura, especialmente en niños. De los más de 600 CAR conocidos actualmente, solo 50 tienen actividad provitamínica A, de acuerdo a su estructura [5]. Las condiciones para dicha actividad, son poseer anillos β insaturados y cadenas poliénicas de 11 átomos de carbono como mínimo [6,7]. Dos posibles rutas para la obtención de vitamina A, incluye, 1) corte central, en el doble enlace 15-15', a través del cual se generan dos moléculas de retinol. Dicho corte, es catalizado por la enzima β -caroteno 15-15'-dioxigenasa que se encuentra en tejidos de mamíferos, tales como intestino e hígado. La máxima actividad de la forma intestinal de esta enzima es suficiente para cubrir las necesidades nutricionales de vitamina A, pero no es lo suficientemente rápida para inducir hipervitaminosis A. Aunque BC posee la mayor actividad provitamínica A, su bioconversión a retinal es ineficiente. La susceptibilidad de retinal a reacciones de oxidación para formar, principalmente, ácido retinoico y luego productos inactivos, la baja absorción de los mismos comparada con la de la vitamina A preformada en la dieta, resulta sólo en alrededor de un sexto de utilización de retinal total. Es por eso, que para el cálculo de la actividad de vitamina A,

se considera que seis unidades de BC equivalen a una unidad de retinal [8]. Mientras que la segunda vía 2) corte excéntrico, que ocurre en uno o más de los otros dobles enlaces, genera dos moléculas de β -apocarotenal una larga y otra corta, dependiendo donde fue el corte, y éstas darán lugar a la formación de retinal.

La formación de vitamina A no está relacionada con la AAO, puesto que el consumo de CAR tales como licopeno y luteína que no poseen actividad provitamínica A, pueden ser tan efectivos como el BC, contra el cáncer y enfermedades del corazón [9].

1.3.2. Funciones Inmune

El efecto de CAR sobre el sistema inmune aparentemente está relacionado a sus propiedades AOx.

La respuesta inicial de leucocitos frente a infección involucra la producción de radicales libres y EROS. Dichas especies pueden ser eficientemente desactivadas por CAR con más de 9 d.e.c. Estudios *in vitro e in vivo*, han demostrado que CAR, y en particular BC, protege células fagocíticas del daño oxidativo, intensifica la respuesta proliferativa de linfocitos T y B, estimula las funciones efectoras de células T, y potencia la capacidad tumoricida de macrófagos [10,11].

1.4 Propiedades Fisicoquímicas

Por su naturaleza química, los CAR son compuestos lipídicos, aunque existen algunas excepciones, por lo que son insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos como acetona, metanol, éter dietílico, hexano, cloroformo y piridina, entre muchos otros [1]. Debido a su carácter hidrofóbico se encuentran normalmente en ambientes lipófilos, como en membranas. Mientras que su asociación con proteínas o reacciones de glicosilación, les permiten también estar presentes en medios acuosos [12]. En relación con el papel de los pigmentos CAR en membranas de distinta naturaleza, cabe señalar que los *carotenos* permanecen en el interior de las mismas, mientras que las *xantófilas* pueden encontrarse en otras localizaciones en las que interaccionan a través de sus grupos hidroxílicos con moléculas de fosfolípidos [13,14]. El carácter hidrofóbico de la mayoría de los CAR, hace que tiendan a la agregación y

cristalización en medio acuoso, siendo un ejemplo típico, los cristales de licopeno en los cromoplastos de los tomates [15].

Los CAR ácidos pueden formar sales sódicas o potásicas solubles en agua por tratamiento con álcali, como es el caso de bixina, astaceno o mitiloxantina [16]. Las carotenoproteínas son también solubles en agua y muy estables. El color de estos complejos, es estable durante años a temperatura ambiente y en contacto con el aire, por lo que tienen un gran interés para su empleo como colorantes [17].

Los CAR son muy sensibles al oxígeno, luz y temperatura. El calor, la luz, la presencia de ácidos y la adsorción sobre una superficie activa promueven la isomerización *trans*→*cis*. Esto resulta en una pérdida de color y de actividad provitamínica A, para los que la poseen. Durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos, se dan condiciones favorables para la isomerización u oxidación de los carotenoides.

La degradación oxidativa, la principal causa de pérdida de CAR, está estimulada por luz, enzimas, metales y la co-oxidación por hidroperóxidos lipídicos. La formación de epoxicarotenoides y apocarotenoides, son el paso inicial en la oxidación de los mismos. Fragmentaciones posteriores producen una serie de compuestos de bajos pesos moleculares, tales como iononas. Así la pérdida del color, y de la actividad biológica son la consecuencia de la degradación de los carotenoides.

1.5 *Actividad Antioxidante*

Los CAR son eficientes desactivadores de $O_2(^1\Delta_g)$ [18-21] y poseen actividad antirradicalaria (AAR) frente a radicales libres, tales como el ROO^\bullet , ejerciendo un efecto protector de compuestos biológicos, frente a la acción dañina de estas especies [19-22]. La AAO de CAR, es consecuencia de la capacidad del extenso sistema de d.e.c. presente en su estructura, para deslocalizar electrones no apareados [23].

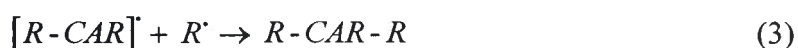
1.5.1 *Interacción de CAR con Radicales Libres*

La desactivación de radicales libres por CAR, puede ocurrir a través de uno o más de los siguientes procesos [24,25]:

Transferencia de Electrones: este paso conduce a la formación del radical catión carotenoide, $CAR^{\bullet+}$.



Reacción de Adición: forma un aducto caroteno-radical, el cual reacciona posteriormente para formar un producto no radicalario.



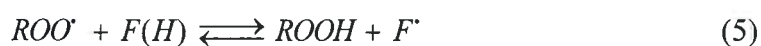
Abstracción de Hidrógeno: forma el radical carotenoide neutro, CAR^{\bullet} .



Además la adición de un electrón a la molécula de CAR, produce el anión radical $CAR^{\bullet-}$ por reducción [24].

1.5.2. Reacción de CAR con Radical Peroxilo

La oxidación lipídica es un proceso complejo que involucra tres etapas. A diferencia de otros AOx que previenen la iniciación de la peroxidación lipídica, los CAR frenan la reacción en cadena que ocurre durante la etapa de propagación, desactivando el radical ROO^{\bullet} . Muchos AOx de este tipo son compuestos fenólicos (F), como la vitamina E y los flavonoides, que eliminan los radicales ROO^{\bullet} mediante la donación de un átomo de hidrógeno, con la formación de un hidroperóxido lipídico y radical antioxidante estabilizado por resonancia (ec. 5). El radical antioxidante no es lo suficientemente reactivo como para propagar la cadena de peroxidación lipídica, y se descompone por reacción con otro radical formando productos estables.

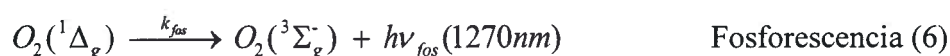


Se ha demostrado, que BC protege a los lípidos de membrana de la peroxidación. Existen evidencias que el mecanismo de desactivación del radical ROO• por BC, no procede vía una transferencia de electrones, sino mediante la formación de aductos y/o abstracción de hidrógeno. Burton e Ingold [26] sugirieron que BC desactiva radicales ROO• por su ataque y adición a su extenso sistema de d.e.c., formando un aducto radical centrado en carbono, peroxi-β-caroteno (ROOCAR•), estabilizado por resonancia. También puede formarse un estable radical β-caroteno centrado en carbono (CAR•), especialmente a baja presión parcial de oxígeno [27].

1.5.3. Desactivación de Oxígeno Singlete

El $O_2(^1\Delta_g)$ es formado de manera indirecta, a través de un proceso de fotosensibilización, como fue previamente descrito. Debido a su inestabilidad y alto nivel de energía, está involucrado en reacciones de oxidación que pueden perjudicar importantes componentes celulares como lípidos, enzimas, ácidos nucleicos, e incluso causar efectos dañinos en el ADN [28,29].

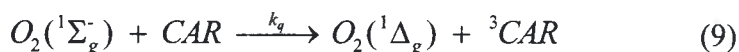
Se ha demostrado que los CAR son eficientes desactivadores de $O_2(^1\Delta_g)$, con valores de constantes de velocidad varios ordenes de magnitud mayores que la desactivación unimolecular, que puede ocurrir por fosforescencia o por vías no radiativas (ec. 6, 7) [30].



Donde k_{fos} y k_{NR} , representan las constantes de velocidad de desactivación unimolecular por fosforescencia y por vías no radiativa, respectivamente.

En principio, la desactivación bimolecular puede ocurrir mediante una reacción química formando productos de oxidación (ec. 8) y/o por un mecanismo de transferencia de energía (ec. 9).





Donde k_r y k_q representan las constantes de velocidad de desactivación reactiva y física, respectivamente. Una vez producido, el 3CAR puede retornar fácilmente a su estado fundamental, disipando el exceso de energía como calor (ec. 10), o ser desactivado físicamente por CES por $O_2(^3\Sigma_g^-)$:



En general, para la mayoría de los CAR, el proceso de desactivación química de $O_2(^1\Delta_g)$ (ec. 8) ocurre en menor proporción que el proceso de desactivación física (ec. 9), ya que la relación $(k_q / k_r) > 1000$. Así, los CAR se comportan como eficientes desactivadores catalíticos de $O_2(^1\Delta_g)$, siendo degradados en muy baja proporción, Figura 3.3.

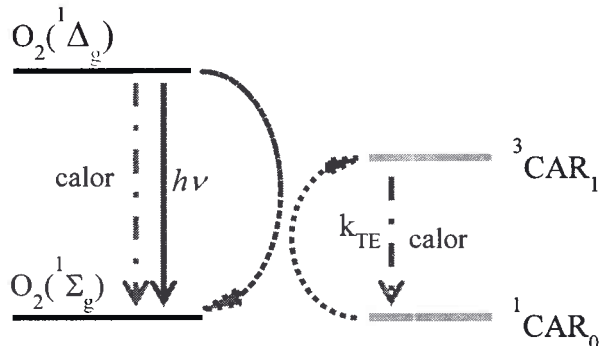


Figura 3.3. Mecanismo de desactivación de $O_2(^1\Delta_g)$ por carotenoides.

Foote y col. [31] fueron los primeros en demostrar que la capacidad de los CAR para desactivar $O_2(^1\Delta_g)$, está relacionada al número de d.e.c. que ellos contienen. Posteriormente, fue confirmado que los que poseen 9, 10 y 11 d.e.c., son desactivadores más eficientes de $O_2(^1\Delta_g)$, que aquellos con 8 o menos [32].

BC, es considerado uno de los desactivantes físicos presentes en alimentos. Foote y col., [33], determinaron que una molécula de dicho CAR, puede desactivar entre 250-1000 moléculas de $O_2(^1\Delta_g)$ con una constante de velocidad de $1,3 \times 10^{10} M^{-1} s^{-1}$.

Numerosos estudios de las propiedades fotoprotectoras de los CAR, han sido realizados en soluciones homogéneas de solventes no polares o poco polares, donde los CAR son suficientemente solubles, demostrando que son excelentes desactivadores de $O_2(^1\Delta_g)$ *in vitro*. Algunas investigaciones, emplearon solución acuosa micelar, como un modelo del ambiente biológico [34]. Anderson y Krinsky [35], estudiaron el efecto protector de CAR (BC y Cantaxantina) incorporados en liposomas, frente al daño causado por fotooxidación sensibilizada. Demostraron un efecto protector de ambos CAR, frente al proceso de fotosensibilización, siendo mayor la protección de BC. Sin embargo, no pudieron demostrar si los CAR actuaron como desactivantes exclusivos de $O_2(^1\Delta_g)$, o también de radicales libres.

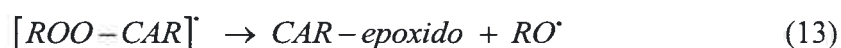
Como ha sido expuesto, la capacidad de desactivación $O_2(^1\Delta_g)$ de los CAR ha sido comprobada en numerosos trabajos de investigación. Sin embargo, las diferencias que se observan entre ellos, indican que existen muchas variables que contribuyen y afectan la capacidad de desactivación de los CAR, incluyendo la naturaleza del solvente, cambios estructurales de los CAR, tales como el número de d.e.c., y los grupos terminales. Por lo que no solo el nivel de energía del triplete, es responsable de las propiedades desactivantes o “quenching”, sino que también deberían estar involucradas las interacciones de transferencia de carga.

1.6 Actividad Prooxidante

Resultados contradictorios fueron informados por numerosos investigadores, sobre la actividad antioxidante de CAR, cuestionando si ejercen un efecto positivo o negativo en la oxidación de grasas [36-38]. Se demostró, que BC fue un activo prooxidante durante la auto-oxidación de grasa de cerdo [38]. Wodsak [39], informó que en exposición a iluminación, BC aceleró la oxidación de grasas, mientras que en oscuridad tuvo un efecto antioxidante.

Posteriores resultados demostraron, que el comportamiento de BC en el proceso de oxidación, depende de su concentración, del medio, así como también si el proceso ocurre en iluminación u oscuridad. Burton e Ingold [26], fueron los primeros en

proponer que BC podría participar en la peroxidación lipídica y ejercer una acción prooxidante, lo cual era dependiente de la presión parcial de oxígeno. Demostraron, que a bajas presiones parciales de oxígeno, BC actúa como un AOx, cortando la cadena de propagación (consumiendo ROO[•], ec. 2), mientras que a presiones parciales de oxígeno elevadas, el CAR[•], puede reaccionar con O₂(³Σ_g⁻), para generar un radical peroxilo carotenoide CAR-OO[•] (ec. 11). Este es un proceso de autooxidación, y el CAR-OO[•] puede actuar como un prooxidante por promover la oxidación de lípidos insaturados (RH) (ecs. 12 y 13) [31,40]. La autooxidación de CAR, es más pronunciada a altas concentraciones [41].



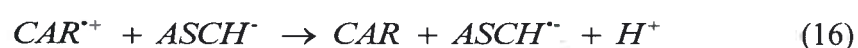
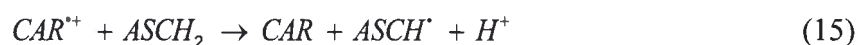
Numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* se han realizado a altas presiones parciales de O₂ (760 mm Hg), sin embargo, aunque se puede observar un efecto prooxidante de CAR, esto no representa las condiciones fisiológicas, donde los diferentes tejidos del cuerpo humano poseen una variada distribución de presión de O₂ [42]. Es por ello, que los CAR podrían presentar un comportamiento muy diferente en las distintas partes del cuerpo, pudiendo comportarse como menos efectivo AOx, pero no necesariamente como prooxidantes.

Wang y Russell [43], han demostrado los efectos procarcinogénicos de los productos de la oxidación (generalmente epóxidos, y apo-carotenales producidos a través de escisión oxidativa) de los carotenoides. Contenidos elevados de este tipo de productos de oxidación, se han detectado *in vitro*, en los tejidos de pulmón humano [43]. Sin embargo, no existe hasta el momento, evidencia directa de que los CAR ejerzan efecto perjudicial en enfermedades de humanos.

1.7 Interacción con otros Antioxidantes

Se conoce que muchos AOx, operan de manera sinérgica con otros, para proveer una efectiva barrera contra la oxidación, entre ellos, BC y α-tocoferol [44,45].

Truscott [46], propuso por primera vez un mecanismo integrado, para la interacción de las vitaminas C y E con BC. En este modelo, los CAR regeneran vitamina E (TOH) (ec. 14) y el CAR^{*+} que resulta, a su vez, es recuperado por la vitamina C ($ASCH_2$) (ecs. 15 y 16). Böhm y col. [47], demostraron que la interacción de los CAR con las vitaminas E y C es posible *in vitro*.



Un CAR polar, tal como zeaxantina o luteína, es capaz de atravesar la membrana lipídica, lo que le permitiría interactuar con AOX, tanto lipo- como hidrosolubles. Por el contrario, CAR como BC y licopeno (apolares), normalmente se encuentran incrustados en la matriz de la doble capa, por lo que se esperaría que fuera menos efectiva la interacción con Vitamina C, ya que por ser hidrofílica se encuentra en la interfaz de la membrana citosólica. Sin embargo, se presume que por el tiempo de vida largo y la polaridad del CAR^{*+} , éste migraría desde el núcleo hidrofóbico hasta la superficie de la membrana, y existe evidencia que indica que en un modelo de membrana los radicales formados de CAR dentro de un núcleo hidrofóbico, reaccionaron efectivamente con Vitamina E [24]. Se demostró además, que Vitamina C protegió del daño oxidativo mediado por Cu^{2+} , tanto a BC y vitamina. E, en lipoproteínas de baja densidad [48].

La protección sinérgica proporcionada por CAR y otros co-antioxidantes, depende de un balance entre todos los componentes. Un incremento en la concentración de CAR puede resultar en la formación de CAR^{*+} o aductos a un nivel mayor que el tocoferol/ascorbato puedan reparar, resultando en un efecto prooxidante.

1.8 Actividad Antimicrobiana

Existen numerosos estudios que demuestran el efecto benéfico de la adición de compuestos con capacidad antimicrobiana [49-53].

Los CAR son, como ha sido previamente mencionado ampliamente conocidos AOX que protegen a compuestos biológicos de la acción dañina de las EROS [19-22]. Sin embargo, poco se sabe acerca de si poseen AAM. Se han realizado investigaciones

sobre la AAM de los CAR bixina y norbixina. Gutierrez y col. [54], estudiaron las propiedades de *Bixa orellana* L. Ésta es una especie de planta arborecente, de las regiones intertropicales de América. De sus semillas, se extrae un pigmento localizado en la superficie, rico en CAR, especialmente apocarotenos como la bixina, isobixina y norbixina (Figura 3.4), y también otros como BC, criptoxantina, luteína y zeaxantina. Entre otras propiedades benéficas, fue comprobada su acción antimicrobiana, principalmente frente a bacterias Gram positivas, tales como *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus termophilus*, y *Listeria monocitógenes*, entre otros, aunque en menor medida, también frente a Gram negativas. Dicha capacidad, es dependiente de las concentraciones empleadas, y se cree que los responsables son la 9'-*cis*-norbixina y *trans*-norbixina. Adicionalmente, Fleischer y col. [55], comprobaron que los extractos etanólicos de hojas (contienen alcaloides [56]) y semillas de *Bixa Orellana* (conteniendo de CAR [57]), presentaron AAM frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) y la levadura *Candida albicans*.

En los últimos años, se ha observado un lento avance en la investigación de la AAM de los CAR. Priya y Maheswari [58] determinaron un amplio espectro de AAM de extractos metanólicos de CAR en residuos de pollos, frente a *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Saccharomyces cerevisiae*, aunque no observaron efecto de inhibición frente a *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus*. La mejora en la AAM del extracto de zanahoria, constituido en su mayoría por el pigmento BC, sobre el sistema Lactoperoxidasa bovina frente a *Salmonella enteritidis*, comprobado por Hayashi y col. [59] demuestran la acción benéfica del empleo de BC como agente antibacteriano.

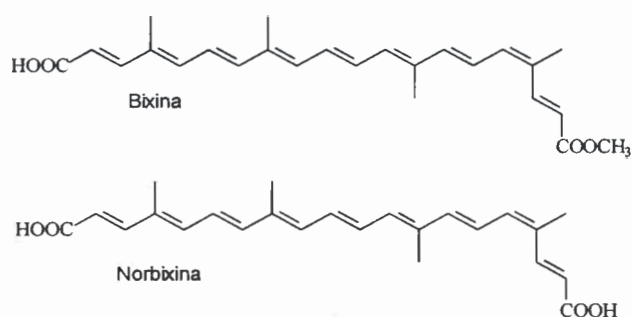


Figura 3.4. Estructura química de CAR bixina y norbixina.



1.9 *Microencapsulación de Carotenoides*

La microencapsulación se basa en el efecto de la incorporación de una sustancia de interés, en una matriz polimérica, que crea un microambiente en la cápsula, capaz de controlar las interacciones entre la parte externa e interna. Es definido como un proceso en el cual, pequeñas partículas o gotas, que son rodeadas o embebidas en una matriz homogénea o heterogénea, para dar pequeñas cápsulas, con numerosas propiedades útiles [60]. Es una técnica que permite la protección de una amplia variedad de materiales de interés biológicos, desde pequeñas moléculas y proteínas (enzimas, hormonas, vitaminas, volátiles aromáticos), hasta células bacteriana, animal o levaduras [61]. La versatilidad de dicha tecnología, hace que sea ampliamente aplicada a la industria alimentaria, en particular para la producción de alimentos nutraceuticos [62].

La microencapsulación es un proceso importante en la industria alimentaria, y se emplea, principalmente por seis razones, que: son proteger y reducir la reactividad del núcleo con los factores ambientales (temperatura, luz, oxígeno, etc.), disminuir la velocidad de transferencia del material del núcleo al ambiente externo, facilitar la manipulación, controlar la liberación del material del núcleo, enmascarar el sabor de los componentes del núcleo, y diluir el material del núcleo cuando debe emplearse en pequeñas cantidades [63-66].

La microcápsula (MC) obtenida, viéndola de una manera simplificada, es una pequeña esfera (con diámetros que van desde pocos micrómetros a milímetros), rodeada por una pared uniforme. El material que está dentro de la MC es denominado como núcleo, fase interna o relleno, mientras que la pared es llamada, algunas veces, caparazón, recubrimiento, material de pared, o membrana.

1.9.1 *Métodos de Microencapsulación*

Existen numerosos procesos de microencapsulación diferentes, tales como secado por aspersión, enfriamiento por aspersión, recubrimiento por suspensión de aire, extrusión, extrusión centrífuga, secado por congelamiento, coacervación, separación por suspensión rotacional, co-cristalización, atrapamiento en liposoma, polimerización interfacial, inclusión molecular, entre otras. La selección del método apropiado, estará determinada por las propiedades físicas y químicas del material interno y el de pared, y según el objetivo que se persiga.

1.9.1.1. Secado por Aspersión

En general, es considerado como un proceso de deshidratación, puede ser utilizado para encapsular un material activo, dentro de una matriz protectora formada por un polímero [67]. Se han desarrollado numerosas técnicas para microencapsular ingredientes alimentarios, sin embargo, el secado por aspersión es la tecnología más comúnmente empleada en la industria de alimentos, debido al equipamiento disponible a su menor costo de producción, respecto del resto de los métodos. La microencapsulación a través de secado por aspersión, ha sido exitosamente empleada durante muchas décadas en la industria alimenticia [68]. Es uno de los métodos más antiguos, empleados desde 1930, para encapsular flavor usando goma acacia como material de pared [69].

Una de las principales ventajas de utilizar el secado por aspersión como método de encapsulación es que los tiempos de secado son muy cortos, es decir, materiales termosensibles como las enzimas pueden ser secados satisfactoriamente sin provocar un daño tan severo en su estructura, mientras que otros tipos de equipos de secado resultarían inadecuados [70].

La aplicación del proceso de secado por aspersión en la microencapsulación, involucra cuatro etapas, descritas por Shahidi y Han [63]: preparación de la dispersión o emulsión, homogenización de la dispersión, atomización de la emulsión, y deshidratación de las partículas atomizadas.

La primera etapa, consiste en la formación de una emulsión fina y estable del núcleo en la solución del material de pared. La dispersión es calentada y homogenizada, con o sin la adición de un emulsificante dependiendo de las propiedades de emulsificación del material de pared, debido a que algunos de ellos presentan actividad interfacial. La retención del material de núcleo durante la microencapsulación por secado por aspersión, es afectada por la composición y las propiedades de la emulsión, además de las condiciones de secado.

La emulsión de aceite en agua obtenida es atomizada en la cámara de aire caliente, y la evaporación del solvente, generalmente agua, induce a la formación de MC. El corto tiempo de exposición y la evaporación rápida del agua, mantiene en el interior de la cápsula una temperatura inferior a los 40 °C, a pesar de las altas

temperaturas usadas en el proceso. Las principales condiciones operativas que deben ser optimizadas en el Spray-drying son: la temperatura de la alimentación, la temperatura de entrada y salida del aire.

1.9.2. *Materiales de Pared*

Se reconoce que el papel de un material de pared de encapsulación es doble [71]. En primer lugar, el material debe tener la superficie activa y las propiedades de formación de película. En segundo lugar, formar una matriz seca alrededor de las gotitas del núcleo, lo que les une dentro del encapsulado y evita la pérdida de volátiles y el contacto con la atmósfera. Esta última función, requiere de materiales capaces de formar concentrados de baja viscosidad, que se secan rápidamente para producir polvo no higroscópico y altamente soluble.

La composición del material de pared es fundamental, ya que determina las propiedades funcionales de la MC. Para ser considerado ideal, debe presentar características como: propiedades reológicas adecuadas, habilidad para dispersar o emulsificar el material activo y estabilizar la emulsión producida, no debe reaccionar con el material encapsulado durante el procesamiento y un almacenamiento prolongado, debe ser capaz de conservar el material activo dentro de la estructura formada, debe proveer una máxima protección del material activo respecto de las condiciones ambientales (oxígeno, calor, luz, humedad, etc.), poseer una buena solubilidad en solventes aceptados en la industria alimentaria (agua, etanol), y finalmente, ser económico y de grado alimenticio.

Dado que la mayoría de los procesos de microencapsulación en alimentos son llevados a cabo a partir de formulaciones de alimentos acuosos, el material de pared debe ser hidrosoluble, en un nivel aceptable. Materiales de pared típicos, incluyen: carbohidratos de bajo peso molecular (tales como goma arábiga (GA), maltodextrina (MD), quitosano, ciclodextrina, almidón modificado), carbohidratos de alto peso molecular (tales como carboximetilcelulosa, metilcelulosa), otros polisacáridos (goma acacia, agar, alginatos y carragenina) y proteínas (incluyendo: gluten, caseína, gelatina, albúmina, péptidos, proteínas de suero). Aunque éstas últimas se emplean en menor medida, ya que su uso puede ser tedioso y costoso, debido a su baja solubilidad en agua.

GA es ideal para la encapsulación de los lípidos, ya que cumple las funciones tanto de un agente tensoactivo y la matriz de secado. Las propiedades de solubilidad, de baja viscosidad y formación de emulsiones han facilitado el uso de GA como un agente de encapsulación para la retención y protección de compuestos químicamente reactivos y volátiles en saborizantes de alimentos comerciales.

GA ha sido muy utilizada como material de pared en microencapsulación por secado por aspersión. Reineccius [72], ha informado sobre la encapsulación de aceite de naranja utilizando la goma arábica. Su principal desventaja, es su costo por la sobredemanda. No obstante, debido a su eficacia reportada en diferentes investigaciones [73], con respecto a otros materiales pared como la MD y el almidón modificado, el costo podría no ser relevante, mientras se obtenga una protección o estabilidad mayor para productos microencapsulados de alto valor, de interés alimentario o farmacéutico. Además, GA resultó ser mejor material de pared para la encapsulación de oleorresina de cardamomo que MD y almidón modificado [74,75]. También fue informado recientemente, que GA es un buen material de pared para la encapsulación de oleorresina de comino, mediante secado por aspersión [76]. Dicho biopolímero, es también ampliamente utilizado para la microencapsulación de lípidos, ya que produce emulsiones estables con la mayoría de los aceites en un amplio rango de pH, y posee la capacidad de formar films [77]. Silva y col. [78] demostraron que GA en una relación 1:6 con anhídrido octenil succínico, fue el más eficiente método para la encapsulación de propóleos.

Debido a su estructura química hidrófoba, los CAR, no son fácilmente dispersables en sistemas acuosos, además como se mencionó anteriormente, son altamente lábiles y reactivos a las condiciones ambientales, la microencapsulación es una técnica muy efectiva, que permite su protección y una amplia variedad aplicaciones en alimentos. Barbosa y col. [79] estudiaron la fotoestabilidad del CAR bixina microencapsulado en diferentes polisacáridos comestibles. Encontraron que bixina microencapsulado en GA, fue de 3 a 4 veces más estables, que la microencapsulada con MD. Demostraron además, que el proceso de microencapsulación, favorece la fotoestabilidad de bixina en un factor de 10. Otros CAR han sido encapsulados en diferentes polímeros, tal como es el caso de BC, encapsulado en almidón extraído de piñón (semillas de *Araucaria angustifolia*) nativo e hidrolizado [80]. En dicho estudio,

demonstraron que las cápsulas con almidón hidrolizado (12 dextrosa equivalente, DE), mejoraron la estabilidad de BC, respecto de aquellas con almidón nativo. Faría y col. [81], compararon la eficiencia de microencapsulación (EM) de varios carotenoides empleando GA y MD (20DE) como material de pared. Pudieron demostrar, que GA incorporó casi completamente en el núcleo de la MC (> 95% EM), mientras que MD incorporó con mayor eficiencia aquellos CAR de menor peso molecular, siguiendo un orden apo-12'-carotenal (93%) > apo-8'-carotenal (76%) > BC (64%). Además, determinaron que GA actúa como desactivante de 1O_2 , siendo 300 veces más eficiente que MD, potenciando así las funciones de GA, que no sólo actuaría como recubrimiento y vehículo de los componentes incorporados en su interior, sino que posee una capacidad AOx adicional.

2. GOMA ARÁBIGA

La GA, es un biopolímero comestible exudado de árboles de las especies *Acacia senegal* y *Acacia seyal*, las cuales crecen en la región Sahel de África, principalmente en Sudan. La goma exuda de los tallos y las ramas de los árboles (por lo general de cinco años de edad o más) cuando son sometidos a condiciones de estrés como la sequía, los suelos pobres o lesiones. Los polisacáridos de goma, representan uno de los más abundantes materiales crudos. Han sido ampliamente estudiados, debido a su sustentabilidad, biodegradabilidad, y bioseguridad [82]. El término goma, es empleado para describir un grupo de polisacáridos naturales que poseen amplias aplicaciones industriales, debido a sus capacidades de formación de gel, como agente espesante o estabilizante [83,94].

El creciente interés por los exudados de gomas, se corresponde a sus diversas propiedades estructurales, y funciones metabólicas en alimentos, productos farmacéuticos, cosmética, textil, biomédica, y como sistemas de transporte de drogas [84]. Además, pueden ser utilizados como fibra dietaria, modificadores de textura, agente gelificante, estabilizante, de recubrimiento y película para embalaje [85].

2.1. Composición y Estructura Química

GA es un heteropolisacárido natural, compuesto de aproximadamente un 98% de polisacáridos y un 2% de polipéptido [86]. Consiste de una cadena ramificada de

polisacáridos, ya sean neutros o ligeramente ácidos. La cadena central está constituida por uniones β -(1 \rightarrow 3)D-galactopiranosil, mientras que las cadenas laterales se componen de dos a cinco unidades de enlaces β -(1 \rightarrow 3)D-galactopiranosil, enlazados a la cadena principal por enlaces 1 \rightarrow 6. Tanto la cadena principal, como las cadenas laterales, contienen unidades de α -L-arabinofuranosil, α -L-ramnopiranosil, β -D-glucuronopiranosil y 4-O-metil- β -D glucuronopiranosil, los dos últimos en su mayoría como unidades terminales [83,87].

La composición química de GA puede variar ligeramente con su origen, clima, estación, edad del árbol y con las condiciones de procesamiento, tales como secado por aspersión [88-92]. Por este motivo, es que existen algunas diferencias en la composición química de la GA obtenida de *Acacia senegal* o *Acacia seyal*. De hecho, las dos gomas poseen los mismos residuos de azúcares, pero la goma de *Acacia seyal* tiene un menor contenido de ramnosa y ácido glucurónico, y un contenido superior de arabinosa y 4-O-metil ácido glucurónico, que la goma de *Acacia Senegal*. La goma de *Acacia seyal*, contiene una menor proporción de nitrógeno y las rotaciones específicas son también muy diferentes. La determinación de estos últimos parámetros pueden proporcionar un medio rápido de diferenciar entre las dos especies [93]. En la Tabla 3.1, se presenta la composición química y algunas propiedades de ambas gomas informada por Williams, [94].

Tabla 3.1. Composición química y propiedades características de gomas provenientes de *Acacia senegal* y *Acacia seyal* [93,94].

Parámetro	<i>Acacia senegal</i>	<i>Acacia seyal</i>
% Ramnosa	14	3
% Arabinosa	29	41
% Galactosa	36	32
% Ácido Glucurónico	14.5	6.5
% Nitrógeno	0,365	0,147
% Proteína	2.41	0.97
Rotación específica (grados)	-30	+ 51
Masa molecular promedio (Da)	380.000	850.000



La composición de aminoácidos es similar para ambas gomas, recientemente Mahendran y col., [95] informaron la composición de aminoácidos de GA obtenida de *Acacia Senegal*, siendo los principales aminoácidos encontrados, hidroxiprolina, serina, treonina, leucina, glicina e histidina, Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Contenido de aminoácidos de GA [95].

Aminoácido	(nmol/ mg) GA
Hidroxiprolina	54,200
Serina	28,700
Treonina	15,900
Prolina	15,600
Leucina	15,100
Histidina	10,700
Ácido aspártico	10,600
Ácido glutámico	8,290
Valina	7,290
Fenilalanina	6,330
Lisina	5,130
Alanina	5,070
Isoleucina	2,380
Tirosina	2,300
Arginina	2,120
Metionina	0,110
Cisteína	0,000
Triptofano	0,000

Ambas gomas, poseen distribución de masa moleculares compleja y muestran características similares, pero la masa molecular promedio de la goma de *Acacia seyal* es mayor que la de *Acacia senegal* (Tabla 3.1).

En los últimos años, se llevaron a cabo numerosas investigaciones con el objetivo de revelar la estructura molecular de GA, y relacionarla con sus excepcionales propiedades emulsionantes y reológicas.

Estudios de los perfiles de distribución de masas moleculares de gomas de *Acacia senegal* y *Acacia seyal*, obtenidos por cromatografía de permeación en gel utilizando como sistema de detección, índice de refracción acoplado a un detector de dispersión de luz, indican que ambas gomas constan de dos componentes, el principal que representa aprox. el 90% del total con un peso molecular mayor a 100×10^3 Da y uno secundario que representa aproximadamente el 10% del total, con una masa molecular superior a 1×10^6 Da. Por otra parte, los resultados obtenidos utilizando cromatografía de permeación en gel con detección UV (260 nm), indican la presencia de tres componentes, dos corresponden a los detectados con índice de refracción, mientras que el tercer componente, se asocia a materiales ricos en proteínas y representa sólo el 1% de la masa total. Esta última fracción, tiene una masa molecular de aprox. 200×10^3 Da. Estos estudios han demostrado que GA se compone principalmente de tres fracciones [94-98]:

(1) La principal fracción es un polisacárido de β -(1 \rightarrow 3) galactosa, altamente ramificado con unidades de ramnosa, arabinosa y ácido glucurónico (el cual se encuentra en la naturaleza como sales de magnesio, potasio y calcio). Esta fracción se denomina Arabinogalactano (AG), representa un 88% del total, con un bajo contenido proteico (0,35%) y una masa molar aprox. 3×10^5 Da [99]. Sanchez y col. [100] demostraron a través de experimentos de dispersión, microscopía de transmisión de electrones y microscopía de fuerza atómica, que esta fracción posee una morfología tipo disco, con un diámetro de 20 nm y un espesor menos a 2 nm.

(2) Una fracción secundaria que constituye el 10% del total, posee un contenido proteico del 11% y una masa molar de $1,4 \times 10^6$ Da, correspondiente a un complejo Arabinogalactano-Proteína (AGP), en la cual, las cadenas de arabinogalactano se unen covalentemente a una cadena de proteínas, a través de residuos de serina e hidroxiprolina [101].

(3) La fracción más pequeña (1% del total), que tienen el mayor contenido de proteína (50% en peso) es una glicoproteína (GP) que difiere en su composición de aminoácidos de la de los complejos AGP [102].

El contenido total de hidratos de carbono de las tres fracciones son similares, según lo reportado por Williams y col. [102]. Sin embargo, se encontró que las

fracciones ricas en proteínas, poseen un contenido de ácido glucurónico significativamente menor.

Estudios realizados por Renard y col. [99] sobre las distintas fracciones de GA, utilizando dicroísmo circular demostraron que los componentes de AGP y GP poseen una estructura secundaria, mientras que para el componente de AG no existiría tal estructura. Qi y col. [103] aislaron la fracción de AGP por cromatografía de filtración en gel preparativa y la sometieron a deglicosilación con ácido fluorhídrico. Ellos encontraron que la proteína remanente consistía de aprox. 400 aminoácidos, con aprox. 130 residuos de hidroxiprolina. Por otra parte, estudios realizados por Mahendran y col. [95] sobre la fracción AGP, indicaron que la misma se compone de bloques de hidratos de carbono unidos a una cadena polipeptídica. Observaron, que un número significativo de las uniones son a través de residuos de serina y de hidroxiprolina. Adicionalmente, estudios de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) sobre muestras de GA deglicosilada con ácido fluorhídrico indican, que hay dos supuestos centros de proteínas. Uno, con una masa de alrededor de 3×10^4 Da, que correspondería a una proteína de aprox. 250 aminoácidos detectado como un banda borrosa, lo que indicaría que se mantiene parcialmente glicosilada. Y un segundo centro, con una masa de alrededor de 5×10^3 Da, que correspondería a cerca de 45 aminoácidos. Este componente proteico, puede estar asociado con la fracción AG. Los datos presentados por la fracción de alto peso molecular AGP son consistentes con el modelo de “*wattle blossom*” (flor de acacia), informado para AGP en el que los bloques de hidratos de carbono están unidos a una cadena común de polipéptido, Figura 3.5.

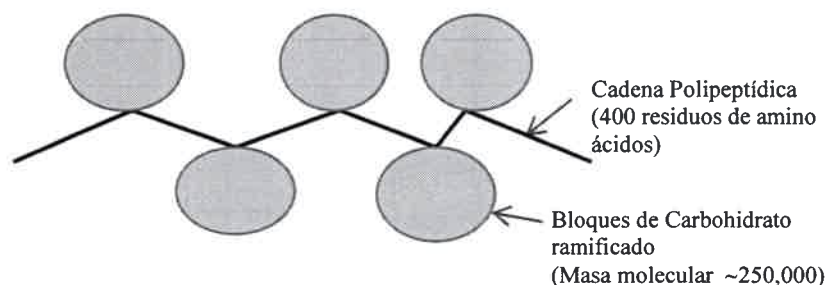


Figura 3.5. Estructura tipo Wattle blossom de la fracción alto peso molecular de goma de *Acacia Senegal*. Esquema adaptado de Fincher y col. [104].

Los resultados obtenidos por Mahendran y col. [95] indican, que los bloques de hidratos de carbono son del orden de 4×10^4 Da y pueden tener una estructura delgada elipsoide, que ha sido publicado recientemente para el componente AG [100]. Finalmente, proponen que la estructura de la fracción de AGP puede ser representado esquemáticamente como se muestra en la Figura 3.6.

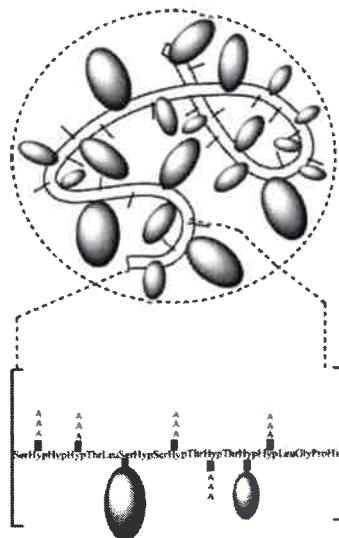


Figura 3.6. Representación esquemática de la estructura del complejo AGP de GA [95].

2.2. Propiedades Biológicas

Las propiedades funcionales de la GA están estrechamente relacionadas con su estructura, la cual determina por ejemplo, la forma en que interactúa con el agua y el aceite en una emulsión. Las propiedades físico-químicas pueden variar dependiendo de la fuente, la edad de los árboles, el tiempo de la exudación, el tipo de almacenamiento, y del clima [105].

Recientes investigaciones han afirmado, que GA posee relevantes propiedades biológicas, tales como: AAO [106-108], sobre el metabolismo de los lípidos [109,110], contribución positiva en enfermedades renales [111-113], cardiovasculares [114] y gastrointestinales [115,116].

2.2.1. *Propiedades Emulsificantes*

Una importante función de la GA, es su capacidad para actuar como emulsionante para aceites esenciales y aromas. Randall y col. [117] informaron que el complejo AGP es el principal componente de GA, responsable de la capacidad de estabilizar emulsiones. Propusieron que el componente proteico anfifílico del AGP se unen a las moléculas de la superficie de las gotas de aceite, mientras que la fracción de carbohidratos hidrofílicos se orienta hacia la fase acuosa, lo cual evita la agregación de las gotas a través de repulsiones electrostáticas. Dicho complejo, contiene aprox. un 20% de proteína y sus propiedades emulsionantes son correlacionadas con el contenido de nitrógeno. Solo un 1-2 % de la goma es adsorbida sobre la interface aceite-agua y participa en la emulsificación, por lo que se requiere contenidos superiores al 12% de GA para estabilizar emulsiones con 20 % de aceite de naranja [102]. Si no hay cantidad suficiente de goma para cubrir todas la gotas, no se forma una emulsión estable y ocurre la floculación y coalescencia.

2.2.2. *Propiedades Farmacológicas*

Dado que la GA, puede llegar al intestino grueso sin la digestión en el intestino delgado, puede ser clasificada como un carbohidrato no digerible o fibra dietaria. Ésta es fermentada por las bacterias intestinales en ácidos grasos de cadena corta, en el intestino grueso [118]. Es capaz de aumentar selectivamente la proporción de bacterias lácticas y bifidobacterias, en sujetos sanos. Se fermenta lentamente, produce ácidos grasos de cadena corta, y la digestibilidad fecal es alrededor del 95%. Debido a sus propiedades físicas, retarda la absorción de glucosa, aumenta la masa fecal, los ácidos biliares y tiene un potencial de modificar beneficiosamente el estado fisiológico de los seres humanos [119]. Además, su tolerancia intestinal es excelente y altas dosis diarias pueden ser consumidos sin ningún tipo de eventos adversos intestinales.

La tendencia actual al estudio del efecto de la nutrición sobre la salud humana, ha llevado al desarrollo de números trabajos científicos, en los que evalúan particularmente el efecto sobre enfermedades renales [120,121]. La mayoría de los cuales utilizan regímenes de restricción en proteínas [122,123]. La suplementación de la dieta con carbohidratos fermentecibles, ha sido propuesta como una alternativa por Winchester y Salsburgh [124] siendo el efecto de los mismos, el aumento de nitrógeno

ureico excretado en las heces con la consecuente disminución en el nitrógeno total de excretado en la orina de los pacientes [114-127]. La extracción, modificación y reciclaje de desechos nitrogenados en el tracto gastrointestinal, podría ser una medida para sustituir a falta de la función renal.

En un estudio realizado por Matsumoto y col. [111] que consistió en el tratamiento de personas sanas por 8 semanas con suplementación a base de GA (SUPERGUM), se determinó que aumentó la concentración de butirato sérico. Por otra parte, analizaron el rol de butirato en la generación de citoquina pro-fibrótico factor de crecimiento transformante beta 1 (TGFbeta1), por células epiteliales renales. Los resultados obtenidos *in vitro*, demostraron que la exposición de células epiteliales renales a elevadas concentraciones de butirato, suprimieron la síntesis, tanto basal como estimulada, de TGFbeta1. Lo que indica, que GA posee un efecto benéfico indirecto sobre la generación de citoquina pro-fibrótica.

En cambio, en un modelo experimental de insuficiencia renal crónica (IRC), Ali [128] demostró que el tratamiento de ratas con GA, en dosis de 3 a 6 g/100 ml en el agua potable durante cinco semanas consecutivas no fue efectivo, ya sea en revertir la disminución en el peso corporal, o el aumento de la creatinina y la urea observadas 2 semanas después la inducción de IRC. Por el contrario, efectos benéficos con la suplementación de GA en la dieta de pacientes con IRC fueron observados, según se informó en dos centros en los EE.UU. [112].

Recientemente, Ali y col. [113] evaluaron el efecto de la GA sobre la concentración de ciertos metabolitos en el suero, de pacientes con IRC en una dieta baja en proteínas. GA fue administrada en una dosis oral de 50 g / día durante 3 meses, con o sin suplementar la dieta con sulfato ferroso (200 mg/día) y ácido fólico (5 mg/día). La creatinina sérica, urea, fosfato y ácido úrico, se informó que fueron significativamente reducidos por GA, mientras que el tratamiento aumentó significativamente el nivel de calcio sérico. A pesar de que no hay una explicación exacta para estos resultados, se llegó a la conclusión de que GA podría aliviar los efectos negativos de la IRC.

Los efectos de la GA sobre el metabolismo de los lípidos, son variables. GA aumentó la biosíntesis de colesterol en ratas alimentadas con una dieta rica en colesterol, pero no tuvo efecto en las ratas alimentadas con una dieta libre de colesterol [129]. Ross y col. [130] y Sharma [131] reportaron una reducción de colesterol total en

un 6% y 10,4%, respectivamente, cuando los sujetos recibieron 25 g/día y 30 g/día de GA, por períodos de 21 y 30 días. La disminución, se limitó solo al colesterol LDL y VLDL, sin ningún efecto sobre el HDL y los triglicéridos. Topping y col. [132] han demostrado que las concentraciones plasmáticas de colesterol, no se vieron afectados por el suministro de GA, pero los triglicéridos en plasma fueron significativamente más bajos que en los controles.

Diversos mecanismos se han propuesto para explicar el efecto hipocolesterolémico de GA [133,134]. Algunos estudios han sugerido, que la viscosidad de la fibra dietaria fermentable, contribuye sustancialmente a la reducción de lípidos en animales y humanos [135,136], mientras que otro sugiere que esta propiedad no se refiere a los lípidos plasmáticos [137]. El mecanismo más claramente implicado, está relacionado con el aumento de ácido biliar y la excreción fecal de esteroides neutros, o una modificación de la digestión y la absorción de lípidos [136]. Esto, consecuentemente, produce la promoción de la desviación de colesterol para la síntesis de ácidos biliares, además de inducir un mayor número de receptores de lipoproteínas en el hígado y disminución de la concentración plasmática de colesterol. Además, la GA tiene una alta capacidad de unión de cationes, en especial para el calcio (Ca^{2+}). La degradación de los GA en el ciego, libera los ácidos biliares secuestrados y el pH ácido generado durante el proceso de fermentación los hace insolubles. El calcio unido también es liberado y forma complejos insolubles con ácidos biliares, promoviendo así su excreción [136].

Finalmente, cabe destacar, que posterior a una prolongada discusión por el reconocimiento de GA como alimento, y no sólo como “aditivo alimentario”, Reino Unido y Francia, aprobaron legalmente a GA como fibra dietaria, lo que ha sido sustentado con numerosas investigaciones científicas [95]. Incluso una monografía con pruebas toxicológicas sobre GA por WHO [138] demuestran que carece de toxicidad aguda, sub-aguda, y crónica (evaluado con pruebas en rata, ratón, conejo, cerdos), y de genotoxicidad (evaluada en bacterias y levaduras *in vitro*, y en *Drosophila* y un ensayo dominante letal en ratas).

2.2.3. Actividad Antioxidante

Algunos autores, estudiaron la AAO de GA. Los resultados de estudios realizados *in vivo*, presentan serias controversias. Una serie de artículos publicados por un grupo de investigadores, afirman un efecto protector de la GA contra la nefrotoxicidad de gentamicina y cisplatina [139,140] y cardiotoxicidad por doxorubicina [141] en ratas. Sin embargo, Ali y col. [142] reportaron que el tratamiento de ratas con GA produce sólo un leve efecto paliativo de la nefrotoxicidad de gentamicina. Posteriormente, Trommer y Neubert [106] estudiaron las propiedades antioxidantes y los efectos reductores de la peroxidación lipídica *in vitro* de diversos compuestos polisacáridos (incluyendo GA). Encontraron que GA protege contra la peroxidación de lípidos en piel, de una manera dosis-dependiente. También, se ha reportado por Ali [128], que la administración de GA en concentraciones del 2,5%, 5% y 10% en agua potable durante ocho días consecutivos a las ratas, no alteró significativamente tanto las concentraciones de los secuestradores de radicales libres, GSH, AA y la SOD, o la peroxidación lipídica. Estos resultados, sugieren que no hay evidencias suficientes de que GA tiene una fuerte acción antioxidante.

Estudios realizados *in vitro* por Rodrigues y col. [143], determinaron la capacidad antioxidante de microcápsulas de GA y MD, conteniendo antioxidantes (trolox, α -tocoferol, β -caroteno, apo-8'-carotenal y apo-12'-carotenal), contra EROS, entre ellas, ROO^\bullet , H_2O_2 , HO^\bullet , HOCl y especie reactiva de nitrógeno (ERN), tal como peroxinitrito (ONOO). Los autores concluyeron, que la MC vacía de GA posee una mayor capacidad desactivante que la de MD, y que la incorporación de apo-8'-carotenal en el interior de la cápsula, mostró el mayor incremento en la desactivación de las especies en estudio, comparado al resto de los AOx evaluados. A su vez, Faría y col. [81] demostraron la capacidad de desactivación de $^1\text{O}_2$, por microcápsulas de GA o MD, conteniendo moléculas antioxidantes, como CAR o derivados de tocoferol. Los resultados arrojados en dicho estudio, demuestran que la eficiencia de desactivación de $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$ de los AOx, es fuertemente dependiente del efecto de compartimentalización de los mismos en el núcleo de la MC, y de la accesibilidad del $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$ al interior de la misma, lo que es gobernado por la lipofilicidad del AOx.

Además, demostraron que la MC de GA por sí misma es más efectivo desactivante de $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$ que la MC de MD, lo que concuerda con los resultados

presentados por Rodríguez y col., [143]. Esta capacidad, probablemente se deba a la presencia de residuos aminoácidos, en la porción proteica de la GA.

2.2.4. Actividad Antimicrobiana

En cuanto a la AAM de GA, pocos estudios han sido realizados, informando principalmente que presenta actividad inhibitoria del crecimiento de ciertas especies patógenos periodontal (o agente causal de caries o agente implicado en la placa bacteriana), tales como *Prophyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia* [144]. Estos resultados sugieren, que GA podría inhibir la formación de placa bacteriana y junto con su efecto mejorador de la remineralización dental, lo que indicaría que GA puede actuar como un potencial agente preventivo en la formación de caries [145]. Tales efectos se atribuyen al alto contenido de sales de Ca^{2+} , Mg^{2+} , y K^+ de polisacáridos en GA, y al efecto de la goma en el metabolismo de Ca^{2+} y posiblemente fosfato. Además, es sabido que GA contiene glucósidos cianogenéticos y muchos tipos de enzimas, tales como oxidasas, peroxidasas, y pectinasas, algunas de las cuales poseen propiedades antimicrobiana [146,147].

Saini y col. [148] estudió el efecto antimicrobiano de diferentes especies de acacia, incluida *Acacia senegal*, empleando diferentes partes de la planta (vaina, corteza, etc.), frente a tres cepas de bacterias Gram positivas (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*) y dos Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*) y tres cepas fúngicas (*Cándida albicans*, *Aspergillus niger* y *Microsporum canis*). El estudio reveló, que los extractos metanólicos de las especies *Acacia catechu* y *Acacia nilotica*, mostraron la máxima actividad antimicrobiana. Esto se debe a la presencia de componentes hidrofílicos, tales como polifenoles, polisacáridos (goma), y taninos, presentes en una o más partes de la planta. Los extractos de hexano de dichas especies, también mostraron actividad significativa. En cuanto a *Acacia senegal*, empleando la corteza, determinaron que el extracto en hexano, presentó AAM frente a *Staphylococcus aureus* y *Cándida albicans*, mientras que el extracto metanólico presentó AAM frente a *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, y los hongos *Cándida albicans* (levadura) y *Aspergillus niger*.

Sin embargo, no se han realizados estudios de AAM frente a microorganismos capaces de desarrollarse en alimentos, tales como los psicrótrofos en productos lácteos,

almacenados a bajas temperaturas, o microorganismos esporoformadores, que son capaces de resistir condiciones de pasteurización y generar flavor desagradables en el alimento, con la consecuente pérdida de calidad nutricional del mismo.

3. BIBLIOGRAFÍA

1. Britton, G. 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB Journal*. 9, 1551-1558.
2. Frank, H.A., Chynwat, V., Desamero, R.Z.B., Farhoosh, R., Erickson, J., Bautista, J. 1997. On the photophysics and photochemical properties of carotenoids and their role as light-harvesting pigments in photosynthesis. *Pure and Applied Chemistry*. 69, 10, 2177-2124.
3. Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. 1995. Carotenoids. Vol 1A: Isolation and Analysis. Eds. Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. Birkhäuser Verlag, Basel y referencias allí citadas.
4. Mercadante, A.Z., Pfander H. 1998. Carotenoids from annatto: a review. *Recent Research in Developments in Agriculture & Food Chemistry*. 2, 79-91.
5. Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. 2004 Carotenoids handbook. Vol 4: Natural Functions. Birkhäuser Verlag. Basal, Switzerland.
6. Rodriguez Amaya, D.B. 1997. Carotenoids and Food preparation: the Retencion of provitamin A Carotenoids in Prepared, Processed, and Stored Food. John Snow, Inc /OMNI Project.
7. Olson, J.A. 1989. Provitamina A Function of Carotenoids. The Conversion of β -carotene into Vitamina A. *Journal of Nutrition*. 119, 105.
8. Madhavi, D.L., Deshpande, S.S., Salunkhe, D.K. 1996. Food Antioxidants. Technological, Toxicological, and Health Perspectives. Marcel Dekker, Inc., New York, USA.
9. Yasui, Y., Hosokawa, M., Mikami, N., Miyashita, K., Tanaka, T. 2011. Dietary astaxanthin inhibits colitis and colitis-associated colon carcinogenesis in mice via modulation of the inflammatory cytokines. *Chemico-Biological Interactions*. 193, 79-87.

10. Seifter, E., Rettura, G., Levinson, S.M. 1981. The Quality of foods and beverages. Eds. Charalambors, G., Inglett, G. Academic Press, New York, 335.
11. Seifter, E., Rettura, G., Padawer, J., Levinson, S.M. 1982. Moloney murine sarcoma virus tumors in CBA/J mice: chemopreventive and chemotherapeutic actions of supplemental beta-carotene. *Journal National Cancer Institute*. 68, 835-840.
12. Britton, G. 1983. The biochemistry of natural pigments. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press.
13. Socaciu, C., Jessel, R., Diehl, H.A. 2000. Carotenoid incorporation into microsomes: yields, stability and membrane dynamics. *Spectrochimica Acta Part A*. 56, 2799-2809.
14. Young, A.J., Lowe, G.M. 2001. Antioxidant and Prooxidant Properties of Carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 385, 20-27.
15. Seybold, C., Fröhlich, K., Bitsch, R., Otto, K., Böhm, V. 2004. Changes in contents of carotenoids and vitamin E during tomato processing. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 52, 7005-7010.
16. Schiedt, K., Liaaen-Jensen, S. 1995. Carotenoids. Volume 1A: Isolation and analysis. Eds. Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H. Birkhäuser. Basel, Switzerland. 81-108.
17. Armenta-López, R., Guerrero, I., Huerta, S. 2004. Astaxanthin extraction from shrimp waste by lactic fermentation and enzymatic hydrolysis of the carotenoprotein complex. *Journal of Food Science*. 67, 1002-1006.
18. Foote, C.S. 1968. Photosensitized Oxygenation and the Role of Singlet Oxygen. *ACC. Chemical Research*. 1, 104 -110.
19. Liebler, D.C. 1993. Antioxidant Reactions of Carotenoids. *Annals New York Academy Science*. 691, 20-31.
20. Montenegro, M.A., Nazareno, M.A., Durantini, E.N., Borsarelli, C.D. 2001. Singlet oxygen quenching ability of carotenoids in a reverse micelle membrane mimetic System. *Photochemistry and Photobiology*. 75, 353-361.
21. Montenegro, M.A., Rios de O, A., Mercadante, A.Z., Borsarelli, C.D. 2004. Model Studies on the Photosensitized Isomerization of Bixin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 52, 367-373.

22. Palozza, P., Krinsky, N.I. 1992. Antioxidant Effects of Carotenoids in Vivo and in Vitro. *Method Enzymology*. 213, 403.
23. Mortensen, A., Skibsted, L.H., Truscott, T.G. 2001. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 385, 13-19.
24. Edge, R., Truscott, T.G. 1999. Carotenoid radicals and the interaction of carotenoids with active oxygen species. The Photochemistry of Carotenoids. Eds. Frank, H.A., Young, A.J., Britton, G., Cogdell, R.J. First ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 223-234.
25. Edge, R., McGarvey, D.J., Truscott, T.G. 1997. The Carotenoids as Anti-Oxidants- A Review. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B*. 41, 189-200 y referencias allí citadas.
26. Burton, G.W., Ingold, K.U. 1984. Betacarotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*. 224, 569-573.
27. Mortensen, A. 2000, *Asian Chemistry Letters*. 4, 135.
28. Pierre, J. 1991. Biological consequences associated with DNA oxidation mediated by singlet oxygen. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B: Biol. I*, 241-260.
29. Gironi, A.W. 1990. Photodynamic lipid peroxidation in biological systems. *Photochemistry and Photobiology*. 51, 497-569.
30. Foote, C.S., Denny, R.W., Weaver, L., Chang, Y., Peters, J. 1970. Quenching of Singlet Oxygen. *Annals New York Academy Science*. 171, 139.
31. Foote, C.S., Chang, Y., Denny, R.W. 1970. Chemistry of Singlet Oxygen. Carotenoid Quenching Parallels Biological Protection. *Journal of American Chemical Society*. 92, 5216-5218.
32. Matthew-Roth, M.M. 1984. *Photochemistry and Photobiology*. 40, 63.
33. Foote, C.S. 1976. Photosensitized oxidation and singlet oxygen: Consequences in Biological Systems. Free radicals in Biology. Ed Pryor, W.A. Academic Press, New York. Vol. 2. 85.
34. Haley, J. 1993. The photochemistry of carotenoids. M.Phil. Thesis. Keele University. UK.

35. Anderson, S.M., Krinsky, N.I. 1973. Protective Action of Carotenoid Pigments against Photodynamic Damage to Liposomes. *Photochemistry and Photobiology*. 18, 403-408.
36. Olcott, H.J. 1934. Antioxidants and autoxidation of fats. *Journal of American Chemical Society*. 56, 2492-2493.
37. Holman, R.T. 1949. Spectrophotometric studies of the oxidation of fats. Coupled oxidation of carotene. *Archives Biochemical*. 21, 51-57.
38. Thomson, C.R., Steenbock, H. 1944. The effect of α -tocopherol and β -carotene in the oxidation of plant and animal fats. *Archives Biochemical*. 4, 15-23.
39. Wodsak, W. 1951. Antioxidantien für fettlösliche Vitamine, *Fette und Seifen*. 53, 73-76.
40. Rouseau, E.J., Davison, A.J., Dun, B. 1992, *Free Rad. Biol. Med.* 13, 407-433.
41. Mortensen, A., Skibsted, L.H., Sampson, J., Rice-Evans, C., Everett, S.A. 1997. Comparatives mechanisms and rates of free radicals scavenging by carotenoid antioxidants. *FEBS Letters*. 418, 91-94.
42. Cruickshank, G.S., Rampling, R. 1994. Does tumour related o edema contribute to the hipoxyc fraction of human brain toumor. *Acta Neurochirurgica Supplement*. 60, 378-380.
43. Wang, X.D., Russell, R.M. 1999. Procarcinogenic and anticarcinogenic effects of beta-carotene. *Nutrition Reviews*. 57, 263-272.
44. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1999. Free Radicals in biology and Medicine. 3rd. Ed. Oxford Univ. Press. Oxford.
45. Palozza, P. 1998. Prooxidant actions of carotenoids in biological systems. *Nutrition Reviews*. 56, 257-265.
46. Truscott, T.G. 1996. β -carotene and disease: a suggested pro-oxidant and anti-oxidant mechanism and speculations concerning its role in cigarette smoking. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B*. 35, 233-235.
47. Böhm, F., Edge, R., McGarvey, D.J., Truscott, T.G. 1998. β -carotene with vitamin E and C offer synergistic cell protection against Nos. *FEBS Letters*. 436, 387-389.

48. Jialal, J., Grundy, S.S. 1991. Preservation of the endogenous antioxidants in low density lipoprotein by ascorbate but not probucol during oxidative modification. *The Journal of Clinical Investigation*. 87, 597-601.
49. Kuetea, V., Alibert-Francob, S., Eyong, K.O., Ngameni, B., Folefoc, G.N., Nguemeving, J.R., Tangmouo, J.G., Fotso, G.W., Komguem, J., Ouahouo, B.M., Bolla, J.M., Chevalier, J., Ngadjuic, B.T., Nkengfack, A.E., Pagès, J.M. 2010. Antibacterial activity of some natural products against bacteria expressing a multidrug-resistant phenotype. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 37, 156-61.
50. Serra, A.T., Matias, A.A., Nunes, V.M., Leitão, M.C., Brito, D., Bronze, R., Silva, S., Pires, A., Crespo, M.T., San Romão, M.V., Duarte, C.M. 2008. In vitro evaluation of olive- and grape-based natural extracts as potential preservatives for food. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 9, 311-319.
51. Tajkarimi, M.M., Ibrahima, S.A., Cliver, D.O. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*. 21, 1199-1218.
52. Gutiérrez-Larraínzar, M., Rúa, J., Caro, I., De Castro, C., De Arriaga, D., García-Armesto, M.R., Del Valle, P. 2012. Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of natural phenolic compounds against foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Food Control*. 26, 555-563.
53. Da Silva Malheiros, P., Sant'Anna, V., Utpott, M., Brandelli, A. 2012. Antilisterial activity and stability of nanovesicle-encapsulated antimicrobial peptide P34 in milk. *Food Control*. 23, 42-47.
54. Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., Bourke, P. 2009. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiology*. 26, 142-150.
55. Fleischera, T.C., Ameadea, E.P.K., Mensaha, M.L.K., Sawerb, I.K. 2003. Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa Orellana*. *Fitoterapia* 74, 136-138.
56. Adegoke, E.A., A. Akisanya & S.H.Z. Naqvi. 1968. Studies of Nigerian medicinal plants. I, a preliminary survey of plant alkaloids, *Journal W. Afr. Sci. Ass.* 13, 13-33.

57. Windholz M. The Merck index. New Jersey: Merck Co, 1976. p.1324.
58. Priya, S., Maheswari, P. 2012. Carotenoids from the feathers waste of Gallus Gallus and its Antimicrobial Activity. *Pollution Research*. 31, 507-509.
59. Makoto Hayashi, Supaporn Naknukool, Shigeru Hayakawa, Masahiro Ogawa, Al-Baarri Ahmad Ni'matullah. 2012. Enhancement of antimicrobial activity of a lactoperoxidase system by carrot extract and b-carotene. *Food Chemistry*. 130, 541-546.
60. Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., Saurel R. 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*. 40, 1107-1121.
61. Thies, C. 2005. A survey of microencapsulation processes. In: Microencapsulation. Ed. Benita, S. Marcel Dekker Inc. New York. 1-20.
62. Chiou, D., Langrish, T.A.G. 2007. Development and characterisation of novel nutraceuticals with spray drying Technology. *Journal of Food Engineering*. 82, 84-91.
63. Shahidi, F., Han, X.Q. 1993. Encapsulation of food ingredients. *Critical Review in Food Science and Nutrition*. 33, 501-547.
64. Anandaraman, S., Reineccius, G.A. 1986. Stability of encapsulated orange peel oil. *Food Technology*. 40, 88-93.
65. Sheu, T.Y., Rosenberg, M. 1993. Microencapsulation of volatiles by whey proteins. *Journal of Dairy Science*. 76, 28.
66. Desai, K.G.H., Park, H.J., 2005. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Dry Technology*. 23, 1361-1394.
67. Dziezak, J.D. 1988. Microencapsulation and encapsulated ingredients. *Food Technology*. 136-151.
68. Gouin, S. 2004. Micro-encapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science and Technology*. 15, 330-347.
69. Shahidi, F., Han, X.Q. 1993. Encapsulation of food ingredients. *Critical Review in Food Science and Nutrition*. 33, 501-547.

70. Nonhebel, M.A., Eng. E., A.R.I.C., Chem, E.M. 1979. Forma física de los materiales manipulados en los secadores de aspersión. El secado de sólidos en la industria química. Ed. Nonhebel, G. Barcelona-Bogotá: Reverté, S. A. 297-305.
71. Thevenet, F. 1998. Acacia gums: stabilizers for flavour encapsulation. In Flavor Encapsulation. Eds. Risch, S. J., Reineccius, G. A. ACS Symposium Series, American. 370
72. Reineccius, G.A. 1988. Spray-drying of food flavors. In: Flavor encapsulation. Eds. Reineccius, G.A. and Risch, S.J. American Chemical Society, Washington, DC. 55-66.
73. Reineccius, G.A. 1989. Isolation of food flavors. Flavor Chemistry of lipids foods. Eds. Min, D.B. and Smouse T.H. American Chemical Society. United States. 24-36.
74. Krishnan, S., Bhosale, R., Singhal, R.S. 2005a. Microencapsulation of cardamom oleoresin: Evaluation of blends of gum arabic, maltodextrin and modified starch as wall materials. *Carbohydrate Polymers*. 61, 95-102.
75. Krishnan, S., Kshirsagar, A.C., Singhal, R.S. 2005b. The use of gum arabic and modified starch in the microencapsulation of a food flavoring agent. *Carbohydrate Polymers*. 62, 309-315.
76. Kanakdande, D, Bhosale, R., Singhal, R.S. 2007. Stability of cumin oleoresin: Evaluation of blends fo gum arabic, maltodextrin and a modified starch as wall materials. *Carbohidrate Polymers*. 61, 95-102.
77. Kenyon, M.M. 1995. Modified starch, maltodextrin, and corn syrup solids as wall materials for food encapsulation. In: Encapsulation and controlled release of food ingredients. Eds. Risch, S.J. and Reineccius, G.A. ACS symposium series American Chemical Society. Washington, DC. 590, 42-50.
78. Silva, F.C., Rodrigues da Fonseca, C., Alencar, S.M., Thomazini, M., Carvalho Balieiro, J.C., Pittia, P., Favaro-Trindade, C.S. 2013. Assessment of production efficiency, physicochemical properties and storage stability of spray-dried propolis, a natural food additive, using gum Arabic and OSA starch-based carrier systems. *Food and bioproducts processing*. 91, 28-36.

79. Barbosa, M.J., Borsarelli, C.D., Mercadante A.Z. 2005. Light stability of spray dried bixin encapsulates with different edible polysaccharide preparations. *Food Research International*. 38, 989-994.
80. Corralo Spada, J., Zapata Noreña, C., Ferreira Marczak, L., Tessaro, I.C. 2012. Study on the stability of β -carotene microencapsulated with pinhão (*Araucaria angustifolia* seeds) starch. *Carbohydrate Polymers*. 89, 1166-1173.
81. Faria, A.F., Mignone, R.A., Montenegro, M.A., Mercadante, A.Z., Borsarelli, C.D. 2010. Characterization and singlet oxygen quenching capacity of Spray-dried microcapsules of edible biopolymers containing antioxidant molecules. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 58, 8004-8011.
82. Rana, V., Rai, P., Tiwary, A.K., Singh, R.S., Kennedy, J.F., Knill, C.J. 2011. Modified gums: Approaches and applications in drug delivery. *Carbohydrate Polymers*. 83, 1031-1047.
83. Verbeken, D., Dierckx, S., Dewettinck. 2003. Exudate gums: Occurrence, production, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 63, 10-21.
84. Nishinari, K., Zhang, H., Ikeda, S. 2000. Hydrocolloid gels of polysaccharides and proteins. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. 5, 195-201.
85. McClements, D.J. 2005. Food emulsions: Principles, practice and techniques. 2nd Ed. Boca Raton: CRC Press.
86. Anderson, D.M., Bridgeman, M.M., Farquhar, J.G., McNab, C.G. 1983. The Chemical Characterization of the test article in toxicological studies of gum Arabic Acacia Senegal (L) Willd). *The International Tree Crops Journal*. 2, 245-254.
87. Idris, O.H.M., Williams, P.A., Phillips, G.O., 1998. Characterization of gum from Acacia senegal trees of different age and location using multidetection gel permeation chromatography. *Food Hydrocolloids*. 12, 379-388.
88. Al-Assaf, S., Phillips, G.O., Williams, P.A. 2005. Studies on acacia exudate gums. Part I: the molecular weight of Acacia senegal gum exudate. *Food Hydrocolloids*. 19, 647-660.

89. Al-Assaf, S., Phillips, G.O., Williams, P.A. 2005. Studies on Acacia exudate gums: part II. Molecular weight comparison of the Vulgares and Gummiferae series of Acacia gums. *Food Hydrocolloids*. 19, 661-667.
90. Flindt, C., Al-Assaf, S., Phillips, G.O., Williams, P.A. 2005. Studies on acacia exudate gums. Part V. Structural features of Acacia seyal. *Food Hydrocolloids*. 19, 687-701.
91. Hassan, E.A., Al Assaf, S., Phillips, G.O., Williams, P.A. 2005. Studies on Acacia gums: Part III molecular weight characteristics of Acacia seyal var. seyal and Acacia seyal var fistula. *Food Hydrocolloids*. 19, 669-677.
92. Siddig, N.E., Osman, M.E., Al-Assaf, S., Phillips, G.O., Williams, P.A. 2005. Studies on acacia exudate gums, part IV. Distribution of molecular components in Acacia seyal in relation to Acacia senegal. *Food Hydrocolloids*. 19, 679-686.
93. Osman, M.E., Williams, P.A., Menzies, A.R., Phillips, G.O. 1993. Characterization of Commercial Samples of Gum Arabic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 41, 71-77.
94. Williams, P.A. 2000. In: Handbook of Hydrocolloids. Eds. Williams, P.A., Phillips, G.O. CRC Press, Cambridge. 155-168.
95. Mahendran, T., Williams, P.A., Phillips, G.O., Al-Assaf, S., Baldwin, T.C. 2008. New Insights into the Structural Characteristics of the Arabinogalactan-Protein (AGP) Fraction of Gum Arabic. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 56, 9269-9276.
96. Islam, A.M., Phillips, G.O., Sljivo, A., Snowden, M.J., Williams, P.A. 1997. A review of recent developments on the regulatory, structural and functional aspects of gum arabic. *Food Hydrocolloids*. 11, 493-505.
97. Idris, O.H.M., Williams, P.A., Phillips, G.O., 1998. Characterization of gum from Acacia senegal trees of different age and location using multidetection gel permeation chromatography. *Food Hydrocolloids*. 12, 379-388.
98. Al-Assaf, S., Phillips, G.O., Williams, P.A. 2006. Controlling the molecular structure of food hydrocolloids. *Food Hydrocolloids*. 20, 369-377.

99. Renard, D., Lavenant-Gourgeon, L., Ralet, M., Sanchez, C. 2006. Acacia senegal Gum: Continuum of Molecular Species Differing by their Protein to Sugar Ratio, Molecular Weight, and Charges. *Biomacromolecules*. 7, 2637-2649.
100. Sanchez, C., Schmitt, C., Kolodziejczyk, E., Lapp, A., Gaillard, C., Renard, D. 2008. The Acacia Gum Arabinogalactan Fraction is a Thin Oblate Ellipsoid: A New Model Based on Small-Angle Neutron Scattering and Ab Initio Calculation. *Biophysical Journal*. 94, 629-639.
101. Goodrum, L.J., Patel, A., Leykam, J.F., Kieliszewski, M.J. 2000. Gum arabic glycoprotein contains glycomodules of both extension and arabinogalactan-glycoproteins. *Phytochemistry*. 54, 99-106.
102. Williams, P.A., Phillips, G.O., Stephen, A.M. 1990. Spectroscopic and molecular comparisons of three fractions of Acacia Senegal gum. *Food Hydrocolloids*. 4, 305-311.
103. Qi, W., Fong, C., Lamport, D.T.A. 1991. Gum arabic glycoprotein is a twisted hairy rope: a new model based on O-galactosylhydroxyproline as the polysaccharide attachment site. *Plant Physiology*. 96, 848-855.
104. Fincher, G.B., Stone, B.A., Clarke, A.E. 1983. Arabinogalactan-protein: Structure, synthesis and function. *Annual Review of Plant Physiology*. 34, 47-70.
105. Phillips, A.O., Phillips, G.O. 2011. Biofunctional behaviour and health benefits of a specific gum arabic. *Food Hydrocolloids*. 25, 165-169.
106. Trommer, H., Neubert, R.H., 2005. The examination of polysaccharides as potential antioxidative compounds for topical administration using a lipid model system. *International Journal of Pharmaceutics*. 298, 153-163.
107. Ali, B.H., Al Moundhri, M.S., 2006. Agents ameliorating or augmenting the nephrotoxicity of cisplatin and other platinum compounds: a review of some recent research. *Food Chemical Toxicology*. 44, 1173-1183.
108. Hinson, J.A., Reid, A.B., McCullough, S.S., James, L.P., 2004. Acetaminophen-induced hepatotoxicity: role of metabolic activation, reactive oxygen/nitrogen species, and mitochondrial permeability transition. *Drug Metabolism Reviews*. 36, 805-822.

109. Tiss, A., Carrière, F., Verger, R., 2001. Effects of gum arabic on lipase interfacial binding and activity. *Analytical Biochemistry Journal*. 294, 36-43.
110. Evans, A.J., Hood, R.L., Oakenfull, D.G., Sidhu, G.S., 1992. Relationship between structure and function of dietary fibre: a comparative study of the effects of three galactomannans on cholesterol metabolism in the rat. *British Journal of Nutrition*. 68, 217-229.
111. Matsumoto, N., Riley, S., Fraser, D., Al-Assaf, S., Ishimura, E., Wolever, T., Phillips, G.O., Phillips, A.O. 2006. Butyrate modulates TGF-beta1 generation and function: potential renal benefit for Acacia (sen) SUPERGUM (G.A.)? *Kidney International*. 69, 257-265.
112. Bliss, D.Z., Stein, T.P., Schleifer, C.R., Settle, R.G., 1996. Supplementation with G.A. fiber increases fecal nitrogen excretion and lowers serum urea nitrogen concentration in chronic renal failure patients consuming a low-protein diet. *American Journal of Clinical Nutrition*. 63, 392-398.
113. Ali, A.A., Ali, K.E., Fadlalla, A., Khalid, K.E. 2008. The effects of GA oral treatment on the metabolic profile of chronic renal failure patients under regular haemodialysis in Central Sudan. *Natural Product Research*. 22, 12-21.
114. Glover, D.A., Ushida, K., Phillips, A.O., Riley, S.G. 2009. Acacia(sen) SUPERGUM™ (Gum arabic): An evaluation of potential health benefits in human subjects. *Food Hydrocolloids*. 23, 2410-2415.
115. Wapnir, R.A., Sherry, B., Codipilly, C.N., Goodwin, L.O., Vancurova, I. 2008. Modulation of rat intestinal nuclear factor NF-kappaB by gum arabic. Rat small intestine by gum arabic. *Digestive Disease and Science*. 53, 80-87.
116. Rehman, K.U., Wingertzahn, M.A., Teichberg, S., Harper, R.G., Wapnir, R.A. 2003. Gum arabic. (GA) modifies paracellular water and electrolyte transport in the small intestine. *Digestive Disease and Science*. 48, 755-760.
117. Randall, R.C., Phillips, G.O., Williams, P.A. 1988. The role of the proteinaceous component on the emulsifying properties of gum arabic. *Food Hydrocolloids*. 2, 131-140.

118. Annison, G., Trimble, R.P., Topping, D.L. 1995. Feeding Australian acacia gums and gum arabic leads to non-Starch polysaccharide accumulation in the cecum of rats. *Journal of Nutrition*. 125, 283-292.
119. Adiotomre, J., Eastwood, M.A., Edwards, C.A., Brydon, W.G. 1990. Dietary fiber: in vitro methods that anticipate nutrition and metabolic activity in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*. 52, 128-134.
120. Younes, H., Egret, N., Hadj-Abdelkader, M., Rémésy, C., Demigné, C., Gueret, C., Deteix, P., Alphonse, J.C. 2006. Fermentable carbohydrate supplementation alters nitrogen excretion in chronic renal failure. *Journal of Renal Nutrition*. 16, 67-74.
121. Lacson Jr., E., Ikizler, T.A., Lazarus, J.M., Teng, M., Hakim, R.M. 2007. Potential impact of nutritional intervention on end-stage renal disease hospitalization, death, and treatment costs. *Journal of Renal Nutrition*. 17, 363-371.
122. Kist-van Holthe tot Echten, J.E., Nauta, J., Hop, W. C., de Jong, M. C., Reitsma-Bierens, W.C., Ploos van Amstel, S.L., van Acker, K.J., Noordzij, C.M., Wolff, E.D. 1993. Protein restriction in chronic renal failure. *Archives of Disease in Childhood*. 1.68, 371-375.
123. Fouque, D., Laville, M., Boissel, JP. 2006. Low protein diets for chronic kidney disease in non diabetic adults. *Cochrane Database Syst. Rev.* 1999, CD001892.
124. Winchester, J.F. Salsburgh, J.A., 2004. Sorbents in the treatment of renal failure. *Minerva Urologica e Nefrologica*. 56, 215-221.
125. Al Mosawi, A.J. 2002. The challenge of chronic renal failure in the developing world possible use of acacia gum. *Pediatric Nephrology*. 17, 390-391.
126. Al Mosawi, A.J. 2004. Acacia gum supplementation of a low-protein diet in children with end-stage renal disease. *Pediatric Nephrology*. 19, 1156-1159.
127. Al Mosawi, A.J. 2007. The use of acacia gum in end stage renal failure. *Journal of Tropical Pediatrics*. 53, 362-365.
128. Ali, B.H. 2004. Does GA have an antioxidant action in rat kidney? *Renal Failure*. 26, 1-3.
129. Kelley, J.J., Tsai, A. 1978. Effect of pectin, gum arabic and agar on cholesterol absorption, synthesis, and turnover in rats. *Journal of Nutrition*. 108, 630-639.

130. Ross, A.H., Eastwood, M.A., Brydon, W.G., Anderson, J.R., Anderson, D.M. 1983. A study of the effects of dietary gum arabic in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*. 37, 368-375.
131. Sharma, R.D. 1985. Hypocholesterolemic effect of gum acacia in men. *Nutrition Research*. 5, 1321-1326.
132. Topping, D., Illman, R.J., Trimble, R.P. 1985. Volatile fatty acid concentrations in rats fed diets containing gum Arabic and cellulose separately and a mixture. *Nutrition Reports International*. 32, 809-814.
133. Annison, G., Trimble, R.P., Topping, D.L. 1995. Feeding Australian acacia gums and gum arabic leads to non-Starch polysaccharide accumulation in the cecum of rats. *Journal of Nutrition*. 125, 283-292.
134. Tiss, A., Carrière, F., Verger, R. 2001. Effects of gum arabic on lipase interfacial binding and activity. *Analytical Biochemistry*. 294, 36-43.
135. Gallaher, D.D., Hassel, C.A., Lee, K.J. 1993. Relationships between viscosity of hydroxypropyl methylcellulose and plasma cholesterol in hamsters. *Journal of Nutrition*. 123, 1732-1738.
136. Moundras, C., Behr, S.R., Demigné, C., Mazur, A., Rémésy, C., 1994. Fermentable polysaccharides that enhance fecal bile acid excretion lower plasma cholesterol and apolipoprotein E-rich HDL in rats. *Journal of Nutrition*. 124, 2179-2188.
137. Evans, A.J., Hood, R.L., Oakenfull, D.G., Sidhu, G.S. 1992. Relationship between structure and function of dietary fibre: a comparative study of the effects of three galactomannans on cholesterol metabolism in the rat. *British Journal of Nutrition*. 68, 217-229.
138. WHO. 1990. WHO food additives series no.26. Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants. Prepared by the thirty-fifth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Geneva: WHO.
139. Al-Majed, A.A., Mostafa, A.M., Al-Rikabi, A.C-, Al-Shabanah, O.A. 2002. Protective effects of oral arabic gum administration on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacological Research*. 46, 445-451.

140. Al-Majed, A.A., Abd-Allah, A.R., Al-Rikabi, A.C., Al-Shabanah, O.A., Mostafa, A.M. 2003. Effect of oral administration of Arabic gum on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 17, 146-153.
141. Abd-Allah, A.R., Al-Majed, A.A., Mostafa, A.M., Al-Shabanah, O.A., Din, A.G., Nagi, M.N. 2002. Protective effect of arabic gum against cardiotoxicity induced by doxorubicin in mice: a possible mechanism of protection. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 16, 254-259.
142. Ali, B.H., Al-Qarawi, A.A., Haroun, E.M., Mousa, H.M. 2003. The effect of treatment with G.A. on gentamicin nephrotoxicity in rats: a preliminary study. *Renal Failure*. 25, 15-20.
143. Rodrigues, E., Mariutti, L.R.B., Faria, A.F., Mercadante, A.Z. 2012. Microcapsules containing antioxidant molecules as scavengers of reactive oxygen and nitrogen species. *Food Chemistry*. 134, 704-711.
144. Clark, D.T., Gazi, M.I., Cox, S.W., Eley, B.M., Tinsley, G.F. 1993. The effects of Acacia arabica gum on the in vitro growth and protease activities of periodontopathic bacteria. *Journal of Clinical Periodontology*. 20, 238-43.
145. Onishi, T., Umemura, S., Yanagawa, M., Matsumura, M., Sasaki, Y., Ogasawara, T., Ooshima, T. 2008. Remineralization effects of gum arabic on caries-like enamel lesions. *Archives of oral biology*. 53, 257-260.
146. Tyler, V., Brady, L., Robbers J. 1977. Pharmacognosy. 7th ed. Lea & Febiger. Philadelphia. 66-8.
147. Kirtikar, K.R., Basu, B.D. 1984. Indian medicinal plants, 2nd ed., vol. II. Allahabad: Lalit Mohan Basu. 919-35.
148. Saini, M., Saini, R., Roy, S., Kumar, A. 2008. Comparative pharmacognostical and antimicrobial studies of acacia species (Mimosaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*. 2, 12, 378-386.

PARTE II.

Resultados Experimentales

CAPÍTULO 4

Capacidad Antioxidante De Carotenoides Microencapsulados

1. INTRODUCCIÓN

Las EROS y ERNS, juegan un doble rol en sistemas biológicos, como así también en alimentos, ejerciendo tanto un efecto benéfico, como perjudicial, para los seres vivos [1]. Estudios recientes, demuestran que EROS y ERNS, podrían actuar como mensajeros de señalización celular en la configuración fisiológica, con importante funciones regulatorias, ejerciendo efectos benéficos [2-8]. Dichas especies, producidas de una manera controlada, funcionarían como reguladores de expresión de genes, activadores de receptores y factores de transcripción nuclear, e inductores de una respuesta adaptativa. Por el contrario, altas concentraciones de EROS y ERNS, son los principales responsables de la iniciación de reacciones oxidativas en los alimentos, reaccionando con lípidos, proteínas, glúcidos y vitaminas, generando compuestos volátiles indeseables, causando la pérdida de ácidos grasos esenciales, aminoácidos, vitaminas, y produciendo compuestos cancerígenos [9]. Datos convincentes han demostrado que las especies reactivas formadas *in vivo*, inducen daño oxidativo de membranas, tejidos y enzimas, las cuales pueden llevar a desordenes y enfermedades, como aterosclerosis, enfermedades neurológicas, y cáncer [10].

Un desbalance entre la producción de oxidantes respecto del sistema AOx de un organismo, genera lo que se denomina, estrés oxidativo [11]. Es por ello, que se considera de suma importancia mantener un balance entre las especies oxidantes y el sistema AOx.

Dicho balance debe cumplirse en todos los sistemas biológicos, inclusive los alimentos, que son susceptibles a sufrir oxidaciones. Si bien los alimentos, entre ellos los productos lácteos, poseen un sistema de defensa AOx protector contra las

degradaciones oxidativas, en muchos casos, estos componentes son perdidos durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos, por lo que se requieren medidas especiales para evitar el deterioro de los mismos. Una alternativa, es la adición exógena de compuestos AOx y sobre todo compuestos naturales, debido a los efectos toxicológicos mostrados por los derivados sintéticos. En tal sentido, los CAR son reconocidos AOx naturales, capaces de desactivar eficientemente a EROS, protegiendo a compuestos biológicos de su acción dañina [12-15]. Debido a su estructura química altamente reactiva e hidrofóbica, una manera de estabilizarlos y solubilizarlos en matrices acuosas es la microencapsulación, tal como fue descrita en el Capítulo 3, utilizando como material de pared polisacáridos comestibles, (tales como GA, MD, etc.), que recubre y protege al carotenoide para su posterior adición a alimentos.

Dado que los AOx naturales poseen diferentes modos de acción, o efectividad frente a la desactivación de especies reactivas, es necesario evaluar la AAO de los mismos, con el objetivo de seleccionar el AOx más eficiente. Para ello se emplean diferentes métodos, que serán desarrollados a continuación.

1.1 Métodos de Determinación de Actividad Antioxidante

Muchos modelos *in vitro* e *in vivo* han sido desarrollados para la evaluación de la AAO. Sin embargo, la interpretación de los resultados obtenidos a partir de estos sistemas modelo, debe tomarse con precaución debido a que métodos diferentes, se basan en mecanismos diferentes, resultando en valores aparentemente contradictorios.

Lamentablemente no existe el sistema ideal, que permita determinar el “verdadero” poder AOx de un compuesto o de una mezcla compleja de AOx [16]. Huang y col. [17], indicaron que es inapropiado generalizar los resultados como “actividad antioxidante total”, debido a que las mediciones realizadas en un ensayo individual, reflejan la reactividad química, sólo bajo las condiciones específicas empleadas. Este problema aún es más agravado, frente a AOx naturales, ya que poseen diferentes modos de acción, tales como ruptura de radicales libres, desactivación de oxígeno, quelación de metales, e inhibición de enzimas oxidativas.

Debido a la falta de ensayos estándar, es difícil comparar los resultados informados por los diferentes grupos de investigación, y a la industria de alimentos y nutracéuticos, le resulta complejo realizar un estricto control de calidad de los productos

AOx. Es por lo tanto, necesaria una discusión abierta de los pros y contras y de los ensayos de AAO que necesitan ser validados por métodos de referencia y también que pueda desarrollarse un método estándar, ampliamente aplicable para la evaluación de AOx. La elección de una metodología apropiada, depende fundamentalmente de las características del compuesto o extracto a analizar.

En general, la efectividad de un AOx se determina monitoreando su poder de inhibición en un proceso de oxidación, determinándose de esta manera la AAO o bien midiendo la capacidad de una sustancia para atrapar radicales libres, en cuyo caso se determina la AAR. Las estrategias para la determinación de la AAO de una sustancia consisten básicamente en comparar la extensión o velocidad de un proceso oxidativo en ausencia y presencia del AOx. Para la AAR, la metodología implica el monitoreo del cambio de alguna propiedad relacionada con la captura de los radicales libres, por ejemplo la disminución de la absorbancia UV-Vis de una solución del radical DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), ante la adición de un AOx. El monitoreo de las reacciones puede ser realizado utilizando métodos químicos, instrumentales o sensoriales.

Cualquier ensayo para la determinación de la capacidad AOx está caracterizado por tres parámetros: el sustrato a oxidar, el iniciador de la oxidación y una técnica apropiada para medir el punto final, u otro parámetro que sirva para evaluar el progreso de la oxidación.

En base a las reacciones químicas involucradas, la mayoría de los ensayos de AAO pueden ser divididos en dos grandes tipos, según Huang y col. [17]. Las reacciones basadas en la transferencia de un átomo de hidrógeno (TAH), y aquellas basadas en transferencia de electrones (TE). Los ensayos de TAH están compuestos de un generador de radical libre sintético, un sustrato sensor oxidable y un AOx, empleando un esquema de reacción competitivo, en el cual el sustrato y el AOx compiten por el radical. Ejemplos de estos ensayos, son la Capacidad de Absorción de Radical Oxígeno (Oxygen Radical Absorbance Capacity, ORAC) [18,19], y el Parámetro Antioxidante de Captura de Radical Total: (Total Radical-trapping Antioxidant Parameter, TRAP) [20]. Por otra parte, los ensayos basados en TE miden la capacidad del AOx, en reducir al oxidante, con modificaciones en coloración cuando

éste es reducido. Entre los métodos basados en TE se incluyen, Contenido de Fenol Total por el Reactivo de Folin-Ciocalteu [21], Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, TEAC) [22], Poder Antioxidante Reductor de Ión Férrico, (Ferric Ion Reducing Antioxidant Power, FRAP) [23], y Desactivación del Radical Libre Estable 2,2-difenil-1-picrilhidracilo, DPPH [24].

En la Tabla 4.1 se resumen los métodos más utilizados en la determinación de la AAO y AAR.

Tabla 4.1. Ensayos empleados para la determinación de la AAO y AAR.

Método	Fundamento de la técnica	Índice	Ref.
Ensayo de Peróxido Lipídicos	Detección de peróxidos por iodometría o colorimetría por reacción con tiocianato férrico	Valor de peróxidos (POV)	25, 26
Test de Ácido tiobarbitúrico (TBA)	Detección espectrofotométrica de aldehídos formados durante la oxidación lipídica, mediante una reacción con TBA.	Especies reactivas con TBA (TBARs)	27
Método del AAPH 2,2'-azobis-(2-amidinopropano) dihidrocloruro.	Detección espectrofotométrica de la desactivación de fluorescencia de 2,7-diclorofluoresceína o ficoeritrina, por reacción con radicales peroxilos originados por AAPH.	TRAP ORAC	28, 29
Decoloración del radical catión ABTS ^{•+}	Detección espectrofotométrica de la decoloración del radical catión pre-formado ABTS ^{•+}	TEAC	22, 30, 31
Ensayo de decoloración del radical libre DPPH	Monitoreo espectrofotométrico de la decoloración del radical libre estable DPPH	EC ₅₀ ARP	24

A continuación, se desarrolla una breve descripción de los ensayos basados en TAH y TE:

1.1.1. Ensayos Basados en TAH

Ensayos de TAH basados en pruebas fluorescentes tienen similitud mecánica con la peroxidación lipídica (una transferencia de un átomo de H desde el sustrato al radical), pero bajo estas condiciones de ensayo, la concentración de sustrato (prueba) es menor que la concentración de AOx. Esta es una contradicción con situaciones reales, como por ejemplo en alimentos, donde la concentración de AOx es mucho menos que la del sustrato (ej. lípidos).

A continuación se detallan los principales métodos de determinación de AAR basados en mecanismos de TAH:

Capacidad de Absorción de Radical Oxígeno (ORAC), donde se combinan tanto el tiempo, como el grado de inhibición dentro de un mismo valor. Este ensayo está compuesto por: un iniciador radical azo, una prueba molecular (generalmente UV o fluorescente) para monitorear el progreso de la reacción, el AOx a evaluar y parámetros cinéticos de reacción que serán recolectados para cuantificar la AAO. Los valores se reportan como μ moles equivalentes de trolox. Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2- carboxílico), es un análogo de vitamina E hidrosoluble con una elevada capacidad AOx.

Parámetro Antioxidante de Captura de Radicales Total: (TRAP), basado en las medidas de consumo de oxígeno durante una reacción de peroxidación lipídica inducida por descomposición térmica del hidrocloreuro de 2,2'-azobis(2- amidinopropano) (AAPH), [20]. El parámetro TRAP, se utiliza generalmente referido a una sustancia patrón por ejemplo; trolox y se define como la relación entre el periodo de inducción de la muestra, con respecto al tiempo de inducción de trolox [31].

1.1.2. Ensayos Basados en TE

Estos métodos miden la capacidad de un AOx en causar la reducción de un oxidante, lo que es evidenciado con un cambio de color. Estos, involucran dos componentes en la mezcla de reacción, AOx y oxidante (prueba). Se basan en el siguiente reacción, ec. 1:



La prueba, es el agente oxidante que abstrae un electrón del AOx, causando cambios de color de la prueba. El grado de cambio de color, es proporcional a la concentración de AOx en la muestra. El cambio de absorbancia (ΔA) es graficado en función a la concentración de AOx, para dar una curva lineal. La pendiente obtenida de dicha curva, refleja la capacidad reductora del agente AOx, el cual es expresado como equivalente a Trolox (TE), o algún otro AOx de referencia. Debido a que no es una reacción competitiva y que no hay un radical de oxígeno, el ensayo es cuestionable, dado que los resultados se correlacionan con la AAO de una muestra. Para hacer tal correlación, se asume que la AAO es igual a la capacidad reductora. En esta categoría están agrupados los siguientes ensayos:

Contenido de Fenoles Totales por Reactivo Folin-Ciocalteu (FCR). Este ensayo mide la capacidad reductora de una muestra, pero no refleja el contenido de “fenoles totales”, como su nombre lo indica. De hecho, puede ser reducido por muchos compuestos no fenólicos. El reactivo FCR, es una mezcla de tungstato y molibdato de sodio, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, agua y sulfato de litio, que posee un intenso color amarillo. Secuencias reversibles de reacciones de uno o dos electrones, lleva a formar especies azules. Como este ensayo es conveniente, simple y reproducible, es ampliamente utilizado.

Actividad Antioxidante Equivalente de Trolox (TEAC). Fue informado por primera vez por Miller y Rice-Evans en 1993 [30], y luego mejorado por Re y col. [22]. El TEAC refleja la capacidad de un antioxidante de donar un átomo de hidrógeno o electrón, comparada con trolox. En el método original, se empleaba el radical sintético $\text{ABTS}^{\bullet-}$ como oxidante. La solución de $\text{ABTS}^{\bullet-}$, se mezcla con un volumen determinado de la muestra. La diferencia de la absorbancia del radical (a 730 nm) (entre el valor sin muestra y el presentado con la muestra) es graficada, respecto de la concentración de AOx, para obtener una línea recta. La concentración de AOx, que da el mismo cambio en el porcentaje de absorbancia de $\text{ABTS}^{\bullet-}$ que la de 1 mM de trolox, es expresada

como TEAC. Debido a su simplicidad operacional, este método es ampliamente utilizado para el estudio de la AAO.

Poder Antioxidante Reductor de Ión Férrico: (FRAP). Se emplea una sal férrica, Fe(III)(TPTZ)₂Cl₃, siendo (TPTZ=2,4,6-tripiridil-s-triazina) como oxidante [23]. El potencial redox de la sal Fe(III) (~0,70V), es comparable al de ABTS^{•-} (~0,68V). Por lo tanto no hay grandes diferencias entre FRAP y TEAC, excepto que en este último, la reacciones llevadas cabo a pH neutro, mientras que el ensayo FRAP es bajo condiciones ácidas (pH 3,6). Se registra la absorbancia a 593 nm después de los 0,5 s de iniciada la reacción y cada 15 s, hasta los 4 min. Los cambios de absorbancia ($\Delta A = A_{4\text{min}} - A_{0\text{min}}$) son calculados y relacionados al ΔA de la solución estándar de Fe(II). Una unidad de FRAP, es arbitrariamente definida, como la reducción de 1 mol de Fe(III) a Fe(II). Los valores FRAP para ácido ascórbico, α -tocoferol y ácido úrico, son idénticas (2,0). Esto indica, que 1 mol de estos AOx, puede reducir 2 moles de Fe(III).

Capacidad de Desactivación de Radical DPPH. El radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), es uno de los pocos radicales libres estables y comercialmente disponibles. Es un radical orgánico de nitrógeno, con un máximo de absorción a 515 nm. Bajo reducción, el color de la solución se va desvaneciendo. El progreso de la reacción es monitoreada a 515 nm por 30 min o hasta que la absorbancia sea estable. El porcentaje de DPPH remanente, es calculado de acuerdo a la ec. 2.

$$\% DPPH_{rem} = 100 \times \left(\frac{[DPPH]_{rem}}{[DPPH]_{T=0}} \right) \quad (2)$$

El %DPPH_{rem} es proporcional a la concentración de AOx. El valor de EC₅₀ expresa la concentración, o bien para el caso de extractos, los μ l de AOx necesarios para reducir el 50% de la concentración inicial del radical DPPH. En la bibliografía, se utilizan indistintamente tanto EC₅₀, como las siglas IC₅₀, (Inhibition Concentration), SC₅₀, (Scavenging Concentration) [24].

1.1.3. Ensayos de Desactivación de Especies Radicalarias de Oxígeno Generación y Desactivación de Radical HO•

Es ampliamente aceptado, que el radical HO• se genera biológicamente, cuando H₂O₂ reacciona con Fe(II), lo que se conoce como reacción de Fenton [32,33]. Es por ello, que hay un considerable interés en desarrollar métodos para la determinación de HO• y especies relacionadas, en sistemas biológicos.

Uno de estos ensayos consiste, en la oxidación de la pentosa 2-desoxirribosa (DoR), por HO• generado por reacción de Fenton, para producir una mezcla de productos. En calentamiento, con ácido tiobarbitúrico (TBA) a pH bajo, alguno o todos estos productos reaccionan para formar un cromógeno rosa que es detectado a 532 nm y corresponde a un aducto ácido tiobarbitúrico-malondialdehído [TBA-MDA] [34].

Sin embargo, la mezcla Fe(II)/H₂O₂ presenta una desventaja en el ensayo de desactivación, debido a que muchos AOx también son quelantes o secuestradores de metales. Cuando la muestra es mezclada con Fe(II), esta podría alterar la actividad de Fe(II) por quelación. Por lo que será imposible distinguir si los AOx son buenos quelantes, o desactivadores de HO•. AOx en alimentos tal como vitamina C, podría actuar como pro-oxidante reduciendo Fe(III) a Fe(II) y así, generar HO• de una manera catalítica. De hecho, en este ensayo se emplea ácido ascórbico, en combinación con Fe(II) catalítico, un exceso de H₂O₂ y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como quelante, para generar un flujo constante de radical HO•.

Generación y Desactivación de Radical O₂•⁻

En medio biológico, el O₂•⁻ se forma cuando el O₂(³Σ_g⁻) capta un electrón que sale de la cadena respiratoria, principalmente a nivel de la semiubiquinona y del complejo I (NADH coenzima Q reductasa) en los organismos aeróbicos. Químicamente, el O₂•⁻ puede ser generado por diferentes métodos entre ellos, radiólisis de pulso, por reducción electroquímica de O₂(³Σ_g⁻), por fotooxidación sensibilizada [35].

Kono [36] confirmó la generación de radical anión superóxido durante la autooxidación de hidroxilamina. Cuando se adicionó hidroxilamina a una solución de carbonato de sodio 50 mM en condiciones aeróbicas, a pH 10,2 y EDTA 0,1 mM, se produjo la autooxidación de hidroxilamina con la formación de nitrito. La adición de NBT indujo un incremento en la absorbancia, debido a la acumulación de

monoformazan (MF). La reducción de nitro azul de tetrazolium (NBT) fue inhibida con la adición de SOD, ya sea al inicio, como durante la reacción, lo que indica la participación de $O_2^{\bullet-}$ en la autooxidación de hidroxilamina. La formación de nitritos no fue afectada por la enzima SOD, mientras que en condiciones anaeróbicas, no hubo formación de nitritos y no fue observada reducción de NBT, lo que permite inferir que la reducción de NBT no es inducida por hidroxilamina, sino por $O_2^{\bullet-}$.

Para la detección de $O_2^{\bullet-}$ ha sido ampliamente utilizado el reactivo NBT [37,38]. El nombre completo de dicho reactivo es 3,3'-(3,3'-dimetoxi[1,1'-bifenil]-4,4'-diil)bis[2-(4-nitrofenil)-5-fenil]-2H-tetrazolium dicloruro. Es una sal de ditetrazolium, que puede ser reversiblemente reducida por la adición de cuatro electrones, a diformazan (DF) [39,40], con la formación de especies radicalarias transcientes ($NBT^{+\bullet}$, MF^{\bullet}) [41,42], y un intermediario estable que consistió en un centro tetrazolium y un centro monoformazan MF^+ [43]. MF^+ tiene un máximo de absorción a 530 nm, con un coeficiente de extinción molar constante de $\epsilon_{530nm} = 25400 \pm 1200 M^{-1}cm^{-1}$, en un rango de pH de 9,5 a 11 [43].

1.1.4. Desactivación de Especies Excitadas No Radicalarias

Estas especies no son radicales, ya que no poseen electrones desapareados. Sin embargo, son ricas en energía, lo que las convierte en altamente reactivas. Se incluye como especies excitadas, al $O_2(^1\Delta_g)$ y a estados tripletes excitados de sensibilizadores ($^3S^*$), muchos de ellos, pigmentos y colorantes tales como eosina, azul de metileno, clorofila, o vitaminas, como la RF, que está presente en la leche.

El $O_2(^1\Delta_g)$ es responsable de oxidación, principalmente, por su capacidad de reaccionar directamente con compuestos ricos en electrones y los $^3S^*$ actúan como generadores de EROS en procesos aerobios fotoinducidos, a través de la fotosensibilización.

1.1.4.1. Generación y Desactivación de $O_2(^1\Delta_g)$

El $O_2(^1\Delta_g)$ es normalmente generado en presencia de luz, a través de un *mecanismo de fotosensibilización*, que fue previamente detallado en el Capítulo 2. Químicamente, puede generarse por la reacción de *descomposición de H_2O_2* con hipoclorito de sodio o con cloro gaseoso en solución salina (ec. 3) [44,45].

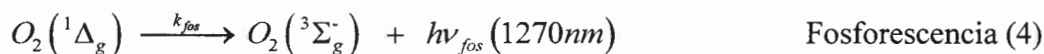


Es conocido que algunos hidrocarburos aromáticos, particularmente policíclicos condensados, forman endoperóxidos por fotooxidación sensibilizada [46]. Estos, a través de una reacción térmicamente reversible, generan el hidrocarburo policíclico y $O_2(^1\Delta_g)$. Otra forma de generar $O_2(^1\Delta_g)$, puede ser por *descarga eléctrica*, empleando un tubo de descarga de radiofrecuencia, o bien, por *descomposición fotocatalítica de ozono*, por irradiación UV en un sistema gaseoso [47,48].

En ausencia de luz, la producción de $O_2(^1\Delta_g)$ puede ser ambigua en sistemas biológicos. Se ha propuesto la producción extracelular de $O_2(^1\Delta_g)$, por *dismutación espontánea de $O_2^{\bullet-}$* [49].

Desactivación de $O_2(^1\Delta_g)$

La desactivación de $O_2(^1\Delta_g)$ en solución puede ocurrir por procesos unimoleculares (fosforescencia, interacción con el solvente o desactivación no radiativa) o bimoleculares, por colisión con un sustrato desactivador o “quencher” (Q) como se muestra en las ecs. 4-6.

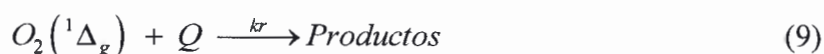
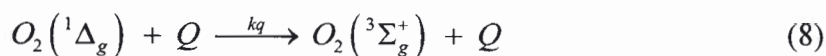


La desactivación natural de $O_2(^1\Delta_g)$, está determinada por los procesos de fosforescencia y de interacción con moléculas del solvente. La especie $O_2(^1\Delta_g)$ tiene un tiempo de vida natural τ_Δ^0 , específico para cada solvente, determinado por la ec. 7.

$$\tau_\Delta^0 = (k_{fos} + k_{NR})^{-1} = k_d^{-1} \quad (7)$$

Donde las k_{fos} y k_{NR} , corresponden a las constantes de desactivación por fosforescencia y no radiativa, respectivamente.

En presencia de un Q, existe una vía competitiva, que se muestra en las ecs. 8 y 9.



Donde las k_q y k_r , corresponden a las constantes de desactivación física y reactiva, respectivamente.

La desactivación bimolecular puede ocurrir a través de un proceso reactivo (ec. 9), en el que se produce una transferencia de carga con formación de productos. Este tipo de desactivación es común para compuestos orgánicos como: alcohol furfurílico, antraceno y sus derivados y bifenilbenzofurano. Algunos sustratos poseen únicamente una vía reactiva, y es posible calcular la k_r . Por otro lado, se puede producir una desactivación física con una constante k_q , en la que no se produce formación de productos, dado que procede vía una transferencia de energía. Algunos compuestos con la capacidad de desactivación por esta mecanismo son: Azida sódica, 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano(DABCO), y BC.

Métodos de detección de $O_2(^1\Delta_g)$

Detección de la fosforescencia de $O_2(^1\Delta_g)$ por (TRPD)

La fosforescencia de $O_2(^1\Delta_g)$ se produce en el infrarrojo cercano y su espectro de emisión muestran máximos a 1270 nm y a 1580 nm correspondientes a las transiciones $^1\Delta_g \rightarrow ^3\Sigma_g^-(0,0)$ y $(0,1)$ respectivamente [50].

La detección de fosforescencia de $O_2(^1\Delta_g)$ resuelta en el tiempo (Time Resolved Phosphorescence Detection, TRPD), es una técnica que consiste en la detección de la fosforescencia de $O_2(^1\Delta_g)$ a 1270nm, emitida cuando retorna a su estado fundamental $O_2(^3\Sigma_g^-)$. Esta técnica se basa, en la irradiación de un S con un pulso corto de luz láser (< 20 ns), y el monitoreo en tiempo real del crecimiento y caída de la fosforescencia de

$O_2(^1\Delta_g)$. La intensidad de la señal, $I(t)$, alcanza el valor I_0 luego del pulso del láser, en función del tiempo de vida del triplete del sensibilizador, τ_T , y decae exponencialmente con un tiempo de vida $\tau_\Delta (=1/k_d)$, Figura 4.1 [51], tal que:

$$I_{(t)} = I_{(0)} \frac{\tau_\Delta}{\tau_T - \tau_\Delta} \left(e^{-t/\tau_T} - e^{-t/\tau_\Delta} \right) \quad (10)$$

Para sistemas en los que $\tau_T \ll \tau_\Delta$, la porción decreciente de la señal después de un $t \gg 5 \tau_T$, puede describirse como (Figura 4.1 (B)):

$$I_{(t)} = I_0 \exp(-t / \tau_\Delta) \quad (11)$$

Los parámetros, I_0 , τ_Δ y eventualmente τ_T pueden ser obtenidos por ajuste de las señales de fosforescencia a las ec. 10 o 11.

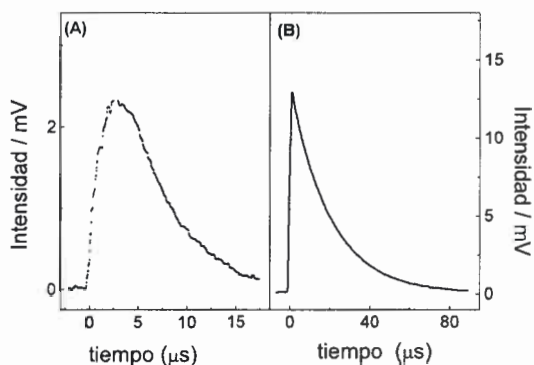


Figura 4.1. Señal típica de la fosforescencia de $O_2(^1\Delta_g)$. (A) $\tau_T \approx \tau_\Delta$, el crecimiento y decaimiento ocurren con constantes de velocidad similares. La señal corresponde a $10\mu\text{M}$ de ácido 1H-fenalen-1-ona-2-sulfónico en agua saturada con aire. (B) $\tau_T \ll \tau_\Delta$, la constante de velocidad para el crecimiento es mayor que la del decaimiento. La señal es de fenalenona en benceno saturado con aire [51].

Por lo tanto, la medida de τ_{Δ} para una serie de concentraciones del desactivador Q, permite obtener la constante de velocidad de desactivación total, k_t , de acuerdo a la ec. 12.

$$k_{obs} = \frac{1}{\tau_{\Delta}} = \frac{1}{\tau_{\Delta}^0} + k_t[Q] = k_d + k_t[Q] \quad (12)$$

La sensibilidad del método, está limitada principalmente por el tiempo de vida de $O_2(^1\Delta_g)$. En situaciones, en la que la velocidad de desactivación es comparable, o superior a la constante de formación, la intensidad de la fosforescencia puede ser no detectada. Cabe destacar, que esta técnica permite determinar si el mecanismo de fotooxidación es mediado por $O_2(^1\Delta_g)$, pero no excluye la presencia de $O_2^{*\cdot}$.

1.1.4.2. Generación y Desactivación de Estados Tripletas Excitados de Sensibilizadores

En sistemas biológicos y particularmente en alimentos, RF es uno de los principales sensibilizadores en procesos de fotooxidación. En dichos procesos, RF absorbe radiación UV cercana y luz visible azul (<500nm), generando la especie singlete excitada, $^1RF^*$, que por un proceso de CES, forma un estado triplete excitado, $^3RF^*$. El estado $^3RF^*$, puede continuar el proceso de oxidación por un mecanismo de Tipo I (transferencia de electrones) generando EROS, o por un mecanismo de Tipo II (transferencia de energía), formando $O_2(^1\Delta_g)$, y como tercera opción causando la oxidación directa de posibles biomoléculas que se encuentren en su entorno. La fotooxidación mediada por RF, será analizada en detalle en el Capítulo 5 de esta tesis.

Métodos de Detección de Estados Tripletas Excitados

Técnica de Láser Flash Fotólisis (LFP)

Esta técnica puede ser empleada para detectar si el estado $^3S^*$, es desactivado por oxígeno o por sustratos (mecanismo tipo I), determinando las constantes de velocidad bimoleculares. La presencia de oxígeno inhibe la reacción entre el sustrato y el 3S , a través de una simple competencia.

La técnica de LFP, permite la determinación de tiempos de vida y espectros de absorción resueltos en el tiempo de especies transitorias como tripletes, iones radicales y radicales libres, generadas por un pulso intenso de radiación láser.

El arreglo experimental utilizado para la implementación de esta técnica, se muestra en la Figura 4.2. La fuente de excitación es un láser Nd:YAG (Spectron SL400) con emisión a 532, 355 o 266nm de 20 ns de ancho de pulso. El sistema óptico de detección consta de: una lámpara de Xenón (PTI, 150 W) como luz analizadora, un sistema de lentes, un obturador (*shutter*), un portacelda para la muestra, un monocromador y un fotomultiplicador (Hamamatsu R666 o RCA 4840) como detector. El haz de excitación se enfoca a 90°, con respecto al haz analizador. La señal eléctrica proveniente del fotomultiplicador, se digitalizó por un osciloscopio (Hewlett Packard 54504A), y se transfirió a una computadora personal por medio de una interfase IEEE.

El análisis de los datos, consiste en ajustar las señales de decaimiento y crecimiento de las diferentes especies transitorias observadas por medio de diferentes ecuaciones cinéticas (primer orden, segundo orden, etc.), que permiten calcular el tiempo de vida del $^3S^*$, o bien la transformación a valores de absorbancia, a partir de los cuales se pueden obtener los espectros de absorción de especies transitorias, registrando a un tiempo fijo la absorbancia de las especies punto a punto, en función de la longitud de onda.

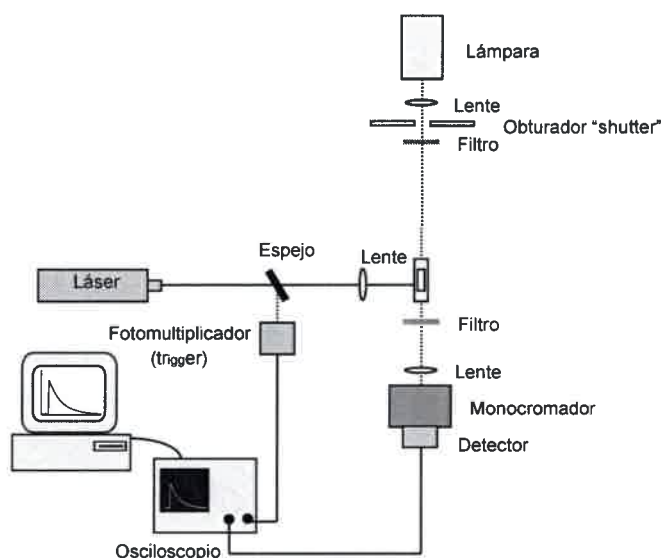


Figura 4.2. Arreglo experimental para la aplicación de la técnica de LFP.

2. OBJETIVOS

El objetivo del trabajo presentado en este capítulo es, determinar la AAO de CAR MC en GA. Específicamente se propone:

Determinar la AAR de β -caroteno, Apo-8'-carotenal, y Apo-12'-carotenal microencapsulados en GA, frente a la desactivación de los radicales OH^{\bullet} , y $\text{O}_2^{\bullet-}$ generados químicamente, y la AAO de GA evaluando la eficiencia de desactivación de las especies excitadas, $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ y $^3\text{RF}^{\bullet}$.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos

Los patrones de CAR empleados para la obtención de las microcápsulas fueron BC (98% pureza) de Sigma-Aldrich, y β -apo-8'-carotenal (Apo8) y β -apo-12'-carotenal (Apo12) de DSM Nutritional Products (Basel, Switzerland). Riboflavina (RF) $\geq 98\%$, Azida de sodio (NaN_3), Superóxido Dismutasa (SOD), Nitro Azul de tetrazolium (NBT), D-Histidina (His), 2-desoxi-D-ribosa (DoR), 6-hidroxi-2,5,7,8-tetramethylcroman-2-ácido carboxílico (Trolox, TX) y Azul de metileno (MB), Histidina (His), fueron provistos por Sigma-Aldrich. Goma arábica (GA), ($\text{PM}=3,5 \times 10^5$ g/mol) grado alimentario, fue adquirida de Colloides Naturels Brasil (San Pablo, Brasil) Buffer fosfato (BP) de Merk. FeCl_3 , H_2O_2 , KH_2PO_4 , ácido ascórbico, ácido tiobarbitúrico (TBA), ácido tricloroacético (TCA), clorhidrato de hidroxilamina (CHA), son reactivos grado analítico, obtenidos de Biopack (Argentina). Las soluciones acuosas fueron preparadas con agua Mili-Q.

3.2. Microencapsulación de Carotenoides

Se prepararon MC de β -caroteno (Bc-GA), β -apo-8'-carotenal (Apo8-GA), y β -apo-12'-carotenal (Apo12-GA), usando GA como material de pared. Adicionalmente se prepararon MC de GA vacía (GA).

Los CAR MC fueron preparados, a través del proceso de secado por aspersión, empleando un sistema Spray-dryer de laboratorio (LabPlant SD-04). Las condiciones de trabajo fueron las siguientes: diámetro de la boquilla de aspersión de 0,7mm, presión de

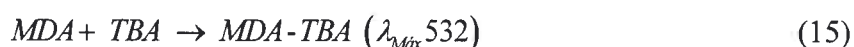
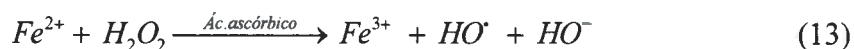
aire de 5 Kg/cm², caudal de aire de 30 ml/min, y entrada y salida de aire de temperaturas de 170 °C y 110 °C, respectivamente.

Se prepararon soluciones de GA (200 ml de solución al 30% (P/V)) en agua a 45 °C para obtener la completa disolución del biopolímero, luego se mantuvo bajo agitación continua hasta que alcanzó una temperatura de 30 °C. Los CAR fueron disueltos en diclorometano y adicionado a la solución de GA. Esta mezcla fue homogeneizada a 7000 rpm por 30 min, y luego diluida con agua para obtener una solución de GA al 20% (P/V). La emulsión fue colocada en la cámara del equipo, y se mantuvo una lenta agitación durante el proceso de secado. Los CAR MC obtenidos fueron inmediatamente almacenados frascos de vidrio, en oscuridad y bajo atmósfera de N₂ a -18 °C para evitar la degradación de los AOx.

3.3. Desactivación de Especies Radicalarias

3.3.1. Desactivación del Radical HO•

Se generó el radical HO• de manera indirecta, a través de la reacción de Fenton a pH 7,4 ec. 13 [52]. El HO• generado oxida a la DoR, produciendo una mezcla de productos, entre ellos MDA (ec. 14), que en condiciones de bajo pH y calentamiento, reaccionan con el TBA, formando un cromógeno, que es un aducto MDA-TBA, con una absorción máxima a 532 nm (ec. 15) [3434]. A través de este método, se determinó la capacidad de los CAR MC en GA: Bc-GA, Apo8-GA, y Apo12-GA, y GA, para inhibir la formación de MDA por reacción con HO• ec. 16. La reacción se realizó en buffer fosfato 50 mM (pH 7.4), conteniendo DoR 10mM, H₂O₂ 100mM, FeCl₃ 1mM, EDTA 5mM y la muestra de AOx. La reacción comenzó con la adición de AA en una concentración final de 5mM. La mezcla de reacción se incubó 1 hora, a 37 °C en baño de agua. Luego de cumplido el tiempo de incubación, se adicionó TBA al 1% y TCA, refrigerado al 2,8% y se calienta hasta temperatura de ebullición (95-100 °C) durante 20 min, para permitir la formación del aducto coloreado, cuya absorbancia se midió a 532 nm.





La capacidad de desactivación del radical HO^{\bullet} por los microencapsulados fue expresada como porcentaje de desactivación (%D) y se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación (ec. 17):

$$\%D = \frac{A_0 - A_{AOx}}{A_0} \quad (17)$$

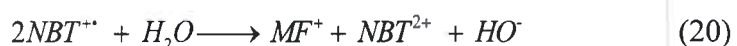
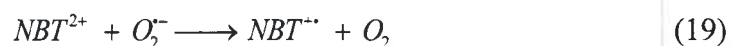
Donde A_0 es la absorbancia del control (blanco), y A_{AOx} , es la absorbancia en presencia de los CAR MC. Los ensayos fueron realizados por duplicado.

3.3.2. Desactivación del Radical Anión Superóxido $O_2^{\bullet-}$

La desactivación del $O_2^{\bullet-}$, se determinó empleando el método descrito por Sabu y Ramadasa [53]. Este se basa, en la generación de $O_2^{\bullet-}$ por la autooxidación de CHA, el cual reduce NBT a nitritos, ecs. 18 y 19. El nitrito NBT^{2+} en presencia de agua produce MF^+ , que tiene un máximo de absorción a 560 nm, ec. 20. Cuando están presentes en el medio, los CAR MC compiten con el NBT por $O_2^{\bullet-}$, ec. 21.

La reacción se realizó en un tubo de ensayo, pesando la concentración deseada de los CAR MC, y adicionando buffer carbonato de sodio (150 mM) pH 10, NBT 1,8 mM y EDTA 1 mM, agua bidestilada y CHA 6 mM. Se incubó 1 hora a 37 °C. Al término de dicho tiempo, se midió la reducción de NBT a 560 nm.

Como AOX de referencia, se empleó la enzima SOD. Se determinaron los porcentajes de desactivación del $O_2^{\bullet-}$, a partir de las absorbancias en ausencia y presencia de los CAR MC. Los resultados se expresan como actividad antioxidante equivalente a SOD (AAE_{SOD}) a partir de la relación entre el %D para los microencapsulados y la SOD, de acuerdo a la ec. 22.





$$AAE_{SOD} = \frac{k_{obs}^{AOx}}{k_{obs}^{His}} \quad (22)$$

Donde k_{obs}^{AOx} y k_{obs}^{His} , corresponden a las constantes observadas, obtenidas de las pendientes iniciales de los gráficos de %D de los AOx e His, respectivamente.

3.4. Desactivación de Especies No Radicalarias

3.4.1. Reactividad de GA Frente a $O_2(^1\Delta_g)$

Se determinó la constante de velocidad de desactivación química, k_r , de $O_2(^1\Delta_g)$ producido por fotosensibilización de MB. Para tal fin, se midió el consumo de oxígeno, en BP a pH 7, en presencia de GA 8,4 μM . Según los datos reportados por Mahendran y col. [54], dicha concentración de GA, corresponde a una concentración 32 μM de His, de acuerdo a su composición química estudiada. Se empleó una disolución 1,3 mM de His como compuesto de referencia ($k_r = 1,2 \times 10^8 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) [55]. La irradiación, se realizó con una lámpara de filamento de tungsteno de 150 W (Phillips), acoplada con un filtro de corte naranja ($\lambda > 530 \text{ nm}$) como fuente de excitación. El consumo de O_2 , fue monitoreado por un sensor de oxígeno de fibra óptica FOXY-R (OceanOptics).

Adicionalmente, se evaluó el consumo de oxígeno por GA, en experimentos fotosensibilizados por RF, la cual puede generar tanto $O_2(^1\Delta_g)$, como $O_2^{\bullet-}$ [56,57]. Se evaluó el efecto de la adición de SOD y de NaN_3 sobre el consumo de oxígeno por GA. SOD es una enzima que participa en la dismutación de $O_2^{\bullet-}$, de acuerdo al proceso descrito con anterioridad. Mientras que NaN_3 , es un exclusivo desactivador físico de $O_2(^1\Delta_g)$ [58].

3.4.2. Desactivación de Triplete de RF

En un trabajo previo, se demostró que el $^3\text{RF}^*$ no fue desactivado por licopeno en soluciones acuosas de micelas 30 mM de Triton X-100 [59]. Resultados similares fueron obtenidos por Cardoso y col. [60], quienes estudiaron la desactivación del $^3\text{RF}^*$ por ascorbato, CAR y tocoferoles, en sistemas acuosos de modelos alimentarios, demostrando que BC, licopeno y crocina, no son capaces de desactivar dicha especie

reactiva. Es por ello, que en el presente trabajo, fue estudiada solamente la interacción del $^3\text{RF}^*$ con la MC de GA vacía.

Con el objetivo de evaluar la interacción entre la GA y el $^3\text{RF}^*$, se realizaron experimentos de LFP, con el sistema montado en el laboratorio de fotoquímica de la Universidad Nacional de Santiago del Estero. Para la excitación de una solución de RF en agua saturada con N_2 , se empleó un pulso de excitación láser a 355 nm de 10 ns de ancho medio, que produce el estado $^3\text{RF}^*$. Para obtener evidencias de la desactivación de $^3\text{RF}^*$ por GA, se monitorearon las señales típicas de absorción de transiente de $^3\text{RF}^*$ a 720 nm, en función de la concentración de GA. Los espectros de transientes y los consumos de la absorción de transitorio de $^3\text{RF}^*$, fueron registrados con un Luzchem m-LFP 112 system, usando como fuente un láser pulsado Q-switched Nd:YAG (Continuum Minilite II, Santa Clara, CA), operado a la frecuencia de salida de 355 nm, 10 ns, 4mJ por pulso.

3.5. Análisis estadístico

Los datos experimentales fueron analizados y procesados, empleando el Software Origin Pro 8, de OriginLab Corporation. Los experimentos fueron realizados por triplicado, sujetos a análisis estadísticos de varianza (ANOVA de una vía) con un nivel de confianza de $p < 0,05$, utilizando el Software Statgraphics Centurion XV.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Desactivación de Especies Radicalarias

4.1.1. Desactivación del Radical Hidroxilo HO^\bullet

El radical HO^\bullet es la ERO más reactiva. Ésta puede reaccionar con lípidos, polipéptidos, proteínas y ácidos nucleico, activando reacciones en cadena que continúan causando daño celular. Además, tiene una fundamental importancia en el campo alimentario, ya que es uno de los principales iniciadores de la peroxidación lipídica, donde es generado fundamentalmente vía la reacción de Fenton [11].

En la Figura 4.3, se muestran los % D del radical HO^\bullet , calculados de acuerdo a la ec. 16, tanto para los CAR MC, como para la cápsula vacía de GA.

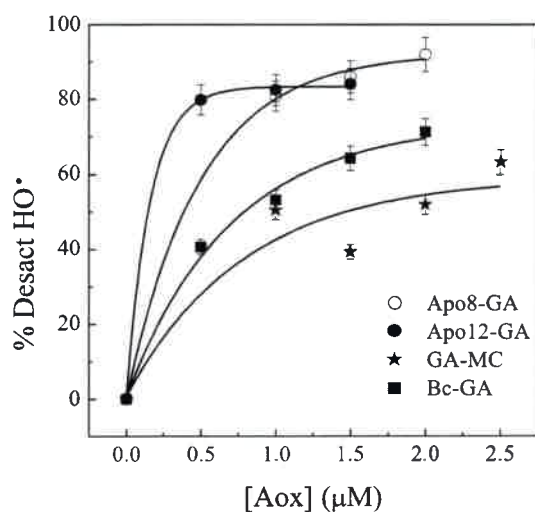


Figura 4.3. % de Desactivación del radical HO• por Bc-GA, Apo8-GA, Apo12-GA y GA-MC.

Se observa en la Tabla 4.2 que frente al radical HO•, los CAR MC, presentan un mayor %D que la MC de GA vacía. En cuanto a la reactividad de los diferentes CAR MC frente al HO•, fue determinado que Apo8-GA es el más eficiente desactivante, con un %D de 92%.

4.2.2. Desactivación del Radical Anión Superóxido $O_2^{\bullet-}$

El radical $O_2^{\bullet-}$ es otra especie reactiva capaz de causar daño celular, y deterioro de los alimentos aumentando la predisposición a varias enfermedades [61].

La Figura 4.4 (A), muestra los % D del radical $O_2^{\bullet-}$ calculados de acuerdo a la ec. 17, tanto para los CAR MC, como para la de GA. En tanto, que en la Figura 4.4 (B), presenta el % D del $O_2^{\bullet-}$, por SOD.

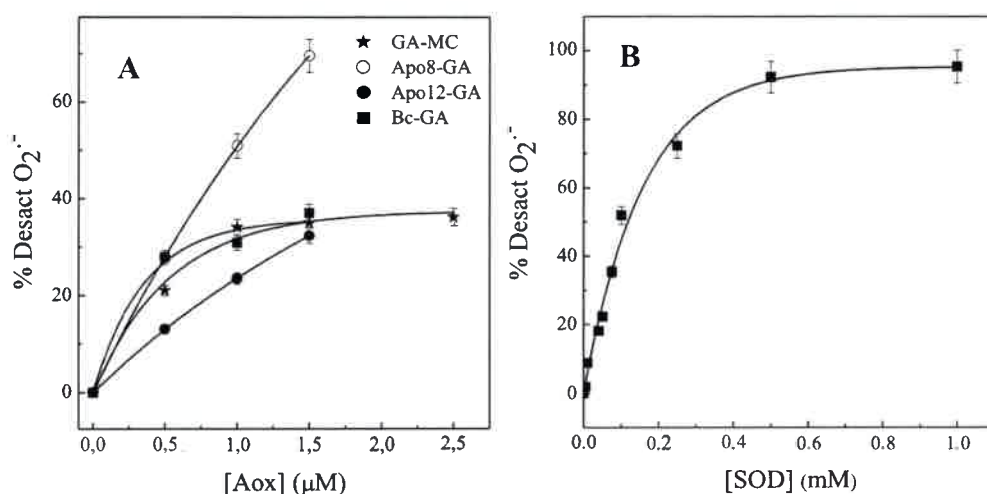


Figura 4.4. % de Desactivación del radical $O_2^{\bullet-}$ por: (A) MC (BcGA, Apo8-GA, Apo12-GA y GA-MC), (B) SOD.

A partir de la relación entre las pendientes iniciales de los gráficos de % D para los MC y SOD, se calculó la AAE_{SOD} .

Los resultados, se expresan como el máximo %D observado para ambos radicales, y como la AAE_{SOD} para $O_2^{\bullet-}$, Tabla 4.2.

Tabla 4.2. % Desactivación máximo y actividad antioxidante equivalente a SOD.

Compuesto	% D_{max}	% D_{max}	AAE_{SOD}
	$\bullet OH$	$O_2^{\bullet-}$	
Apo8-GA	92	70	0,15
Apo12-GA	84	32	0,07
Bc-GA	71	37	0,13
GA-MC	52	30	0,05

Se observa que la desactivación del radical $O_2^{\bullet-}$, es mayor con las MC conteniendo CAR, comparado con el efecto de MC de GA vacía. A su vez, de los CAR MC, Apo8-GA presentó el mayor %D, siendo prácticamente el doble, respecto de GA y de los demás CAR MC (Tabla 4.2).

Se conoce que la actividad antioxidante de los CAR, es consecuencia de la capacidad del extenso sistema de dobles enlaces conjugados, presentes en su estructura, para deslocalizar electrones no apareados [62], siendo este sistema, el principal responsable de la excelente capacidad de los CAR para desactivar físicamente el $O_2(^1\Delta_g)$ sin degradación, y de la reactividad química de BC con los radicales libres como el ROO^\bullet , OH^\bullet , y el $O_2^{\bullet-}$.

Si bien, aún no se conoce el mecanismo exacto por el actúan los CAR en la desactivación de EROS, o existen numerosas contradicciones en la bibliografía. Hay resultados que muestran que la posición C-4 alílico, en el anillo de BC, es una posición reactiva y susceptible a la abstracción de hidrógeno por radicales libres, inclusive radical ROO^\bullet [63]. Por otra parte, Polyakov y col. [64] cuestionaron que CAR podrían actuar como AOX o pro-oxidantes en la reacción de Fenton, dependiendo del potencial de oxidación de los CAR y de la naturaleza de los radicales libres. A través de la técnica atrapador de espín (ESR), estudiaron la influencia de los CAR (BC, β -apo-8'-caroteno-8'-al, *canta*, β -apo-8'-caroteno-8'-oato etilo) en el rendimiento de radicales libres en la reacción de Fenton. A altas concentraciones de H_2O_2 , el efecto pro-oxidante aumenta, a medida que disminuye el potencial de oxidación del CAR, disminuyendo la capacidad de desactivar radicales libres, ya que compiten con la reducción de Fe^{+3} a Fe^{+2} , incentivando una mayor producción de HO^\bullet . Dado que BC y *canta*, poseen menores potencial de oxidación ($E^{ox}=0,64$ y $0,69$, respectivamente) respecto de todos los CAR estudiados, presentan menores velocidades de desactivación de radicales libres.

Se demostró que Apo8-GA es el más eficiente desactivante de los radicales HO^\bullet y $O_2^{\bullet-}$. Estos resultados pueden ser explicados, en términos de efectos de compartimentalización (localización) de la molécula AOX en la MC, y de la accesibilidad de las EROS al interior de la misma. Esto es particularmente importante, para compuestos apolares, tales como BC, ya que la localización en microdominios hidrofóbicos en el interior de la MC, puede reducir fuertemente su capacidad intrínseca de desactivarlos. En cambio, para compuestos más polares como los apocarotenoides, su capacidad desactivante se mantiene prácticamente constante en las MC, en comparación con los disolventes homogéneos [65,66]. Es probable, que el grupo carbonilo de Apo8, le permita "anclarse" en una posición más externa de la MC, lo que le facilita la interacción con las especies radicales, y el número de dobles enlaces

conjugados que posee le permite donar electrones. Estos resultados, concuerdan con los informados por Rodrigues y col. [67], que demostraron que Apo8, fue el AOx incorporado en microcápsulas de GA y MD, que promovió un mayor incremento en la desactivación de diferentes EROS y ERNS, entre ellas, el radical HO[•]. Justificaron que dicho efecto pudo deberse a que Apo8 presentó la mejor relación entre localización de la molécula en el interior de la MC y reactividad frente a las EROS y ERNS.

Resultados similares se observaron en el estudio de la AAO de CAR en la oxidación mediada por radicales libres, de liposomas de fosfatidil colina (FC) [68]. La mayor AAO fue obtenida con astaxantina- β -glucosido, seguido de astaxantina, zeaxantina, y finalmente BC, indicando que los CAR polares fueron más efectivos desactivadores de radicales. Esto demuestra que la efectividad de los AOx, podrían depender, no sólo de la capacidad intrínseca de interactuar con compuestos oxidativos, sino también, de la capacidad de localización, orientación y partición en regiones interfaciales en sistemas organizados, como liposomas, emulsiones, vesículas y membranas [69,70]. Lim y col. [71] informaron que CAR más polares, como zeaxantina y astaxantina, inhibieron la oxidación de liposomas de FC de yema de huevo de manera más eficiente que CAR no polar como BC y cana. Ello es debido a que la orientación de los CAR polares, paralela a la bicapa de FC, les resulta favorable para actuar como AOx por ruptura de la reacción en cadena.

Los resultados obtenidos demuestran que los CAR MC pueden actuar como eficientes desactivantes de los radicales analizados, siendo más efectivos frente al radical HO[•], que es una especie altamente reactiva y capaz de actuar como iniciador en la peroxidación lipídica, lo cual potenciaría su aplicación como AOx de alimentos.

4.3. Desactivación de Especies No Radicalarias

4.3.1. Reactividad de GA frente a O₂(¹Δ_g)

La desactivación total de O₂(¹Δ_g) por los CAR MC, (Apo8-GA, Apo12-GA y BC-GA, entre otros), fue previamente estudiada por Faria y col. [65]. Los resultados obtenidos, demuestran que la eficiencia de desactivación de O₂(¹Δ_g) es fuertemente dependiente de los efectos de la localización de los AOx en la MC y de la accesibilidad de O₂(¹Δ_g) al interior de la misma. Además, en dicho trabajo también fue demostrado

que GA es (en sí mismo) un eficiente desactivador de $O_2(^1\Delta_g)$, con un valor de $k_t^{GA} = 2,7 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$, probablemente, debido a alguna fracción de su composición proteica.

Como es conocido que los CAR son eficientes Q físicos de $O_2(^1\Delta_g)$, y para determinar la naturaleza de la eficiencia de desactivación de $O_2(^1\Delta_g)$ por GA, se evaluó la constante de desactivación reactiva de $O_2(^1\Delta_g)$ por GA, k_r^{GA} . Para tal fin, se registraron los consumos de oxígeno en procesos de fotosensibilización, empleando His como actinómetro, ya que posee la capacidad de desactivar a $O_2(^1\Delta_g)$ por vía química exclusivamente con un valor de $k_r = 4 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ [54], Figura 4.5.

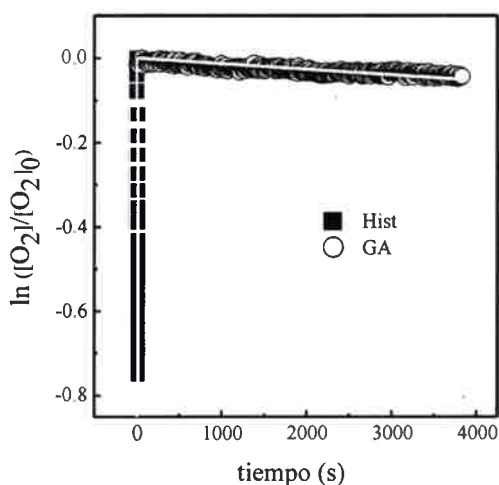


Figura 4.5. Consumo de oxígeno en fotosensibilización de MB conteniendo (○) GA 8,4 μM y (■) His 1,4 mM.

La constante k_r^{GA} , fue calculada a partir de la relación entre las constantes de velocidades unimoleculares para el consumo de oxígeno por GA e Hist, k_{obs}^{GA} , k_{obs}^{Hist} obtenidos a partir de las gráficas logarítmicas de consumo de oxígeno (ec. 23). Se obtuvo un valor de $k_r^{GA} = 7,6 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$.

$$k_r^{GA} = k_r^{His} \times \frac{k_{obs}^{GA}}{k_{obs}^{His}} \tag{23}$$

Comparando el valor de las constantes de desactivación total de $O_2(^1\Delta_g)$ (k_t), obtenido por Faria y col. [65], y desactivación química (k_r), por GA, se observa que GA es capaz de desactivar a $O_2(^1\Delta_g)$ principalmente por un mecanismo de transferencia de energía, desactivación física (ec. 8) y en menor proporción por reacción química (ec. 9). De esta forma, GA ejercería una actividad catalítica con una mínima degradación y una mayor actividad antioxidante.

4.3.2. Desactivación de Triplete de RF

El espectro de absorción triplete-triplete del sensibilizador excitado, $^3RF^*$, en MeOH-H₂O (50:50) saturada con N₂ se muestra en la Figura 4.6.

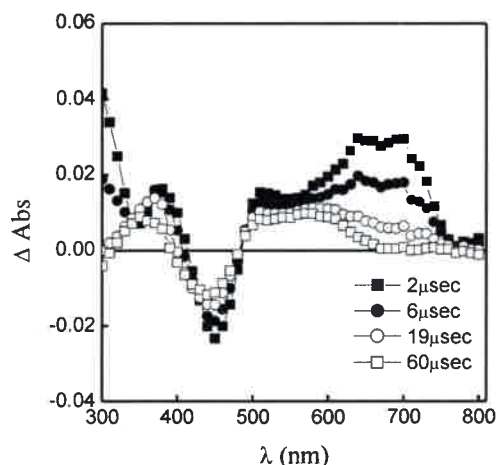


Figura 4.6. Espectros de absorción de transiente observados después de la excitación láser a 355 nm de RF (34 μ M) en MeOH-H₂O (50:50) saturada con N₂.

Para obtener evidencias de la interacción entre $^3RF^*$ y GA, se monitorearon las señales típicas de absorción de transiente de $^3RF^*$ a 720 nm en función de la concentración de GA, Figura 4.7 (A). En presencia de GA, la constante de velocidad para la desactivación de $^3RF^*$, se calculó de acuerdo a la ec. 24.

$$k_{RF} = k_{RF}^0 + k_q^{RF-GA}[GA] \quad (24)$$

Donde, k_{RF}^0 ($1/\tau^0$) es la constante de velocidad del decaimiento de ${}^3RF^*$ en ausencia de GA, con $\tau^0 = 27 \mu s$, y $k_q^{RF-GA} = 1,56 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$ es la constante de velocidad aparente para la desactivación de 3RF por GA, Figura 4.7 (B). Este valor es próximo al valor de la constante de velocidad de desactivación de un proceso controlado por difusión en agua $k_q = 6,5 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$ [60].

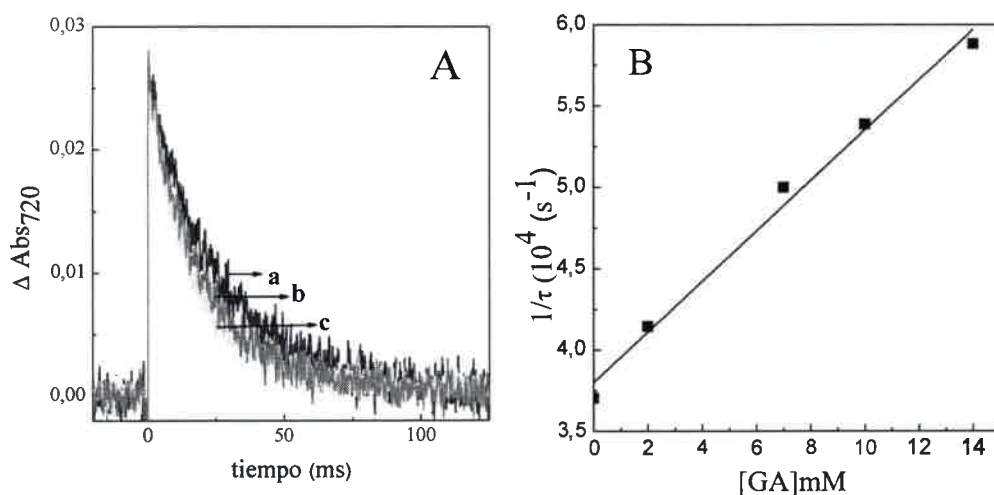


Figura 4.7. (A) Decaimientos a 720 nm para RF en agua en función de la concentración de GA, a) 0 μM , b) 7 μM , c) 14 μM . (B) Relación lineal de $1/\tau$ con la concentración de GA.

En un trabajo reportado por Cardoso y col. [60], se presentan valores de constantes de desactivación de ${}^3RF^*$ por aminoácidos, siendo para Tirosina (Tir) $k_q^{Tir} = 1,4 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$. Considerando la fracción proteica de GA [54] y en particular el contenido en aminoácidos capaces de desactivar estados ${}^3RF^*$, se recalculó la constante de velocidad para la desactivación de ${}^3RF^*$ por los aminoácidos His y Tir, en función del contenido de los mismos en GA, obteniéndose valores de k_q^{RF} de $3,8 \times 10^8 M^{-1}s^{-1}$ y $1,8 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$, respectivamente. Se puede observar que el valor de obtenido para Tir, es similar con el previamente informado por Cardoso y col. [60], y coincidente con el valor experimental obtenido para GA, lo cual estría indicando que la desactivación del ${}^3RF^*$ por GA se debe a los residuos de Tir presentes en la misma.

Además, comparando el valor de k_q^{RF-GA} obtenida para GA con el valor de la constante de desactivación de ${}^3RF^*$ por $O_2({}^3\Sigma_g^-)$, $k_q^{RF-O_2} = 9,8 \times 10^8 M^{-1}s^{-1}$, se observa que GA puede actuar como un eficiente desactivante de ${}^3RF^*$, compitiendo con oxígeno

en condiciones aerobias, lo que demuestra que GA posee una importante capacidad Antioxidante.

Evidencias adicionales para el mecanismo de transferencia de electrones fueron obtenidas de los espectros de absorción de transientes de una solución de RF (34 μM), conteniendo GA en una concentración de 14 μM , a diferentes tiempos de decaimientos en solución MeOH-H₂O (50:50) saturada con N₂, Figura 4.8 (A). Los espectros a 2 y 6 μs son similares al reportado para el anión radical, RF^{•-} (banda centrada a 340 nm), mientras que el espectro a 60 μs , es similar al radical neutro RFH[•] (banda a 320 nm), formado por la protonación del anión radical [72]. Esto estaría sugiriendo, que el principal mecanismo de desactivación de triplete, es una transferencia electrónica desde la fracción proteica de GA al ³RF^{*}.

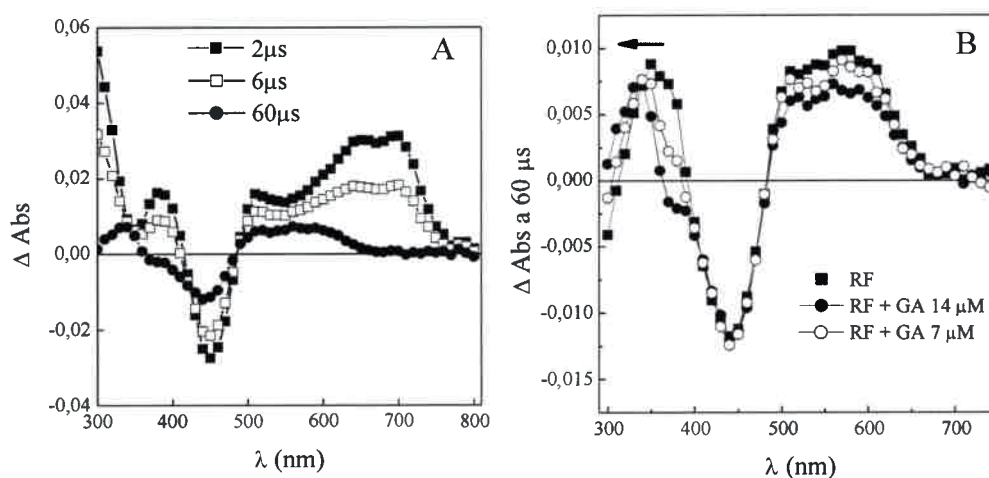


Figura 4.8. (A) Espectros de absorción de transiente registrados a 2, 6 y 60 μs después del pulso en láser a 355 nm de RF (34 μM) y GA 14 μM en MeOH-H₂O (50:50) saturada con N₂. (B) Espectros de absorción de transiente registrados a 60 μs después del pulso en láser a 355 nm de RF (34 μM), RF+GA 7 μM , RF+GA 14 μM en MeOH-H₂O (50:50) saturada con N₂.

En la Figura 4.8 (B), se muestran los espectros de absorción de transientes de las soluciones RF, y RF conteniendo GA 7 y 14 μM , a 60 μs después del pulso láser. En la misma, se observa claramente el desplazamiento al azul de la banda a 340 nm en función del incremento en la concentración de GA. Esto indicaría que el proceso de

transferencia de electrones se ve favorecido por la concentración de GA. El mismo comportamiento fue previamente informado por Lu y Liu [73], para la reacción del $^3\text{RF}^*$ con residuos de Tir o Triptofano (Trp), debido a la formación de radicales neutros RFH^* y $\text{Tir}^*/\text{Trp}^*$ por transferencia de un electrón, acoplada a la transferencia de protón.

5. CONCLUSIÓN

Se pudo comprobar que los CAR MC pueden actuar como eficientes desactivantes de EROS, específicamente frente a HO^* y $\text{O}_2^{\bullet-}$, siendo más efectivo para la desactivación del HO^* , que es el principal iniciador de peroxidación lipídica. De los todos los CAR MC, Apo8-GA fue el más eficiente, debido a su polaridad que le permite una localización más favorable en la MC, con una mayor accesibilidad de los EROS al interior de la misma.

Adicionalmente, se determinó la capacidad de desactivación de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ por GA, principalmente a través de vía física, por un mecanismo de transferencia de energía, ejerciendo AAO catalítica, con una mínima degradación.

Finalmente, se comprobó que GA es capaz de desactivar el $^3\text{RF}^*$, incluso, en condiciones aeróbicas, compitiendo con el oxígeno. Esta capacidad es atribuida a la fracción proteica de GA, específicamente al aminoácido Tir, a través de un mecanismo de transferencia de electrones.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Ziegler, R.G. 1989. A review of epidemiologic evidence that carotenoids reduce the risk of cancer. *Journal of Nutrition*. 119, 116-122.
2. Saran, M., Bors, W. 1989. Oxygen radicals acting as chemical messengers: a hypothesis. *Free Radical Research Communications*. 7, 213-220.
3. Suzuki, Y.J., Foramn, H.J., Sevanian, A. 1997. Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radical Biology and Medicine*. 22, 269-285.
4. Finkel, T. 2011. Signal transduction by reactive oxygen species. *The Journal of Cell Biology*. 194, 7-15.

5. Janssen-Heininger, Y.M.W., Mossman, B.T., Heintz, N.H., 2008. Redox based regulation of signal transduction: principles, pitfalls, and promises. *Free Radical Biology and Medicine*. 45, 1-17.
6. Winterbourn, C.C. 2008. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature Chemical Biology*. 4, 278-286.
7. Forman, H.J., Maiorino, M., Ursini, F. 2010. Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry*. 49, 835-842.
8. Murphy, M.P., Holmgren, A., Larsson, N.G., Halliwell, B., Chang, C.J., Kalyanaram, B., Rhee, S.G., Thornalley, P.J., Partridge, L., Gems, D., Nyström, T., Belousov, V., Schumacker, P.T., Winterbourn, C.C. 2011. Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. *Cell Metabolism*. 13, 361-366.
9. Bendich, A. 1994. Recent advances in clinical research involving carotenoids. *Pure and Applied Chemistry*. 66, 1017-1024.
10. Goodwin, T.W. 1952. The comparative biochemistry of the carotenoids. Chapman and Hall, London.
11. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 2007. Free Radicals in Biology and Medicine. Fourth ed. Oxford University Press, Oxford.
12. Liebler, D.C. 1993. Antioxidant Reactions of Carotenoids. *Annals of the New York Academy Science*. 691, 20-31.
13. Montenegro, M.A., Nazareno, M.A., Durantini, E.N., Borsarelli, C.D. 2002. Singlet Oxygen quenching ability of carotenoids in a reverse micelle membrane mimetic system. *Photochemistry and Photobiology*. 75, 353-361.
14. Montenegro, M.A., Rios de O, A., Mercadante, A.Z., Borsarelli, C.D. 2004. Model Studies on the Photosensitized Isomerization of Bixin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 52, 367-373.
15. Palozza, P., Krinsky, N.I. 1992. Antioxidant Effects of Carotenoids *in Vivo* and *in Vitro*. *Method in Enzymology*. 213, 403.
16. Rong, T., Zeyuan, D. 2004. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals, Review. *Journal of Chromatography. B*. 812, 85-89.



17. Huang, D., Ou, B., Prior, R.L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 1841-1856.
18. Cao, G.H., Alessio, H.M., Cutler, R.G. 1993. Oxygen-radical absorbency capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*. 14, 303-311.
19. Cao, G., Prior, R.L. 1999. The measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. *Methods in Enzymology*. 299, 50-62.
20. Wayner, D.D.M., Burton, G.W., Ingold, K.U., Locke, S. 1985. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. *FEBS Letters*. 187, 33-37.
21. Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. 299, 152-178.
22. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26, 1231-1237.
23. Benzie, I.F.F., Strain, J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239, 70-76.
24. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E, Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*. 28, 25-30.
25. Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. 1999. Phenolic Compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*. 66, 401-436.
26. Marinova, E.M., Yanishlieva, N. 1996. Antioxidative activity of phenolic acids on triacylglycerols and fatty acid methyl esters from olive oil. *Food Chemistry*. 56, 139-145.
27. Gray, J.I. 1978. Measurement of lipid oxidation: a review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 55, 539-546.
28. Valkonen, M., Kuusi, T. 1997. Spectrophotometric assay for total peroxy radical-trapping antioxidant potential in human serum. *Journal of Lipid Research*. 38, 823-833.

29. De Lange, R.J., Glaze, A.N. 1989. Phycoerythrin fluorescence-base assay for peroxy radicals: a screen for biologically relevant protective agents. *Analytical Biochemistry*. 177, 300-306.
30. Miller, N., Rice-Evans, C., Davies, M., Gopinathan, V., Milner, A. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidants status in premature neonates. *Clinical Science*. 84, 407-412.
31. Perez, D.D., Leighon, F., Aspee, A., Aliaga, C., Lissi, E. 2000. A comparison of methods employed to evaluate antioxidant capabilities. *Biological Research*. 33, 71-77.
32. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1985. *Mol. Aspects Med.* 8, 89-193. Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. (1988) in *ISI Encyclopedia of Science. Biochemistry*, in the press.
33. Minotii, G., Aust, S.D. 1987. The role of iron in the initiation of lipid peroxidation. *Chemistry and Physics of Lipids*. 44, 191-208.
34. Gutteridge, J.M.C. 1981. Thiobarbituric acid-reactivity following iron-dependent free-radical damage to amino acids and carbohydrates. *FEBS Letters*. 128, 343-346.
35. Braun, A.M., Maurette, M-T., Oliveros, E. 1991. *Photochemical Technology*. John Wiley & Sons. Chichester. Y citas allí incluidas.
36. Kono, Y. 1978. Generation of Superoxide radical during autoxidation of Hydroxylamine and an assay for superoxide dismutase. *Archives of Biochemistry and biophysics*. 186, 189-195.
37. Rajagopalan, K.V., Handler, P. 1964. Hepatic Aldehyde Oxidase.II. Differential Inhibition of Electron Transfer to Various Electron Acceptors. *The Journal of Biological Chemistry*. 239, 2022-2026.
38. Miller, R.W. 1970. Reactions of superoxide anion, catechols, and cytochrome c. *Canadian Journal of Biochemistry*. 48, 935-939.
39. Altman, F.P., Butcher, R.G. 1973. Studies on the reduction of tetrazolium salts. I. The isolation and characterization of a half-formazan intermediate produced during the reduction of neotetrazolium chloride. *Histochemie*. 37, 333.

40. Altman, F.P. 1974. Studies on the reduction of tetrazolium salts. The products of chemical and enzymic reduction. *Histochemie*. 38, 155-171.
41. Lofberg, R.T. 1965. *Nature (London)* 206, 503.
42. Neugebauer, F.A., Russell, G.A. 1968. Tetrazolynil radicals. *The Journal of Organical Chemistry*. 33, 2744-2746.
43. Blelski, B.H.J., Shiue, G.G., Bajuk, S. 1980. Reduction of Nitro Blue Tetrazolium by CO₂- and O₂- Radicals. *The Journal of Physical Chemistry*. 84, 830-833.
44. Martinez, G.R., Ravanat, J.L., Medeiros, M.H.G., Cadet, J., Di Mascio, P. 2000. Synthesis of a naphthalene endoperoxide as a source of O-18-labeled singlet oxygen for mechanistic studies. *Journal of the American Chemistry Society*. 122, 10212-10213.
45. Aubry, J.M. 1985a. Search for singlet oxygen in the decomposition of hydrogen peroxide by mineral compounds in aqueous solutions. *Journal of the American Chemistry Society*. 107, 5844-5849.
46. Golnick, K. 1968. R. Livingston, in "Autoxidation and Antioxidants. Ed. Lundberg, W.O., Wiley, New York. *Advances in Photochemistry*. 6, 249.
47. Jones, J.T.N., Wayne, R.P. 1969. *The Journal of Chemical Physics*. 51, 317.
48. Noxon, J.F. 1970a. *The Journal of Chemical Physics*. 52, 1852.
49. Tarr, M., Velenzeno, D.P. 2003. Singlet oxygen: the relevance of extracellular production mechanisms to oxidative stress *in vivo*. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2, 355-361.
50. Nonell, S. 1994. Reactive Oxygen Species. *Photobiology in Medicine*. Eds. Jori, G. *et al.*, Plenum Press, New York, 29-50 y referencias allí citadas.
51. Nonell, S., Braslavsky, S.E. 2000. Time-Resolved Singlet Oxygen Detection. *Methods in Enzymology*. 319, 37-49.
52. Aruoma, O.I. 1994. Deoxyribose assay for detecting hydroxyl radicals. *Methods in Enzymology*. 233, 57-66.
53. Sabu, M.C., Ramadasan, K. 2002. Anti-diabetic activity of medicinal plants and its relationship with their antioxidant property. *Journal of Ethanopharmacology*. 81, 155-160.

54. Mahendran, T., Williams, P.A., Phillips, G.O., Al-Assaf, S., Baldwin, T.C. 2008. New Insights into the Structural Characteristics of the Arabinogalactan-Protein (AGP) Fraction of Gum Arabic. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 56, 9269-9276.
55. Liu, F., Ooi, V.E.C., Chang, S.T. 1997. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sciences*. 60, 763-771.
56. Pajares, A., Gianotti, J., Stettler, G., Bertolotti, S., Criado, S., Posadaz, A., Amat-Guerri, F., Garcia, N.A. 2001. Modelling the natural photodegradation of water contaminants-A kinetic study on the light-induced aerobic interactions between riboflavin and 4-hydroxypyridine. *Journal of Photochemistry and Photobiology A, Chemistry*. 139, 199-204.
57. Ahmad, I., Fasihullah, Q., Noor, A., Ansari, I.A., Ali, Q.N.M. 2004. Photolysis of riboflavin in aqueous solution: A kinetic study. *International Journal of Pharmaceutics*. 280, 199-208.
58. Wilkinson, F., Helman, W.P., Ross, A. 1995. Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited state of molecular oxygen in solution. An extended and revised compilation. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*. 24, 663-1021.
59. Montenegro, M.A., Nunes, I.L., Mercadante, A.Z., Borsarelli, C.D. 2007. Photoprotection of Vitamins in Skimmed Milk by an Aqueous Soluble Lycopene-Gum Arabic Microcapsule. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 55, 323-329.
60. Cardoso, D.R., Franco, D.W., Olsen K., Andersen, M.L., Skibsted, L.H. 2004. Reactivity of Bovine Whey Proteins, Peptides, and Amino Acids toward Triplet Riboflavin as Studied by Laser Flash Photolysis. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 52, 6602-6606.
61. Spiteller, G. 2001 Lipid peroxidation in aging and age dependant diseases. *Experimental Gerodontology*. 36, 1425-1457.
62. Mortensen, A., Skibsted, L.H., Truscott, T.G. 2001. The interactions of dietary carotenoids with radical species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 385, 13-19.

63. Woodall, A.A., Wai-Ming Lee, S., Weesie, R.J., Jackson, M.J., Britton, G. 1997. Oxidation of carotenoids by free radicals: relationship between structure and reactivity. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1336, 33-42.
64. Nikolai, E., Polyakov, T.V., Leshina, T.A., Konovalova, Lowell D. 2001. Kispert. Carotenoids as Scavengers of Free Radicals in a Fenton Reaction: Antioxidants Or Pro-Oxidants?. *Free Radical Biology and Medicine*. 31, 398-404.
65. Faria, A.F., Mignone, R.A., Montenegro, M.A., Mercadante, A.Z., Borsarelli, C.D. 2010. Characterization and Singlet Oxygen Quenching Capacity of Spray-Dried Microcapsules of Edible Biopolymers Containing Antioxidant Molecules. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 58, 8004-8011.
66. Cantrell, A., McGarvey, D.J., Truscott, T.G., Rancan, F., Böhm, F. 2003. Singlet Oxygen quenching by dietary carotenoids in a model membrane environment. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 412, 47-54.
67. Rodrigues, E., Mariutti, L.R.B., Faria, A.F., Mercadante, A.Z. 2012. Microcapsules containing antioxidant molecules as scavengers of reactive oxygen and nitrogen species. *Food Chemistry*. 134, 704-711.
68. Matsushita, Y., Suzuki, R., Nara, E., Yokoyama, A., Miyashita, K. 2000. Antioxidant activity of polar carotenoids including astaxantin- β -glucoside from marine bacterium on PC liposomes. *Fisheries science*. 66, 980-985.
69. Frankel, E.N., Huang, S.W., Kanner, J., German, J.B. 1994. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs. emulsions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 42, 1054-1059.
70. Coupland, N.J., McClements, D.J. 1996. Lipid oxidation in food emulsions. *Trends in Food Science and Technology*. 7, 83-91.
71. Lim, B.P., Nagao, A., Terao, J., Tanaka, K., Suzuki, T., Takama, K., 1992. Antioxidant activity of xanthophylls on peroxy radical-mediated phospholipid peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1126, 178-184.
72. Lu, C., Lin, W., Wang, W., Han, Z., Yao, S., Lin, N. 2000. Riboflavin-(VB2) photosensitized oxidation of 2'-deoxyguanosine-5'-mono-phosphate (dGMP) in aqueous solution: A transient intermediates study. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2, 329-334.

73. Lu, C.Y., Lui, Y.Y. 2002. Electron transfer oxidation of tryptophan and tyrosine by triplet states and oxidized radicals of flavin sensitizers: a laser flash photolysis study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 1571, 1, 71-76. ISSN: 0304-4165.

CAPÍTULO 5

Capacidad Protectora de β -Caroteno Microencapsulado

Sobre Degradaciones Fotoinducidas en Leche

1. INTRODUCCIÓN

La exposición a la luz puede afectar el valor nutricional y el *flavor* de la leche y los productos lácteos, causando disminución en la aceptabilidad por parte de los consumidores. Aún así, en supermercados la leche es almacenada en refrigeración, expuesta a luz fluorescente para aumentar y atraer la atención de los compradores. La luz, a través de un proceso de fotosensibilización puede acelerar la velocidad de oxidación de ciertos componentes, como aminoácidos, ácidos grasos insaturados, y vitaminas, causando la formación de off-flavor y pérdida de la calidad nutricional [1-3].

La RF (Vitamina B₂), está presente en la leche, en una concentración de 0,8-3,0 mg/L [4]. La degradación de RF es dependiente de la intensidad y longitud de onda de la luz, el tiempo de exposición, y los materiales de embalaje. Particularmente, longitudes de onda entre 420-520 nm, puede reducir la calidad nutricional de los alimentos, lo que está relacionado con el proceso de fotosensibilización, en el cual RF absorbe radiación y pasa a su estado triplete excitado $^3\text{RF}^*$, que en presencia de $\text{O}_2(^3\Sigma_g^-)$, puede generar $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ por un mecanismo de transferencia de energía [5,6].

La RF pertenece a la familia de las flavinas (isoalloxacin) que se encuentran entre los compuestos más ampliamente investigados por sus funciones biológicas, importancia nutricional, usos terapéuticos y fotosensibilidad. Químicamente, RF es 3, 10-dihidro-7, 8-dimetil-10-[(2*S*, 3*S*, 4*R*)-2, 3, 4, 5-tetrahidroxipentil]benzopteridina-2,4-diona, la estructura química se muestra en la Figura 5.1. RF es esencial para el normal desarrollo y crecimiento del cuerpo, la producción y regulación de ciertas hormonas, y la formación de células sanguíneas. Es requerida en el metabolismo de grasas, carbohidratos, proteínas, y para la respiración, pero debe ser incorporada en la

alimentación, ya que el organismo no es capaz de sintetizarla o almacenarla. Deficiencia de RF son manifestadas en piel y membranas mucosas.

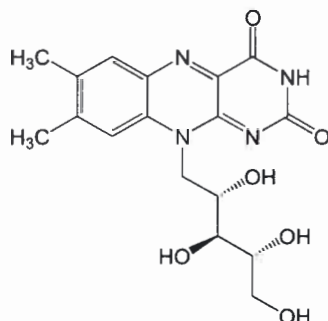


Figura 5.1. Estructura química de RF.

1.1. Propiedades Espectroscópicas de RF.

El espectro de absorción UV-Vis de la RF exhibe máximos de absorción a 267 nm (ϵ $2,94 \times 10^3$ ($M^{-1}cm^{-1}$)); 375 nm (ϵ $0,96 \times 10^3$ ($M^{-1}cm^{-1}$)); 445 nm (ϵ $1,12 \times 10^3$ ($M^{-1}cm^{-1}$)) en solución acuosa de buffer fosfato pH 7,4, Figura 5.2 [7]. Los altos valores de absorptividad molar de RF en los máximos de absorción ($\times 10^4$ $M^{-1}cm^{-1}$) indican que la molécula está sufriendo una transición electrónica $\pi \rightarrow \pi^*$. La posición de los máximos de absorción y las absorptividades molares asociadas podrían estar afectadas por el entorno del cromóforo, como solvente, pH, uniones hidrógeno. Esto ha sugerido que la transición electrónica $\pi \rightarrow \pi^*$ de la banda UV cercana a 375 nm, podrían sufrir alguna contribución de la transición electrónica $n \rightarrow \pi^*$ involucrando los N-1 electrones de antienlace. RF se encuentra en forma catiónica (RFH_2^+) en soluciones ácidas (pH < 4), forma neutra (RFH), y aniónica (RF^-) a pH altos (> 9,7), siendo la forma catiónica no fluorescente y la aniónica levemente fluorescente. RF neutra exhibe una intensa fluorescencia amarilla a 520 nm, con un rendimiento cuántico, de 0,2 en solución acuosa de buffer fosfato pH 7,4, y el tiempo de vida de la especie excitada es de 4,7 ns [7]. El rendimiento cuántico de fluorescencia de RF es dependiente de la polaridad del solvente, e incrementa con la disminución de polaridad del mismo. En la Figura 5.2, se muestra el espectro de absorción y emisión de RF en buffer fosfato pH 7,4.

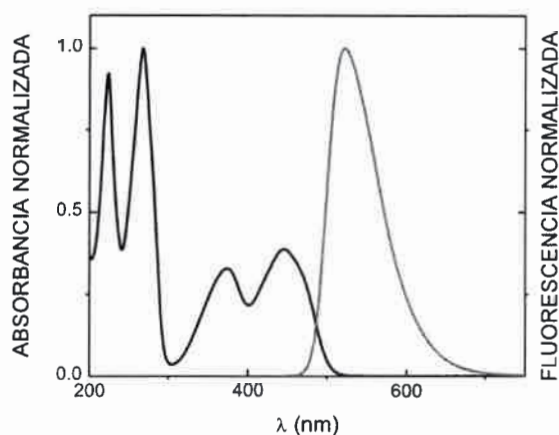


Figura 5.2. Espectros de absorción y emisión normalizados de RF en buffer fosfato pH 7,4 [7].

1.2. Mecanismos de Fotosensibilización por RF

RF actúa como S, ya que posee la capacidad de absorber radiación UV cercana y luz visible azul (<500 nm) generando por una transición permitida por espín, un estado fluorescente singulete excitado, $^1\text{RF}^*$ de vida corta (~5 ns en agua a temperatura ambiente) [8]. Por un proceso de entrecruzamiento con un rendimiento cuántico ($\Phi_T \approx 0,6$), se forma un estado triplete excitado, $^3\text{RF}^*$, ec. 1 (Figura 5.3). El estado $^3\text{RF}^*$, es de vida media larga (~15 μs en agua a temperatura ambiente) con un alto potencial oxidante ($E^\circ \sim + 1,7 \text{ V}$), comparado al de RF en estado fundamental, ($E^\circ = -0,3 \text{ V}$), lo que permite la oxidación directa de la mayoría de los tipos de biomoléculas por el $^3\text{RF}^*$.

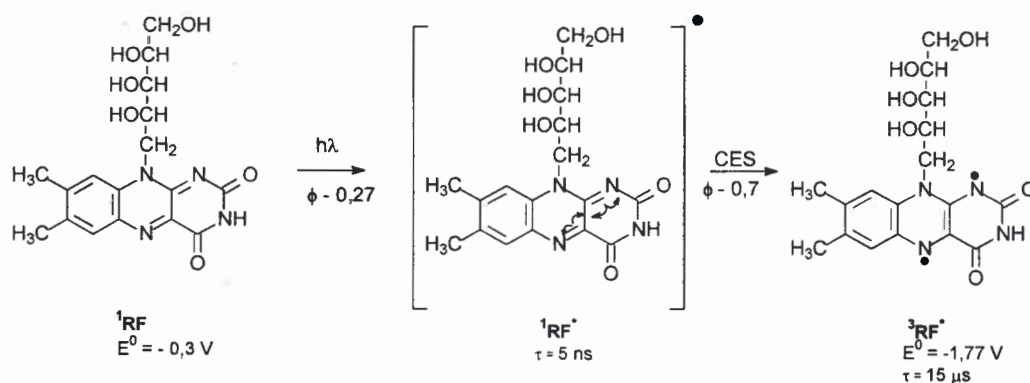
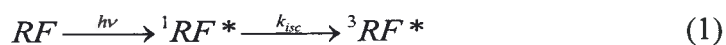


Figura 5.3. Formación fotoinducida de estados excitados de RF.

RF es capaz de inducir oxidación fotosensibilizada de otras moléculas, por mecanismos de Tipo I (transferencia de electrones) o de Tipo II (transferencia de energía), en función de la concentración de sustrato reactivo y de $O_2(^3\Sigma_g^-)$ disuelto en el medio [9]. En el mecanismo Tipo I, el $^3RF^*$ puede reaccionar con residuos de amino ácidos de péptidos y proteínas, lípidos y vitaminas del alimento, produciendo iones radicales $RF^{\bullet-}$ y $A^{\bullet+}$ (ec. 2). El nuevo radical anión semirreducido puede continuar en reacciones secundarias, generando EROS, tales como $O_2^{\bullet-}$ y, H_2O_2 (ecs. 3-6). Éste último, en presencia de cationes de metales pesados, como Fe^{2+} , a través de la reacción de Fenton, puede producir el radical HO^\bullet , altamente reactivo, ec. 7.



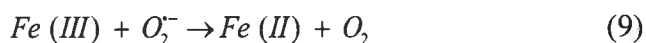
Por el contrario, cuando la concentración de oxígeno molecular es alta ($\sim 0,27$ mM), es decir, en ambientes aeróbicos, se ve favorecido el proceso de Tipo II, siendo el $O_2(^1\Delta_g)$, la EROS principalmente generada, con un rendimiento cuántico de $\Phi_{\Delta} \approx 0,48$, (ec.8) [10].



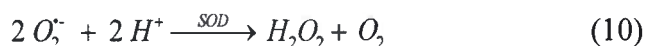
Esta especie de oxígeno es altamente reactiva y electrofílica, por lo que interactúa de manera muy eficiente con moléculas ricas en electrones, tales como lípidos, proteínas, vitaminas, e incluso la RF misma, por procesos de desactivación física y química, presentados en ecs. 8 y 9 del Capítulo 4 [11].

Se ha demostrado, que $O_2(^1\Delta_g)$ es responsable de la mayor parte de las oxidaciones en los alimentos, ya que las constantes de velocidad de la reacción oxidativa, es aproximadamente unas 1000 veces mayor que las mostradas por $O_2(^3\Sigma_g^-)$ [12]. Esto se debe fundamentalmente, a que dichas reacciones son permitidas por reglas de multiplicidad, ya que la mayoría de estos compuestos biológicos presentan un estado fundamental singulete. El $O_2(^1\Delta_g)$ no es un radical y solo posee la capacidad de reaccionar con compuestos no radicales, con dobles uniones. Su tiempo de vida es de 50 a 700 μs , dependiendo del sistema de solvente, lo que le confiere una gran reactividad [13].

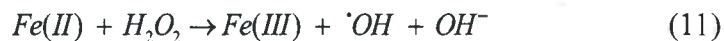
En este proceso de fotosensibilización, también es posible la formación de $O_2^{\bullet-}$, a través de una reacción de transferencia de electrones desde $^3RF^*$ al $O_2(^3\Sigma_g^-)$, pero la eficiencia de la misma es prácticamente despreciable ($<0,1\%$). El $O_2^{\bullet-}$ es un radical que no reacciona directamente con azúcares, polipéptidos, ácidos nucleicos, y su capacidad de oxidar lípidos es controversial [14]. Éste es considerado una ERO primaria, capaz de interactuar con otras moléculas, de manera directa o a través de procesos catalizados por metales o enzimas, para generar EROS secundarias. El $O_2^{\bullet-}$ está involucrado en la reacción Haber-Weiss [15], la cual combina la reacción de Fenton con la reducción de Fe (III), generando Fe (II) y oxígeno, ec. 9.



La enzima Superóxido dismutasa (SOD) reduce el $O_2^{\bullet-}$, generando peróxido de hidrógeno, catalizando la ec. 10.



Este peróxido que se forma, en sistemas biológicos, es eliminado por enzimas tales como catalasa y glutatión peroxidasa. Sin embargo, en situaciones de estrés, se puede producir un desbalance en los metales que participan en el sistema redox, tales como cobre o hierro, participando en la reacción de Fenton, que da origen al radical hidroxilo, ec. 11.



Este último radical formado es altamente reactivo. Actúa en sitios cercanos a su formación, debido a su corto tiempo de vida media, de aproximadamente 1 ns en soluciones acuosas [16]. Es una de las pocas especies capaces de iniciar la peroxidación lipídica.

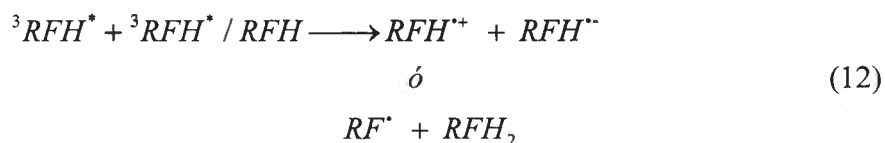
1.3. Oxidación de Compuestos Biológicos

1.3.1. Vitaminas

Las vitaminas están presentes en pequeñas cantidades en los alimentos, sin embargo, pueden ser fácilmente oxidadas por diferentes factores, como luz, EROS, o temperatura, ocasionando la disminución del valor nutricional del alimento y del tiempo de vida útil del producto, ya que algunas poseen AAO.

El $O_2(^1\Delta_g)$ formado por fotosensibilización de RF puede contribuir a la degradación de vitaminas tales como A, C, D, e incluso RF misma en alimentos, ya que puede reaccionar directamente por la presencia de muchos dobles enlaces en sus estructura [17-20]. La velocidad de reacción de RF con $O_2(^1\Delta_g)$, varía de 6×10^7 /M/s [21] a $1,01 \times 10^{10}$ /M/s [22], en función del solvente.

Para el caso particular de RF, cuando $^3RF^*$ reacciona con otra molécula en estado excitado o fundamental de RF, forma radicales catiónico (RFH^+) y aniónico (RF^\bullet) de RF (ec. 12). Esta es una oxidación electrónica de RF que ocurre en el grupo metilo del C-8, y luego se extiende al sistema π de electrones [23]. A su vez, los radicales formados pueden reaccionar con oxígeno triplete por transferencia de electrones y continuar así la oxidación.



Durante el decaimiento natural del $^3RF^*$, RF puede sufrir una autooxidación o degradación intramolecular por abstracción de un átomo de hidrógeno, formando

lumicromo, lumiflavina, 2'- y 4'-ceteriboflavina e hidrox-acetaldehído lumiflavina, en una reacción de primer orden, con un rendimiento cuántico moderado.

Adicionalmente, $^3\text{RF}^*$ puede reaccionar con otras vitaminas hidro y liposolubles, entre ellas, vitaminas A, C, D y E, a través de una reacción de segundo orden. Vitamina E y otros tocoferoles, como ejemplo de vitaminas liposolubles, mostraron una desactivación de $^3\text{RF}^*$ con una constante de velocidad entre $0,96$ a $1,1 \times 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para δ -tocoferol y α -tocoferol en micelas acuosas de Tween-20, a 25°C , con formación de ortoquinona metiluro, quinona, epoxiquinona, espirodímero tocoferol como principales fotoproductos [24]. Vitaminas hidrosolubles como ácido ascórbico, folato, ácido lipoico y piridoxal, muestran constantes de desactivación del $^3\text{RF}^*$ altas, similar que las liposolubles, en la Tabla 5.1 se presentan las constantes de velocidad de segundo orden, para la desactivación del $^3\text{RF}^*$ por diversos compuestos biológicos.

Tabla 5.1. Constantes de velocidad de segundo orden, para la desactivación del estado triplete excitado de riboflavina a 25°C .

Desactivador	$k_2 \times 10^{-7}$ ($\text{L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
O_2^{10}	98 ^a
Ascorbato ²⁴	200 ^b
Ácido Úrico ²⁵	290 ^a
Ácido Lipoico ²⁶	2,9 ^a
Tiamina ²⁷	690 ^a
Folato ²⁸	48 ^a
Aminoácidos, péptidos, y proteínas	
Triptofano ²⁹	1.80 ^b
Tirsoina ³⁰	140 ^b
Metionina ³⁰	6.4 ^b
Histidina ²⁹	5.2 ^b
Vitaminas	
Trolox ²⁴	260 ^b
α -tocoferol ²⁴	54 ^c
α -tocoferol ²⁴	11 ^d
δ -tocoferol ²⁴	48 ^c

Lípidos	
Metil linoleato (C18:2) ³¹	0,03 ^d
Metil linolenato (C18:3) ³¹³¹	0,11 ^d
Metil EPA (C20:5) ³²	0,79 ^e
Metil DHA (C20:6) ³²	1,2 ^e

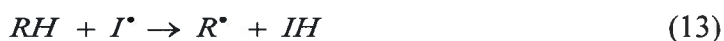
^a agua pH 7.4, ^b agua pH 6.4, ^c t-butanol:agua (7:3), ^d micelas Tween-20, ^e acetonitrilo.

1.3.2. Lípidos

La oxidación de lípidos es un proceso complejo, que lleva a la formación de diferentes compuestos. En estadios tempranos, ocurre una oxidación primaria, formando hidroperóxidos alquílicos como productos. Sin embargo, estos hidroperóxidos son inestables, por lo que se descomponen en una variedad de productos de oxidación secundarios, a través de reacciones como rearrreglos a productos de peso molecular similar, ruptura con la formación de compuestos de cadena más corta (aldehídos, ácidos), y dimerización generando compuestos de menor peso molecular [33].

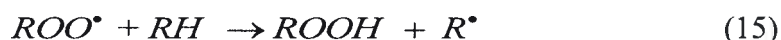
La oxidación lipídica es promovida por factores externos o iniciadores como son elevadas temperaturas, presencia de luz, o materiales extraños, tales como, metales (Fe^{+2}), radicales (OH^\bullet y HOO^\bullet) y $\text{O}_2(^1\Delta_g)$. El proceso completo de oxidación lipídica involucra tres etapas: iniciación, propagación y terminación.

La etapa de iniciación comienza con la formación del radical alquilo (R^\bullet), por el ataque del iniciador, I^\bullet , en el lugar de la molécula del lípido, RH , más propenso a la pérdida de un átomo de hidrógeno [34]. La energía necesaria para la extracción de un átomo de hidrógeno de un ácido graso saturado, es de 100 Kcal/mol aproximadamente, dependiendo de la posición del mismo en la cadena carbonada. Como resultado de la deslocalización del electrón impar, estos radicales pueden sufrir isomerización *cis-trans*, por cambios en la configuración de las dobles uniones, ec. 13.

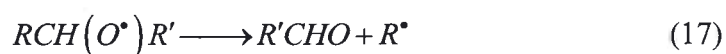
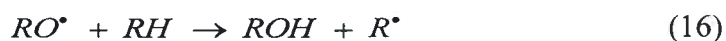


La etapa determinante de la velocidad de la reacción es la de propagación, y se lleva a cabo rápidamente por la reacción del radical R^\bullet de lípidos insaturados con el oxígeno, para formar el radical ROO^\bullet , seguido de una reacción de transferencia de

hidrógeno con un H débil de otro lípido insaturados o de un antioxidante, ec. 14 y 15.



Diferentes reacciones de terminación son posibles. Los hidroperóxidos son sometidos a homólisis, formando radicales ROO^{\bullet} o alcoxilo (RO^{\bullet}), los cuales pueden continuar reaccionando, ec. 16 y 17. Los alcoholes formados remueven especies reactivas, mientras que los aldehídos insaturados, podrían ser inestables.



La reacción de radicales R^{\bullet} , RO^{\bullet} y ROO^{\bullet} , dirigen a una etapa de terminación, con formación de dímeros o productos tipo dímeros no radicalarios, ec 18-21.



Los hidroperóxidos formados continúan sufriendo un complejo proceso de degradación, en lo que es conocido como una oxidación secundaria, que lleva a la formación de una gran variedad de productos secundarios, que pueden ser clasificados como monoméricos (compuestos con la misma longitud de cadena de la inicial, pero con diferente grupo funcional), oligoméricos (productos de mayor peso molecular), y volátiles (compuestos de cadena corta). Los tipos de reacciones que pueden ocurrir durante el proceso de descomposición incluyen, deshidratación, ciclización, rearreglo, sustitución radical, ruptura de cadena, dimerización, e incluso combinación de varias reacciones. La oxidación lipídica sensibilizada por RF es otro factor importante en el desarrollo de flavor fotoinducido, aunque la velocidad de degradación de lípidos por RF

son relativamente bajas comparado con proteínas [35]. Los ácidos grasos poliinsaturados, tales como ácido linoleico, constituyentes de lípidos de alimentos que contienen RF y en productos lácteos, pueden fácilmente ser oxidados por el $O_2(^1\Delta_g)$, producido por el $^3RF^*$ por el mecanismo fotoinducido. Una gran variedad de compuestos tales como hidrocarburos, alcoholes, furanos, aldehídos, cetonas y compuestos ácidos, son producidos durante la oxidación y responsables del off-flavour del alimento, Figura 5.4.

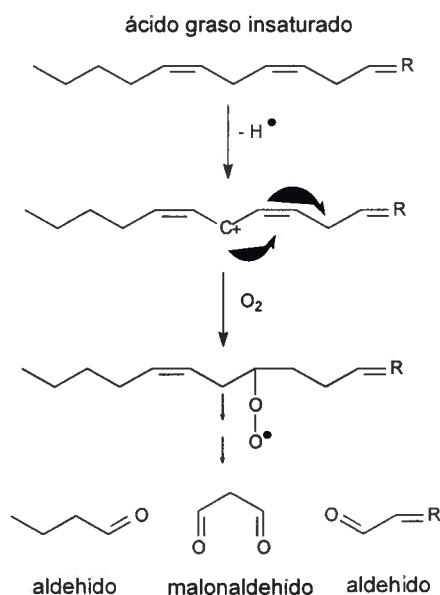


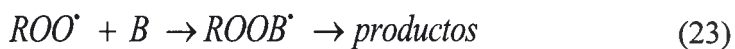
Figura 5.4. Esquema de peroxidación lipídica de ácidos grasos insaturados.

La molécula de oxígeno puede reaccionar de dos maneras sobre los lípidos, en su estado fundamental como diradical (autooxidación), y en estado singulete excitado $O_2(^1\Delta_g)$ (fotooxidación), existiendo importantes diferencias entre ellas. El proceso de autooxidación tiene un periodo de inducción, en el cual la reacción es lenta, mientras que en la fotooxidación, debido a la alta electrofilicidad del $O_2(^1\Delta_g)$, la reacción es rápida, sin periodo de inducción y a diferencia de la autooxidación, no es una reacción en cadena. Los hidroperóxidos formados por autooxidación pueden servir como iniciadores

para la fotooxidación. Sin embargo, numerosos estudios han demostrado que la velocidad de oxidación del oxígeno triplete $O_2(^3\Sigma_g^-)$ sobre ácidos grasos insaturados, es prácticamente despreciable, respecto de la causada por el oxígeno singulete excitado $O_2(^1\Delta_g)$ [36]. Por ejemplo, la velocidad de reacción del $O_2(^1\Delta_g)$ con el ácido linoleico, es aproximadamente unas 1450 veces mayor que la oxidación por radicales libres de oxígeno triplete [37]. La oxidación de lípidos puede ser inhibida o disminuida con la adición de AOx capaces de desactivar los radicales en la autooxidación, mientras que en la fotooxidación se requieren desactivantes del $O_2(^1\Delta_g)$, tales como BC. En presencia de un antioxidante, AH, la etapa de terminación ocurre de la siguiente manera, ec. 22 y 23:



Donde AH=AOx es un compuesto fenólico, como tocoferol



Donde B= Compuesto insaturado, como β -caroteno

1.3.3. Aminoácidos, Péptidos y Proteínas

Las proteínas y amino ácidos pueden ser oxidados por EROS, principalmente HO^{\bullet} y $O_2(^1\Delta_g)$. La reacción de $O_2(^1\Delta_g)$ con proteínas que contienen dobles enlaces activados con grupos amino o RO^{\bullet} , producen dioxietanos, que son muy inestables, y fácilmente descompuestos a productos carbonilos [38]. La oxidación por HO^{\bullet} , genera productos entrecruzados y compuestos carbonilos, además tiene la capacidad de generar proteínas radicalarias, que pueden continuar la oxidación de otras proteínas [39,40]. La velocidad de reacción de $O_2^{\bullet-}$ con aminoácidos son muy bajas. Sin embargo, éste oxida selectivamente las proteínas conteniendo un grupo hierro o azufre, inactivando su actividad biológica [41].

En condiciones de fotosensibilización por RF, el $^3RF^*$ es desactivado por el oxígeno, generando $O_2(^1\Delta_g)$, como se ve en la ec. 8. Sin embargo, en soluciones acuosas, donde la solubilidad del oxígeno es baja, los aminoácidos aromáticos como

tirosina y triptófano compiten con el oxígeno como desactivadores del $^3\text{RF}^*$, en solución acuosa neutra o ácida saturada de aire. En condiciones anaeróbicas, la mayoría de los aminoácidos desactivarán el $^3\text{RF}^*$, por el mecanismo de fotosensibilización Tipo I. Las constantes de velocidad tienen altos valores, incluso algunos próximos al límite de difusión, lo cual parece indicar que ocurre por un mecanismo de transferencia de electrones, Tabla 5.1 [29].

En péptidos, la velocidad de desactivación del $^3\text{RF}^*$, parece estar dominada por los aminoácidos desactivantes más eficientes, independientemente de su posición en la secuencia que conforma el péptido. En proteínas, se ha visto un efecto similar, con una velocidad de desactivación alrededor de $5 \times 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [30]. Sin embargo, problemas estéricos podrían cobrar importancia para aminoácidos aromáticos, que actúan como desactivantes, ubicados en el interior de la proteína [30].

La oxidación de proteínas puede ocurrir también por EROS catalizada por metales, causando daños oxidativos como escisión de proteínas, pérdida de residuos histidina, iniciación en la formación de grupos carbonilos, y formación de radicales de proteína, R^\bullet , RO^\bullet , y ROO^\bullet [42,43]. Otro efecto que pueden causar las EROS, es el entrecruzamiento entre proteínas, que luego lleva a su desnaturalización y finalmente puede causar la pérdida de actividad enzimática en ciertas proteínas. Estudios previos, han determinado que desactivadores de oxígeno singulete como: α -tocoferol acetato, BC, azida de sodio y AA pueden prevenir el entrecruzamiento de proteínas y la fotoinactivación de enzimas [44].

1.4. Estrategias Antioxidantes

Por todo lo anteriormente expuesto, es de suma importancia evitar o reducir la oxidación de los componentes alimenticios. En un intento para proteger la leche de la luz, se han desarrollado envases protectores [45]. En la actualidad se está empleando una nueva estrategia para la conservación de productos alimenticios, basada en la adición de compuestos antioxidantes, capaces de desactivar EROS y evitar así la oxidación de los alimentos.

2. OBJETIVOS

Evaluar el efecto protector de β -caroteno microencapsulado en GA sobre las alteraciones nutricionales, y organolépticas en leche durante el almacenamiento en refrigeración y expuesto a iluminación. Específicamente, se evaluará el efecto protector sobre la degradación de RF, lípidos y proteínas y sobre el desarrollo de compuestos volátiles.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos

Se empleó patrón de β -caroteno (98% pureza) Sigma-Aldrich, y Goma arábica (GA), ($PM=3,5 \times 10^5$ g/mol) grado alimentario, adquirida de Colloides Naturels Brasil (San Pablo, Brasil), para obtener MC de Bc-GA y MC vacía de GA siguiendo la metodología de microencapsulación descrita en el Capítulo 4.

Riboflavina (RF) $\geq 98\%$, albúmina sérica bovina (BSA), ácido tiobarbitúrico (TBA), ácido tricloroacético (TCA), Sulfato de Sodio, Dodecilsulfato de sodio (SDS), fueron provistos por Sigma-Aldrich (Estados Unidos). Buffer fosfato (BP) y buffer acetato, de Merck (Argentina). Buffer Tris-Glicina de BioRad (Estados Unidos).

Fueron empleados solventes grado HPLC: metanol, hexano, isopropanol, 1-butanol, ácido acético glacial, agua ultrapura, adquiridos LiChrosolv, Alemania.

3.2. Ensayo de Fotooxidación de Leche

3.2.1. Preparación de las Muestras

Se empleó leche en polvo entera de una marca comercial conocida, reconstituida según indicación del fabricante. Para obtener 1 litro de leche fluida, con un contenido graso del 3,5%, 130 g de leche en polvo se disolvieron en 900 ml de agua.

La fotodegradación de la leche se realizó, colocando alícuotas medidas (500 ml) en frascos de vidrio (corte en 310 nm), almacenadas a 4°C, bajo iluminación con lámparas fluorescentes (1000 lux) en ciclos discontinuos de luz y oscuridad durante 7 días, simulando las condiciones de almacenamiento en góndola. En las mismas condiciones, se realizó un control manteniéndolo en oscuridad. Debido al gran número de muestras, el ensayo fue dividido en dos partes, realizando una cinética I con adición

de GA en condiciones de luz y oscuridad y su correspondiente control de leche en iguales condiciones, y un segundo ensayo (cinética II), con y sin adición de Bc-GA.

3.2.2. Muestras

L Luz: Leche reconstituida sin adición de ningún compuesto, almacenada en condiciones de iluminación y refrigeración.

L Osc: Leche reconstituida sin adición de ningún compuesto, almacenada en oscuridad y refrigerada.

L + Microencapsulado Luz: Leche con la adición de una concentración de 1,37 mg/ml de Bc-GA o GA, almacenada en condiciones de iluminación y refrigeración.

L + Microencapsulado Osc: Leche con la adición de una concentración de 1,37 mg/ml de Bc-GA o GA, almacenada en oscuridad y refrigeración.

3.3. Fotooxidación de RF en Leche

La RF en leche fue cuantificada por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). De acuerdo a la metodología presentada en las cinéticas I y II.

3.3.1. Cinética I con adición de GA

La preparación de las muestras consistió en una extracción ácida en caliente basada en el método levemente modificado descrito por A.O.A.C. [46]. En un tubo se adicionó un volumen exactamente medido de leche con o sin GA, a los que se adicionó HCl 0,1N. Las muestras fueron sometidas a un ciclo de autoclave a 121°C por 30 minutos, y luego se dejaron enfriar. Posteriormente, se ajustó el pH a 4,5 con una solución de acetato de sodio 1,25 M y se llevó a volumen, en un matraz de 25 ml con buffer acetato de sodio 0,2 M a pH 4,5. Luego, fueron filtradas con filtros de membrana de 0,45 µm, y colocadas en viales de vidrio con tapa para su inyección en el equipo de HPLC. Este procedimiento se realizó por duplicado para cada muestra analizada.

La identificación de RF en las muestras, se llevó a cabo comparando los tiempos de retención de la muestra con el del estándar. Para cuantificar el contenido de RF de las mismas, se realizó una curva de calibración externa, en base a una concentración conocida de RF (50 µg/ml) en HCl 0,1N, a partir de la cual se preparon puntos patrones



de concentración conocida, (entre 0,1-3,0 $\mu\text{g/ml}$), siguiendo el mismo tratamiento que el realizado para las muestras. Los resultados fueron expresados en $\mu\text{g/ml}$.

La cuantificación fue realizada por HPLC, empleando un Cromatógrafo Líquido marca Agilent equipado con una bomba modelo 1050, módulo de detectores e inyector automático 1100. Software empleado en el análisis de datos: Chemstation Rev. A 10.0. Se empleó una columna analítica Phenomenex Synergie 4U Fusion RP80A C_{18} (150 x 3,0 mm) con pre columna. Las señales fueron registradas con un Detector de Fluorescencia (FLD) operado a $\lambda_{\text{ex}} = 453 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 580 \text{ nm}$. Estas longitudes de onda de detección, hacen posible determinar el contenido de vitaminas, evitando la posible interferencia de otras sustancias. Las condiciones cromatográficas fueron: fase móvil Agua-Metanol-Ácido acético glacial (65:35:0,1), velocidad de flujo de 0,8 ml/min, se seleccionó por presentar el mayor número de platos teóricos, y mantener una buena relación entre la simetría y el tiempo de retención, volumen de inyección de muestra de 10 μl , y tiempo de análisis por muestra de 10 minutos.

3.3.2. *Cinética II con adición de Bc-GA*

La extracción de RF de las muestras se basó en el método descrito por Ashoor y col. [47]. Se empleó un cartucho de extracción en fase sólida C_{18} (sep-pak, Agilent) el cual se activó con metanol y agua bidestilada. Posteriormente, se adicionó un volumen exactamente medido de la muestra de leche con y sin Bc-GA a temperatura ambiente, y se realizaron dos lavados sucesivos con agua bidestilada, todo lo anteriormente mencionado se descarta. Posteriormente se adicionó un volumen de una solución eluyente (mezcla de buffer acetato de sodio 0,02 M pH 4,0, metanol (1:1)) que se recogió en un balón de 50 ml. Se evaporó la muestra en rotavapor, y se llevó a volumen final en matraz de 25 ml con la solución eluyente. Dicha solución se filtró con filtro de membrana de 0,45 μm , y se colocó en vial de vidrio con tapa, para su inyección en el equipo de HPLC. Este procedimiento se realizó por duplicado para cada muestra analizada.

Para cuantificar el contenido de RF en las muestras, se realizó una curva de calibración en base a una concentración conocida de RF stock (50 $\mu\text{g/ml}$) en buffer acetato de sodio 0,02M pH 4,0, a partir de la cual se prepararon puntos patrones de concentración conocida, (entre 0,1-1,5 $\mu\text{g/ml}$), seleccionadas en base al contenido de RF

presente en leche, siguiendo el mismo tratamiento que el realizado para las muestras. La identificación de RF en las mismas, se llevó a cabo comparando los tiempos de retención del pico estándar con el de RF de la muestra.

El análisis cromatográfico se realizó en idénticas condiciones a las empleadas en la cinética I, excepto que se utilizó un detector de Arreglo de Diodos (DAD) a 270 nm.

La metodología desarrollada para la cuantificación de RF en la cinética con adición de GA, es diferente a la utilizada para la cinética con Bc-GA. Esto fue debido a que la señal de absorbancia del detector DAD en la cuantificación de RF en los tiempos iniciales, se observa reducida en las muestras conteniendo GA, respecto de las muestras de leche sin adición de GA, lo que ocurre tanto en condiciones de luz como en oscuridad, expresando un resultado erróneo. Esto podría ser explicado por el hecho que se ha empleado GA pura, que no ha sufrido el proceso de microencapsulación por "Spray-drier". Este proceso modifica la solubilidad y la capacidad emulsionante de GA [48]. Puede ser que la GA forme una emulsión o modifique la disponibilidad de la RF, quedando retenida en el cartucho sep-pack que se empleó, lo que causa un decaimiento en la detección.

Para subsanar dicha diferencia, se empleó una metodología diferente que involucra un calentamiento en medio ácido y con detección de fluorescencia. Sin embargo, se pudo demostrar que no hubo diferencia significativa en la cuantificación de RF en leche por ambos métodos, y es concordante con la reportada en bibliografía [4], además de dar resultados correctos la prueba de recuperación.

3.4. Determinación de Oxidación Lipídica en Leche

3.4.1. Extracción de la fracción lipídica

Con el fin de determinar la oxidación de lípidos a través de diferentes ensayos, ha sido necesaria la extracción de la fracción lipídica y los compuestos liposolubles de la leche, empleando el método IDF 172:2001/ISO 14156:2001, descrito por A.S.P.A [49]. Este consistió en la adición en un embudo separador de un volumen determinado de muestra homogeneizada a 20 °C, etanol (96% v/v), NH₃ 14 M y éter etílico. Luego de agitación vigorosa durante un minuto se adicionó pentano, se agitó y dejó reposar hasta obtención de dos fracciones. La fracción acuosa se descartó, mientras que la fracción orgánica fue lavada 2 veces con una solución de sulfato de sodio (10% p/v). La

fracción orgánica fue deshidratada con sulfato de sodio y se evaporó el solvente etéreo en rotavapor hasta peso constante. Se pesó el balón para determinar el contenido graso extraído, y se resuspendió en una mezcla hexano:isopropanol (4:1). Este procedimiento se realizó por duplicado para cada muestra.

El efecto protector frente a la oxidación de los lípidos de leche, debido a que la peroxidación lipídica es principalmente mediada por especies radicalarias, y que los CAR son conocidos especialmente desactivadores de $O_2(^1\Delta_g)$, en el presente capítulo fue evaluado solamente el efecto protector de GA sobre la fotooxidación lipídica.

3.4.2. *Determinación de Sustancias Reactivas con Ácido Tiobarbitúrico (TBARs)*

Esta determinación se basa en la medida espectrofotométrica del pigmento rosado producido por la reacción entre TBA y productos de oxidación de ácidos grasos insaturados, tales como MDA.

Se realizó de acuerdo al método descrito por Tarladgis y col. [50], para lo cual, se pesó una cantidad exacta de muestra de leche con y sin adición de GA. Se adicionó buffer fosfato pH 7 y se homogeneizó con ultraturrax durante 30 s a una velocidad de 21500 rpm. A continuación, se adicionó una solución acuosa de TCA al 30% (p/v) y se homogeneizó con ultraturrax por 30 s a 17500 rpm. Se filtró la muestra con un papel de filtro Whatman N°1. Se colocó en un tubo con tapa, volúmenes iguales del filtrado y de solución acuosa 0,02 M de TBA. Se incubó en baño de agua a 90 °C durante 20 min, y luego se enfrió en heladera (4 °C) por 30 min. Se centrifugó la muestra a 1800 rpm durante 3 min y se midió la absorbancia de la solución a 530 nm y a 450 nm. De manera simultánea, se preparó un blanco, conteniendo las mismas cantidades de buffer, TCA y TBA. La lectura espectrofotométrica se realizó empleando un espectrofotómetro de doble rango Genesys 20 (Thermo-Spectronic, Waltham, MA), contra un blanco siguiendo en paralelo la muestra, de modo de obtener un valor de absorbancia sin interferencia proveniente de los reactivos. Previamente se realizó una curva de calibración, empleando patrones de concentraciones conocidas de MDA.

Se determinó la concentración de sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico (TBARs), expresada en mg de Malonaldehído (MDA) por Kg de muestra, calculado a través de la ec. 24.

$$mg_{MDA/Kg} = \left(\frac{Abs + a}{b} \right) \cdot \frac{72,06}{P_{muestra} \times 1000} \quad (24)$$

Donde Abs corresponde a la absorbancia obtenida de la muestra, a es la intersección de la curva de calibración, y b es la pendiente de la misma. $P_{muestra}$ corresponde al peso de la muestra (en gramos), 72,06 es el peso molecular de MDA, 1000 es para expresarlo en mg.

3.4.2.1. Determinación del Número de Peróxidos en Lípidos

El índice de peróxidos se emplea como un útil indicador de la extensión de la oxidación de lípidos, grasas y aceites. Su determinación presenta la ventaja de indicar la medida directa de los peróxidos lipídicos, los cuales son productos de oxidación primaria.

La determinación se llevó a cabo a través del método propuesto por Shantha y Decker [51], basado en la capacidad de los peróxidos de oxidar el ión ferroso a ión férrico. La oxidación resultante es cuantificada utilizando un compuesto que forma un complejo con ión férrico, que genera una coloración, que luego se mide por espectrofotómetro, comparando con un blanco. Este valor es un útil indicador de la peroxidación lipídica.

El ensayo se realizó pesando una cantidad determinada de la fracción lipídica extraída de una muestra de leche con y sin adición de GA, en un tubo de vidrio con tapa, en el cual se adicionó un volumen determinado de cloroformo:metanol (2:1), tiocianato de amonio y de solución de sulfato ferroso. Se mezcló con vortex por 2-4 s, se incubó 5 min al resguardo de la luz y se realizó la lectura espectrofotométrica a la longitud de onda de 500 nm. Previamente se realizó una curva de calibración, empleando puntos de 1-50 μ g de Fe(III) a partir de una solución estándar de Fe(III)Cl₃.

El valor de peróxidos se calculó a través de la ec. 25. El mismo, sólo se puede emplear cuando la absorbancia del blanco se encuentra entre 0,02-0,04, dado que una absorbancia mayor indicaría oxidación y deterioro de la solución de Fe (II).

$$\text{Peróxidos} = \frac{(A_s - A_b) \times (1/m)}{55,4 \times m_0 \times 2} \quad (25)$$

Donde A_s corresponde a la absorbancia de la muestra, A_b a la absorbancia del blanco, m es la pendiente obtenida de la curva de calibración, m_0 es la masa de muestra, expresada en gramos, y 55,84 corresponde a la masa atómica del hierro. El denominador indica la concentración de hierro oxidado de Fe^{2+} a Fe^{3+} , en μg . La división por un factor de 2 es necesaria para expresar el valor de peróxidos en miliequivalentes de peróxidos en lugar de miliequivalentes de oxígeno, como se menciona en el método de IDF [52].

3.4.2.2. Determinación de la Composición de Ácidos Grasos Total de Leche

Con el objetivo de estudiar el efecto de oxidación inducida por luz, sobre los ácidos grasos presente en leche y además, si la adición de GA ejerce un efecto protector sobre dicha matriz, se determinó la composición de ácidos grasos de leche en polvo reconstituida, con y sin adición de GA, almacenada a 4 °C durante 7 días, expuesta a períodos discontinuos de luz y oscuridad, según la metodología descrita por la IDF [53]. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

La fracción lipídica extraída de la muestra de leche con y sin adición de GA, fue transesterificada con KOH metanólico 2 N, siguiendo el método IDF 182:2002/ISO 15884:2002, posterior a la adición de una concentración específica de los estándares internos ácido tricosenoico (C 23:0) y metil nonanoato (C 9:0), se agitó 1 min, se esperó 5 min y luego se centrifugó a 3000 rpm durante 3 min. El sobrenadante se transfirió a un vial y posteriormente se inyectó para su análisis en el equipo de Cromatografía de Gases con Detección de Ionización a la llama (CG-FID).

Para el análisis cromatográfico se empleó un cromatógrafo gaseoso CG 8000 Series (Instrumentos Fisons, Milán, Italia) con detector FID y una interfase con un sistema computarizado para la adquisición de datos Chromcard Data System, Instrumentos Fisons, Milán, Italia. Se usó una columna de sílice fundida (100 m x 0.25 mm x 0.2 μm espesor) (Agilent) recubierto con 88% de cianopropil aril siloxano. La temperatura del horno fue programada desde 100 °C a 180 °C a una velocidad de 3°C



/min, y se mantuvo a 180 °C durante 10 min, luego se aumentó a 240 °C a una velocidad de 3 °C /min, y se mantuvo por 30 minutos. La temperatura del inyector y detector fueron programadas a 250 °C.

3.4.2.3. Determinación de Compuestos Volátiles en Leche

Los compuestos volátiles que contribuyen al desarrollo de sabores indeseables en leche bajo reacciones fotoinducidas, fueron determinados por microextracción en fase sólida (SPME) y detectados por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría masa (GC-MS), según el método propuesto por Marsilli [54], levemente modificado.

Se colocó un volumen exactamente medido de la muestra de leche con y sin la adición de GA, correspondientes a diferentes tiempos de fotooxidación, en viales de 20 ml, cerrados con tapa metálica y septo sin perforar. Se conservaron en freezer a -20 °C hasta su análisis.

Al momento de realizar el análisis, cada muestra se extrajo del freezer, y fue descongelada por 30 min a temperatura ambiente y 30 min a 45°C en baño de agua. Posteriormente, se procedió a la absorción de los compuestos volátiles por la microfibra SPME 2 cm 23-Gauge (Supelco, USA) a 45 °C por 30 min. Finalmente se colocó la fibra en el inyector de CG-MS a 250 °C por 10 min para permitir la desorción.

Las condiciones empleadas en el CG fueron las siguientes: Columna: RTX Wax (carbowax) (Restek, USA) (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm I.D.), temperatura del horno a 45 °C durante 8 min, luego a 100 °C con un incremento de 3 °C/min. Posteriormente, desde 100 °C a 240 °C con un incremento de 6 °C/min. La isoterma final es de 10 min. La Duración total del ciclo es de 59,67 minutos. Como fase móvil se empleó Helio.

El espectrómetro de masa empleado en el análisis fue CG-MS QP- 2010 (Shimadzu, Japón), con una temperatura de fuente ionizante de 230 °C, voltaje del detector de 1,06 KV. El Sistema de adquisición de datos utilizado fue CG-MS Solution Version 2.50 SU1 – 2006 (Shimadzu, Japonés), con un intervalo de adquisición (m/z) de 33-500. El tiempo total del programa fue de CG: 80 min.

Se calculó el porcentaje de inhibición de los volátiles empleados como marcadores de oxidación (hexanal, pentanal, heptanal) por GA (%I GA) a las 40 h de exposición a iluminación, respecto de L Luz, (ec. 26).

$$\%I_{\text{Volatiles}} = \left(\frac{\%V_{LLuz} - \%V_{L+GALuz}}{\%V_{LLuz}} \right) \times 100 \quad (26)$$

Donde $\%V_{LLuz}$, corresponde al porcentaje de volátil de la muestra de leche sin adición de GA, expuesta a iluminación. $\%V_{L+GALuz}$, es el porcentaje de volátil de la muestra de leche con adición de GA, expuesta las mismas horas de iluminación.

3.4.3. Fotooxidación de Proteínas

La fotodegradación de leche en polvo reconstituída, se realizó colocando fracciones medidas en tubos de vidrio (corte en 310 nm), almacenadas a temperatura de 4°C bajo iluminación continua con lámparas fluorescentes (2.030 lux), simulando las condiciones de almacenamiento en góndola. Los tiempos de fotólisis de las muestras fueron: 0 h (t0), 140 h (t1), 168 h (t2) y 230 h (t3) h de iluminación. En cada uno, se realizaron los siguientes tratamientos: leche expuesta a iluminación (L Luz), leche control en oscuridad (L Osc), leche con adición de una concentración 1 μ M de Bc-GA (1,37 mg/ml) (L+Bc), y una cuarta muestra a la que se adicionó el peso equivalente a 1 μ M de Bc-GA, de la GA (L+GA). Una vez transcurrido el tiempo, las muestras se almacenaron congeladas hasta la siembra en el gel de electroforesis, con el objetivo de frenar el proceso de oxidación que puede transcurrir durante el periodo de oscuridad. Cada muestra fue analizada por duplicado.

3.4.3.1. Cuantificación de Proteínas en Leche

Previo a la determinación de proteínas por electroforesis en gel, a través de la metodología descrita por Galindo-Amaya y col. [56], es necesario conocer el contenido total de proteínas de cada muestra, y con ello poder calcular el volumen de muestra que es necesario adicionar al gel. Para esto, se llevó a cabo la cuantificación de proteínas por el método Bradford [55]. Este se basa en el cambio de absorbancia a 595 nm de una solución ácida de Coomassie Azul brillante G 250, contenida en el reactivo de Bradford

Se realizó una curva de calibración, empleando como estándar, 2 ml de soluciones de BSA en las concentraciones: 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10; 20 y 25 μ g/ml, a cada una de las cuales se adicionó 1 ml de reactivo Bradford diluido (1/5), se incubaron 5

minutos a temperatura ambiente y se realizó la lectura espectrofotométrica. El mismo procedimiento se repitió con 2 ml de una dilución 1/1000 de cada muestra de leche. Luego, se calculó el contenido proteico de la muestra, a partir de la ecuación de la recta patrón. Todas las medidas se realizaron por duplicado.

3.4.3.2. *Electroforesis en Geles de Poliacrilamida*

Para determinar las principales proteínas de la leche, y si Bc-GA y GA poseen efecto protector frente a la oxidación fotoinducida, se realizaron ensayos de Electroforesis en Geles de Poliacrilamida (PAGE) [56], específicamente usando la modalidad PAGE-SDS. La muestra se trató con el detergente iónico SDS, el cual, desnatura las proteínas y se une fuertemente a la molécula desenrollada, enmascarando la carga intrínseca de la proteína, y generando la distribución de una carga negativa relativamente uniforme, causada por los grupos sulfatos. Cuando se aplique corriente eléctrica, todas las proteínas migrarán por el gel, hacia el ánodo. Esta electroforesis permite la separación de las proteínas principalmente de acuerdo al tamaño, debido a que las proteínas recubiertas por SDS tendrán una relación masa-carga uniforme. De esta forma, las proteínas de menor peso, migrarán más a través del gel, que aquellas de mayor peso, debido a un efecto de tamizado [57].

Para la determinación de proteínas se empleó una cuba de electroforesis Vertical (Mini-Protean III, Bio-Rad) y una fuente de poder a 200V. Se utilizaron geles de apilamiento y separación de acrilamida-bisacrilamida respectivamente, la cantidad de acrilamida será la determinante del tamaño de poros del gel y ello el tamaño de proteína que es capaz de separar. El gel de separación se realizó con un porcentaje de reticulado del 12%, logrando una resolución que permite separar proteínas de entre 15 y 60 kDa de peso molecular [58,59] rango en el que se encuentran las caseínas (20-25 kDa) y β -lactoglobulina (18 kDa) de la leche. Para la evaluación de las distintas fracciones proteicas, en las corridas se incluyó un marcador de amplio rango de peso molecular (MPM) (Thermo Scientific) (Figura 5.5), conteniendo las proteínas β -galactosidasa (116 KDa), albúmina sérica bovina (66.2 KDa), ovoalbúmina (45.0 KDa), lactato deshidrogenasa (35.0 KDa), REasa Bsp981 (25.0 KDa), β -lactoglobulina (18.4 KDa), y lisozima (14.4 KDa), que permitió la comparación con las proteínas estudiadas.

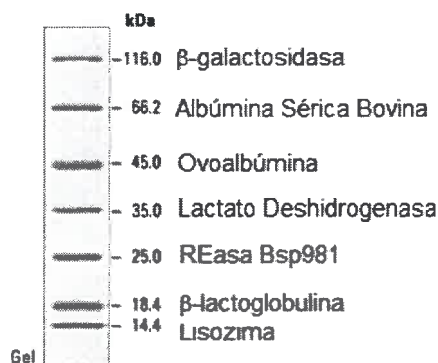


Figura 5.5. Marcador de Peso Molecular de Proteínas no teñido, Thermo Scientific.

Dicho marcador fue tratado previo a su empleo, a 95 °C durante 10 min en baño de agua, según indicación del fabricante. Luego se sembró el gel de electroforesis, colocando 10 µl del MPM en la primera calle, y 20 µl de cada muestra a analizar, conteniendo 20 µg/ml de proteínas, en las sucesivas calles.

Luego de la corrida, la visualización de las bandas proteicas se realizó mediante tinción de los geles con una solución de azul de Coomasie R-250 0,2% en metanol-ácido acético-agua, a 37 °C durante 2 h, seguido del empleo de una solución decolorante de metanol-ácido acético-agua, para desteñir el gel. Los geles obtenidos se escanearon, y las imágenes digitalizadas se analizaron mediante el Software MyImage Analysis (Thermo Scientific), a fin de cuantificar las bandas obtenidas a distintos tiempos de exposición a la luz de la leche. El programa permite medir la intensidad de color de cada una de las bandas de proteínas, determinando el área (en pixeles), y con ello se establece el porcentaje relativo de cada banda respecto de la del control.

La masa molecular de las proteínas separadas en el gel es estimada por el software, a partir de una curva de calibración construida al graficar el logaritmo de la masa molecular de las bandas del MPM (logPM), contra la movilidad relativa, Fr, (distancia recorrida a través del gel) de los mismos. Luego, son extrapolados y determinados, empleando la ecuación de la recta, los valores de peso molecular de cada una de las bandas. Es importante señalar que la relación lineal entre logPM y Fr se

mantiene para una concentración dada de poliacrilamida y sólo en un corto intervalo de peso molecular.

3.5. *Análisis Estadístico*

Los datos experimentales fueron analizados y procesados, empleando el Software Origin Pro 8, de OriginLab Corporation. Los experimentos fueron realizados por triplicados, sujetos a análisis estadísticos de varianza (ANOVA de una vía) con un nivel de confianza de $p < 0,05$, utilizando el Software Statgraphics Centurion XV.

4. **RESULTADOS**

4.1. *Fotoprotección de Riboflavina en Leche*

En la Figura 5.6, se observan los cromatogramas de RF obtenidos por HPLC con detección de fluorescencia (FLD) a λ_{ex} 453 nm y λ_{em} 580 nm, para muestras de leche con y sin adición de GA almacenadas a 4 °C, a los tiempos 0 y 60 h de iluminación.

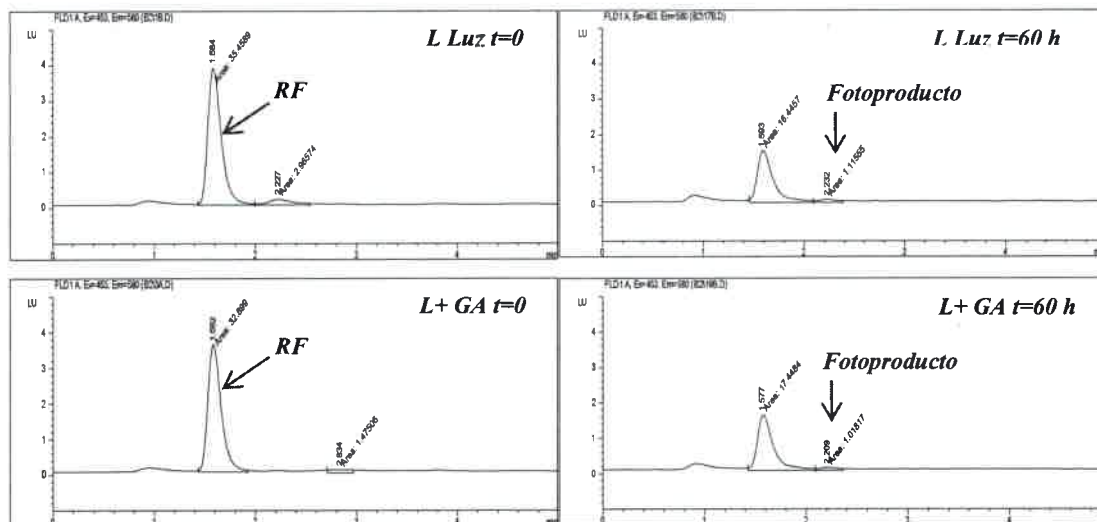


Figura 5.6. Cromatogramas de RF en leche con y sin adición de GA, almacenada a 4 °C, a las 0 y 60 h de iluminación, determinados por HPLC con detector fluorescencia (FLD) a λ_{ex} 453 nm y λ_{em} 580 nm.

En la Figura 5.7, se presentan los cromatogramas de RF obtenidos por HPLC con detector de arreglo de diodos (DAD) a 270 nm, en muestras de leche con y sin adición de Bc-GA, almacenadas a 4 °C, a las 0 y 120 h de iluminación.

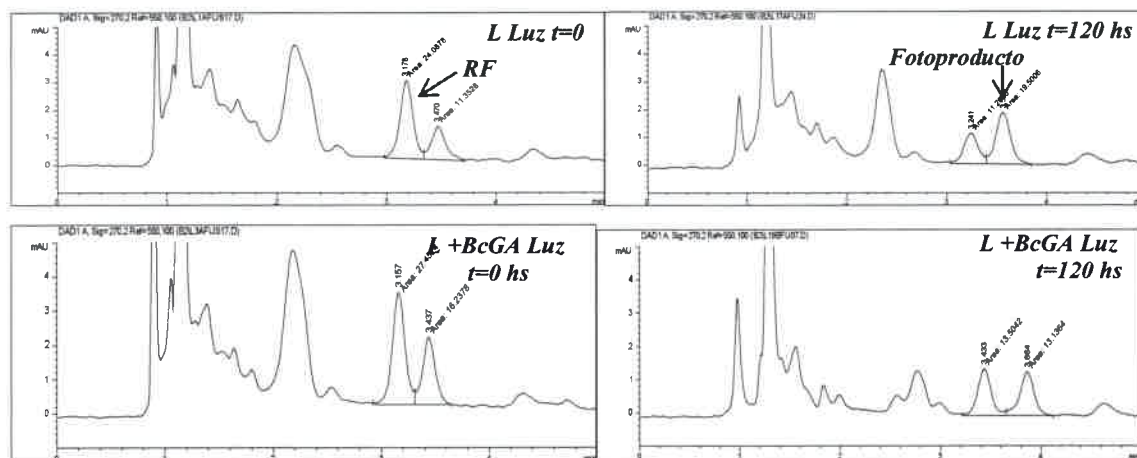


Figura 5.7. Cromatogramas que muestran el pico de RF en leche con y sin adición de Bc-GA, almacenada a 4 °C, a las 0 y 120 h de iluminación, determinado por HPLC y detector DAD a 270 nm.

Es importante aclarar, que en los cromatogramas de la Figura 5.7, los picos que están presentes antes de la RF corresponden a otros componentes de la matriz que pueden quedar retenidos en el cartucho, mientras que en la Cinética I por el método de extracción ácida, se eliminan el resto de los componentes de la muestra (Figura 5.6).

En los cromatogramas se observa la presencia de un pico adicional al de RF que podría corresponder a un fotoproducto de RF, ya que si bien está presente en muestras iniciales, se observa un incremento en su área con el tiempo de iluminación. Su presencia en muestras iniciales podría deberse a la generación durante la reconstitución de la leche.

En la figura 5.8 (A) se muestra el espectro de absorción del fotoproducto, con un máximo de absorbancia a 200 y 240 nm. Este pico fue detectado tanto, por arreglo de diodos (270 nm) como por fluorescencia (λ_{ex} 453nm; λ_{em} 580 nm), lo que indica que el mismo corresponde a un compuesto fluorescente. Estudios previos indican que en la reacción fotosensibilizada de RF, se generan productos denominados Lumicromo y

Lumiflavina, principalmente a través de un mecanismo de tipo I. Además, que estos actúan también como fotosensibilizadores, al igual que la RF [60]. Como se puede observar en la Figura 5.8 (B), el producto es formado tanto en presencia como ausencia de luz, siendo en estas últimas condiciones, menor la cantidad generada. La adición de Bc-GA reduce las áreas de los picos correspondientes al producto de fotooxidación en leche, prácticamente al mismo nivel que el que se desarrolla en ausencia de luz, demostrando un efecto protector del Bc-GA sobre la formación del mismo.

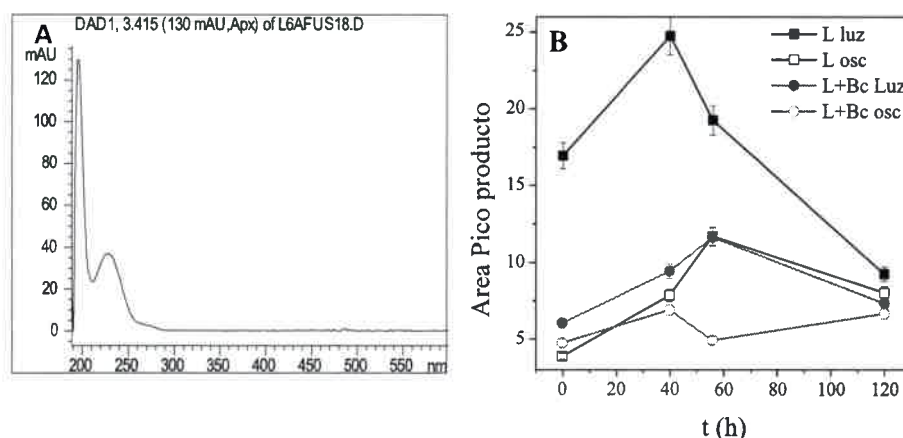


Figura 5.8. (A) Espectro de absorción del fotoproducto formado por RF durante la exposición a la luz a 4 °C, en leche. (B) Perfiles cinéticos mostrados por el área del pico fotoproducto generado en función del tiempo de iluminación, con y sin adición de Bc-GA

En la Figura 5.9, se muestran las cinéticas de degradación de RF en leche en polvo entera, reconstituida, almacenada en condiciones de iluminación (con luz fluorescente blanca ($\lambda > 350$ nm)) y oscuridad a 4 °C, durante 7 días, en presencia y ausencia de GA (A) y Bc-GA (B).

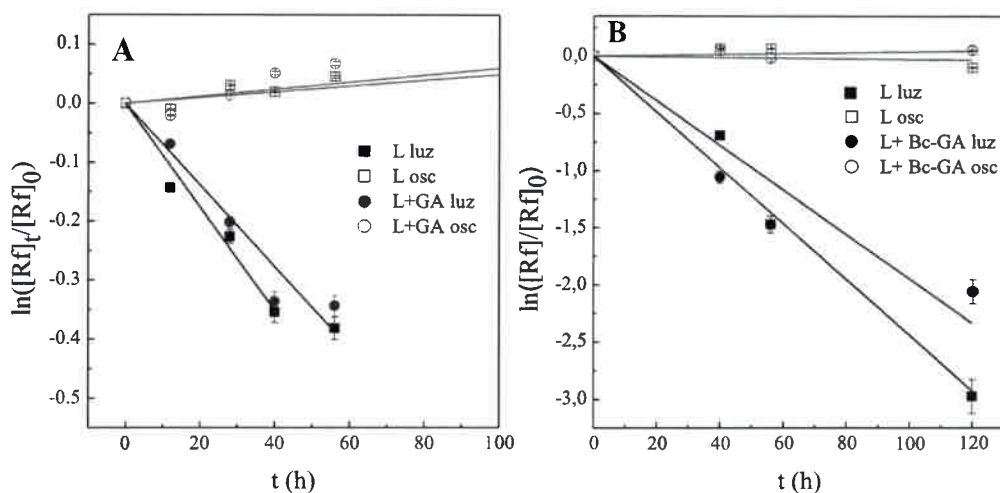


Figura 5.9. Cinéticas de primer orden de la degradación de RF en leche en polvo reconstituida almacenada a 4 °C, bajo condiciones de luz y oscuridad. (A) Con adición de GA, (B) Con adición de Bc-GA.

En ambos casos, no se observa degradación de la vitamina en condiciones de oscuridad. Mientras que bajo condiciones de iluminación, la RF fue consumida siguiendo una cinética de primer orden, según la ec. 27.

$$\ln \left[\frac{[RF]_t}{[RF]_0} \right] = -k_{obs}t \quad (27)$$

Donde $[RF]_0$ y $[RF]_t$ corresponde a las concentraciones de RF, expresadas en $\mu\text{g/ml}$, a tiempo cero y en los diferentes intervalos de tiempo de iluminación respectivamente, determinadas por HPLC. Los valores de la constante de velocidad observada de la fotodegradación de RF, k_{obs} , fue calculada de las pendientes iniciales de la cinética de primer orden con la ec. 27, Tabla 5.2.

Tabla 5.2. Constante de velocidad observada de la fotodegradación de RF (k_{obs}) en leche, con y sin GA adicionada.

Muestra	$k_{obs} \text{ (h}^{-1}) \times 10^{-2}$	$k_{obs} \text{ (h}^{-1}) \times 10^{-2}$
	GA	Bc-GA
L Luz	30 ± 5	25 ± 4
L+Microencapsulado Luz	22 ± 2	18 ± 6
L Osc	$0,3 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$

Como se puede observar, los resultados demuestran que tanto GA como Bc-GA disminuyen la velocidad de degradación de la RF inducida por la luz, indicando un efecto protector por los microencapsulados. El porcentaje de vitamina fotoprotegido, %FP, fue calculado por la ec. 28.

$$\% FP = \left(1 - \frac{k_{obs}^{Mic}}{k_{obs}} \right) \times 100 \quad (28)$$

Donde k_{obs} y k_{obs}^{Mic} , son las constantes de velocidad de primer orden para la fotodegradación de RF en leche en ausencia y presencia de microencapsulado, respectivamente.

Los resultados demuestran que la adición de GA y Bc-GA a la leche, reducen la fotodegradación de la RF en un 26% y un 30%, respectivamente.

4.1.1. Mecanismos de Fotoprotección de RF en Leche

Como ya fue presentado en el Capítulo 4, GA tiene la capacidad de desactivar el ^3RF , con una constante de velocidad aparente de $k_q^{\text{RF-GA}} = 1,6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, compitiendo con el oxígeno en condiciones aeróbicas, cuya constante de desactivación de $^3\text{RF}^*$ por $\text{O}_2(^3\Sigma_g^-)$, $k_q^{\text{RF-O}_2} = 9,8 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [48]. Esto demuestra que GA podría estar desactivando al ^3RF , aun en presencia de oxígeno, reduciendo la concentración de

EROS generadas a partir de este estado, causando una cierta protección sobre la degradación fotooxidativa de RF.

Por otra parte, como también ya fue expuesto en el Capítulo 4, tanto Bc-GA como GA son eficientes desactivadores de $O_2(^1\Delta_g)$ lo cual estaría indicando la desactivación por ambos microencapsulados, podría ejercer un efecto adicional sobre la fotoprotección de RF, siendo mayor en el caso de Bc-GA, como es de esperarse, debido a su elevada eficiencia como desactivante de $O_2(^1\Delta_g)$ [61]. Además, debe considerarse el efecto de filtro interno que podrían estar ejerciendo tanto GA como Bc-GA por la absorción de parte de la radiación emitida por la lámpara fluorescente. En la Figura 5.10, se muestran los espectros de absorción de RF en leche, y de GA y Bc-GA usados en los experimentos, así como el espectro de emisión de la lámpara fluorescente. En la misma se observa claramente que en el intervalo de emisión de la lámpara, tanto GA como Bc-GA, absorben gran parte de la radiación, ejerciendo el efecto de filtro interno mencionado.

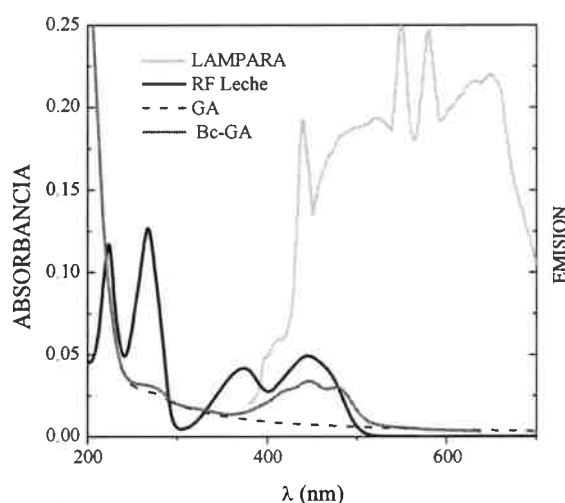


Figura 5.10. Espectros de emisión de la lámpara fluorescente y de absorción de RF, GA y Bc-GA en las concentraciones empleadas en los experimentos de fotooxidación de leche.

Existe evidencia informada anteriormente por Montenegro y col. [62], que la adición en leche descremada, de licopeno microencapsulado en una mezcla de GA-sacarosa (8:1) produjo una reducción en la fotodegradación de Vitamina A y D del 45%.

4.2. Fotoprotección de Lípidos en Leche

4.2.1. Determinación de Sustancias Reactivas con Ácido Tiobarbitúrico (TBARs)

La degradación de ácidos grasos poliinsaturados contribuye a la disminución de la vida media de los productos alimenticios, formando una gran variedad de compuestos [63]. Algunos de los efectos perjudiciales incluyen, desarrollo de off-flavours y aromas indeseables, cambios en la textura y pérdida del valor nutricional. Además, los productos de la peroxidación lipídica parecen estar directamente relacionados con el desarrollo de enfermedades como aterosclerosis, cáncer y procesos de envejecimiento [64]. Los hidroperóxidos formados al inicio de la oxidación de lípidos sufren diferentes procesos, obteniendo como producto final del proceso de peroxidación, el MDA. El MDA es mutagénico en bacterias y células mamarias, y carcinogénico en ratas y puede reaccionar con ADN para generar aductos mutagénicos.

El nivel de MDA formado puede ser determinado a través de un ensayo que se basa en la reacción producida entre una solución de TBA y los lípidos oxidados, para generar un cromógeno rosa, con un máximo de absorción a 532 nm [65]. Éste es un método simple y que, a diferencia de la técnica para determinar el valor de peróxidos (POVs), se aplica directamente sobre la muestra.

Se cuantificaron las sustancias reactivas con TBA, expresadas como mg MDA/Kg muestra de leche, con y sin adición de GA, a diferentes intervalos de tiempo de exposición a condiciones de luz y oscuridad a 4 °C durante 7 días. Figura 5.11.

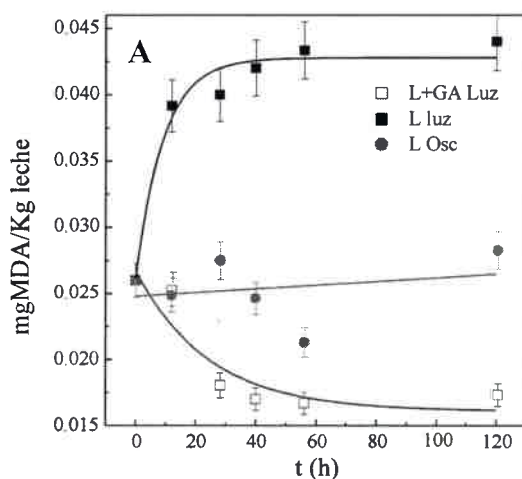


Figura 5.11. Concentración de TBARs, (mg MDA/Kg muestra) en leche con y sin adición de GA (A), a diferentes intervalos de tiempo de exposición a condiciones de luz y oscuridad a 4 °C durante 7 días.

Como se puede observar en la Figura 5.11, la formación de TBARs en leche en oscuridad fue prácticamente nula. En leche expuesta a condiciones de iluminación a 4 °C durante 120 h, sin adición de GA se observó un incremento en la concentración de los productos de oxidación TBARs. Mientras que con la adición de GA, hubo una disminución de la misma. Esto nos indica un efecto benéfico de la GA sobre la oxidación de lípidos de la leche. Para evaluar el grado de dicha acción, se determinó el porcentaje de inhibición de la formación de TBARs ($\%I_{TBARs}$), empleando la ec. 29.

$$\%I_{TBARs} = \left(\frac{TBAR_L - TBAR_{L+AOx}}{TBAR_L} \right) \times 100 \quad (29)$$

Los valores obtenidos de $\%I_{TBARs}$ indican que la GA adicionada a la leche, sometida a condiciones de iluminación, ejerce una inhibición máxima sobre la formación de TBARs aproximadamente del $60 \pm 3 \%$ a partir de las 25 h de exposición, y dicho efecto se mantiene constante a mayores tiempos de fotodegradación.

El efecto fotoprotector de GA sobre la formación de TBARs en leche puede deberse a la capacidad de inhibir la EROS, en particular HO^\bullet , el cual como se mencionó anteriormente, es uno de los principales radicales involucrados en la oxidación lipídica, actuando como iniciador. Numerosos estudios han demostrado que la aplicación de GA está relacionada con una disminución del estrés oxidativo, lo que estaría sustentado principalmente por su capacidad de desactivar EROS [48,66].

4.2.2. Determinación del Número de Peróxidos en Lípidos

La oxidación lipídica causa pérdida de calidad del alimento durante la elaboración y almacenamiento del mismo. En la peroxidación de ácidos grasos insaturados, los hidroperóxidos son formados durante la etapa de propagación, y pueden ser empleados como un indicador de la extensión de la oxidación de lípidos, grasas y aceites, indicando oxidación primaria en dicho alimento. Existen diferentes técnicas para determinar el número de peróxidos (POVs) en leche, muy sencillas, con la desventaja de ser requerida la extracción de la fase lipídica de la muestra.

En este ensayo se determinó el número de peróxidos producidos en leche por fotosensibilización, y el efecto de inhibición de su formación en presencia de GA. A

través de mediciones espectrofotométricas, se determinó el número de peróxidos, expresados como Meq de peróxido/Kg lípido, en leche con y sin adición de GA, almacenada a 4 °C durante 7 días, bajo condiciones de luz y oscuridad, Figura 5.12 (A). El tratamiento de leche con adición de GA mantenido al resguardo de la luz a 4 °C (L+GA Osc), fue realizado con el objetivo de determinar si existía un efecto térmico en la formación de POVs durante el ensayo (datos no mostrados). Se pudo comprobar que en la formación de POVs, no está involucrada la temperatura y su desarrollo, se debe principalmente a la fotoinducción. Se empleó como control en oscuridad, la leche sin adición de GA.

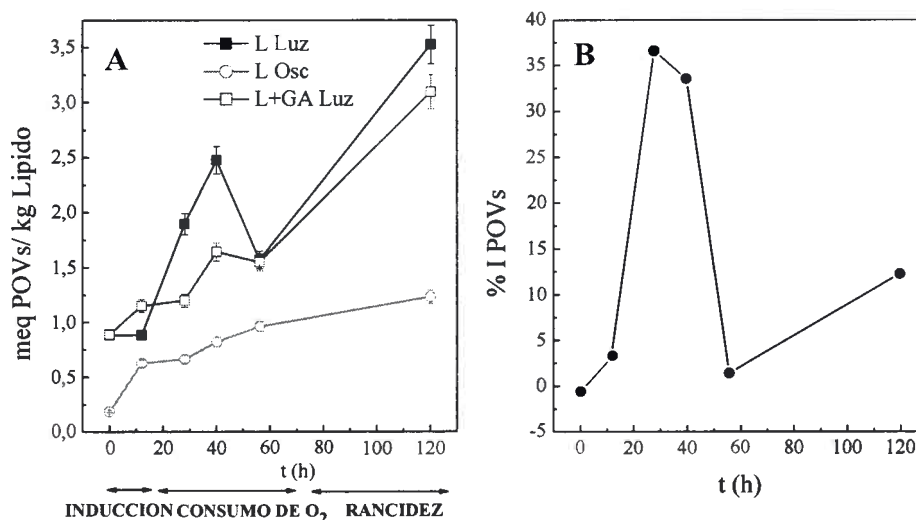


Figura 5.12. (A) Número de peróxidos, expresados como meq de POVs/Kg lípido, extraídos de leche con y sin adición de GA, almacenada a 4 °C durante 7 días, bajo condiciones de luz y oscuridad. (B) Porcentaje de inhibición de formación de POVs en lípidos extraído de leche con GA adicionada, respecto de leche sin adición, en condiciones de iluminación.

En la Figura 5.12 (A), se puede observar que la formación de peróxidos transcurre básicamente por tres etapas. Siendo la primera una inducción, con formación de los radicales iniciadores. Seguido de un consumo bimolecular de O₂, observándose la máxima formación de POVs durante esta etapa de propagación. Se observa claramente una reducción en la formación de peróxidos en la fracción lipídica obtenida de leche en presencia de GA. Inmediatamente posterior, se produce una marcada disminución del número de POVs, lo que es justificado por la inestabilidad y rápida degradación de los

hidroperóxidos primarios formados el segundo estadio de oxidación, para dar origen a una amplia variedad de productos de oxidación secundarios, indicando el comienzo de la rancidez oxidativa.

Debido al efecto en la disminución de formación de POV que se observa en la Figura 12 por adición de GA, se calculó el porcentaje de inhibición de la formación de peróxidos en lípidos de leche con GA (% IPOVs GA), en función POVs formados en lípidos de leche sin adición de GA, a cada intervalo de exposición a la luz, según la (ec. 30), Figura 5.12 B.

$$\% I_{POVs} = \left(\frac{POV_L - POV_{L+AOx}}{POV_L} \right) \times 100 \quad (30)$$

Donde POV_L es la concentración de peróxidos, expresados como meq de O_2/Kg lípido, formados en leche sin GA durante exposición a iluminación a $4^\circ C$ por 7 días, y POV_{L+GA} es la concentración de peróxidos, expresados como meq de O_2/Kg lípido, formados en leche con GA durante exposición a iluminación a $4^\circ C$ por 7 días.

En dicha figura, se observa claramente un máximo efecto de inhibición de la peroxidación lipídica por la GA, entre las 20 y 40 h de iluminación de la leche, de alrededor del $35 \pm 1,75\%$.

Como se ha mencionado anteriormente, el biopolímero GA por su composición aminoacídica, tiene la capacidad de desactivar especies radicalarias oxidantes. Además la desactivación del $O_2(^1\Delta_g)$ comprobada del β -caroteno, y los resultados obtenidos sobre dicha capacidad por acción de la GA en estudios anteriores, evitarían la fotooxidación de lípidos mediada por un mecanismo Tipo I.

4.2.3. Determinación de Ácidos Grasos Total de Leche

La oxidación lipídica influye sobre la calidad de los productos lácteos a través del deterioro del flavor, y la reducción en el valor nutritivo. Dicha oxidación en leche, es altamente influenciada por los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFA-LC), que son particularmente más susceptibles a oxidación, dando origen al desarrollo de off-flavor [22]. Sin embargo, a pesar de su susceptibilidad, éstos son de gran

importancia ya que se ha demostrado que confieren efectos benéficos para la salud. Ácido docosahexaenoico (C22:6n – 3, DHA) sólo, o en combinación con ácido eicosapentanoico (C20:5n – 3, EPA), reducen los niveles de triacilgliceroles (TAG) en plasma, en pacientes con enfermedades coronarias [67]. Hellan y col. [68], informaron que la ingesta materna de DHA y ácido araquidónico (C20:4n – 6, ARA) durante el embarazo y lactancia, serían benéficos para el desarrollo mental del niño.

Es importante conocer el perfil de ácidos grasos (AG) de la leche, tanto por su posterior procesamiento, como por la salud humana. La composición de AG de leche es altamente saturada [69], lo que implica un creciente riesgo en enfermedades del corazón. Se conoce que los AG n – 3 ayudan a prevenir enfermedades cardíacas coronaria, aunque en la leche, éstos se encuentran presentes en una proporción menor al 1% de los AG total [70].

En el presente trabajo el perfil de AG de la leche, fue determinado en leche con y sin adición de GA, a las 0 y 120 h de iluminación a 4 °C. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.3, expresados como porcentaje de AG y desviación estándar (AG ± DS) %. Cabe destacar que en la tabla se muestran los AG de mayor importancia, mientras que las sumatorias contienen todos los AG identificados en los cromatogramas de las muestras de leche analizadas.

Tabla 5.3. Composición de ácidos grasos de leche en polvo entera, con y sin adición de GA, expuesta a 0 y 120 hs de iluminación.

AG	t=0 hs Ilum.	t=120 hs Iluminación			
	L t=0	L Luz	L Osc	L+GA Luz	L+GA Osc
C4:0	5,72 ± 0,01	6,65 ± 0,08	6,74 ± 0,14	6,11 ± 0,18	6,23 ± 0,24
C5:0	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00
C6:0	2,69 ± 0,02	3,15 ± 0,03	3,17 ± 0,04	2,76 ± 0,07	2,80 ± 0,07
C7:0	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,00
C8:0	1,35 ± 0,02	1,56 ± 0,01	1,58 ± 0,08	1,34 ± 0,06	1,36 ± 0,05
C10:0	2,98 ± 0,05	3,23 ± 0,03	3,24 ± 0,11	2,93 ± 0,04	2,90 ± 0,07
C11:0	0,28 ± 0,00	0,32 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,28 ± 0,00

C12:0	3,79 ± 0,06	3,93 ± 0,02	3,91 ± 0,05	3,73 ± 0,03	3,71 ± 0,02
C13:0	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,00
C14:0	11,21 ± 0,27	11,09 ± 0,01	11,03 ± 0,06	11,02 ± 0,06	10,98 ± 0,01
C15:0	1,01 ± 0,03	0,98 ± 0,01	0,99 ± 0,01	0,95 ± 0,02	0,96 ± 0,03
C16:0	28,43 ± 0,74	27,54 ± 0,10	27,46 ± 0,23	28,07 ± 0,03	27,90 ± 0,22
C17:0	0,48 ± 0,00	0,48 ± 0,00	0,47 ± 0,01	0,46 ± 0,02	0,46 ± 0,02
C18:0	10,35 ± 0,23	10,02 ± 0,05	10,02 ± 0,11	10,29 ± 0,09	10,22 ± 0,20
C20:0	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,00	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,00
C22:0	0,04 ± 0,03	0,07 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01
C24:0	0,06 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,00
Σ SFA^a	68,64 ± 0,09	69.31 ± 0,02	69.30 ± 0,05	68.28 ± 0,04	68.17 ± 0,06
C14:1	1,03 ± 0,02	1.03 ± 0.02	1.04 ± 0.01	1.03 ± 0.00	1.03 ± 0.02
C16:1 n-7	1,46 ± 0,02	1.72 ± 0.01	1.71 ± 0.03	1.75 ± 0.02	1.75 ± 0.00
C18:1 n-9	23,20 ± 0,23	22.46 ± 0.11	22.47 ± 0.29	23.26 ± 0.26	23.27 ± 0.04
C19:1	0,09 ± 0,00	0.11 ± 0.03	0.11 ± 0.03	0.09 ± 0.00	0.08 ± 0.01
C20:1	0,59 ± 0,01	0.57 ± 0.00	0.57 ± 0.00	0.58 ± 0.01	0.59 ± 0.00
Σ MUFA^b	25,71 ± 0,056	25.77 ± 0,034	25.83 ± 0,072	26.59 ± 0,058	26.61 ± 0,014
C18:2	3.14 ± 0.03	2.94 ± 0.02	2.87 ± 0.01	3.13 ± 0.02	3.19 ± 0.01
C18:3 n-6	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.00
C18:3 n-3	0.09 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.09 ± 0.00	0.09 ± 0.00	0.09 ± 0.00
C20:3 n-6	0.06 ± 0.01	0.08 ± 0.00	0.08 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01
C20:3 n-3	0.08 ± 0.02	0.10 ± 0.00	0.11 ± 0.00	0.09 ± 0.00	0.10 ± 0.01
C22:2	0.55 ± 0.72	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00
C20:5 (EPA)	0.06 ± 0.02	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.01
C22:5	0.10 ± 0.09	0.14 ± 0.00	0.16 ± 0.00	0.14 ± 0.00	0.15 ± 0.00
C22:6(DHA)	0.09 ± 0.10	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.03	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01
Σ PUFA^c	4.45 ± 0,11	4.19 ± 0,007	4.14 ± 0,006	4.37 ± 0,006	4.46 ± 0,006

^a SFA, ácidos grasos saturados, ^b MUFA, ácidos grasos monoinsaturados, ^c PUFA, ácidos grasos poliinsaturados.

Han sido identificados 46 AG de la fracción lipídica de leche. Como se observa en la Tabla 5.3, la mayor proporción corresponde a AG saturados (SFA), siendo el más

abundante el ácido palmítico, C16:0, con un porcentaje de 27,5-28,5%, seguido del mirístico, C14:0 (10,98-11,2 %), esteárico C18:0 (10,02-10,35 %), y butírico C4:0 (5,7-6,74 %), entre otros. Estos resultados concuerdan con Guler y col. [71], en el estudio sobre el contenido de ácidos grasos en leche de Turquía, en el cual determinaron que el contenido de SFA (59,4-61,4%) fue mayor que el de AG monoinsaturados (MUFA) y PUFA. En cuanto a los MUFA, éstos se encuentran en una proporción entre 25,7 % y 26,6%, siendo el ácido oleico C18:1n – 9 el de mayor abundancia. Resultados similares fueron presentados por Prandini y col. [72], con un contenido de MUFA de 21.61% en leche fermentada, y ácido oleico como el más abundante.

Por otra parte, los PUFA representan el menor porcentaje de AG en leche, de aproximadamente ~4,5%, en el que se destaca ácido linoleico C18:2. Estos resultados también son coincidentes con Guler y col. [71], sin embargo los valores de PUFA informados (3.14- 3.19%), son menores a los obtenidos en el presente trabajo. Debido al mayor contenido de dobles enlaces de los PUFAs, son más susceptibles al ataque por los radicales libres, y por ende, a su oxidación. Esto concuerda con la oxidación que sufre el ácido DHA de leche almacenada 7 días a 4 °C respecto del tiempo 0, demostrando una disminución de 0,09% (L t=0) a 0,03% (L t=120), tanto en luz como en oscuridad, lo que indica que ocurre un proceso oxidativo, no inducido por luz. En cuanto al resto de los PUFAs, se encuentran en muy baja proporción y prácticamente no varían en los distintos tratamientos.

A diferencia de lo esperado, la oxidación fotoinducida posterior a la exposición de 120 h de luz fluorescente, no genera grandes modificaciones en la composición de AG total de leche, excepto puntualmente para C18:2n – 6, que se ve reducido de 3,14% a 2,94% en L luz, de 3,14% a 2,87% en L Osc, mientras que dicho AG no disminuyó en leche con adición de GA, almacenada bajo iluminación o en oscuridad, posterior a 120 hs de almacenamiento. También se observó una leve disminución en el contenido de ácido oleico C18:1n – 9, que va desde 23,2% a 22,46% por exposición a 120 h de luz, mientras que en las muestras de leche con adición de GA, permaneció constante, en un valor alrededor de ~23,27%. En ambos casos, GA estaría ejerciendo un pequeño efecto protector, que podría deberse la capacidad de desactivar EROS y el ³RF, que ha sido previamente demostrado en el Capítulo 4. Los resultados obtenidos, concuerdan con lo informado por Chávez-Servín y col. [73], donde observaron escasos cambios en AG de

fórmulas infantiles comerciales a base de leche, durante el almacenamiento a 25 °C a los 70 días posterior a la apertura del envase, aunque sí determinaron pérdidas significativas en, particular en C18:2n – 6 y C18:3n – 3, en algunas de las fórmulas estudiadas. Estos resultados confirman que no es la oxidación de lípidos y ácidos grasos la principal consecuencia del deterioro oxidativo de alimentos, sino que serían otros los componentes alimenticios que son más sensibles y propensos a sufrir oxidaciones, tales como las proteínas y las vitaminas.

4.2.4. *Determinación de Compuestos Volátiles en Leche*

El deterioro de las propiedades sensoriales de los alimentos, es comúnmente percibido, siendo una de las mayores causas de quejas de los consumidores. La aparición de off-flavour resulta principalmente de la degradación de productos de oxidación primarios, tales como hidroperóxidos, los cuales pueden rápidamente isomerizar y ser degradados para producir compuestos volátiles responsables del deterioro de las propiedades sensoriales.

En productos lácteos, los off-flavors pueden desarrollarse por contaminación microbiana, materiales de envase, reacciones químicas de oxidación de lípidos o aminoácidos, o por factores como temperatura de almacenamiento y exposición a la luz [74]. La luz es uno de los más importantes factores, que causa deterioro del valor nutricional y la calidad sensorial de los productos lácteos, disminuyendo la aceptabilidad del consumidor [75]. Está estrechamente relacionado, con procesos de fotosensibilización, como fue anteriormente expuesto. La radiación luminosa genera dos tipos de off-flavors en leche. Uno de ellos es a “luz o luz solar”, dando sabor a quemado y aroma a oxidado, por exposición a iluminación durante 2 o 3 días. El desarrollo de sulfuro de dimetilo y metional, deriva de la oxidación de aminoácidos conteniendo azufre, tal como la metionina, y son responsables de éste tipo de flavor. El otro off-flavors fotoinducido es “tipo cartón o metálico”, se desarrolla en leche con exposición prolongada a la luz, generando productos de oxidación como hexanal, pentanal, cetonas, alcoholes, e hidrocarburos, a causa de la oxidación secundaria de lípidos [76-78]. El desarrollo de flavor foto-inducido, depende de la longitud de onda y la intensidad de la luz, tiempo de exposición, temperatura del producto, y las propiedades de transmisión de la luz del contenedor.

Los ácidos grasos de cadena corta y mediana (C_4 a C_{12}) son responsables del desarrollo de ciertos sabores, tales como jabón, rancidez, astringencia. Además, estos ácidos grasos son precursores de reacciones de oxidación, generando aldehídos y cetonas, que son los responsables de sabores desagradables en la leche en polvo [79]. Al menos 400 compuestos volátiles, fueron informados en leche, entre ellos, ácidos, cetonas, lactonas, compuestos conteniendo -N (piridazinas), compuestos sulfurados, carbonilos, alcoholes, ésteres, e hidrocarburos alifáticos y aromáticos.

Diferentes técnicas modernas son empleadas para el aislamiento y concentración de compuestos activos del aroma, desde la fracción volátil de leche y productos lácteos, previo a su análisis por CG-MS, tales como: destilación en vacío, destilación de vapor y extracción simultánea, espacio de cabeza estático, espacio de cabeza dinámico, entre otros [80].

Para determinar los componentes volátiles presentes y fotoinducidos en leche durante su almacenamiento a 4 °C, con y sin adición de GA y Bc-GA, se empleó la técnica de SPME seguida del análisis por CG-MS [81]. En la determinación de los compuestos volátiles presentes en leche entera durante el almacenamiento en las condiciones antes mencionadas, con y sin adición de GA y Bc-GA, una gran variedad de volátiles fueron detectados, incluyendo entre ellos hidrocarburos, aldehídos, cetonas y alcoholes. En la Tabla 5.4, se informa el contenido porcentual de los compuestos volátiles detectados en muestras de leche, con y sin la adición de GA, a un tiempo de 0 y 120 h de exposición a la luz.

Debido a que no se pudo emplear un estándar interno, el contenido de volátiles se informan como un porcentaje de cada compuesto, respecto del total de volátiles en cada muestra, que será tomado como el 100%.

Tabla 5.4. Compuestos volátiles (%) determinados en leche, con y sin adición de GA, almacenada a 4 °C, en condiciones de luz (0 y 120 h) y en oscuridad.

COMPUESTO	t0	t5= 120 hs Iluminación		
	L	L Luz	L Osc	L+GA Luz
2,4-dimetilhexano	0.00	1.93	0.00	2.35
Acetona	9.19	3.74	8.77	2.80
2-Butanona	0.00	0.51	1.37	0.50
3-metil-Butanal,	0.00	0.24	0.00	0.00
2-Pentanona	10.34	2.00	5.57	1.69
Pentanal	13.59	18.46	18.87	15.75
Dimetil disulfuro	0.00	0.59	0.00	0.62
Hexanal	7.95	24.82	12.17	28.33
2-Heptanona	39.31	17.89	33.26	11.90
Heptanal	2.69	5.12	2.96	5.75
1-Pentanol	3.71	4.12	5.06	3.75
2-Propanona	1.93	0.00	0.00	0.00
2-Hexenal	0.00	1.23	0.00	1.05
Octanal	0.00	2.76	0.00	2.35
1-Octen-3-ona	0.00	0.87	1.17	0.91
(Z)-2-Heptenal	0.00	11.62	3.51	10.22
2,3-Octanediona	0.00	1.79	1.79	2.08
1-Hexanol	0.00	0.74	0.00	0.86
2-Nonanona	10.01	0.00	5.49	1.49
Nonanal	0.00	0.00	0.00	1.23
1-Butanol- 2-metil	1.29	0.72	0.00	0.00
1-octen-3-ol	0.00	0.00	0.00	3.78
2-etil-1-Hexanol	0.00	0.00	0.00	0.00
Benzaldehído	0.00	0.00	0.00	0.00
2,3-dimetilpentanal	0.00	0.87	0.00	0.00
3-Octen-2-ona	0.00	0.00	0.00	1.15
(E)-2-Octenal	0.00	0.00	0.00	1.44
2,2-dimetilhexanal	0.00	0.00	0.00	0.00
Volátiles Total (%)	100.00	100.00	100.00	100.00

Como se observa en la Tabla 5.4, los compuestos volátiles producidos en leche entera en polvo, almacenada a 4 °C sin exposición a iluminación (L t=0) fueron 10, y corresponden a hidrocarburos, cetonas, aldehídos, alcohol, compuestos sulfurados.

Estos resultados concuerdan en parte, con el estudio realizado por Karatapanis y col. [82], que informan la formación de volátiles en leche fresca, pasteurizada en función del tiempo de almacenamiento y material de embalaje. En dicha muestra, almacenada el día 0 a 4 °C en envase de vidrio claro, coincidieron en la detección de los siguientes compuestos volátiles: acetona, 2-butanona, 2-pentanona, pentanal, y hexanal. Un perfil de volátiles similar al detectado en este estudio, ha sido determinado en leche de vaca reducida en grasa, al día 0 de almacenamiento por Marsili y Miller [80]. Los resultados del presente trabajo también concuerdan con los informados por Kim y Morr [83], que monitorearon compuestos volátiles a través del espacio de cabeza dinámico, de leche comercial fluida almacenada en tubos de ensayo pirex, expuestos a luz fluorescente.

Posteriormente, a las 120 h de exposición a luz fluorescente, se produjo una modificación en el perfil de volátiles, en las muestras de L Luz y L+GA Luz (Tabla 5.4). Fueron detectados adicionalmente los compuestos: dimetil disulfuro, 1-hexanol, 2-heptenal, 2,3-octadiona, octanal, y nonanal. Estos resultados concuerdan con Karatapanis y col. [82] en las muestras de leche a los 7 días de almacenamiento.

De los compuestos volátiles detectados, los aldehídos de cadena recta (hexanal, heptanal, octanal y nonanal) han sido informados como los más importantes volátiles de oxidación lipídica [84]. Hexanal, 1-octen-3-ol, 3-octen-2-ona y pentanal, han sido identificados como constituyentes del flavor, resultante de la oxidación de ácido linoleico, que es el principal PUFA en leche en polvo [85,86]. De hecho, numerosos trabajos informan que hexanal y pentanal son volátiles, productos de oxidación de PUFA $n - 6$ y propanal de PUFA $n - 3$ [87-90]. Los aldehídos ramificados, que provienen de la degradación de Strecker, tal como 2 y 3-metilbutanal, resultan de la degradación de leucina e isoleucina en la reacción de Maillard, aunque investigación previa sugiere que su formación también está influenciada por la oxidación lipídica [84,91]. Todos éstos compuestos antes mencionados, junto con 2-heptanona y dimetil sulfuro, han sido previamente determinados, documentados en leche en polvo, y asociados con flavor a pintura y a hierba [92-94].

De todos los compuestos volátiles generados en leche, hexanal, pentanal, heptanal, y dimetil disulfuro fueron seleccionados para monitorear la cinética de oxidación. Estos generalmente, son utilizados como indicadores para la oxidación lipídica avanzada [95].

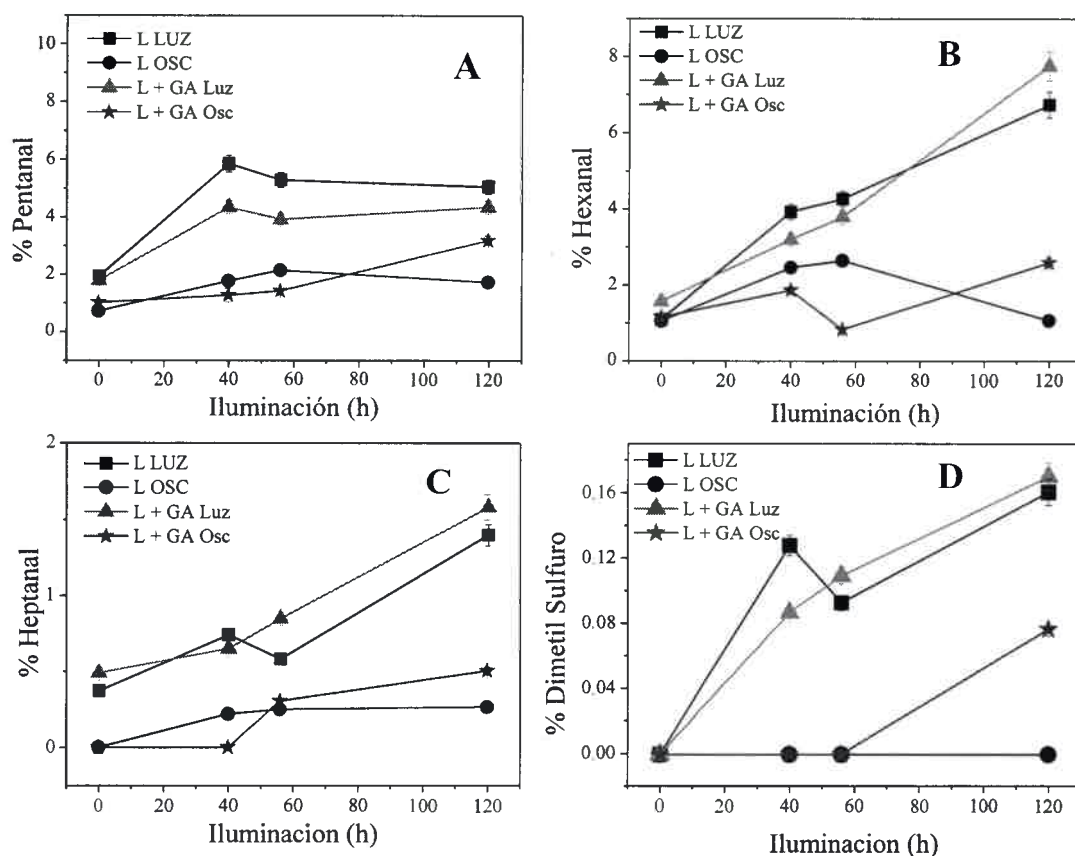


Figura 5.13. Cinética de formación de volátiles (%) de, (A) pentanal, (B) hexanal, (C) heptanal, (D) dimetil disulfuro, producidos en leche con y sin adición de GA, expuesta a luz y oscuridad, durante 7 días a 4 °C.

Como se observa en la Figura 5.13, en todos los casos, el control en oscuridad prácticamente no presenta formación de volátiles, comparado a los tratamientos expuestos a la luz, esto indica que está involucrado un proceso de oxidación fotoinducido. De las muestras expuestas a iluminación, se observó un efecto protector de GA, principalmente en la formación de pentanal (Figura 5.13 A), con un porcentaje de inhibición próximo al 25% en la formación del mismo (calculado de acuerdo a la ec. 26) en todo el intervalo de tiempo analizado, respecto L Luz. En cuanto a la formación de los demás volátiles, se observan inhibición hasta aproximadamente las 40 h de iluminación, siendo levemente mayor el % de volátiles en L+GA a tiempos mayores de exposición a la luz, es decir, no hay inhibición (NI). En la tabla 5.5 se muestran los % I de formación de volátiles por la adición de GA, respecto de L Luz.

Los resultados obtenidos de la formación de dimetil disulfuro (Figura 5.13 D), confirman que dimetil disulfuro es producto tanto de exposición a luz, como un

metabolito de desarrollo microbiano [81]. El flavor de productos lácteos es influenciado por los compuestos volátiles azufrados. La exposición a iluminación, el calentamiento de leche empleado para eliminar bacterias patógenas e inactivar enzimas, son factores que generan nuevos compuestos volátiles que contienen compuestos sulfuro, modificando el sabor de la leche y afectando la aceptabilidad del consumidor. Numerosos trabajos han demostrado, que RF cataliza la ruptura de metionina a 3-metiltiopropional, y con exposición continuada de luz, compuestos como: metanetiol, sulfuros y dimetil disulfuro, son formados [96,97].

Al igual que para GA, se estudió la cinética de formación de volátiles indicadores de oxidación lipídica, y el efecto que causa la adición de Bc-GA en leche, expuesta a iluminación.

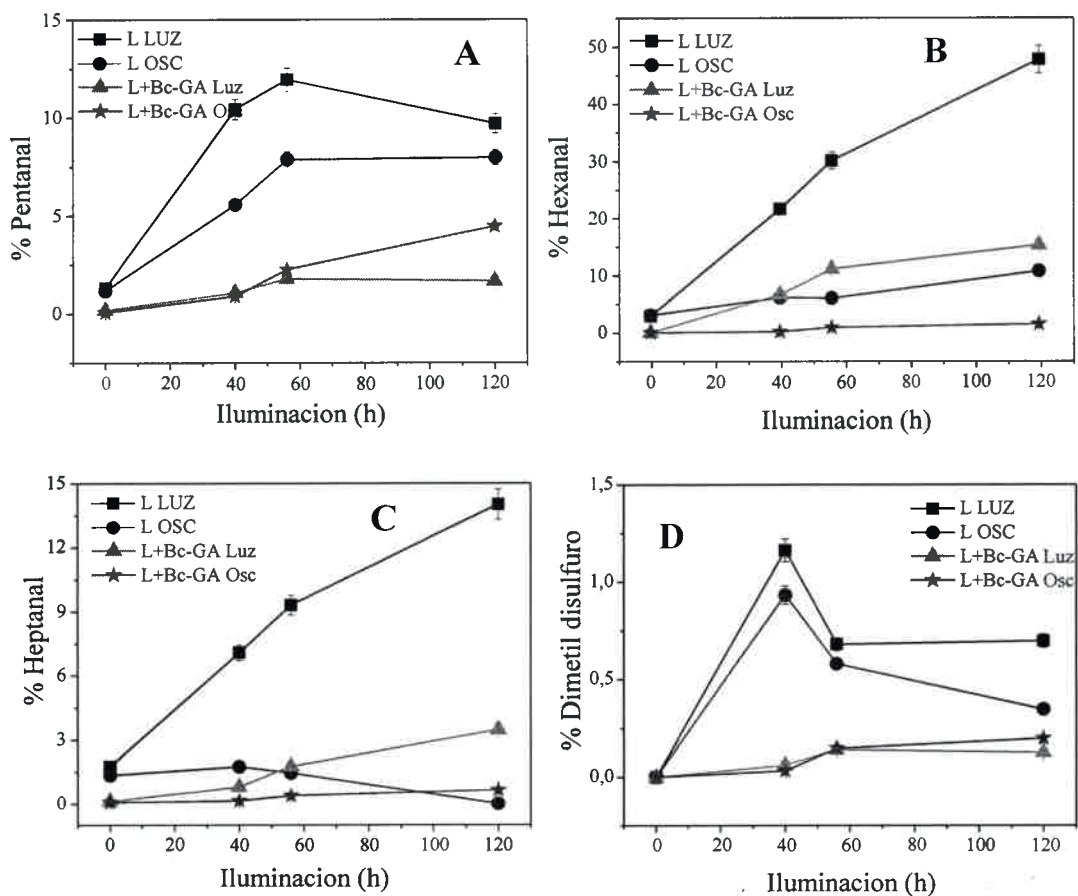


Figura 5.14. Cinética de formación de volátiles (%) de (A) pentanal, (B) hexanal, (C) heptanal, (D) dimetil disulfuro, producidos en leche con y sin adición de Bc-GA, expuesta a luz y oscuridad, durante 7 días a 4 °C.

La Figura 5.14 (A), muestra que la evolución en la formación de pentanal en L luz, es significativamente mayor a la de L+Bc-GA Luz, demostrando un efecto protector del microencapsulado frente a la fotooxidación, en todo el período de iluminación. En el caso de hexanal (Figura 5.14 B), se observa un pronunciado aumento en la concentración del mismo con el tiempo de iluminación, llegando prácticamente a constituir el 50% de los volátiles en L Luz. La adición de Bc-GA demuestra claramente una reducción en la aparición de tal compuesto. Lo mismo ocurre en la aparición de heptanal (Figura 5.14 C), aunque con porcentajes menores. Frente a dimetil disulfuro (Figura 5.14 D), se observó un máximo de generación a las 40 h de exposición a iluminación, tanto para L Luz como L Osc, sin embargo, los porcentajes se vieron reducidos de manera significativa con la adición de Bc-GA. Como se observa en la Figura 5.14, al igual que en la cinética 1, en todos los casos el control en oscuridad (L Osc y L+Bc-GA Osc) prácticamente no presenta formación de volátiles, comparado a los tratamientos expuestos a iluminación de lámpara fluorescente.

Estos resultados demuestran una importante actividad fotoprotectora del microencapsulado Bc-GA. Para corroborarlo, se determinó el porcentaje de inhibición en los volátiles por la adición de Bc-GA, respecto de L Luz, (Tabla 5.5).

Los porcentajes de inhibición de los volátiles (% I) por la adición de GA y Bc-GA, a los distintos tiempos de exposición a iluminación, fueron calculados empleando la ecuación 26, se muestran en la Tabla 5.5.

Tabla 5.5. Porcentaje de Inhibición de volátiles generados, a las diferentes horas de almacenamiento expuesto a luz fluorescente a 4 °C, por la adición de GA y Bc-GA, respecto de L Luz.

COMPUESTO	Tiempo (h)	% I GA	%I Bc-GA
Hexanal	40	18,4	87,3
	60	NI	75,9
	120	NI	76,1
Heptanal	40	12,1	88,5
	60	NI	81
	120	NI	83
Pentanal	40	25,9	94,8
	60	NI	85
	120	14,1	82,8

El efecto protector de GA se puede deber a la capacidad de desactivar el estado triplete excitado de $^3\text{RF}^*$, el $\text{O}_2(^1\Delta_g)$, y la AAR frente a otras EROS como es el OH^\bullet , lo que reduce el ataque de dichas especies oxidantes a los altamente electrofilicos AG insaturados, y en consecuencia, se reduce la formación de volátiles causantes de off-flavor en la leche.

Los resultados de la adición de Bc-GA, arrojan un % I de volátiles que oscila entre 87 y 95%, lo que demuestra que el microencapsulado ejerce un importante efecto fotoprotector sobre la generación de volátiles, estimulado por la luz. Dicho efecto puede deberse, además de la AAO aportada por el material de pared, a la capacidad de BC de desactivar el $\text{O}_2(^1\Delta_g)$, y otras EROS, evitando la posterior oxidación.

4.3. Oxidación de Proteínas Fotoinducida

La fracción proteica representa aproximadamente el 3-3,2% de la composición de la leche. Éstas se pueden clasificar en dos grandes grupos, aquellas que precipitan a pH 4,6, denominadas caseínas y las proteínas del suero (Tabla 5.6). Las caseínas constituyen el 75-80% de las proteínas totales en leche, y por su composición, son consideradas un grupo de fosfo-glicoproteínas [98,99]. La caseína no es una proteína globular, sino que se asocia extensamente y se encuentra en la leche en forma de grandes agregados llamados micelas, de entre 30 a 300 nm de diámetro, que contienen fosfato cálcico coloidal. Las caseínas son proteínas termo-estable, resistiendo a la coagulación cuando es sometida a alto tratamiento térmico [100].

Las proteínas del suero, representan entre 18-20% de las proteínas totales de la leche. En esta fracción se encuentran cuatro proteínas mayores: β -lactoglobulina (β -Lg), α -lactoalbúmina (α -La), albúmina sérica (BSA), e inmunoglobulina (Ig). Estas proteínas representan el 50%, 20%, 10% y 10% de las proteínas del suero, respectivamente. Además de dichos componentes mayoritarios, la fracción del suero contiene proteínas minoritarias como son, proteosa-peptona, lactoferrina, transferrina, proteínas de unión a vitaminas, y alrededor de seis enzimas indígenas. Todas ellas, excepto las proteasas-peptona son proteínas globulares termo-lábiles. Cuando las proteínas de suero son expuestas a altas temperatura (mayores a 65 °C), se produce su desnaturalización irreversible y posterior coagulación [101].

Tabla 5.6. Clasificación y composición de las proteínas de la leche [102]

Proteínas	g/Kg de leche	Masa molar (KDa)
Caseína	26	
Caseína α s1	10	23,6
Caseína α s2	2,6	25,2
Caseína β	9,3	23,9
Caseína κ	3,3	19,6
Caseína γ	0,8	20,5
Proteínas del suero	6,3	
β lactoglobulina	3,2	18,3
α -lactoalbúmina	1,2	14,2
Albúmina sérica	0,4	66,3
Proteasa peptona	0,8	4,0-40,0
Inmunoglobulinas	0,8	-
Ig G1-Ig G2	0,65	150
Ig A	0,14	385,7
Ig M	0,05	900
Proteínas minoritarias del suero	0,8	
Lactoferrina	0,1	86
Transferrina	0,1	76
Proteínas de membrana	0,6	s/d
Enzimas	<0,01	s/d

Tradicionalmente, la investigación se ha enfocado principalmente en los productos de oxidación de lípidos, debido a su alto impacto sobre off-flavor de los productos lácteos. Sin embargo, durante los últimos años, se intensificó la atención en la oxidación de proteínas, a causa del off-flavor producido por la oxidación de aminoácidos específicos [103]. Uno de ellos es el aminoácido Metionina, que a través del mecanismo de fotosensibilización por RF, que causa la formación de 3-metil-tiopropional [104,105]. Otro aspecto de alta relevancia para la industria láctea, es el posible efecto de la oxidación de proteínas sobre los procesos enzimáticos esenciales durante procesos lácteos, tales como fermentaciones y maduración de queso.

La oxidación de proteínas en leche puede ser iniciada por diferentes vías: enzimáticamente (ej. sistema lactoperoxidasa) [106], por acción de la luz [107], o por metales de transición, que en presencia de ácido ascórbico, causan oxidación a través de la reacción de Fenton [108].

Las proteínas son el mayor blanco de fotooxidación, debido a su alta abundancia, a la presencia de cromóforos endógenos en su propia estructura proteica (aminoácidos en la cadena lateral y grupos prostéticos unidos, tales como flavinas, grupos hemo, etc.), a la capacidad de unión de cromóforos exógenos, y su alta velocidad de reacción con otras especies en estado excitado. La fotooxidación de proteínas puede ocurrir a través de dos vías principales [109,110]. La primera es por absorción directa de radiación UVB (280-320 nm), y en menor medida UVA (320-400 nm), por la estructura proteica (cadenas laterales primarias, con residuos de aminoácidos, como triptófano (Trp), tirosina (Tir), fenilalanina (Fea), histidina (His), metionina (Met), cisteína (Cis), y puentes disulfuro de cistina), o cromóforos exógenos unidos, llevando a la generación de especies en estado excitado (singulete o triplete). La segunda vía, involucra la oxidación indirecta de proteínas por acción de $O_2(^1\Delta_g)$, generado por un mecanismo de fotosensibilización, a través de la absorción de luz UV y/o visible por parte de S. Estos compuestos pueden ser, especies endógenas, (tales como porfirinas y riboflavina), o especies exógenas (drogas, compuestos poliaromáticos, y pigmentos).

El daño oxidativo de proteínas es de gran importancia, dado que la pérdida de funcionalidad de las mismas, puede afectar la actividad enzimática, o bien, la proteína modificada puede contener grupos químicos reactivos, que contribuyan a un daño secundario de otras biomoléculas [111]. Diferentes tipos de modificaciones son causadas por la oxidación de proteínas, entre ellas, fragmentación de uniones covalentes, entrecruzamientos, formación de grupos carbonilos y tirosinas, son identificados como indicadores de oxidación proteica [112].

Es necesario desarrollar una metodología para evitar o reducir la fotooxidación de proteínas y los defectos que causa. Es por ello, que en el presente estudio se determinó el efecto protector de la adición de Bc-GA y GA sobre la oxidación fotoinducida de proteínas en leche durante el almacenamiento refrigerado y bajo iluminación.

4.3.1. Fotoprotección de Proteínas en Leche

De la cuantificación de proteínas, a través del método de Bradford, no se evidenció una disminución significativa del contenido de proteínas totales de las muestras de leche (~13-16 % consumo), frente a la exposición prolongada a la luz. Sin embargo, dicho resultado es de esperarse, dado que la interacción que ocurre entre el colorante hidrofóbico (Azul de Coomassie G-250) usado en este método, al encontrarse con el entorno hidrofóbico del interior de una proteína es inespecífica. Por lo que puede ocurrir, que dicho método esté censando el entorno hidrofóbico total de las proteínas, mientras que modificaciones puntuales en un residuo de aminoácido, no esté siendo detectado. Cabe destacar, que no se observa diferencia en la cuantificación de proteínas totales de las leche con adición de GA ni Bc-GA, es decir que el aporte de proteínas por la composición química de la GA y Bc-GA (aproximadamente 0,275% p/p), sería despreciable.

Con el fin de determinar la fotodegradación de proteínas en leche, evidenciada en forma de proteólisis o agregación, se analizó la movilidad electroforética de las proteínas en leche, empleando SDS-PAGE, como se observa en la Figura 5.15.

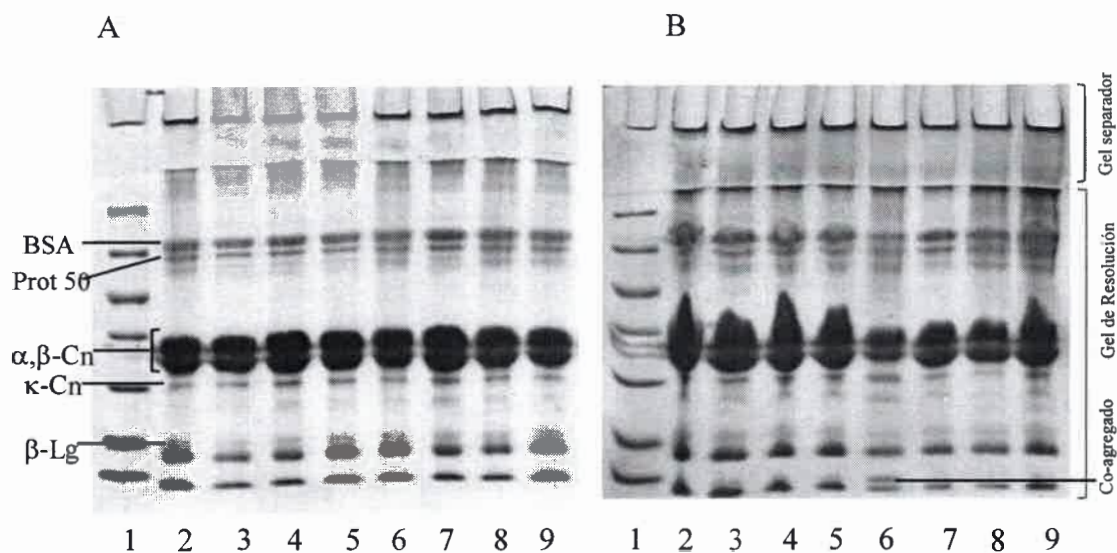


Figura 5.15. Perfiles proteicos de muestras de leche en polvo reconstituida expuesta a luz fluorescente a 4 °C, (A) Leche t0 y t1, (B) Leche t0 y t3.

En la Figura 5.15 (A), se observa ubicado en orden desde el extremo izquierdo hacia el derecho, el MPM (calle 1), las muestras de leche sin irradiación (t_0): L Luz, L Osc, L+GA y L+Bc-GA, en las calles 2, 3, 4 y 5, respectivamente. En las calles 6, 7, 8 y 9, se encuentran las muestras L Luz, L Osc, L+GA y L+Bc-GA, expuestas a 140 h de luz. En el gel B, de la calle 2 a la 5, corresponde a muestras de leche t_0 (L Luz, L Osc, L+GA y L+Bc-GA), y las muestras correspondientes al tiempo 3, que fueron expuestas a 230 hs de luz fluorescente, se observan en el orden: L Luz, L Osc, L+GA y L+Bc-GA en las calles 6, 7, 8 y 9, respectivamente.

4.3.1.1. Identificación de Proteínas

La identificación de proteínas fue realizada en función de la distancia recorrida en el gel (fr) y de la comparación con la banda correspondiente del MPM. De esta forma, la banda 4, en función al MPM, fue identificada como BSA (66,2 KDa), la banda 6, se trata de una proteína de alrededor de 50 KDa (Prot 50), que no ha sido identificada, la banda 7, rango de peso molecular (20,5-25,2kDa) y alta concentración, corresponde a las caseínas α_{s2} - y β - ($\alpha\beta$ -cn), seguido de la banda 8 (25-26 KDa) que en función al peso molecular, fue identificada como α_{s1} -caseína (α_{s1} -cn). La banda 9 corresponde a la κ -caseína (κ -cn), cuyo peso molecular es de 19,55 kDa. Finalmente, la banda 10, posee el mismo peso molecular que la banda 6 del MPM, la cual corresponde a β -Lactoglobulina (β -Lg) (18,4 kDa).

Las proteínas fueron cuantificadas relativamente del gel SDS-PAGE digitalizado, a través del análisis con el software MyImage (Thermo Scientific). Se analizó el área (en pixeles) que representa cada banda, tomando un promedio de dos experimentos independientes de SDS-PAGE. Los resultados son expresados como porcentajes relativos promedio de cada banda, respecto del correspondiente blanco (Leche t_0).

De los resultados obtenidos, se ha observado la aparición de una nueva banda a las 230 h de iluminación, en la muestra de leche (L Luz t_3) en la calle 6 (Figura 5.15 B), mientras que no ocurre lo mismo en las muestras con adición de GA y Bc-GA o en L Osc, que permanecieron almacenadas en idénticas condiciones. Esta banda, posee un valor promedio de fr= 0,970, un área de 3270 Pixeles, y no ha podido ser identificada, aunque podría tratarse de α -lactoalbúmina (14,176 kDa). Esto concuerda con la última

banda del MPM, que es la lisozima (14,4 kDa), ya que se encuentra ligeramente por encima de esta nueva banda, con un $r_f = 0,949$, dado que en función al tamaño, las proteínas de mayor peso molecular, se movilizan menos. También se ha observado la presencia de agregados de alto peso molecular. Estos resultados indican que en leche expuesta a luz fluorescente, se produjo *polimerización de proteínas*. Éstos pueden dividirse en dos tipos, oligómeros, cuyo peso molecular es mayor de 80 KDa y menor de 175 KDa, e ingresan en el gel separador. Mientras que se denomina agregados a aquellas proteínas que no pasan el gel de separación, y permanecen en la parte superior del gel. Como se observa en la Figura 15, hay formación de oligomero en las muestras expuestas a luz fluorescente a partir de las 140 h de iluminación, cuyo peso molecular es mayor a 116 KDa (correspondiente a la banda β -galactosidasa del MPM), mientras que no está presente en L Osc. A su vez esto se ve intensificado a las 230 h de irradiación. Sin embargo, no se observa formación de agregados mayores a 175 KDa en las muestras de leche expuesta a luz fluorescente. Los resultados del presente trabajo concuerdan con lo informado por Scheidegger y col. [113], que observaron polimerización (oligómeros) en leche expuesta a luz fluorescente, aunque dicho ensayo fue a tiempos más cortos de irradiación. Es importante destacar, que este estudio, se basa en el efecto de degradación de proteínas, que ocurre a través del mecanismo de fotosensibilización por RF, empleando sólo luz fluorescente y las muestras contenida en un envase de vidrio que actuaría como filtro, evitando el paso de la luz UV. Mientras que Scheidegger y col. [113], evalúan la fotodegradación de las proteínas por luz UV y FL, lo que involucra tanto un mecanismo de fotooxidación directa, por parte de los aminoácidos capaces que absorber la luz (Trp, His, Met, etc.), como el de fotosensibilización por RF.

Trabajos previos han demostrado, que nuevos complejos químicos entre proteínas de leche pueden originarse, como una consecuencia de la fotooxidación de proteínas, y son denominados co-agregados [114-117]. Estos complejos podrían formarse por interacción entre α -La y β -Lg, α -La y κ -caseína, como también entre β -Lg y κ -caseína. Existen diversas teorías que explicarían el mecanismo de formación de dichos co-agregados, y los factores que lo favorecen, tales como el tratamiento térmico y la exposición a la luz [101,118]. Uno de los mecanismos propuestos, consiste en una primera etapa, en que las proteínas del suero desnaturalizadas se agregan en relación



dependiente a la concentración inicial individual de las proteínas séricas. En una segunda etapa, estos complejos se asocian a micelas de caseínas [119]. En la principal interacción, estaría involucrada reacciones de intercambio tiol-disulfuro entre las β -Lg y κ -caseína desnaturalizadas, en la superficie de la micela. La segunda teoría, sugiere que a altas temperatura, β -Lg primero sufre desnaturalización, y luego interacciona con caseína [120].

Por otra parte, *proteólisis o fragmentación* de proteínas fue observada puntualmente en: la banda 4 o BSA, la banda 6 (Prot 50), la banda 7, que corresponde a $\alpha_y\beta$ -cn, seguido de la banda 8 o α_{s1} -cn, la banda 9 o κ -cn, y la banda 10, la cual corresponde a β -Lg. En dichas bandas, se determinó el *porcentaje relativo* (%R t/t_0) de cada proteína en función del tiempo de exposición a luz fluorescente, relativo a leche no irradiada (L t_0). La Figura 5.16 representa el Porcentaje relativo de áreas, t/t_0 de proteínas lácticas en función al tiempo de exposición a iluminación fluorescente a 4 °C (expresado en porcentaje relativo respecto de L t_0) de las proteínas A) BSA, B) Prot 50, C) $\alpha_y\beta$ -cn, D) α_{s1} -cn, E) κ -cn, F) β -Lg.

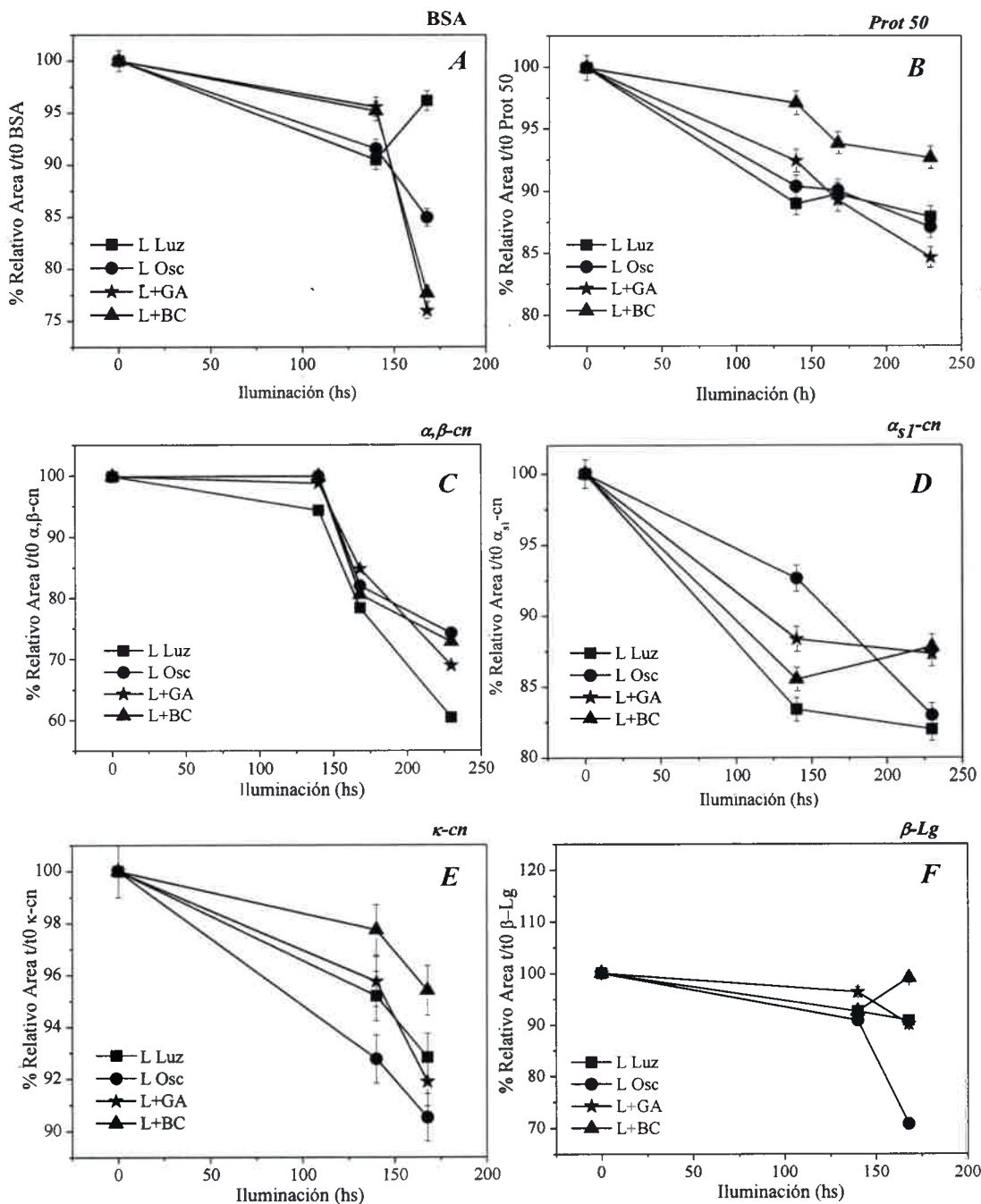


Figura 5.16. Cinética individual de proteínas de leche, expuesta a luz fluorescente a 4 °C. Cada gráfico representa el porcentaje relativo de áreas, a cada tiempo respecto de tiempo cero (t/t0) resultante de un promedio de dos ensayos independientes de SDS-PAGE. Los resultados son expresados como porcentaje promedio de la relación de pixeles de una banda respecto de la misma banda, de una muestra no expuesta a iluminación (L t0). Las proteínas lácteas son: A) BSA, B) Prot 50, C) α₂β₁-cn, D) α₁-cn, E) κ₁-cn, F) β₂-Lg.

La degradación de la BSA, como se observa en la Figura 5.16 (A) es inducida por acción de la luz, ya que se produjo el mayor porcentaje de oxidación en la leche expuesta a iluminación, en todos los tiempos analizados. Además, a las 168 h se evidencia un máximo en la oxidación de la proteína BSA por efecto de la luz. Frente a la degradación de dicha proteína, la adición de GA y Bc-GA ejercen AAO, demostrando un efecto protector frente a la oxidación fotoinducida de las proteínas de la leche. El efecto fotoprotector de leche con adición de GA o Bc-GA, respecto de L Luz sin adición, fue calculado y los resultados se expresan en porcentaje, Tabla 5.7. El %FP que mostró la adición GA y Bc-GA, sobre la BSA, a diferentes intervalos de exposición a luz fluorescente se presenta en la Tabla 5.7.

En la Figura 5.16 (B), se observa una leve disminución del %R $t/t0$ de la Prot 50 causado por un proceso de oxidativo que no es inducido por luz, ya que la diferencia entre L Luz y L Osc es mínima. Sin embargo, GA y Bc-GA presentan AAO frente a dicho proceso, demostrando protección en todos los tiempos evaluados. El efecto FP de Prot 50 con la adición de Bc-GA, fue mayor que con GA (Tabla 5.7). En cuanto al %R $t/t0$ de las proteínas α_{s2} - y β -cn, se observa en la Figura 5.16 (C), que aumenta a mayor tiempo de exposición a iluminación, lo que indica que es un proceso de oxidación fotoinducido. Cabe destacar que la adición de GA y Bc-GA, redujo la degradación de dichas proteínas, demostrando prácticamente los mismos porcentajes relativos, que la leche que se mantuvo en oscuridad. Los %FP de GA y Bc-GA se muestran en Tabla 5.7.

En la Figura 5.16 (D), se observa el %R $t/t0$ de α_{s1} -cn, que ocurre a través de un proceso fotoinducido, presentando un comportamiento similar al de $\alpha_y\beta$ -cn. Es importante mencionar que si bien el control de oscuridad presenta menor consumo que L Luz, éste posterior a las 140 h de iluminación comienza a aumentar, indicando que estaría ocurriendo además, un proceso de oxidación no inducido por acción de la luz. Los %FP por Bc-GA fueron menores que con adición de GA (Tabla 5.7). El consumo de κ -cn, que se muestra en la Figura 5.16 (E), sería causado por un proceso de oxidación no inducido por luz, sin embargo ambos encapsulados ejercen un efecto fotoprotector. En este caso los %FP fueron mayores al 50% con la adición de Bc-GA (Tabla 5.7). La fotooxidación de β -Lg, se observa en la Figura 5.16 (F), mostrando un consumo relativamente bajo, respecto del resto de las proteínas. Los %FP de GA y Bc-GA frente a β -Lg, Tabla 5.7.

Tabla 5.7. Porcentaje de fotoprotección (%FP) de GA y Bc-GA, frente al consumo de proteínas lácticas, en función del tiempo de exposición a iluminación.

	<i>Tiempo de fotólisis (h)</i>	<i>%FP</i>					
		<i>BSA</i>	<i>Prot 50</i>	<i>$\alpha_2\beta$-cn</i>	<i>α_{s1}-cn</i>	<i>κ-cn</i>	<i>β-Lg</i>
<i>GA</i>	<i>140</i>	54	31	49	30	43	50
	<i>168</i>	17	13	30	ND	7	50
	<i>230</i>	ND	10	22	30	ND	ND
<i>Bc-GA</i>	<i>140</i>	50	74	ND	13	70	0
	<i>168</i>	26	40	10	ND	57	96
	<i>230</i>	ND	39	32	32	ND	ND

ND= No ha sido detectado efecto fotoprotector.

La disminución de la recuperación de las proteínas causada por la irradiación de luz fluorescente, respecto del control en oscuridad, es atribuida a proteólisis o fragmentación. Diversos trabajos informan que fragmentación de proteínas es inducida por intermediarios de fotooxidación [121,122]. Por ejemplo, la fotooxidación de lisozima en presencia de lumiflavina origina fragmentos de péptidos [123].

Los resultados presentados, concuerdan con lo informado por Dalsgaard y col. [112] que estudiaron las modificaciones en los diferentes niveles de la estructura proteica, empleando soluciones de proteínas de la leche, a ciertos intervalos de tiempo de exposición con luz fluorescente (2200-2600 lx), en presencia de RF (1,75 $\mu\text{g/ml}$), en una concentración similar a la que posee naturalmente la leche. En dicho trabajo, se demostró que ocurren modificaciones en la estructura cuaternaria de proteínas lácteas (polimerización), posterior a 44 h de fotooxidación con luz fluorescente. Sin embargo, a diferencia de dicha investigación, los resultados obtenidos en el presente trabajo, indican relevantes modificaciones en la estructura cuaternaria de las caseínas α_{s2} y β -cn, y α_{s1} -cn, por degradación o proteólisis, en lugar de polimerización, como es informado en el mismo. Por el contrario, solo leves cambios en cuanto a fragmentación, fueron observados para β -Lg, κ -cn, y BSA. Dichas proteínas sufren una baja degradación, y con el aumento del tiempo de exposición a iluminación, favorece la agregación. Este

resultado concuerda con el hecho que las caseínas carecen de estructura terciaria, y son proteínas parcialmente desenrolladas comparadas a las proteínas globulares, siendo más lábiles frente a la oxidación, con cambios en la estructura primaria (modificaciones químicas) y cuaternaria (polimerización). Las proteínas globulares del suero, debido a su enrollamiento y estructura más compacta, son menos sensibles a la fotooxidación, y demostraron menor formación de ditirosina. Las diferencias con los resultados publicados por Dalsgaard y col. [112], pueden deberse a que estudian un sistema modelo, empleando proteínas purificadas suspendidas en buffer fosfato y simulando la matriz, mientras que en el presente estudio, el comportamiento de las proteínas frente a la oxidación fotoinducida ocurre en una matriz compleja como es la leche, pudiendo estar afectado por la presencia de sales, tales como Cu, enzimas, lípidos, la generación de especies oxidantes a través de diferentes vías, etc.

Se ha demostrado que en casi todas las proteínas analizadas de la leche (excepto Prot 50 y κ -cn) se observan modificaciones fotoinducidas. Esto se explica por un proceso de oxidación fotosensibilizado que está ocurriendo en presencia de RF. Si bien, numerosos procesos oxidativos están involucrados en la fotooxidación de proteínas, la formación de $O_2(^1\Delta_g)$ a través de un proceso fotosensibilizado de tipo II, es una de las vías principales. Aurand y col. [124] informaron que las proteínas de la leche forman un complejo débilmente unido con RF. En dicho trabajo demostraron que, en condiciones aeróbicas de exposición a luz, las cantidades de residuos Trp y RF disminuyen proporcionalmente, y que además, se relacionan directamente con la intensidad de desarrollo de flavor [125].

Los resultados obtenidos sobre la fotooxidación de las proteínas, ya sea polimerización o fragmentación, demostraron que GA y Bc-GA, ejercieron un importante efecto antioxidante, protegiendo a las proteínas entre un 15-50% y en algunos casos, hasta un 95% de la acción de la luz. Si bien, el mecanismo exacto con que actúan éstos AOx, no se conoce, evidencia experimental sugiere que la AAO de GA estaría asociada a los residuos de aminoácidos presentes en la fracción proteica, tales como His, Tir, y Lis, que son considerados moléculas AOx. Además de, la capacidad de GA de desactivar EROS y el 3RF , como ha sido demostrado en el Capítulo 4. Los resultados demostraron un mayor efecto fotoprotección Bc-GA, respecto de la microcápsula vacía, lo que puede ser explicado por la eficiente desactivación de $O_2(^1\Delta_g)$

por BC [6]. Finalmente, debe considerarse un pequeño efecto de filtro interno que podrían estar ejerciendo tanto GA como Bc-GA por la absorción de parte de la radiación emitida por la lámpara fluorescente.

5. CONCLUSIÓN

Se pudo comprobar, a partir de los resultados obtenidos, que tanto Bc-GA como GA, ejercen un efecto protector, frente a la fotodegradación de RF con %PP del 30 y 26 %, respectivamente. Dicho efecto puede ser explicado por la capacidad de desactivación de $O_2(^1\Delta_g)$ mostrada tanto por Bc-GA como por GA, (mayor en Bc-GA, ya que β -caroteno es un excelente desactivante de $O_2(^1\Delta_g)$), por la desactivación del 3RF causada por GA aun en presencia de oxígeno, reduciendo la concentración de EROS generadas, y adicionalmente, por un efecto de filtro interno que podrían ejercer, tanto GA como Bc-GA, por la absorción de parte de la radiación emitida por la lámpara fluorescente.

En relación a la oxidación lipídica fotoinducida, la cual genera productos de oxidación y off-flavors, se determinó el efecto fotoprotector de GA por la inhibición de la formación de TBARs en leche de alrededor de 55 %, y la inhibición de la formación de peróxidos por la GA del 35%, lo que puede deberse a la capacidad de desactivar EROS, en particular OH^\bullet , el cual es uno de los principales radicales involucrados en la oxidación lipídica, actuando como iniciador.

En cuanto al perfil de ácidos grasos, no se observaron grandes modificaciones fotoinducidas en la composición de AG total de leche. Sin embargo, se demostró que la adición de GA evitó la fotooxidación de ácido linoleico (C18:2n – 6) y oleico (C18:1n – 9), que constituyen los principales AG insaturados de la leche. Con respecto a la generación de compuestos volátiles, se observa que la GA ejerce un efecto de inhibición sobre la máxima producción de pentanal, hexanal, heptanal, siendo estos indicadores de mayor importancia en la generación de off-flavors en la leche, con valores entre 12 y 25 % Inhibición.

Los resultados de oxidación de proteínas inducida por acción de luz fluorescente demostraron que la adición de GA ejerce un efecto protector que varía de 13-50%, mientras que entre 30 a 96% es ejercido por Bc-GA, reduciendo la proteólisis

de proteínas lácticas. Dicho efecto se debería a la AAO de ambos microencapsulados, especialmente, a la capacidad de desactivar el ^3RF por GA, y la desactivación del $\text{O}_2(^1\Delta_g)$, tanto por BC y GA, que reducen la vía de oxidación fotosensibilizada.

En base a todo lo anteriormente expuesto, se puede concluir que BC microencapsulado en GA y la GA, ejercen un marcado efecto protector sobre las alteraciones nutricionales (lípidos, proteínas y vitaminas) y organolépticas (desarrollo de off-flavor) en leche durante el almacenamiento inducidas por iluminación, indicando que su incorporación en la matriz alimenticia disminuiría o retardaría su deterioro.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Levine, R.L. 2002. Carbonyl modified proteins in celular regulations, aging and disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 32, 790-796.
2. Min, D.B., Choe, E.O. 2002. Effects of singlet oxygen oxidation on the flavor of foods and stability of vitamins. *Food Science and Biotechnology*. 11, 582-586.
3. Lee, J., Min, S., Lee, E.C., Min, D.B. 2003. Formation of volatile compounds in soy flour by singlet oxygen oxidation during storage under light. *Journal of Food Science*. 68, 1993-1997.
4. Muñoz, A., Ortiz, R., Murcia, M.A. 1994. Determination by HPLC of changes in riboflavin levels in milk and nondairy imitation milk during refrigerated storage. *Food Chemistry*. 49, 203-206.
5. Bosset, J.O., Gallmann, P.U., Sieber, R. 1994. Influence of light transmittance of packaging materials on shelf-light of milk and dairy products-a review. *Food Packaging and Preservation*. Ed. Mathlouthi. Blackie Academic & Prof., London. 222-268.
6. Foote, C.S., Denny, R.W. 1968. Chemistry of singlet oxygen quenching by β -carotene. *Journal of American Chemical Society*. 90, 6232-6238.
7. Valle, L., Morán, F.E., Borsarelli, C.D. 2011. Microenvironmental modulation of photophysical properties of flavins. *Photophysical and Photochemical Sciences*.

8. Skibsted, L.H. 2010. Understanding oxidation process in foods. In oxidation in foods and beverages and antioxidants applications. Eds. Decker, E.A., Elias, R.J., McClements, D.D. Woodhead Publishing Oxford. Vol I, 3-35.
9. Foote, C.S. 1991. Definition of Type I and Type II Photosensitized Oxidation. *Photochemistry and Photobiology*. 54, 659.
10. Lu, C., Lin, W., Wang, W., Han, Z., Yao, S., Lin, N. 2000. Riboflavin-(VB2) photosensitized oxidation of 2'-deoxyguanosine-5'-mono-phosphate (dGMP) in aqueous solution: A transient intermediates study. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2, 329-334.
11. Bisby, R.H., Morgan, C.G., Hamblet, I, Gorman, A.A. 1999. Quenching of Singlet Oxygen by Trolox C, Ascorbate, and Amino Acids: Effects of pH and Temperature. *Journal of Physical Chemistry A*. 103, 37, 7454-7459..
12. Bradley, D.G., Min, D.B. 1992. Singlet oxygen oxidation of foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 31, 211-236.
13. Yang, W.T.S, Min, B.D. 1994. Chemistry of singlet oxygen oxidation of foods. In: Lipids in Food Flavours. Eds. Ho, T.C, and Hartmand, T.G. American Chemical society. Washintong, D.C. 15-29.
14. Fiecrovich, I. 1986. Biological effects of the superoxide radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 247, 1-11.
15. Haber, F., Weiss, J. 1934. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceedings of the Royal Society of London A*. 147, 332-351.
16. Burton, G., Joyce, A., Keith Ingold, U. 1983. Is vitamin E the only lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes? *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 221, 281-290.
17. Allen, C., Parks, O.W. 1979. Photodegradation of riboflavin to lumichrome in milk exposed to sunlight. *Journal of Dairy Science*. 60, 1038-41.
18. Rooney, M.L. 1983. Ascorbic acid as a photooxidation inhibitor. *Photochemistry and Photobiology*. 38, 619-621.
19. King, J.M., Min, D.B. 2002. Riboflavin-photosensitized singlet oxygen oxidation product of vitamin D2. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 79, 983-987.

20. Mukai, K., Daifuku, K., Okabe, K., Tanigaki, T., Inoue, K. 1991. Structure-activity relationship in the quenching reaction of singlet oxygen by tocopherol (vitamin E) derivatives and related phenols. Finding of linear correlation between the rates of quenching of singlet oxygen and scavenging of peroxy and phenoxy radicals in solution. *The Journal of Organic Chemistry*. 56, 4188-4192.
21. Chacon, J.N., McLearnie J., Sinclair R.S. 1988. Singlet oxygen yields and radical contribution in the dye-sensitized photo-oxidation in methanol of esters of polyunsaturated fatty acids (oleic, linolenic and arachidonic). *Photochemistry and Photobiology*. 47, 647-56.
22. Huang, R., Choe, E., Min, D.B. 2004. Kinetics for singlet oxygen formation by riboflavin photosensitization and the reaction between riboflavin and singlet oxygen. *Journal of Food Science*. 69, 726-32.
23. Lu, C.Y., Wang, W.F., Lin, W.Z., Han, Z.H., Yao, S.D., Lin, N.Y. 1999. Generation and photosensitization properties of the oxidized radical of riboflavin: a laser flash photolysis study. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 52, 111-6.
24. Cardoso, D.R., Olsen, K., Skibsted, H.L. 2007. Mechanism of deactivation of triplet-excited riboflavin by ascorbate, carotenoids, and tocopherols in homogeneous and heterogeneous aqueous food models systems. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 55, 6285-6291.
25. Cardoso, D.R., Homem-de-Mello, P., Olsen, K., da-Silva, A.B.F., Franco, D.W. and Skibsted, L.H. 2005. Deactivation of triplet-excited riboflavin by purine derivatives: important role of uric acid in light induced oxidation of milk sensitized by riboflavin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 53, 3679-3684.
26. Lu, C., Bucher, G., Sander, W. 2004. Photoinduced interactions between oxidized and reduced lipoic acid and riboflavin (vitamin B2). *An European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry*. 1, 47-56.
27. Natera, J., Massad, W., García, N. 2011. Vitamin B1 as a scavenger of reactive oxygen species photogenerated by vitamin B2. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 87, 317-323.

28. Scurachio, R.S., Skibsted, L.H., Metzker, G., Cardoso, D.R. 2011. Photodegradation of folate sensitized by riboflavin. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 87, 840-845.
29. Huvaere, K., Skibsted, L.H. 2009. Light-Induced Oxidation of Tryptophan and Histidine. Reactivity of Aromatic N-Heterocycles toward Triplet-Excited Flavins. *Journal of American and Chemical Society*. 131, 8049-8060.
30. Cardoso, D.R., Franco, D.W., Olsen, K., Andersen, M.L., Skibsted. 2004. Reactivity of bovine whey proteins, peptides, and amino acids toward triplet riboflavin as studied by laser flash photolysis. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 52, 6602-6606.
31. Huvaere, K., Cardoso, D.R., Homem-de-Mello, P., Westermann S., Skibsted, L.H. 2010. Light-induced oxidation of unsaturated lipids as sensitized by flavins. *The Journal of Physical Chemistry B*. 114, 5583-5593.
32. Cardoso, D.R., Homem-de-Mello, P., Skibsted, L.H. 2011. Riboflavin Photosensitized Oxidation of Long-Chain Omega-3 Fatty Acid Methyl Esters, *Food Chemistry*.
33. Gunstone, F.D., Harwood, J.L., Dijkstra, A.J. 2007. The lipid handbook. 3rd ed. CRC Press Taylor & Francis Group. United States of America. ISBN-13: 978-0-8493-9688-5.
34. Frankel, E.N. 1985. Chemistry of autoxidation: Mechanism, products and flavor significance. In: Flavor Chemistry of Fats and Oils. Eds. Min, D.B. and Smouse, T.H. American Oils Chemist's Society. 1-34.
35. Dimick, P.S. 1982. Photochemical effects on flavor and nutrients of fluid milk. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*. 15, 247-56.
36. Min, D.B, Boff, J.M. Lipid oxidation of edible oil. In: Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology. 2nd Edition. Eds. Casimir, C.A., Min, D.B. The Ohio State University, Columbus, Ohio.
37. Rawls, H.R., Van Santen, P.J. 1970. A possible role for singlet oxidation in the initiation of fatty acid autoxidation. *Journal of the American Oil Chemist's Society*. 47, 121-5.

38. Jefford, C.W., Boschung, A.F., Rimbault, C.G. 1978. Formation of dioxetanes and related species. In: Singlet oxygen. Eds. Ranby, B., Rabek, J.F. John Wiley and Sons. New York. 182-5.
39. Levine, R.L., Stadtman, E.R. 2001. Oxidative modification of proteins during aging. *Experimental Gerontology*. 36, 1495-502.
40. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 2001. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford University. Press, New York.
41. Fridovich I. 1986. Biological effects of the superoxide radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 247, 1-11.
42. Stadtman, E.R. 1990. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: Biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radical Biology and Medicine*. 9, 4, 315-325.
43. Henrietta, A., Headlam, Davies, K.J.A. 2002. *Free Radical Biology and Medicine*. 32, 1171-1184.
44. Dalle Carbonare M., Pathak, M.A. 1992. Skin photosensitizing agents and the role of reactive oxygen species in photoaging. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 14, 105-24.
45. Moyssiadi, T., Badeka, A., Kondyli, E., Vakirtzi, T., Savvaidis, I., Kotominas, M. 2004. Effect of light transmittance and oxygen permeability of various packaging material on keeping quality of low fat pasteurized milk: chemical and sensorial aspects. *International Dairy Journal*. 14, 429-436.
46. A.O.A.C. 1984. Official Methods of Analysis. 14th Edition, Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C.
47. Ashoor, S., Knox, M., Olsen, J., Deger, D. 1985. Improved Liquid Chromatographic Determination of Milk and Dairy Products. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. 68, 693-696.
48. Montenegro, M.A., Boiero, M. L., Valle, L., Borsarelli, C.D. 2012. Gum Arabic: More Than an Edible Emulsifier. In: Products and Applications of Biopolymers. Ed. Johan Verbeek. InTech - Open Access Publisher.

49. Antongiovanni, M., Lercker, G., Secchiari, P. 2007. Method of analysis for the study of the lipid fraction of milk, animal products and food animal husbandry. A.S.P.A., project F.I.S.R., Ed. Plus, Pisa. 218.
50. Tarladgis, B.S., Watts, B.M., Younathan, M.T. 1960. A Distillation Method for the Quantitative Determination of Malonaldehyde in Rancid Foods. *The Journal of the American Oil Chemists Society*. 37, 44-48.
51. Shantha, N.C., Decker, E.A. 1994. Rapid, Sensitive, Iron-Based Spectrophotometric Methods for Determination of Peroxide Values of Food Lipids. *Journal of AOAC International*. 77, 421-424.
52. International IDF Standards. 1991. International Dairy Federation, IDF - Square Vergote 41, Brussels, Belgium, sec. 74 A,
53. IDF 182:2002/ISO 15884:2002, Milk fat - preparation of fatty acids methyl esters.
54. Marsili, R.T. 1999b. Comparison of solid-phase microextraction and dynamic headspace methods for the GC-MS analysis of light-induced lipid oxidation products in milk. *Journal of Chromatographic Science*. 37, 17-23,
55. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254.
56. Galindo-Amaya, L., Valbuena-Colmenares, Rojas-Villaroel, E. 2006. Estandarización de la detección del glicomacropéptido por PAGE-SDS como índice de adulteración en leche. *Revista Científica XVI*. 3, 308-314.
57. Bollag, D.M., Rozycki, M.D., Edelstein, S.J. 2002. Protein Methods. 2nd Edition. N.Y. Wiley- Liss, Inc. New York. 149.
58. Hames, B.D. 1981. Gel Electrophoresis of Proteins: A practical approach. Eds. Hames, B.D. and Reekwood. 14-17.
59. Cultek 2006. Protocolos y técnicas. Soluciones Electroforesis. (<http://www.cultek.com>).
60. Huang, R., Kim, H.J., Min, D.B. 2006. Photosensitizing Effect of Riboflavin, Lumiflavin, and Lumichrome on the Generation of Volatiles in Soy Milk. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 54, 2359-2364.

61. Foote, C.S., Chang, Y.C., Denny, R.W. 1970. *Journal of the American Chemical Society*. 92, 5216-5218.
62. Montenegro, M.A., Nunes, I.L., Mercadante, A.Z., Borsarelli, C.D. 2007. Photoprotection of Vitamins in Skimmed Milk by an Aqueous Soluble Lycopene-Gum Arabic Microcapsule. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55, 323-329.
63. Allen, J.C. 1987. Industrial aspects of lipid oxidation. In: Recent Advances in Chemistry and Technology of Fats and Oils. Eds. Hamilton, R.J. and Bhati, A., Elsevier. London, U.K. 31-39.
64. Rice-Evans, C., Burdon, R. 1993. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Progress in Lipid Research*. 32, 71-110.
65. Halliwell, B., Gutteridge, J.C. 1989. Free Radicals in Biology and Medicine; Oxford University Press: Oxford, U.K.
66. Trommer, H., Neubert, R.H., 2005. The examination of polysaccharides as potential antioxidative compounds for topical administration using a lipid model system. *International Journal of Pharmaceutics*. 298, 153-163.
67. Schewellenbach, L.J., Olson, K.L., McConnell, K.J., Stolcpart, R.S., Nash, J.D., Merenich, J.A. 2006. The triglyceride-lowering effects of a modest dose of docosahexanoic acid alone versus in combination with low dose eicosapentanoic acid in patients with coronary artery disease and elevated triglycerides. *Journal of the American College of Nutrition*. 25, 6480-6485.
68. Hellan, B., Smith, L., Saarem, K., Saugstad, O.C., Devron, C.A. 2003. Maternal supplementation with very-long-chain n-3 fatty acids during pregnancy and lactation augments children's IQ at 4 years of age. *Pediatrics*. 111, 39-44.
69. Looor J.J., Herbein J.H., Jenkins T.C. 2002. Nutrient digestion, biohydrogenation, and fatty acid profiles in blood plasma and milk fat from lactating Holstein cows fed canola oil or canolamide. *Animal Feed Science and Technology*. 97, 65-82.
70. Chilliard, Y., Ferlay, A., Doreau, M. 2001. Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. *Livestock Production Science*. 70, 31-48.

71. Guler, G.O., Cakmak, Y.S., Zengin, G., Aktumsek, A., Akyildiz, K. 2010. Fatty Acid Composition and Conjugated Linoleic Acid (CLA) Content of Some Commercial Milk in Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 16 (Suppl-A): S37-S40.
72. Prandini, A., Sigolo, S., Tansini, G., Brogna, N., Piva, G. 2007. Different level of conjugated linoleic acid (CLA) in dairy products from Italy. *Journal of Food Composition and Analysis.* 20, 472-479.
73. Chávez-Servín, J.L., Castellote, A.I., López-Sabater, M.C. 2008. Volatile compounds and fatty acid profiles in comercial milk-based infant formulae by static headspace gas chromatography: Evolution after opening the packet. *Food Chemistry.* 107, 558-569.
74. Marsili, R.T. 1999a. SPME-MS-MVA as an electronic nose for the study of off-flavors in milk. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* 47, 648-54.
75. Whited, L.J., Hammond, B.H., Chapman, K.W., Boor, K.J. 2002. Vitamin A degradation and light-oxidized flavor defects in milk. *Journal of Dairy Science.* 85, 351-4.
76. Gaafar, A.M., Gaber, F.I. 1992. Volatile flavor compounds of sunlight-exposed milk. *Journal of Dairy Science.* 20, 1, 111-5.
77. Skibsted, L.H. 2000. Light-induced changes in dairy products. *Bulletin International Dairy Federation.* 346, 4-9.
78. Pereda, J., Jaramillo, D.P., Quevedo, J.M., Ferragut, V., Guamis, B., Trujillo, A.J. 2008. Characterization of volatile compounds in ultra-high-pressure homogenized milk. *International Dairy Journal.* 18, 826-34.
79. IDF. Determination of free fatty acids in milk and milk products. *Bulletin FIL-IDF No 265.* Brussels: *International Dairy Federation*, 1991.
80. Marsili, R.T., Miller, N. 1999. SPME-GC/MS testing for monitoring off-flavours in processed milk: Application of odour whey plots. In: *Flavour, Fragrance and Odours analysis.* Ed. Marsili, R.T. Marcel Dekker, New York, USA.
81. Jung, M.Y., Yoon, S.H., Lee, H. O., Min, D.B. 1998. Singlet oxygen and ascorbic acid effects on dimethyl disulfide and off-flavor in skim milk exposed to light. *Journal of Food Science.* 63, 408-412.

82. Karatapanis, A.E., Badeka, A.V, Riganakos, K.A., Savvaidis, I.N., Kontominas, M.G. 2006. Changes in flavour volátiles of whole pasteurized milk as affected by packaging material and storage time. *International Dairy Journal*. 16, 750-761.
83. Kim, Y.D., Morr, C.V. 1996. Dynamic headspace analysis of light activated flavor in milk. *International Dairy Journal*. 6, 2, 185-193.
84. Hall, G., Andersson, J. 1985. Flavor changes in whole milk powder during storage. 3. Relationships between flavor properties and volatile compounds. *Journal of Food Quality*. 7, 237-53.
85. [USDA-ARS]. 2008. U.S. Dept. of Agriculture-Agricultural Research Service. 2007. USDA Natl. Nutrient Database for Standard Reference, Release 20. <http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=8964>
86. Frankel, E.N. 1993. Formation of headspace volatiles by thermal decomposition of oxidized fish oils vs oxidized vegetable-oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 70, 8, 767-772.
87. Romeu-Nadal, M., Castellote, A.I., López-Sabate, M.C. 2004. Headspace gas chromatographic method for determining volatile compounds in infant formulas. *Journal of Chromatography A*. 1046, 235-239.
88. Boyd, L.C., King, M.F., Sheldon, B. 1992. A rapid method for determining the oxidation of n _ 3 fatty acids. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 69, 325-330.
89. Nuchi, C.D., McClements, D.J., Decker, E.A. 2001. Impact of Tween 20 hydroperoxides and iron on the oxidation of methyl linoleate and salmon oil dispersions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 49, 4912-4916.
90. Satué-Gracia, M.T., Frankel, E.N., Rangavajhyala, N., German, J.B. 2000. Lactoferrin in infant formulas: effect on oxidation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 48, 4984-4990.
91. Andersson, K., Lingnert, H. 1998. Influence of oxygen concentration on the flavour and chemical stability of cream powder. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technology*. 31, 245-51.

92. Carunchia Whetstine, M.E., Drake, M.A. 2007. The flavor and flavor stability of skim and whole milk powders. In: Flavor of dairy products. Eds. Cadwallader, K.R., Drake, M.A., McGorin, R. ACS Publishing, Washington, D.C. 217-251.
93. Hall, G., Andersson, J., Lingnert, H., Olofsson, B. 1985. Flavor changes in whole milk powder during storage. 2. The kinetics of the formation of volatile fat oxidation products and other volatile compounds. *Journal of Food Quality*. 7, 153-90.
94. Lloyd, M.A., Hess, S., Drake, M.A. 2009. Impact of temperature and nitrogen flushing on storage stability of wholemilk powder. *Journal of Dairy Science*. 92, 2409-22.
95. Romeu-Nadal, M., Chávez-Servín, J.L., Castellote, A.I., Rivero, M., López-Sabater, M.C. 2007. Oxidation stability of the lipid fraction in milk powder formulas. *Food Chemistry*. 100, 756-763.
96. Badings, H.T., de Jong, C. 1984. Headspace analysis for the study of aroma compounds in milk and dairy products. In: Analysis of Volatiles: Methods and Applications. Walter de Gruyter & Co, New York. Berlin. 401-417.
97. Samuelsson, E.E. 1962a. Model experiments on sunlight flavor in milk di- and tripeptides and methionine. *International Dairy Congress A*. 152.
98. Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. 1998. Milk proteins. Dairy Chemistry and Biochemistry. Chapman & Hall, London. 146-239.
99. Sanz Ceballos, L., Ramos Morales, E., De la Torre Adarve, G., Díaz Castro, J., Pérez Martínez, L., Sanz Sampelayo, M.R. 2009. Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. *Journal of Food Composition and Analysis*. 22, 322-329.
100. Amiot, J. 1991. Ciencia y Tecnología de la Leche. Principios y Aplicaciones. 1ra edición. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España.
101. Snezana, J., Miroljub, B., Ognjen, M., Tanja, V., Caslav, L. 2007. SDS-PAGE Analysis of Soluble Proteins in Reconstituted Milk Exposed to Different Heat Treatments. *Sensors*. 7, 371-383.
102. Walstra, P., Jenness, R. 2001. Dairy chemistry and physics. Wiley. Nueva York.

103. Trine, K., Dalsgaard, Otzen, D., Nielsen, J.H., Larsen, L.B. 2007. Changes in Structures of Milk Proteins upon Photo-oxidation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 55, 10968-10976.
104. Kim, Y.D., Morr, C.V. 1996. Dynamic Headspace Analysis of Light Activated Flavor in Milk. *International Dairy Journal*. 6, 185-193.
105. Patton, S. 1954. The mechanism of sunlight flavor formation in milk with special reference to methionine and riboflavin. *Journal of Dairy Science*. 37,446.
106. Østdal, H., Bjerrum, M.J., Pedersen, J.A., Andersen, H.J. 2000. Lactoperoxidase-induced protein oxidation in milk. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 48, 3939-3944.
107. Dimick, P.S. 1976. Effect of Fluorescent Light on Repartition of Riboflavin in Homogenized Milk. *Journal Dairy Science*. 59, 2019-2023.
108. Leclere, J., Birlouez-Aragon, I., Meli, M. 2002. Fortification of milk with iron-ascorbate promotes lysine glycation and tryptophan oxidation. *Food Chemistry*. 76, 491-499.
109. Davies, M.J. 2003. Singlet oxygen-mediated damage to protein and its consequences. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 305, 761-770.
110. Pattison, D.I., Rahmanto, A.S., Davies, M.J. 2012. Photo-oxidation of proteins. *Photochemical and Photobiological Science*. 11, 38.
111. Salvia, A., Carrupta, P.A., Tillementb, J.P., Testa, B. 2001. Structural damage to proteins caused by free radicals: assessment, protection by antioxidants, and influence of protein binding. *Biochemical Pharmacology*. 61, 1237-1242.
112. Dalsgaard, T.K., Otzen, D., Nielsen, J.H. Larsen, L.B. 2007. Changes in Structures of Milk Proteins upon Photo-oxidation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 55, 10968-10976.
113. Scheidegger, D., Pecora, R.P., Radici, P. M., Kivatinitz, S.C. 2008. Alteración del perfil proteico de leche en polvo por acción de la luz ultravioleta o fluorescente. *II Congreso Iberoamericano sobre Seguridad Alimentaria*. Barcelona, 5-7 de Noviembre de 2008.

114. Redecke, L., Binder, S., Elmallah, M.I.Y., Broadbent, R., Tilkorn, C., Schulz, B., May, P., Goos, A., Eich, A., Rubhausen M., Betzel, C. 2009. UV-light-induced conversion and aggregation of prion proteins. *Free Radicals Biology and Medicine Journal*. 46, 1353-1361.
115. Roy, S., Mason, B.D., Schöneich, C.S., Carpenter, J.F., Boone, T.C., Kerwin, B.A. 2009. Light-induced aggregation of type I soluble tumor necrosis factor receptor. *Journal of Pharmaceutical Science*. 98, 3182-3199.
116. Goosey, J.D., Zigler, J.S. Jr., Kinoshita, J.H. 1980. Cross-linking of lens crystallins in a photodynamic system: A process mediated by singlet oxygen. *Science*. 208, 1278-1280.
117. Wang, W., Nema, S., Teagarden, D. 2010. Protein aggregation-pathways and influencing factors. *International Journal of Pharmaceutics*. 390, 89-99.
118. Anema, S.G., Lie, Y. 2003. Association of denatured whey proteins with casein micelles in heated reconstituted skim milk and its effect on casein micelle size. *Journal of Dairy Research*. 70, 73-80.
119. Corredig, M., Dalgleish, D.G. 1996. Effect of different heat treatments on the strong binding interactions between whey proteins and milk fat globules in whole milk. *Journal of Dairy Research*. 63, 441-449.
120. Mottar, J., Bassier, A., Joniau, M., Baert, J. 1989. Effect of heat-induced association of whey proteins and casein micelles on yogurt texture. *Journal of Dairy Science*. 72, 2247-2256.
121. Michaeli, A., Feitelson, J. 1994. Reactivity of singlet oxygen toward amino acids and peptides, *Photochemistry and Photobiology*. 59, 284-289.
122. Straight, R.C., Spikes, J.D. 1985. In Singlet O₂. Ed. Frimer, A.A. CRC Press, Boca Raton. 4, 91.
123. Gomyo T., Fujimaki, M. 1970. Studies on changes in protein by dye sensitized photooxidation. Part 3. On the photodecomposition products of lysozyme. *Agricultural and Biological Chemistry*. 34, 302-309.
124. Aurand, L.W., Singleton, J.A., Matrone, G. 1964. Sunlight flavor in milk. II. Complex formation between milk proteins and riboflavin. *Journal Dairy Science*. 47, 827.

125. Singleton, J.A., Aurand, L.W., Lancaster, F.W. 1963. Sunlight flavor in milk. I. A study of components involved in the flavor development. *Journal Dairy Science*. 46, 1050.

CAPÍTULO 6

Actividad Antimicrobiana de Carotenoides Microencapsulados, Frente a Microorganismos de Referencia y Aislados de Leche.

1. INTRODUCCIÓN

En la elaboración de alimentos, es indispensable asegurar la calidad, estabilidad e inocuidad de los mismos, durante su vida útil. La tendencia actual de los consumidores, es de exigir alimentos de alta calidad, libre de preservantes, levemente procesados y con una vida media prolongada. Por otro lado, la legislación restringió el uso, y los niveles permitidos de conservantes actualmente permitidos, en diferentes alimentos. Esto ha generado un problema en la industria, ya que ha disminuido la susceptibilidad de algunos microorganismos, frente a los conservantes más comúnmente empleados.

Los preservantes utilizados se pueden diferenciar en dos grandes grupos; aquellos de origen químico, y los de origen natural.

1.1. Preservantes Químicos

1.1.1. Ácidos Orgánicos Débiles

Los más comunes son, por ejemplo, ácido acético, láctico, benzoico y sórbico. Estos compuestos inhiben el crecimiento de bacterias y hongos, y ácido sórbico se ha informado que también inhibe la germinación de esporas [1]. El modo de acción se cree que es debido a que en solución, a bajo pH, la molécula se encuentra en estado no-disociado, el cual es libremente permeable a través de la membrana plasmática y capaz de entrar a la célula. Una vez en el interior de la misma, el pH más alto causará su disociación, resultando en la acumulación de aniones y protones en el interior de la



célula [2]. Por lo tanto, se ha propuesto que los ácidos débiles ejercen su acción preservante a través de numerosas acciones incluyendo, disrupción de membrana [3], inhibición de reacciones metabólicas esenciales [4], estrés en homeostasis de pH intracelular [3], y acumulación de aniones tóxicos [5].

1.1.2. *Peróxido de Hidrógeno*

El sistema lactoperoxidasa encontrado en leche, tiene profundos efectos antimicrobianos, frente a bacterias y hongos [6]. Para su actividad óptima, requiere H_2O_2 y tiocianato, por lo que es más activo frente a microorganismos productores de peróxido, o bien, como alternativa se puede adicionar H_2O_2 en los alimentos para ser preservados. La AAM es ejercida a través de la generación de especies altamente biocidas, tales como $O_2(^1\Delta_g)$, $O_2^{\bullet-}$, e incluso, como ha sido mencionado anteriormente, en presencia de $O_2^{\bullet-}$ y de metales de transición, generar por la reacción de Fenton, radical HO^{\bullet} .

Una amplia variedad de m.o., tanto Gram positivo, como Gram negativo, pueden ser inhibidos por el sistema lactoperoxidasa [7,8]. El H_2O_2 por sí mismo, tiene acción bactericida, dependiendo de las concentraciones aplicadas y de factores, tales como pH y temperatura [9]. En los Estados Unidos de América (USA), la legislación regulatoria permite el agregado de H_2O_2 a productos alimenticios tales como leche cruda, para la preparación de ciertos tipos de quesos, almidón de maíz y huevo en polvo, y finalmente para la descontaminación de materiales de embalajes.

Los mecanismos de resistencia de bacterias y hongos, contra H_2O_2 , incluyen el sistema glutatión, con enzimas asociadas y catalasa [6]. Esta última enzima, degrada los niveles tóxicos de peróxido en oxígeno y agua, sin embargo, generalmente, continúa el daño, debido a la alta velocidad de difusión de H_2O_2 en la célula. Por el contrario, las levaduras poseen un sistema completo de defensa contra el estrés oxidativo [10].

1.1.3. *Agentes Quelantes*

Aquellos empleados en la industria alimentaria incluyen, ácido cítrico, y sales de calcio y la sal disódica de EDTA [11]. EDTA, actúa como potenciador del efecto de ácidos débiles, contra bacterias Gram negativas [12], mientras que ácido cítrico, inhibe el crecimiento de *Clostridium botulinum*, debido a su capacidad de sustraer Ca^{2+} [13].

1.2. *Preservantes Naturales*

1.2.1. *Pequeñas Biomoléculas Orgánicas*

Son compuestos antimicrobianos que son permitidos a ser adicionados en alimentos por autoridades regulatorias. Algunos de ellos, están naturalmente presentes en especies, tales como orégano, tomillo, eneldo, clavo, y sus aceites esenciales. Estos compuestos son hidrofóbicos, y poseen la capacidad de perturbar la membrana, incluso hasta causar su ruptura. Algunas de las moléculas orgánicas con AAM más comunes, son ácido benzoico, ácido vanílico, benzaldehído, ácido ferúlico, eugenol, estragol, etc. Los aceites esenciales de albahaca, comino, y coriandro, tienen efectos inhibitorios contra m.o. como *Aeromonas hidrófila*, *Pseudomona fluorescens*, y *Staphylococcus aureus* [14]. Samy y col. [15], identificaron extractos de plantas medicinales de la India, que mostraron actividad antibacteriana contra Gram negativas, a concentraciones de 1 mM.

1.2.2. *Péptidos y Proteínas Perturbadoras de Membrana*

Las plantas contienen proteínas perturbadoras de membrana, denominadas defensinas, que la protegen de infecciones microbianas. La acción inhibitoria de péptidos y proteínas, se cree que ocurre a través de disrupción de membrana, aunque el modo exacto es desconocido.

Mecanismos de resistencia contra péptidos y proteínas antimicrobianos, han sido desarrollado, en diferentes niveles. El primero, es la secreción de enzimas proteolíticas, por el microorganismo “blanco”. Otros mecanismos de resistencia incluyen, prevención de captación o consumo de péptidos antimicrobianos por las células, o bien, la modificación de la estructura de membrana de la célula, como respuesta del estrés inducido por la exposición del péptido antimicrobiano.

1.2.3. *Perturbadores de Pared Celular*

Se trata de biomoléculas, capaces de perturbar la pared celular microbiana, que resulta crucial para la supervivencia. Además, dado que estas estructuras no se encuentran en el hombre, intensifica su acción sobre el objetivo, sin causar modificaciones en el huésped.

La modificación de la pared celular bacteriana, es la principal acción inhibitoria de muchos antibióticos comerciales, producidos por la industria farmacéutica. Además de proteínas, también se pueden encontrar enzimas que degraden la pared celular bacteriana, tal como lisozima [16]. La lisozima, hidroliza las uniones glucosídicas $\beta \rightarrow 1,4$, en los polímeros de azúcar N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico. La actividad inhibitoria de esta enzima es mayor, contra bacteria Gram positiva, ya que carecen de membrana externa.

1.3. Leche Cruda

La leche cruda, posee una composición rica en nutrientes y pH neutro, lo que favorece el crecimiento de una amplia variedad de especies microbianas. La flora microbiana en leche cruda, es considerada esencial para las características sensoriales y variedad de quesos tradicionales. Sin embargo, dicha microflora también puede ser responsable de defectos de flavour en productos lácteos, o incluso, podría constituir un riesgo para la salud. Consecuentemente, el contenido microbiano de leche cruda ha disminuido respecto de décadas pasadas [17], y ha reducido el nivel de microorganismos indeseables (flora alterante y potencial patógeno). Sin embargo, el espectro completo de la microbiota ha sido afectado [18]. Muchos quesos madurados son producidos con leche cruda, por lo que es esencial la calidad sanitaria de la materia prima; sin embargo, la microflora natural es también de gran importancia tecnológica en la elaboración de quesos, dado que contribuyen a las características sensoriales por el sabor y aroma que generan [19-21].

La calidad microbiológica de leche cruda, es de gran interés en cuestiones de salud pública, en la prevención de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). Muchos esfuerzos se han realizado en países industrializados para mejorar la calidad sanitaria de leche cruda. Tales avances incluyen, mantenimiento de leche fresca en almacenamiento en frío, desarrollo de procedimientos de limpieza de la ubre y desinfección del pezón, y monitoreo del estado sanitario del rebaño.

Los m.o. de leche cruda pueden provenir de diferentes fuentes, entre ellas, el aire, suelo, hierba, pienso, ubre, equipamiento de ordeño y excrementos [22,23]. Las fuentes de contaminación de la leche cruda, han sido clasificadas en tres tipos: ambiental, que incluye agua, suelo y vegetación; la proveniente del interior de la ubre,

que es con frecuencia un resultado de mastitis (una inflamación de la ubre que puede dar lugar a altos niveles de bacterias); y el equipamiento de ordeño, incluyendo: máquinas de ordeño, tuberías, tanques a granel y cisternas [24]. Posterior al ordeño, la leche es infectada con diferentes tipos de m.o., que se detallan a continuación, en la Tabla 6.1.

Tabla 6.1. Microflora inicial, contaminante de leche cruda [25].

<i>Infección</i>	<i>Fuente</i>
<i>E. coli</i>	Heces
<i>Enterococcus</i>	
<i>Micrococcus</i>	
Esporas de <i>Bacillus</i>	Aire
Esporas de hongos	
Levaduras	
<i>Lactococcus</i>	Equipo de ordeño
<i>Lactobacillus</i>	
Bacilos Gram-negativos	

La microflora dominante en leche cruda, generalmente incluye 1) especies de bacterias ácido lácticas (BAL), *lactococcus* y *lactobacillus* spp., 2) *Pseudomonas* spp., 3) *Micrococcaceae* (*Micrococcus* y *Staphylococcus* spp.) y 4) levaduras. Otros grupos microbianos presentes en leche cruda, perteneciente a BAL (incluyen *Leuconostoc*, *Enterococcus*, y *Streptococcus* spp.), *Bacillus*, *Clostridium*, y *Listeria* spp. y Enterobacteriaceae. Además de otras especies Gram negativos (*Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Cromobacterium*, *Flavobacterium* y *Aeromonas* spp.) y Gram positivos (*Artrobacter*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium*, *Brevibacterium*) [26-30].

Numerosos factores influyen en la composición de la leche, y por lo tanto, en la naturaleza y abundancia de la carga microbiana. Diferentes condiciones de ordeño, y en particular, las prácticas de higiene de los granjeros, tales como el lavado del equipamiento de ordeño, y preparación de la ubre, pre- y post-ordeño, determinaran el espectro de microorganismos presentes en leche cruda, permitiendo mantener una dominancia de los microorganismos útiles en la elaboración de queso [18]. Un informe realizado por Richard [31], indicó que un lavado intensivo del equipamiento de ordeño

y la preparación individual de la ubre, resultó en leche cruda conteniendo mayoría de m.o. alterantes, (tales como, Coliformes y *Pseudomonas* spp). Mientras que por el contrario, una mínima higiene alrededor de la ubre, preserva la flora microbiana, incluyendo flora halotolerante (como son: *Micrococcus*, *Artrobacter*, *Microbacterium*, *Brevibacterium*, y *Staphylococcus* spp.) y también BAL [32], produciendo leche cruda, en la cual los m.o. útiles en la elaboración de queso, son dominantes.

Otro factor que influye la composición microbiana de la leche, es la temperatura de almacenamiento. El uso de la refrigeración a baja temperatura, es una de las estrategias más aplicadas para conservar la leche cruda y los productos lácteos de la descomposición, y mantener la calidad de los mismos. Sin embargo, esto trae como consecuencia la selección de m.o. psicrótrofos. Dichos m.o., son aquellos capaces de crecer a temperaturas cercanas a 0 °C, y representan menos del 10% de la flora inicial de leche cruda, pero se pueden convertir en flora predominante, al permanecer, de uno a tres días bajo condiciones de refrigeración. *Pseudomonas* spp. generalmente, representa entre el 10-15% de la flora psicrótrofa en leche cruda, siendo *P. fluorescens* la especie predominante [33,34]. Las fuentes primarias de *Pseudomonas* spp. son el agua y el suelo [35]. Además este género posee la particularidad de poder formar biofilms, generando una biopelícula que favorece su adherencia (permite colonizar las superficies de los equipos de ordeño y mangueras), y las protege de los agentes desinfectantes [36]. Este género está representado por especies de corto tiempo de generación a 0-7 °C y las más bajas temperaturas de crecimiento mínimo (-10 °C), próximo a la temperatura de crecimiento de psicrófilos. Actividad proteolítica fue detectada cuando se desarrollan entre 2-6 °C y en concentraciones de 10^4 - 10^5 ufc/ml [37]. Producen grandes cantidades de péptidos, aminoácidos y amonio, que son liberados por acción de proteasas y lipasas, lo que estimularía el crecimiento de BAL, en leche [38].

Otros psicrótrofos presentes en leche cruda refrigerada, pertenecen a los géneros *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Listeria*, y *Artrobacter*; *Enterobacteriaceae*, tales como *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundii*, o *Serratia liquefaciens* son también encontrados [39]. Un trabajo realizado por Fricker, y col. [40], reveló que se produjo un cambio en la flora, desde bacterias Gram positivas a Gram negativas, desde el tambo a los tanques de almacenamiento de la industria láctea, en leche cruda.

Los m.o. psicrótrofos, además de su alta velocidad de crecimiento a bajas temperaturas, son sensibles a tratamientos térmicos, tales como pasteurización o tratamiento a ultra alta temperatura (UHT), resultando eliminados, pero las enzimas hidrolíticas producidas por éstos permanecen, ya que resisten altas temperaturas. Entre dichas enzimas extracelulares liberadas, se encuentran: *proteasas*, *lipasas* y *fosfolipasas*, algunas de las cuales son termoresistentes [41-43]. La producción de dichas enzimas, es máxima al final de la fase exponencial y al inicio de la fase estacionaria del crecimiento. Las *lipasas* hidrolizan los acilgliceroles, y son definidas como carboxilesterasas. Aquellas que hidrolizan cadenas de acilgliceroles menores de 10 carbonos, se denominan esterasas o carboxilasas, y son más activas en solución acuosa. Mientras que, las que hidrolizan cadenas acilgliceroles de mayor de 10 carbonos, son lipasas o triacilglicerol acilhidrolasas, y son más activas en la interfase agua-lípido. Muchos microorganismos pueden producir más de un tipo de lipasa extracelular, que causará la hidrólisis de cadenas de ácidos grasos de diferente longitud [44], generando defectos del flavour, asociado a la ruptura de los glóbulos de grasa en crema, manteca, queso, y productos UHT.

La producción de *proteasas* por bacterias psicrótrofas, principalmente de especies de *Pseudomona* spp., es máxima, al final de la fase exponencial y al inicio de la fase estacionaria del crecimiento. Las proteasas, son capaces de degradar las κ -, β - y α_1 caseínas (siendo ésta última la menos susceptible), convirtiéndola en péptidos solubles. Además, tienen una baja actividad sobre las proteínas de suero no desnaturalizadas. Se ha comprobado, que el calor puede causar la pérdida de actividad de las proteasas, a través de tres mecanismos diferentes. Uno, es el desenrollamiento conformacional de proteasas (desnaturalización), otro es la autodigestión de las proteasas, y el último es, la modificación covalente, no enzimática e irreversible (ej. desaminación). Sin embargo, el contenido de iones calcio y de alta concentración de proteínas en leche, pueden estabilizar las proteasas frente a la desnaturalización térmica y autólisis, respectivamente [45].

Diferentes *fosfolipasas* pueden ser producidas por m.o. psicrótrofos Gram positivos y Gram negativos. Éstas, dañan la membrana del glóbulo de grasa, y exponen la grasa para la degradación por lipasas nativas de la leche, resultando en la degradación física de la emulsión en leche [46,47].



La acción de todas estas enzimas, afectan la composición química y nutricional de la leche, generan disminución en los rendimientos para la elaboración de queso y otros productos lácteos. Además, los productos de degradación, generan efectos indeseables en el sabor y aroma, disminuyendo la calidad e inocuidad de la leche. Las lipasas, son de mayor importancia que las proteasas, en el desarrollo de defectos de flavor durante la elaboración de quesos, debido a que las proteasas son solubles en agua y se pierden con el suero, mientras que las lipasas son absorbidas en el glóbulo de grasa y son retenidos en la masa. La actividad de las proteasas en leche y productos lácteos, es relacionada a defectos como: amargo, sucio, agrio, pútrido. La lipólisis contribuye a sabores indeseables en estadios avanzados de hidrólisis, en leche y productos lácteos.

1.4. Métodos para Determinar la Microflora Bacteriana en Leche Cruda

La metodología clásica empleada para determinar la comunidad bacteriana de leche cruda, es generalmente lenta, tediosa, y permite identificar parcialmente la microflora bacteriana. Nuevas técnicas moleculares, basadas en análisis directo de ADN o ARN, en su ambiente (sin enriquecimiento microbiano), han permitido una descripción más precisa, de la dinámica microbiana en ecosistemas complejos. Los métodos más desarrollados son polimorfismo conformacional de simple hebra [48,49], electroforesis en gel desnaturizante en gradiente (DGGE) [50,51], electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE) [52,53], y electroforesis en gel de temperatura temporal (TTGE) [54,55]. En todos estos métodos, se extrae el ADN (o ARN) directamente de la muestra, y luego una zona correspondiente a los genes 16S o 28S de ARNr, es amplificado por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La separación durante electroforesis, se basa en la variación de nucleótidos dentro de las secuencias conservadas. En un estudio realizado por Lafarge, y col. [56], emplearon DGGE y TTGE para determinar la evolución de la comunidad bacteriana en leche cruda, posterior a la conservación a 4 °C durante 24 h. Incluso, esta técnica les permitió detectar la aparición de la bacteria psicrótrófa *Listeria* spp. en tan solo tres días, que constituye un problema para la industria láctea, particularmente en quesos de leche cruda. Machado y col. [57], desarrollaron un método alternativo de PCR, para detectar bacteria psicrótrófa proteolítica en leche cruda, diseñando cebadores específicos para los genes que codifican para proteasas de *Acinetobacter* spp., *P. fluorescens*,

Aeromonas hidrófila y *Serratia marcescens*, a través de PCR múltiple. Estos métodos moleculares, permiten un importante avance en la detección de la flora alterante y patógena, constituyendo así una nueva herramienta para reducir las modificaciones en la calidad nutricional y microbiológica, en los productos lácteos.

1.5. *Preservación de la Calidad Microbiológica y Nutricional de la Leche*

Como fue anteriormente mencionado, debido al desarrollo de m.o. patógenos y alterantes, a la generación de enzimas hidrolíticas, y a las consecuencias que generan en la calidad del producto, es imprescindible el control de la calidad microbiológica de leche y productos lácteos. Principalmente, el control de la carga bacteriana en leche cruda es muy importante para la salud pública [58], sobre todo cuando los agentes patógenos transmitidos por alimentos en la leche pueden sobrevivir y crecer a temperatura de refrigeración. El crecimiento de m.o. psicrótrofos alterantes durante un periodo prolongado de refrigeración, puede resultar en la pérdida o reducción de la calidad de la leche, o bien, en un producto finalmente en mal estado.

Todas las razones anteriormente mencionadas, indican la relevancia de la detección y el control de microorganismos, especialmente psicrótrofos y sus enzimas resistentes al calor, cobrando gran importancia y siendo ésta, una de las principales preocupaciones en la industria láctea.

Un método alternativo para reducir las posibilidades de contaminación microbiana y oxidación química, manteniendo la calidad de la leche, es la adición de compuestos naturales. Existen numerosos estudios, que demuestran el efecto benéfico de la adición de compuestos con capacidad antimicrobiana [59-63].

Los CAR son importantes compuestos naturales y ampliamente conocidos AOx, que desactivan EROS como ha sido demostrado en los Capítulos 4 y 5, protegiendo así a compuestos biológicos de la acción dañina de las mismas [64-67]. Sin embargo, poco se sabe acerca de que si poseen AAM.

Se han encontrado investigaciones sobre la AAM de los CAR, bix y norbixina. Gutierrez y col. [68], realizaron estudios sobre *Bixa orellana* L. Ésta es una especie de planta arborecente, de las regiones intertropicales de América. De sus semillas, se extrae un pigmento localizado en la superficie, rico en CAR, especialmente apocarotenos como la bix, isobixina, norbixina, y también, otros como BC,

criptoxantina, luteína y zeaxantina. Entre otras propiedades benéficas, fue comprobada su acción antimicrobiana, principalmente frente a bacterias Gram positivas, tales como *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus termófilus*, y *Listeria monocytógenes*, entre otros, aunque en menor medida, también frente a Gram negativas. Dicha capacidad, es dependiente de las concentraciones empleadas, y se cree que los responsables son la 9'-*cis*-norbixina y *trans*-norbixina. Adicionalmente, Fleischera y col. [69], comprobaron que los extractos etanólicos de hojas y semillas de *Bixa Orellana L*, presentaron AAM frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas (*B. subtilis*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. typhi*, *P. aeruginosa*, *E. coli*) y la levadura *C. albicans*. Dicho efecto fue mayor en los extractos de hojas.

En los últimos años, se ha observado un lento avance en la investigación de la AAM de extractos CAR. Priya y Maheswari [70], determinaron un amplio espectro de AAM de extractos metanólicos de CAR en residuos de pollos, frente a *E. coli*, *B. subtilis* y *S. cerevisiae*, aunque no observaron efecto de inhibición frente a *Aspergillus niger* y *A. flavus*. En otro estudio, la mejora en la AAM del extracto de zanahoria, constituido en su mayoría por el pigmento BC, sobre el sistema Lactoperoxidasa bovina frente a *Salmonella enteritidis*, comprobado por Hayashi y col. [71], demuestran la acción benéfica del empleo de BC como antibacteriano.

Los CAR químicamente son tetraterpenoides, compuestos de 40 átomos de carbono, constituido por ocho unidades isoprenoides unidas, formando un extenso sistema de dobles enlaces conjugados, que les confiere sus propiedades liposolubles [72]. Para poder adicionarlos en matrices alimenticias acuosas y emplearlos como nutracéuticos, debido a su estructura química altamente reactiva e hidrofóbica, una manera eficaz de estabilizarlos y solubilizarlos, es la microencapsulación con biopolímeros. Comúnmente para su adición en alimentos, se utilizan polisacáridos comestibles, tales como GA, MD, etc. generando a través de un proceso de microencapsulación, una pared que recubre y protege al carotenoide [73].

La hipótesis que se plantea en el presente estudio, indica que la aplicación de sustancias naturales con propiedades antimicrobiana y AAO, tales como BC y GA, pueden proveer una nueva estrategia para controlar el deterioro causado por bacterias alterantes y psicrótrofas, además de eliminar o reducir especies oxidantes, mejorando la calidad y seguridad del alimento.

2. OBJETIVOS

Los objetivos a alcanzar en el presente capítulo son:

- Determinar la actividad antimicrobiana de los compuestos CAR puros y de GA como material de pared.
- Evaluar el efecto de microencapsulación, comparando la AAM de los CAR microencapsulados, respecto de la cápsula vacía.
- Estudiar el efecto protector de la adición de CAR microencapsulados, sobre el desarrollo de m.o. psicrótrofos y productor de off-flavor, en leche.

Específicamente se propone:

- Evaluar efecto de la microencapsulación, comparando la AAM de Bc-GA y Apo8-GA, respecto de las microcápsulas vacías de GA.
- Evaluar la AAM de Bc-GA y la cápsula vacía, adicionados en leche, frente a cepas ATCC de *Bacillus subtilis*, y *Pseudomona aeruginosa*, en leche.
- Aislar m.o. psicrótrofos y mesófilos, capaces de crecer en leche cruda, e identificarlos a través de métodos convencionales y moleculares.
- Determinar de la AAM de Bc-GA y la cápsula vacía, en leche, frente a m.o. aislados de leche cruda.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Carotenoides

Se emplearon los compuestos CAR: BC y licopeno (Lic) purificados de fuentes naturales de acuerdo al método propuesto por Montenegro y col. [65], 8'apo- β -carotenal (Apo8), 12'apo- β -carotenal (Apo12), fueron gentilmente donados por DSM Nutritional Products (Basel, Switzerland). Cantaxantina (β -Caroteno-4,4'-diona) (Canta) de Fluka, Astaxantina (3,3'-Dihidroxi- β , β -caroteno-4,4'-diona) (Asta) de Sigma, bixina (metil hidrógeno 9'Z-6,6'-diapocaroten-6,6'dioato) (Bix) (99% de pureza) fue gentilmente donada por Dr. Werner Simon de Vitaminas Roche (Basel, Switzerland) y vitamina A (Vit A) hidrodispersable (acetato de retinilo) de Sigma-Aldrich, como un metabolito de carotenoides.

Los CAR, BC, Apo8 y Apo12 fueron microencapsulados en GA, de acuerdo a la metodología presentada en el Capítulo 4 de esta tesis.

3.2. Reactivos

GA (PM=3,5x10⁵ g/mol) grado alimentario, de Colloides Naturels Brasil (San Pablo, Brasil). Solventes para disolución de CAR: hexano, cloroformo y metanol, grado HPLC de Sintorgan, Argentina.

3.3. Medios de Cultivo

Medio de cultivo para difusión en agar: Agar Müller-Hinton (MH).

Medio específico de crecimiento: Agar Cetrimide (AC) para *Pseudomona* spp., Agar glucosa-peptona de caseína (AGP) para *Bacillus subtilis* Agar KF para Cocos Gram positivos (*Enterococcus* y *Streptococcus*).

Medio para aislamiento: Agar de Recuento total (ART).

Medio líquido: Caldo nutritivo (CN).

Solución diluyente: agua peptonada 0,1%.

3.3.1. Composición de Medios de Cultivos

- Agar Müller-Hinton (g/l). Britania, Argentina

Infusión de carne	300,0
Peptona ácida de caseína	17,5
Almidón	1,5
Agar	15,0

- Cetrimida Agar Base (g/l). Britania, Argentina

Peptona de gelatina	20,0
Cloruro de magnesio	1,4
Sulfato de Potasio	10,0
Agar	13,6
Cetrimida	0,3

- Agar glucosa-peptona de caseína (AGP)

Peptona de caseína	10,0
Glucosa	5,0

Púrpura de bromocresol	0,04
Agar	12,0
▪ KF Streptococcus Agar Base (g/l). Oxoid	
Proteosa peptona	10,0
Extracto de levadura	10,0
Cloruro de sodio	5,0
Glicerofosfato de sodio	10,0
Maltosa	20,0
Lactosa	1,0
Azida de sodio	0,4
Púrpura de Bromocresol	0,015
Agar	20,0
▪ Agar de Recuento total (g/l). Britania, Argentina	
Extracto de levadura	2,5
Tripteína	5,0
Glucosa	1,0
Agar	15,0
▪ Caldo nutritivo (g/l). Britania, Argentina	
Peptona de carne	5,0
Extracto de carne	3,0
▪ Agua peptonada (g/l). Britania, Argentina.	
Peptona de carne	10,0
Cloruro de soido	5,0

3.4. Microorganismos de Referencia

Pseudomona aeruginosa (Ps), cepa ATCC 27853 y *Bacillus subtilis* (Bs), cepa ATCC 6633, *Micrococcus luteus* (Mc), cepa ATCC 9341.

3.5. Aislamiento y Caracterización de Microorganismos de Leche Cruda

Con el objetivo de evaluar la AAM de CAR MC, frente a m.o. capaces de crecer en leche, se realizaron los pasos necesarios para obtener cultivos puros de m.o. aislados de leche cruda.

El aislamiento de los m.o. a partir de leche cruda (almacenada a 4 °C inmediatamente posterior al ordeño), se realizó a través de siembra en profundidad de una dilución 10^{-2} de la muestra, empleando ART y medios selectivos como AC y AGP. Las placas fueron incubadas a 37 °C por 48 h (mesófilo) y a 4 °C durante 10 días (psicrótrofo). Cultivos puros fueron obtenidos tras sucesivos repiques en ART. Para la purificación de algunas cepas, se empleó la adición de una solución 0,1% de tween 20 estéril (agente dispersante), en solución diluyente, y diluciones seriadas de un cultivo contaminado, permitió obtener colonias aisladas y separar el m.o. de interés, de uno contaminante.

Se realizó además la caracterización morfológica y bioquímica preliminar de los aislamientos obtenidos mediante tinción de Gram, pruebas de la catalasa y oxidasa, y pruebas bioquímicas (oxidación o fermentación de diferentes azúcares, enterotest, crecimiento en medios selectivos y diferenciales). Ciertas cepas de interés fueron seleccionadas, para continuar con su caracterización genotípica.

3.5.1. Caracterización Genotípica de los Aislamientos

La extracción de ADN genómico de los aislamientos seleccionados se llevó a cabo a partir de cultivos en fase exponencial tardía crecidos en CN, empleando el kit comercial Wizard Genomic DNA-Purification Kit (Promega, USA) según las especificaciones del fabricante. El ADN obtenido se empleó como templado para la realización de los ensayos de biología molecular llevados a cabo en este estudio.

3.5.1.1. Amplificación y Secuenciación del Gen 16S ARNr

Se realizó la identificación genotípica mediante amplificación y secuenciación del gen marcador molecular 16S ARNr. La región de interés se amplificó, a partir del ADN templado, empleando los cebadores universales 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492r (5'-TACGGYTACCTTGT TACGACTT-3') [74]. Los productos de PCR fueron precipitados y purificados (DNA Clean and

Concentrator-5, Zymo Research, USA) y posteriormente, fueron enviados para su secuenciación, en el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA Castelar, Buenos Aires, Argentina). Los electroferogramas obtenidos, se analizaron y editaron manualmente con el software (BioEdit Sequence Alignment Editor) para obtener las secuencias completas (1300-1500 pb) del gen *16S* ARNr. Se analizaron las secuencias del gen *16S* ARNr, con el objetivo de determinar el género y la especie más cercana, empleando: la base de datos del Ribosomal Data Project (RDP) utilidad SeqMatch [75], y también, Basic Local Alignment Search tool (BLAST) [76]. Los análisis fueron además, respaldados con el sitio List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) [77].

3.6. Determinación de Actividad Antimicrobiana por Difusión en Agar

Para evaluar la AAM de CAR puros, del material de pared y de los CAR MC en polímeros comestibles, se empleó el método de difusión radial en medio agarizado, según recomendaciones del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) [78], basada en el método de Kirby-Bauer [79]. Este método se basa, en que el compuesto en estudio, difundirá en el medio agarizado, produciendo un gradiente de concentración, de modo que si el compuesto es efectivo contra el m.o. probado, se formará una zona de inhibición alrededor del disco embebido. El tamaño de la zona de inhibición del crecimiento, proporciona indicios de la relativa sensibilidad del m.o. frente a dicho compuesto.

Para esta determinación se emplearon 3 microorganismos de referencia: *Ps*, *Bs*, y *Mc*, que fueron conservados suplementados con glicerol estéril (concentración final 40 % v/v), en criotubos a -20 °C. Para la activación de las cepas, se prepararon suspensiones de cada una de ellas en CN, y se incubaron a 37 °C hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento.

Para la preparación del inóculo, se tomó una ansada de la bacteria en estudio (previamente activada), y se suspendió en una porción de CN hasta lograr una turbidez comparable al patrón de turbidez 0,5 de la escala Mc Farland. De este inóculo, se tomó una alícuota de 100 µl, que corresponde a 1×10^8 unidades formadoras de colonias/ml (UFC/ml), y se colocó en la placa estéril conteniendo 15 ml de agar MH solidificado. Para la correcta distribución del inóculo, se empleó un hisopo estéril, efectuando un

barrido del inóculo por toda la superficie del agar, rotando la placa aproximadamente 60° para asegurar una distribución pareja del inóculo. A continuación, se esperan 3 a 5 minutos, pero no más de 15, para que la superficie del agar se seque, y se colocaron en cada placa, con la ayuda de una pinza estéril, y ejerciendo una ligera presión sobre la superficie del medio, 3 discos embebidos con 20 µl de soluciones de CAR puros, biopolímero GA y CAR MC. A los 15 minutos posterior de aplicados los discos, comenzó la incubación, a 32 °C durante 24 h, al cabo de las cuales, se leyeron los resultados. Se midió cuidadosamente la zona de inhibición completa alrededor del disco, mediante calibre con un error de $\pm 0,02$ mm, incluyendo el diámetro del disco. Por lo tanto, un diámetro de 5 mm corresponde a ausencia de inhibición del crecimiento microbiano.

Las categorías de susceptibilidad antimicrobiana reconocidas por el Comité de Estandarización de Laboratorios Clínicos (ex NCCLS, hoy denominado CLSI) [80], son las siguientes: susceptible, moderadamente susceptible y resistente. Para el procedimiento de difusión en discos, existe una categoría adicional, denominada intermedia, que sirve como regulador o intermediario entre las categorías moderadamente susceptible y resistente.

Los experimentos fueron realizados por triplicado, en cabina de seguridad microbiológica. Todos los materiales empleados fueron esterilizados previamente. Se realizaron controles negativos y positivo con solventes orgánicos y con el antibiótico sulfato de polimixina, respectivamente. Se determinó la AAM frente a los microorganismos de referencia: *Ps*, *Bs* y *Mc*.

3.6.1. Actividad Antimicrobiana de Carotenoides Puros

Se determinó, mediante el método de difusión en agar, la capacidad antimicrobiana de los CAR puros: Bc, Apo8, Apo12, Lic, Canta, Asta, Bix y Vit A. Para ello, los CAR fueron disueltos en solventes orgánicos, empleando hexano para: Bc, Apo8, Apo12, Lic, Cant, Asta, para Bix se utilizó cloroformo y metanol para Vit A. Se analizaron concentraciones de CAR en el rango de 1 a 50 µM, las que fueron determinadas por espectroscopia UV-Visible de acuerdo a las absortividades molares reportadas por Davies [81].

3.6.2. Actividad Antimicrobiana de Carotenoides Microencapsulados

Para evaluar el efecto del proceso de microencapsulación, se estudió la AAM de los CAR, Bc y Apo8, microencapsulados en GA (Bc-GA, Apo8-GA, respectivamente), la microcápsula vacía (GA) y la GA sin microencapsular (GA-P).

Se evaluó particularmente, la AAM de Apo8 y BC, dado que son colorantes permitidos en el Código Alimentario Argentino [82], y ampliamente utilizados en la industria. Se prepararon las soluciones de cada compuesto en agua destilada estéril, de modo de obtener concentraciones de 5, 10 y 20 μM del CAR. Se adicionaron 20 μL de cada una de las disoluciones, sobre discos de papel de filtro de 5 mm de diámetro, los cuales fueron aplicados sobre placas de agar MH, previamente inoculada con la cepa de interés. Las placas fueron incubadas durante 24 h a 32 °C. Posteriormente, se midieron los diámetros de las zonas de inhibición.

3.7. Determinación Actividad Antimicrobiana por Reducción de la Velocidad de Crecimiento Microbiano

La velocidad de crecimiento microbiano (μ), con o sin agregado de microencapsulados, se determinó a la temperatura óptima de cada m.o., empleando la técnica de recuento en placa, a través de siembra en profundidad.

A partir de un inóculo *overnight* en CN de cada m.o., se preparó un inóculo general, en un frasco con caldo estéril o leche reconstituída, ajustando la concentración a una absorbancia de 0,002 a 600 nm, que equivale a 10^6 ufc/ml. De esta manera, se logra que el inóculo inicial sea exactamente el mismo en la muestra con y sin antimicrobiano. Posteriormente se divide en porciones iguales, a las que se adicionan los compuestos GA y Bc-GA, en cantidades previamente pesadas para obtener concentraciones finales de 0,34, 1,37 y 6,85 mg/ml, correspondiente a 10, 25 y 50 μM de Bc-GA, y los pesos equivalentes de GA. Las muestras fueron incubadas a 37 °C durante 30 h para m.o. mesófilos (*Bs* y *Mc*), y a 4 °C, entre 7-10 días para psicrótrofos (*Ps*, y aislados de leche cruda).

Se realizó el recuento de microorganismos en placa, a través de la técnica de siembra en profundidad [83]. Para ello, se toma una alícuota de cada muestra a diferentes intervalos de tiempo, y tras diluciones seriadas en agua peptonada estéril (0,1%), se coloca 0,1 ml en una placa estéril, a la que luego se adiciona 12 ml del agar

correspondiente. Las placas fueron incubadas 48 h a 37 °C. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada microorganismo, y las siembras fueron realizadas en cabina de seguridad microbiológica. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realizó el recuento microbiano de las placas que presentaron entre 30-300 colonias, de cada una de las muestras, para determinar si ejerce efecto antimicrobiano la adición del microencapsulado. Los resultados se expresan como UFC/ml.

La μ , (h^{-1}) con o sin el agregado del microencapsulado, fue determinada de la pendiente de la porción lineal (fase exponencial), de las curvas de crecimiento del m.o. El porcentaje de reducción del crecimiento microbiano (%R), fue calculado a través de la ecuación 1:

$$\%R = \frac{\mu - \mu^{MC}}{\mu} \times 100 \quad (1)$$

Donde μ y μ^{MC} , son las velocidades de crecimiento bacteriano en ausencia y presencia del microencapsulado, respectivamente.

3.7.1. Actividad Antimicrobiana de Carotenoides Microencapsulados Frente a Cepas de Referencia en Caldo Nutritivo

Se determinó el efecto protector de la adición de CAR MC, sobre la alteración nutricional causada por el desarrollo de un m.o. psicrótrofo *Ps*, y otro productor de off-flavour *Bs*. Para tal efecto, se determinó la velocidad de crecimiento de cada m.o., empleando la técnica de recuento microbiano, con y sin adición de los CAR MC, en particular Bc-GA y la cápsula vacía, GA, en una concentración equivalente a Bc-GA. Se realizó la siembra en profundidad en agar AGP para *Bs*, y AC para *Ps*, a determinados intervalos de tiempo. Las placas se incubaron durante 48 h a 32 °C. Luego, se realizó el recuento en UFC/ml y se determinó la μ de cada tratamiento.

3.7.2. Actividad Antimicrobiana de Carotenoides Microencapsulados, Frente a Cepas de Referencia en Leche

Se estudió AAM de CAR MC, frente al crecimiento de los microorganismos *Ps* y *Bs*, determinando la μ , con y sin adición de los microencapsulados en leche en polvo



reconstituida, empleando la técnica de recuento microbiano, anteriormente descrita. Se analizó si ejerce algún efecto el medio de crecimiento, comparándolo con las curvas realizadas en CN.

3.8. *Actividad Antimicrobiana de Carotenoides Microencapsulados, frente a Microorganismos Aislados, en Leche*

Se evaluó AAM de CAR MC, específicamente BcGA y su peso equivalente de GA, en las concentraciones finales de 10, 25 y 50 μM de Bc, frente al crecimiento de los m.o. aislados e identificados, en leche. Se determinó la μ , con y sin adición de los microencapsulados en leche en polvo reconstituida almacenada a 4 °C durante 7 días, empleando la técnica de recuento microbiano, anteriormente descrita. Se comparó la μ de cada m.o., con y sin adición de las MC, para determinar si poseen AAM.

3.9. *Análisis Estadístico de los Resultados*

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente, empleando el software Statgraphics Centurion XV.II, mediante análisis de la varianza ANOVA multifactorial, con el objetivo de comparar si los factores tiempo y concentración de antimicrobiano adicionado, tienen un efecto estadísticamente significativo sobre los valores, con un nivel de significancia del 95,0 %. También se realizó comparación de varias muestras, para determinar si hay o no, diferencias significativas entre las medias de dos o más muestras independientes de datos variables.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. *Aislamiento y Caracterización de Microorganismos de Leche Cruda.*

Con el objetivo de evaluar la AAM de GA y Bc-GA frente a m.o. que pueden desarrollarse en leche almacenada a 4 °C, se realizó el aislamiento e identificación de m.o. capaces de crecer en dicho medio, a partir de muestras de leche cruda.

De los m.o. que se desarrollaron en diferentes medios a 4 °C (psicrótrofos) y 37 °C, fueron aisladas y purificadas 13 cepas, siguiendo la metodología y pasos anteriormente detallados. A partir de los cultivos puros, las cepas fueron identificadas en base a la morfología de colonia, tinción de Gram, y pruebas bioquímicas, tales como:

catalasa, oxidasa, oxidación o fermentación de diferentes azúcares, crecimiento en medios selectivos y diferenciales, y formación de esporas, para una primera clasificación, Tabla 6.2.

Tabla 6.2. Pruebas de Identificación de m.o. aislados de leche cruda.

Cepas	Morfología	Gram	Catalasa	Oxidasa	Medios*
1	Bacilo (cadena)	(+)	+	+	AGP(NV)
2	Bacilo (cadena)	(+)	+	-	AGP(NV)
3	Bacilo	(+)	+	+	AGP(NV)
4	Bacilo	(+)	+	-	-
5	Bacilo	(-)	+	-	AGP (NV)
6	Bacilo	(-)	+	-	
7	Bacilo	(-)	+	+	AGP (V)
8	Bacilo	(-)	+	-	AGP (V)
9	Pleomórfico	(+)	+	-	
10	Bacilo	(-)	+	-	AGP (V)
11	Bacilo	(-)	+	+	Cetri (V)
12	coco	(+)	-	-	KF (V)
13	coco	(+)	-	-	KF (V)

*Medios: AGP (NV): Crece glucosa-peptona-No vira; AGP (V): Crece glucosa-peptona-Vira, Cetri (V): Agar Cetrimide (Vira); KF: Agar KF para Streptococcus.

Entre las cepas aisladas, se encuentran **bacilos Gram negativos, catalasa-positivos**, que son los agentes más importantes en el deterioro de los alimentos y al mismo tiempo, los patógenos más relevantes de origen entérico transmitidos por alimentos. También se han aislado cuatro **bacilos Gram positivos catalasa-positivos**, todos ellos formadores de esporas. El género más común, es *Bacillus*, agente causal de alteración de alimentos sometidos a calentamiento. Finalmente, dos **Cocos catalasa-negativos** han sido aislados. Dentro de este grupo, se encuentran los géneros *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Aerococcus*.

De todas las cepas aisladas y caracterizadas, fueron seleccionadas las cepas: 2, 4, 9, 10, 11 y 13, en función de su morfología, de manera de cubrir un amplio espectro microbiano, para ser identificadas genotípicamente por PCR, y finalmente, evaluar si la adición de GA y Bc-GA, ejerce AAM sobre su desarrollo en leche a 4 °C.

Para arribar a la identificación de género se empleó la base de datos RDP (a través de sus aplicaciones Classifier y Seqmatch), tal como fue descrito en Materiales

y Métodos. Los principales resultados de la identificación molecular de los aislamientos y el porcentaje de identidad con la secuencia homóloga de la cepa tipo más relacionada (Utilidad Seqmatch), se muestran en Tabla 6.3.

Tabla 6.3. Identificación de aislamientos de leche cruda

Cepa	Longitud Secuencia analizada (pb)	Identificación taxonómica	Especie más relacionada (N° de acceso)	Identidad (%)
2	1298	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Bacillus subtilis</i> (CICC10034; AY881640)	99,4
4	1311	<i>Gordonia</i> spp. (GO)	<i>Gordonia rubripertincus</i> (AGP1-3,AY277554)	99,0
9	1313	<i>Cellulosimicrobium</i> spp. (CM)	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i> (AS 4.1333, AY114178)	99,1
10	1312	<i>Enterobacter</i> spp. (EB)	<i>Pantoea agglomerans</i> (WAB 1870, AM184212)	98,5
11	1339	<i>Pseudomona</i> spp. (Ps)	<i>Pseudomona aeruginosa</i> (R6-357, JQ659816)	100,0
13	1340	<i>Enterococcus</i> spp. (EC)	<i>Enterococcus faecium</i> (ATTC-27273, EU547780)	99,3

Según la utilidad Classifier de la base de datos RDP, todas las cepas aisladas pertenecen al dominio bacteria. La cepa 2 y 13, fueron clasificados en el phylum Firmicutes, los aislamientos 9 y 14 pertenece al phylum Actinobacteria, mientras que la cepa 10 y 11, corresponde al phylum Proteobacteria. De estos, el aislamiento de la cepa 2, pertenece a clase Bacilli, orden Bacillales, familia Bacillaceae, género *Bacillus* y fue específicamente identificado como *Bacillus* spp., con alta probabilidad de corresponder a la especie *Bacillus subtilis* (N° de acceso: CICC10034; AY881640) con un 99,4% de similitud. La cepa 4, fue clasificada como perteneciente a clase Actinobacteria, subclase Actinobacteridae, orden Actinomicetales, suborden Corinebacterineae, familia Nocardiaceae, género *Gordonia*, identificado como *Gordonia* spp., con una alta probabilidad de corresponder a la especie *Gordonia Rubripertincus* (N° de acceso: AGP1-3, AY277554), con un 99.0% de similitud. La clasificación de la cepa 9, pertenece a clase Actinobacteria, subclase Actinobacteridae, orden Actinomicetales,

suborden Micrococcineae, familia Promicromonosporaceae, y género *Cellulosimicrobium*, y fue identificado como *Cellulosimicrobium* spp., con una alta probabilidad de corresponder a la especie *C. cellulans* (N° de acceso: AS 4.1333, AY114178), con un 99,1% de similitud.

El aislamiento de la cepa 10, pertenece a la clase de Gammaproteobacteria, orden Enterobacteriales, familia Enterobacteriaceae, y género *Enterobacter*, siendo identificado como *Enterobacter* spp., con una alta probabilidad de corresponder a la especie *Pantoea agglomerans* (N° de acceso: WAB 1870, AM184212), con un 98,5% de similitud. La cepa 11, corresponde a la clase Gammaproteobacteria, orden Pseudomonadales, familia Pseudomonadaceae, y género *Pseudomona*, fue identificado como *Pseudomona* spp., siendo la especie más relacionada *Pseudomonas aeruginosa* (N° de acceso: R6-357, JQ659816), con un 100,0% de similitud. Por último, el aislamiento correspondiente a la cepa 13, pertenece a la clase Bacilli, orden Lactobacillales, familia Enterococcaceae, género *Enterococcus*. Ésta fue identificada como la *Enterococcus* spp., siendo la especie más relacionada *Enterococcus faecium* (N° de acceso: ATTC-27273, EU547780), con una similitud de 99,3%.

EN son típicas BAL, que forman parte de la flora normal de humanos y animales de producción. *E. faecalis* y *E. faecium*, son las especies más frecuentes en el intestino humano. También se encuentran en un alto número en animales de producción como de aves de corral, ganado vacuno, y cerdos. En concordancia con su amplia distribución en el tracto intestinal de animales, es su presencia en muchos alimentos, especialmente los de origen animal. Es por ello, que la detección de dichas especies, era a menudo utilizado como indicativo de contaminación fecal de alimentos [84]. Sin embargo, un estudio realizado por Gelsomino y col. [85] demostró que no existía ninguna relación clonal entre los enterococos aislados a partir de heces de vaca, respecto de los leche cruda, en tres ocasiones separadas en el mismo tambo. Sino que los enterococos presentes en la leche provenían de la maquinaria de ordeño [86].

Las características de los enterococos que permiten identificarlos, es que son cocos Gram positivos, catalasa-negativo. A través de la confirmación de grupo serológico D, según la clasificación de Lancefield, se puede diferenciarlos de *Streptococcus*, entre otras pruebas, por su desarrollo en medio NaCl 6,5% y a 10 °C [87]. Se caracterizan por ser fuertemente resistentes a antibióticos, especialmente

glicopéptidos como vancomicina y teicoplanina [88]. Además, diversas investigaciones han demostrado la presencia de enterococos vancomicina resistentes, en alimentos de origen animal [89,90].

Diversos estudios demuestran la presencia de *Bacillus* en leche. Uno de ellos, es el de Phillips y Griffiths [91], que informaron que el 86% de las bacterias resistentes al calor, aisladas de leche cruda fueron especies de *Bacillus*. En numerosos trabajos de investigación, han sido aislados diversas especies de *Bacillus* de leche, incluyendo *B. brevis*, *B. circulans*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. micoides*, *B. polymixa*, *B. pumilus*, *B. turingiensis* [92]. Además de especies patógenas, como *B. cereus*, que pueden causar intoxicación o ETA [25]. *Bacillus subtilis*, es una bacteria Gram positiva, aerobia, autóctona del suelo que prospera en la naturaleza, en la que se encuentra distribuido en una gran variedad de hábitats. Es un microorganismo mesófilo (amplio rango de 15 °C a 55 °C), que tiene la capacidad de esporular frente a diversos factores de estrés, que le permiten tolerar condiciones ambientales extremas, pudiendo sobrevivir (en forma de spora) a tratamientos térmicos y generar, enzimas lipolíticas productoras de off-flavor, por lo que se considera de interés su recuento.

Las especies de *GO*, han sido aisladas de diferentes biotopos nativos, tales como suelo o rizosfera manglar, desde hábitats extensivamente industrializados, como pozos productores de petróleo o suelos contaminados con hidrocarburos, a partir de fuentes artificiales como biorreactores para el tratamiento de aguas residuales o biofiltros, y también de seres humanos enfermos. Si bien *Gordonia* spp. no es una bacteria comúnmente encontrada en leche, ha sido aislada de leche cruda almacenada a 20 °C y pH 7,0, por Mallet y col [93], la especie *Gordonia bronchialis*.

El género *Gordonia*, pertenece filogenéticamente al suborden Corinebacterineae, en el grupo de ácidos micólicos, dentro del orden Actinomycetales [94]. Sin embargo, su clasificación ha cambiado drásticamente los últimos años, con numerosas especies que son reclasificadas, y nuevas especies descritas. Los miembros de este género, se caracterizan por ser: aeróbicas, catalasa-positivo, varían de Gram positivo a Gram variable, ligeramente ácido alcohol resistentes, no-móviles, Poseen metabolismo oxidativo y son arilsulfatasa negativo, susceptibles a lisozima, no forman esporas. La cepa de *GO* aislada, presentó colonias redondas, cremosas y con pigmentación anaranjada.

La cepa 9, corresponde a *Cellulosimicrobium* spp. Este género fue propuesto por Schuman y col. [95]. Se caracteriza por ser Gram positivo, pleomórfico, carente de esporas y cápsula, cuya colonia es de pequeño diámetro y de color amarillo [96]. Sin embargo, no hay bibliografía que demuestre que dicho microorganismo ha sido encontrado en leche.

Enterobacter spp. ha sido informado como bacteria psicrótrófa, que puede desarrollarse en alimentos refrigerados, tales como como leche, carne, y pescado, incluso llegando a recuentos superiores a 10^7 ufc/g, causando el deterioro de los alimentos [97-99]. Un estudio realizado por Lindberg y col. [100], demostraron que *Enterobacteriaceae* se encuentra en grandes números, después de almacenamiento a 7 °C en el 6% de las muestras de leche en caja pasteurizada, en el 31% del pescado vendido al por menor y en el 100% de los paquetes de la carne picada. El crecimiento de éstos m.o. representa un potencial peligro para la salud de los consumidores, debido no solo a la alteración que pueden causar del alimento, sino principalmente a la producción y liberación de potentes toxinas entéricas. *Pantoea agglomerans* es un bacilo Gram negativo, que causa fundamentalmente infecciones nosocomiales, aunque también se han descrito casos de meningitis neonatal y de artritis séptica [101]. Puede crecer en medios ricos en glucosa, por lo que ocasionalmente produce infecciones relacionadas con la infusión intravenosa de sueros, que pueden originar brotes de bacteriemia en los hospitales [102].

4.2. Actividad Antimicrobiana de Carotenoides Puros

En este ensayo se determinó la inhibición de crecimiento bacteriano que ejercen los CAR puros frente a los m.o. *Bs*, *Mc*, y *Ps*.

La Figura 6.1 (A) muestra, la AAM de los CAR puros frente a *Bs*. Se observa el siguiente orden decreciente en AAM: Bix, Vit A, Bc y Apo8, la cual aumenta con las concentraciones. Apo12, comienza a ejercer AAM partir de 25 μ M. Mientras que Asta y Lic, carecen de actividad frente a este m.o.

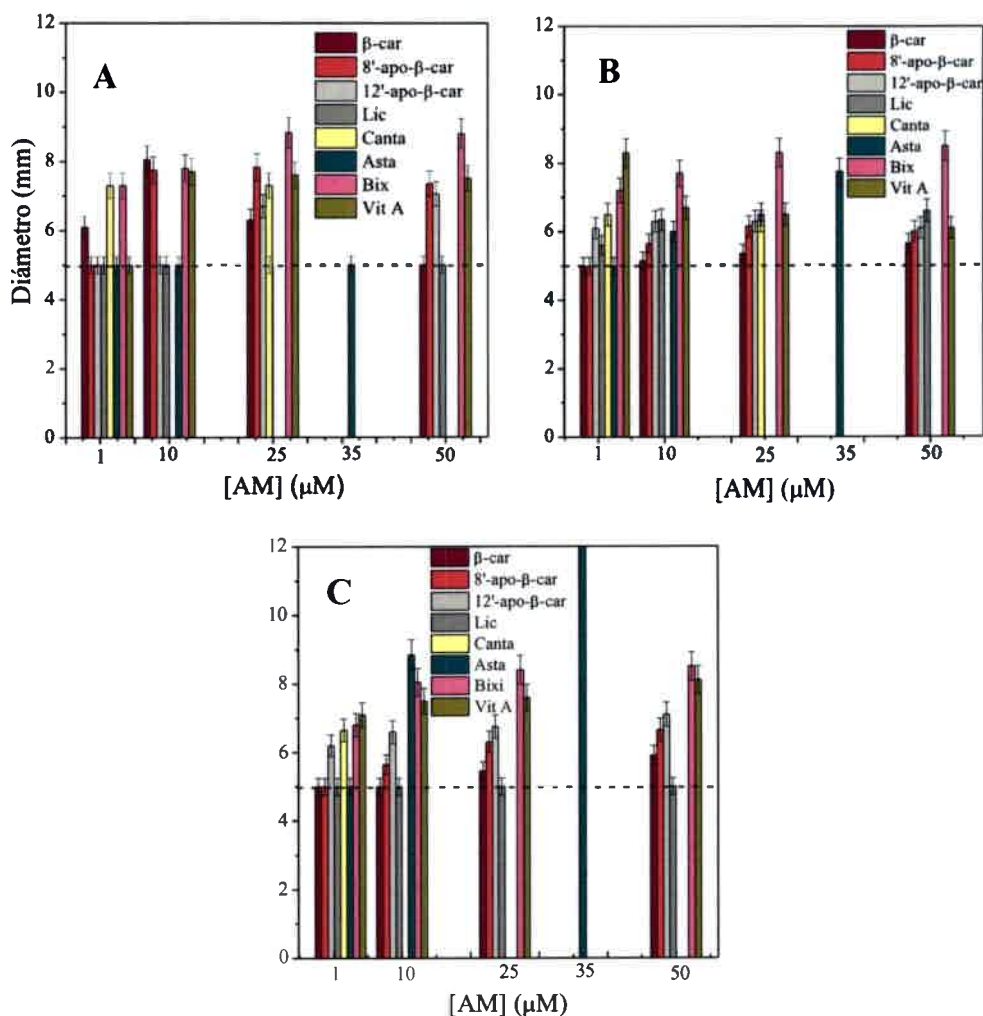


Figura 6.1. AAM determinada por difusión en agar, por CAR puros frente a (A) *Bacillus subtilis*, (B) *Micrococcus luteus*, (C) *Pseudomonas aeruginosa*.

Frente a *Mc*, Figura 6.1 (B), Bix, y Asta presentan mayor AAM, cuyo diámetro de halo de inhibición aumenta con la concentración. Vit A presenta importante AAM a bajas concentraciones, que va disminuyendo a medida que ésta aumenta. Lic y Apo12, presentan relativamente baja AAM, pero ésta se mantiene constante en las diferentes concentraciones estudiadas.

Con respecto a *Ps*, como puede observarse en la Figura 6.1 (C), la AAM decrece en el siguiente orden Asta, Bix, Vit A, Apo12 y Apo8. En todos los casos, la misma aumenta con la concentración de los compuestos. Bc no presenta actividad a bajas

concentraciones, mientras que si lo hace a concentraciones mayores. *Canta* demuestra actividad únicamente, a bajas concentraciones y *Lic* carece de actividad.

En la Tabla 6.4, se informan la concentración inhibitoria mínima (CIM), expresada en μM para cada CAR, y el diámetro correspondiente, medido en mm, para los m.o. estudiados (*Ps*, *Bs*, *Mc*). Es importante resaltar, que la CIM informada en el presente estudio, representa a la menor concentración que ejerce AAM, respecto de todas las concentraciones analizadas en el mismo.

Tabla 6.4. Concentraciones inhibitorias mínima de Carotenoides en (μM), diámetro de halo de inhibición en (mm) en Agar Müller-Hinton.

<i>Compuesto</i> <i>AM</i>	<i>Ps</i>		<i>Bs</i>		<i>Mc</i>	
	CIM	D	CIM	D	CIM	D
BC	25	5,45	1	6,5	10	5,15
Apo8	10	5,65	10	7,75	5	5,35
Apo12	1	6,2	25	6,7	1	6,1
Lic	-	NI	-	NI	1	5,6
Canta	2	6,45	0,5	6,25	0,5	6,7
Asta	5	8,45	-	NI	5	5,9
Bix	1	6,8	1	7,3	1	7,2
Vit A	1	7,1	5	7,7	1	8,3

NI: No inhibe

De los resultados obtenidos, se puede concluir que existe una dependencia de la AAM con la estructura del carotenoide, siendo los compuestos más polares lo que presenten una mayor eficiencia de inhibición (*Bix*, *Asta*, *Canta*, *Vit A*). Lo cual podría deberse a la interacción de los carotenoides con la bicapa lipídica de la membrana celular, la que depende de la localización de carotenoides en la membrana. Esto sugiere, que un posible mecanismo de acción antimicrobiana de los CAR podría ser el de alteración de membrana citoplasmática.

Es importante destacar, que este método es útil para realizar una evaluación general. Sin embargo, muchas variables afectan el resultado del antibiograma, entre ellas, se mencionan: que el diámetro del halo de inhibición obtenido dependerá, no sólo de la sensibilidad del m.o. y la carga del disco, sino también del espesor de la capa de agar MH, su pH y composición, de la capacidad de difusión de la droga en ese medio, temperatura y atmósfera de incubación, velocidad de duplicación bacteriana, el tamaño del inóculo y la fase de crecimiento de la bacteria, etc.

4.3. Actividad Antimicrobiana de Carotenoides microencapsulados y Cápsula Vacía Frente a Cepas de Referencia

Se realizó la determinación comparativa de la AAM de Bc-GA, Apo8-GA, Apo12-GA y GA-MC, con los respectivos compuestos puros, para determinar la mayor capacidad antimicrobiana frente a los tres m.o. en estudio, y evaluar si el proceso de microencapsulación, ejerce algún efecto sobre la misma.

4.3.1. Determinación de Actividad Antimicrobiana por Método de Difusión en Agar

AAM de BC.

La AAM de BC y GA fue determinada frente a tres cepas de referencia de los m.o. *Bs*, *Mc* y *Ps*, Figura 6.2.

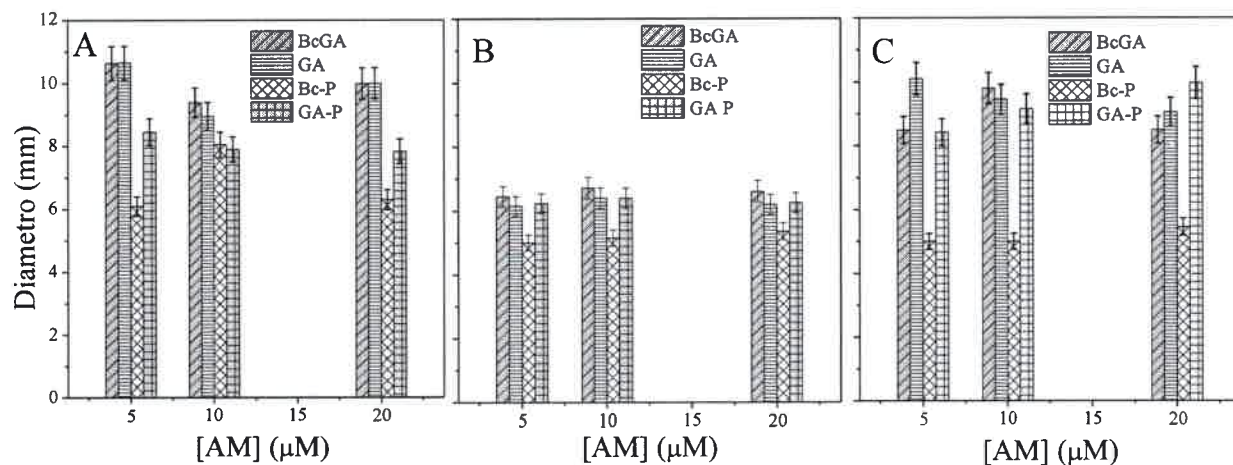


Figura 6.2. Capacidad antimicrobiana de Bc-GA frente a los m.o. (A) *Bs*, (B) *Mc* y (C) *Ps*.

Como se observa en la Figura 6.2, *Bs* y *Ps* son más sensibles al efecto antimicrobiano de los compuestos evaluados que *Mc*, y queda en evidencia que dicha AAM es aportada por el biopolímero GA, lo que demuestra el beneficio que ejerce el proceso de microencapsulación.

AAM de Apo8

Se determinó la AAM que posee Apo8 y GA, puros y microencapsulados, frente a los m.o. *Bs*, *Mc* y *Ps*, Figura 6.3.

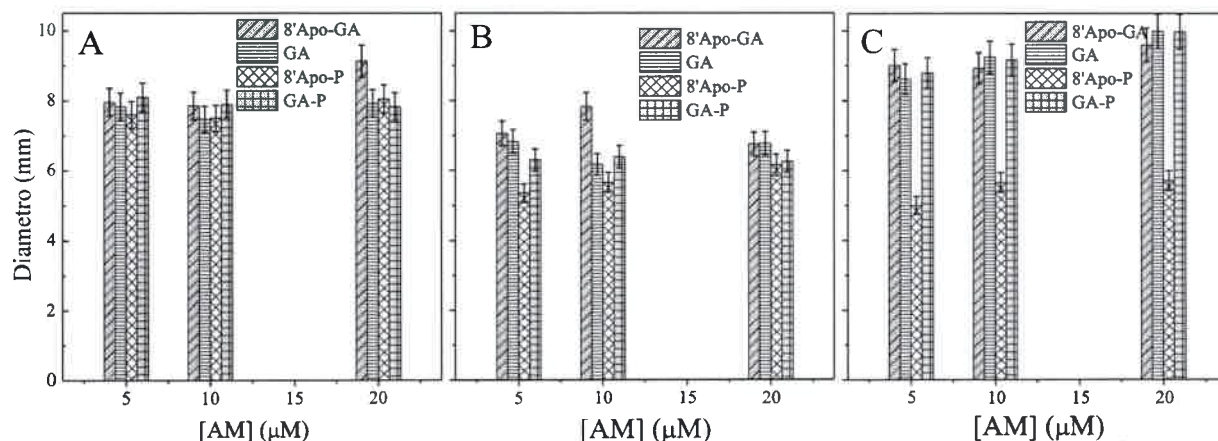


Figura 6.3. Capacidad antimicrobiana de Apo8-GA frente a los m.o. (A) *Bs*, (B) *Mc* y (C) *Ps*.

Como se observa en la Figura 6.3 (A), el diámetro del halo de inhibición de Apo8-GA es levemente mayor que la GA. Sin embargo, esta diferencia no es significativa, indicando que la microencapsulación no afecta el efecto antimicrobiano. La AAM de GA frente a *Mc*, es mayor que la de Apo8, tal como se muestra en la Figura 6.3 (B), lo que demuestra que la microencapsulación con GA favorece la AAM de los compuestos Apo8 y GA puros. En cuanto a la AAM frente a *Ps*, Figura 6.3 (C), se observa que es el m.o más sensible a la acción de GA, mientras que Apo8-P prácticamente carece de AAM, lo que demuestra que la microencapsulación causa un marcado incremento en la AAM de Apo8 microencapsulado, aportado por el material de pared.

AAM de Apo12.

La AAM de Apo12 frente a *Bs*, *Mc* y *Ps*, se observa en la Figura 6.4.

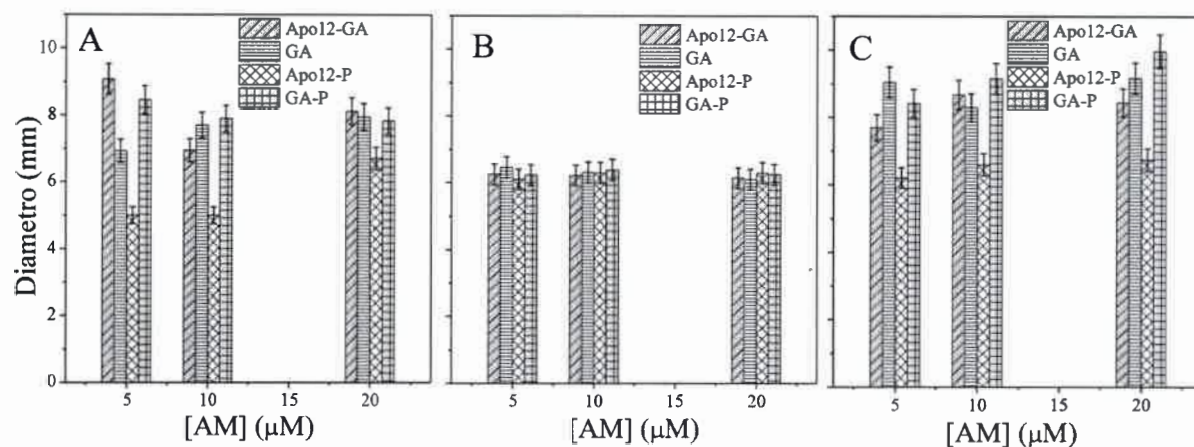


Figura 6.4. Capacidad antimicrobiana de Apo12-GA Frente a los m.o. (A) *Bs*, (B) *Mc* y (C) *Ps*.

La AAM de Apo12-P frente a *Bs* es pequeña. Sin embargo, como se observa en la Figura 6.4 (A) la encapsulación con GA, incrementa dicha capacidad.

A excepción de Apo12-GA 5 μM , Figura 6.4 (A), no existe diferencia significativa en las diferentes concentraciones estudiadas. Mientras que el diámetro de los halos más parecidos entre sí, es decir, no existe diferencia significativa entre los encapsulados

La AAM de Apo12 frente a *Mc*, es similar a la observada para BC Figura 6.4 (B), la AAM de Apo12 y GA (tanto puros como encapsulados) es pequeña y no existe diferencia significativa entre ellos. Esto demuestra que este coco Gram-positivo, ofrece mayor resistencia frente a CAR apolares. Frente a *Ps* la AAM de Apo12, se ve incrementada con la microencapsulación con GA (Figura 6.4 (C)), cuyo efecto es dependiente de la concentración, es decir, a mayores concentraciones, mayor AAM.

Para el ensayo de Difusión en Agar, se realizó un control positivo (empleando antibiótico Sulfato de Polimixina) para determinar la sensibilidad de las cepas bacterianas y un control negativo (diluyente) para comprobar que el diluyente carece de

actividad inhibitoria (Figura 6.5). Se observó que *Mc* es el m.o. más sensible al antibiótico Sulfato de Polimixina, mientras que *Ps*, es el más resistente.

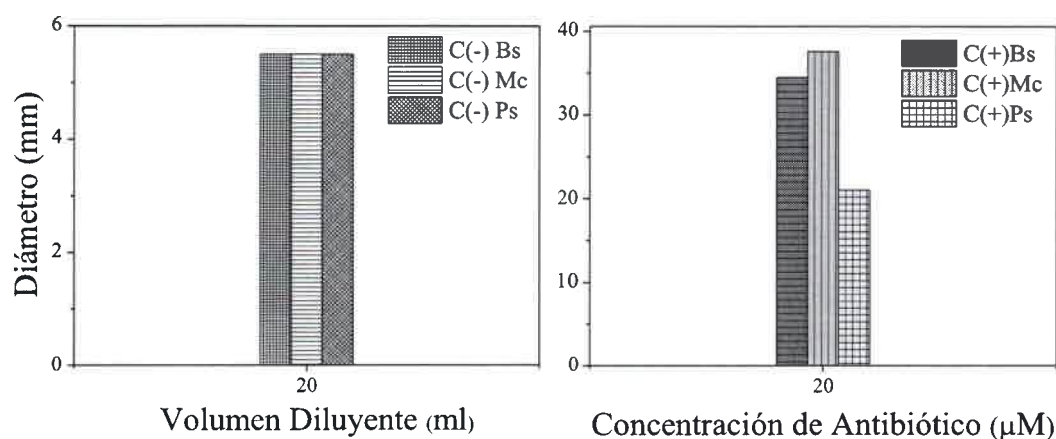


Figura 6.5. Control negativo del diluyente y control positivo de las cepas, frente al antibiótico Sulfato de Polimixina.

De los resultados obtenidos por el método de difusión en agar, podemos concluir de manera parcial, que los CAR puros que presentan mayor AAM frente a los tres microorganismos estudiados, son compuestos más polares (Asta, Canta, Bix y Vit. A), respecto de Bc, Apo8, Apo12 y Lic. Griffin [103], demostró que la estructura y la composición química de los agentes antimicrobianos es de gran importancia, dado que esto determinará su localización y orientación en la membrana lipídica, y finalmente, el efecto que tenga sobre la célula bacteriana, causando la modificación de las propiedades dinámicas y estructurales en la misma. Los CAR (Bc, Lic) por ser hidrofóbicos, se localizan dentro del núcleo hidrofóbico de la membrana. Mientras que los CAR polares (Asta, Canta, Vit A, Bix), presentan extremos hidrofílicos que les permiten localizarse en los lados opuestos de la misma, causando importante modificación en la barrera de difusión, aumentando la permeabilidad [104,105].

Uno de los posibles mecanismos de AAM de los terpenos, entre los cuales se encuentran los CAR, ocurre por ruptura o daño en la membrana celular [106]. Esta disrupción en la membrana celular, puede ocurrir a través de las siguientes vías: 1) aumentando la permeabilidad de la membrana a iones pequeños, 2) afectando la

estabilidad estructural de la membrana, y 3) desestabilizando el empaquetamiento de la bicapa lipídica [107,103].

De los CAR MC, se determinó que el proceso de microencapsulación de los CAR puros, Bc, Apo8 y Apo12, incrementa la AAM frente a los tres m.o. en estudio, debido a la contribución del material de pared de las cápsulas de GA. Se demostró que Apo8-GA presenta mayor actividad frente a *Bs* y *Ps*. Para todos los casos de CAR MC comparado con la microcápsula vacía, se obtuvieron valores de $p > 0,05$; por lo que se puede concluir que no existen diferencias significativas para un nivel de confianza de 95%, indicando que la AAM de los CAR MC es aportada principalmente por el material de pared de la cápsula.

Cabe destacar, que si bien los halos de inhibición medidos de los cultivos de *Ps* y *Bc* son mayores, éstos son translúcidos pero no transparentes, lo que corresponde a una disminución del desarrollo bacteriano, indicando que el agente antimicrobiano tendría un efecto bacteriostático sobre dichas cepas, y no bactericida como ocurre con *Mc* (halo transparente).

Las diferencias de sensibilidad observadas en el control positivo, radican principalmente en la estructura de la envoltura celular. Debido a que las bacterias Gram negativas (*Ps*) presentan dos membranas citoplasmáticas, que las rigidizan y dificultan el acceso de las moléculas antimicrobianas. Mientras que las bacterias Gram positivas (*Mc* y *Bs*), presentan sólo una membrana lipídica y una pared celular de peptidoglucano más gruesa. Numerosos estudios demuestran que bacterias Gram negativas, son menos sensibles a compuestos lipofílicos, que bacterias Gram positivas, lo que está relacionado a su membrana externa [108,109].

4.3.2. *Determinación de la Actividad Antimicrobiana por Reducción de la Velocidad de Crecimiento*

4.3.2.1. *Actividad Antimicrobiana en Caldo Nutritivo*

La curva de crecimiento de cepas de referencia de los m.o. *Bs* y *Ps*, fue realizada en CN y en leche en polvo reconstituida, con el objetivo de determinar si existe influencia del medio, sobre la AAM de GA. En la Figura 6.6 (A), se muestra la curva de crecimiento de *Bs* a 37 °C, en CN, determinada a través de recuento en placa. Los resultados se expresan en log UFC/ml en función del tiempo, en horas.

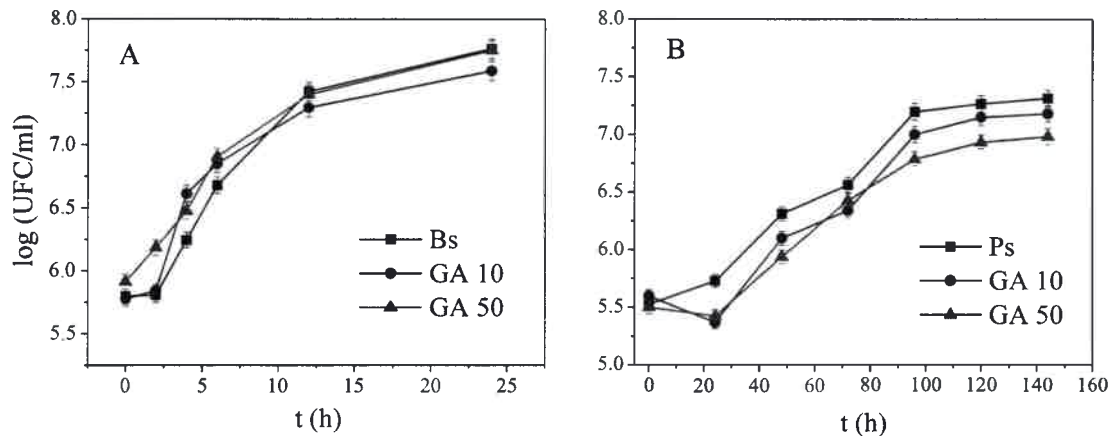


Figura 6.6. Curva de crecimiento de (A) *Bs* en CN a 37 °C, con y sin adición de GA, y (B) *Ps* en CN a 4 °C, con y sin la adición de GA.

Se determinó una reducción de la μ , que ejerce la adición de GA, en distintas concentraciones sobre el desarrollo de *Bs*, siendo mayor %R con la adición de 50 μM , arrojando un 38% (Tabla 6.5), principalmente, posterior a las 10 h de incubación.

En la Figura 6.6 (B), se observa la curva de crecimiento de *Ps* a 4 °C en CN. Se evidencia, que la adición de GA a diferentes concentraciones, redujo efectivamente la μ de dicho m.o., siendo más efectiva una concentración 50 μM de GA, alcanzando un %R del 54%, como se muestra en la Tabla 6.5.

Este mismo ensayo fue realizado con *Mc*, ATCC 9341. Sin embargo, se ha demostrado que GA no ejerce efecto inhibitor sobre el crecimiento de dicho m.o., confirmando los resultados de la técnica de difusión en agar, donde el diámetro de los halos de inhibición, eran despreciables.

Estos resultados demuestran que GA empleada como material de pared de las microcápsulas estudiadas en este trabajo de tesis, ejerce un importante efecto bacteriostático frente a *Bs* y *Ps*, ya que disminuye significativamente su velocidad de crecimiento, pero no lo destruye. Estos concuerdan con los resultados obtenidos a través de la técnica de difusión en agar, donde se observó la aparición de halos traslucidos alrededor del disco, cuando fueron adicionadas diferentes concentraciones de GA.

4.3.2.2. Actividad Antimicrobiana en Leche

La AAM de GA y Bc-GA adicionados en leche, fue evaluada a la temperatura de almacenamiento de la misma (4 °C), frente a *Ps* y a m.o. aislados de leche, para comprobar su acción frente a la contaminación que puede ocurrir en el producto final. Mientras que frente a *Bs*, se evaluó a 37 °C, debido a que es un m.o. mesófilo, cuyas esporas son capaces de sobrevivir a la pasteurización.

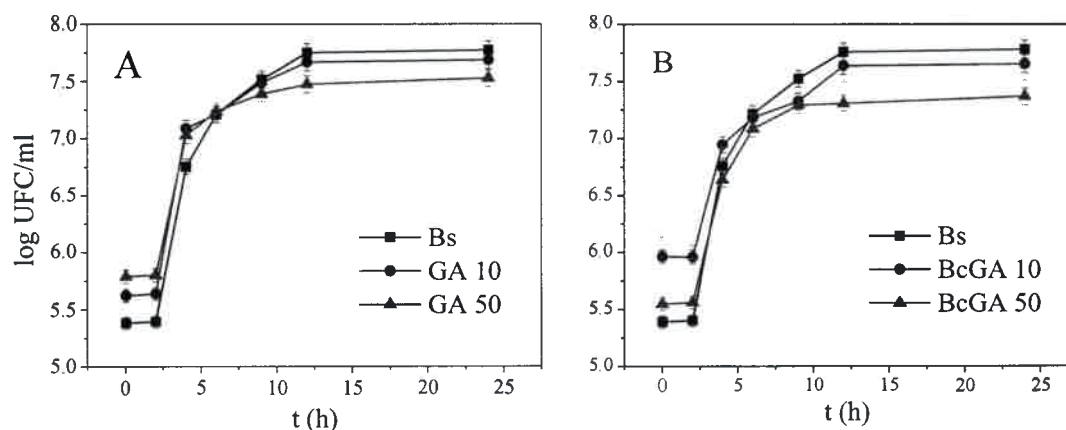


Figura 6.7. Curva de crecimiento de *Bs* en leche, a 37 °C con y sin adición de (A) GA y (B) Bc-GA.

La Figura 6.7 (A), muestra la curva de crecimiento de *Bs* a 37 °C en leche, con y sin adición de GA. En ella, se observa una disminución de la μ de *Bs* con la adición del biopolímero GA, principalmente posterior a las 8 h de incubación, siendo mayor la reducción, con una concentración 50 μ M de GA, reflejando un %R mayor al 50% (Tabla 6.5). Con la adición de los microencapsulados de Bc-GA, el efecto fue similar, aunque ocurrió a tiempos más cortos. También, se observa un efecto de concentración, Figura 6.7 (B). Con el agregado de 50 μ M de Bc-GA, el %R fue similar al obtenido con la adición de la misma cantidad de GA, lo que indica que la AAM provendría básicamente del biopolímero que constituye el material de pared de la MC.

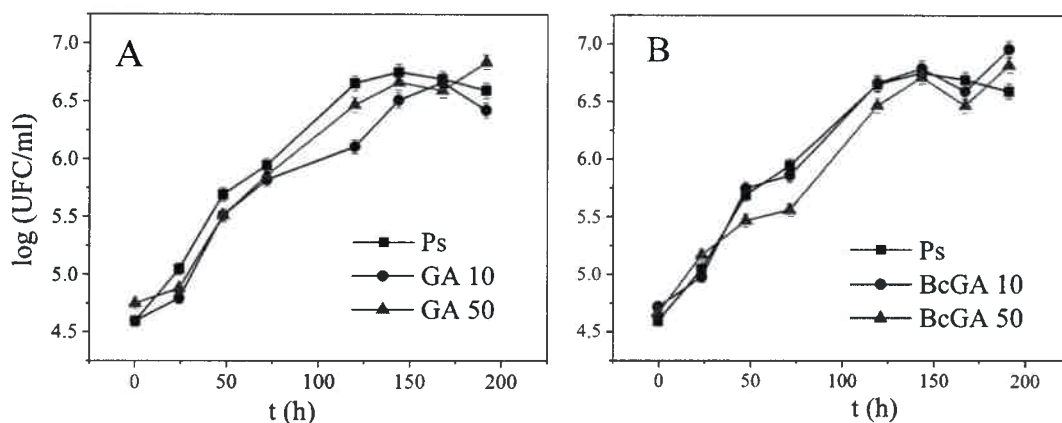


Figura 6.8. Curva de crecimiento de *Ps* en leche, a 4 °C con y sin adición de (A) GA y (B) Bc-GA.

En la Figura 6.8, se muestran las curvas de crecimiento de *Ps* en leche, a 4 °C con y sin adición de GA (A) y Bc-GA (B).

Los resultados indican que la μ de *Ps*, se vio disminuida con la adición de GA en todas las concentraciones (Figura 6.8 (A)), siendo mayor el %R obtenido (37%), con la concentración de 50 μ M, Tabla 6.5. Tal como se observa en la Figura 6.8 (B), la μ de *Ps* con la adición de Bc-GA en una concentración de 50 μ M, resultó en la inhibición de un 49% (Tabla 6.5). Es decir, que la diferencia de un 12% de la AAM provendría de la acción del β -caroteno incorporado en el interior del microencapsulado, aunque la mayor proporción de dicho efecto corresponde principalmente al material de pared GA, al igual que ocurre frente a *Bs*. Por el contrario, la adición de una concentración 10 μ M, presenta prácticamente igual AAM GA y Bc-GA, con un %R del 22%, demostrando nuevamente la acción de GA.

Tabla 6.5. Velocidad de crecimiento y porcentaje de reducción de *Bs* y *Ps*, en CN y leche.

[GA] (μM) en CN	<i>B. subtilis</i> (37 °C)		<i>P. aeruginosa</i> (4 °C)	
	μ (h^{-1}) \pm SD	% R	μ (h^{-1}) \pm SD	% R
0	0,419 \pm 0,004	0	0,069 \pm 0,001	0
10	0,348 \pm 0,003	9	0,045 \pm 0,001	34
50	0,233 \pm 0,002	39	0,044 \pm 0,001	36
[GA] (μM) en leche				
0	0,276 \pm 0,003	0	0,037 \pm 0,004	0
10	0,197 \pm 0,002	29	0,029 \pm 0,003	22
50	0,125 \pm 0,001	55	0,023 \pm 0,002	37
[Bc-GA] (μM) en leche				
0	0,276 \pm 0,003	0	0,037 \pm 0,004	0
10	0,134 \pm 0,001	51	0,029 \pm 0,003	22
50	0,132 \pm 0,001	52	0,019 \pm 0,002	49

Se ha demostrado a través de estos resultados, que la adición de microencapsulados, ejercen un efecto bacteriostático, reduciendo la μ de cepas de referencia de m.o. *Bs* y *Ps* hasta en un 50 %, sin llegar a inhibirlos o eliminarlos. Cabe destacar, que dicha capacidad está siendo aportada principalmente por el biopolímero que conforma el material de pared de la cápsula, GA. Se determinó que la adición de GA y Bc-GA comienza a ser efectiva a tiempos más prolongados de incubación, es decir, cuando el m.o. se encuentra en la fase exponencial de crecimiento, y que la AAM es dependiente de la concentración. Además, no se observa efecto alguno de la matriz empleada (CN o leche) sobre el desarrollo de m.o. o la AAM de GA y Bc-GA.

Si bien pocos estudios han sido realizados sobre la AAM de GA, algunos han demostrado que posee actividad inhibitoria del crecimiento de m.o. causantes de placa dental y caries, tales como *Prophyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia* [110]. Onishi y col. [111], sugieren que GA actuaría como agente preventivo en la formación de caries, inhibiendo la formación de placa y mejorando la remineralización dental. Esto se sustenta, en el alto contenido de sales de Ca^{+2} , Mg^{+2} y K^{+} de los polisacáridos de la GA, y el efecto de la goma en el metabolismo de calcio y posiblemente de fosfato. Además, la AAM de GA puede atribuirse a la presencia de enzimas tales como oxidasas, peroxidasas y pectinasas presentes en la fracción proteica de la misma. Algunas de las cuales, han demostrado propiedades antimicrobianas [112,113]. Otro estudio fue realizado, empleando partes de plantas (tallos, raíz, etc.) de diferentes especies de *Acacia* (incluyendo *Acacia senegal*), efectivas contra una amplia variedad

de enfermedades, para determinar la AAM frente a tres cepas de bacterias Gram positivas (*B. cereus*, *E. coli*, *S. typhi*) dos Gram negativos (*P. aeruginosa* y *S. aureus*), y tres cepas de hongos (*C. albicans*, *A. niger*, y *Microsporium canis*) [114]. Los resultados que obtuvieron, demostraron la mayor AAM en los extractos metanólicos de las especies *Acacia catechu* y *Acacia nilotica*, debido a la presencia de metabolitos secundarios, tales como, compuestos fenólicos, polisacáridos, taninos y saponinas, en una o más partes de la planta. El extracto metanólico de la corteza de *Acacia senegal*, mostró AAM frente a *E. coli*, *B. cereus*, y los hongos *C. albicans* y *A. niger*. Mientras que el extracto con hexano, ejerció efecto antimicrobiano contra *S. aureus* y *C. albicans*.

Es importante destacar, que si bien no se observaron grandes diferencias en la AAM con BC incorporado en el interior, respecto de la MC vacía, esto puede deberse a que su estructura es no polar, lo que determinará su ubicación en la membrana lipídica, y por ende, sus propiedades, tal como fue mencionado [103]. Gruszecki y Strzalka [115] han empleado diferentes técnicas para determinar el efecto que poseen los CAR en las propiedades físicas de la membrana lipídica. Los carotenoides apolares (BC y Lic) por ser hidrofóbicos, se localizan dentro del núcleo hidrofóbico de la membrana, siendo gobernado por interacciones van der Waals con las cadenas acil hidrocarbonadas de los lípidos de membrana, causando un incremento en la libertad de movimiento de las moléculas de lípidos en la región de las cabezas polares de fosfatidilcolina [116-118]. En cuanto al posible mecanismo de AAM, existen diversos trabajos en los que se ha demostrado que la AAM de los terpenos ocurre por un mecanismo de ruptura o daño en la membrana celular [106].

4.4. Actividad Antimicrobiana de Carotenoides Microencapsulados, Frente a Microorganismos Aislados en Leche

Con el objetivo de determinar la AAM de los CAR MC frente al desarrollo de m.o. aislados de leche cruda, fue determinada la μ de cada uno, con y sin adición de GA y BcGA, a través de la técnica de recuento en placa. La AAM frente a la cepa 2, *Bacillus* spp., no fue determinada, ya que se trata de un m.o. mesófilo y que ha sido previamente evaluado, empleando una cepa de referencia, cuyos resultados han sido anteriormente expuestos. Con respecto a la cepa 9, *Celulosimicrobium* spp. no se

realizó tal determinación, ya que no fue encontrado en la bibliografía, que se trate de un m.o. que crezca normalmente en leche. Es probable que haya llegado a la muestra por un defecto de manipulación.

4.4.1. Actividad Antimicrobiana Frente a *Gordonia* spp.

Se determinó la velocidad de crecimiento del m.o. aislado *GO*, con y sin adición de GA, Figura 6.9 (A), y BcGA, Figura 6.9 (B).

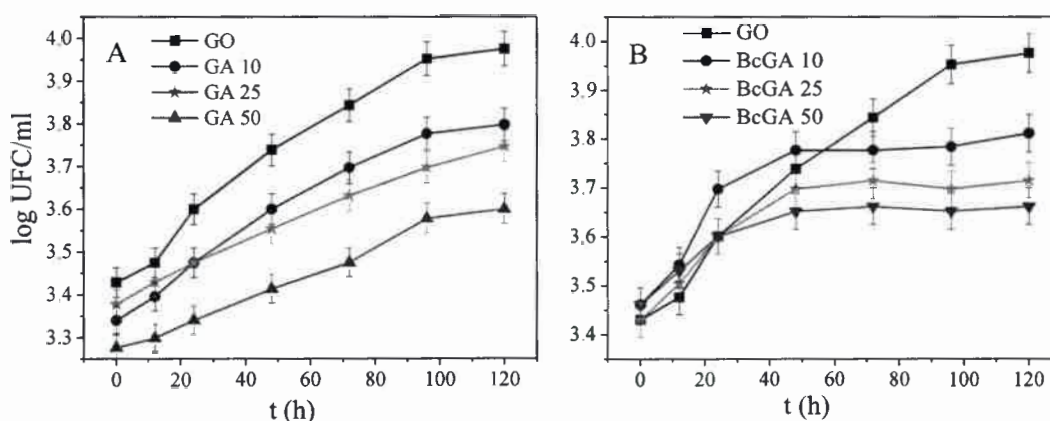


Figura 6.9. Curva de crecimiento de *GO* en leche, a 4 °C con y sin adición de (A) GA y (B) Bc-GA.

Se pudo demostrar que la AAM de GA, como se observa en la Figura 6.9 (A), incrementa con la concentración del biopolímero, ejerciendo un significativo efecto antimicrobiano, principalmente la adición de 50 μM, causando una reducción de la μ , del 43 %. A su vez, la adición de GA 10 y 25 μM, no presentan diferencia significativa entre sí.

En cuanto a la AAM de BcGA, se observa en la Figura 6.9 (B), que no muestran diferencia significativa, respecto de la cepa sin adición, en los primeros tiempos del desarrollo. Sin embargo, a partir de las 60 h de incubación a 4 °C, comienza a observarse mayor AAM con la adición de concentraciones crecientes del compuesto, siendo los %R similares a los obtenidos con la adición de GA, lo que permite inferir, que la AAM proviene del material de la cápsula.

4.4.2. Actividad Antimicrobiana Frente a *Enterobacter* spp.

La AAM de GA y BcGA, fue determinada por la metodología de recuento en placa, frente al desarrollo microbiano del bacilo Gram negativo *EB*, Figura 6.10.

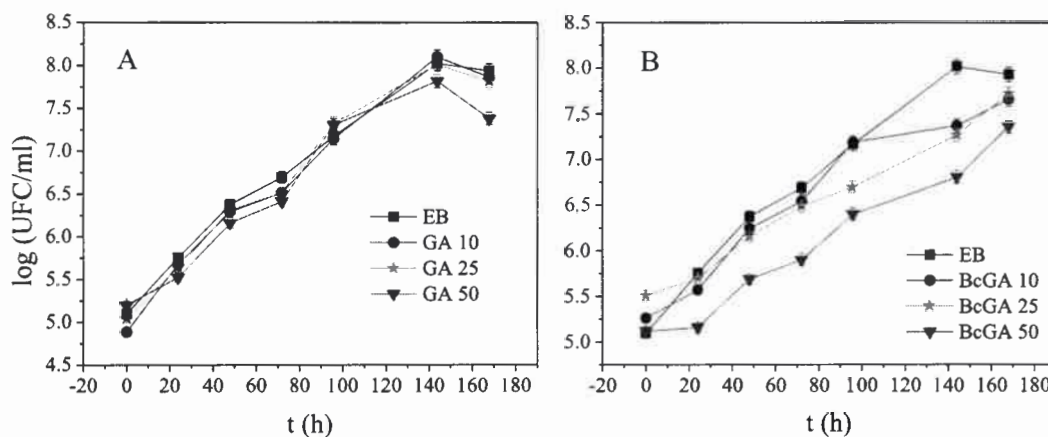


Figura 6.10. Curva de crecimiento de *EB* en leche, a 4 °C con y sin adición de (A) GA y (B) Bc-GA.

Como se observa en la Figura 6.10 (A), la adición de distintas concentraciones de GA (10, 25 y 50 μM), no presentan diferencias estadísticamente significativas (con un nivel de confianza del 95,0 %), sobre el desarrollo de *EB*. Por el contrario, BcGA, particularmente la concentración 50 μM , posee AAM, reduciendo de manera estadísticamente significativa la μ de *EB* (%R 21 %), respecto de *EB*, sin adición y con adición de BcGA 10 y 25 μM .

4.4.3. Actividad Antimicrobiana Frente a *Enterococcus* spp.

La AAM de GA y BcGA, fue determinado por recuento en placa, y luego se calculó la μ , a partir de la porción lineal de la curva del coco Gram positivo *EC*, Figura 6.11.

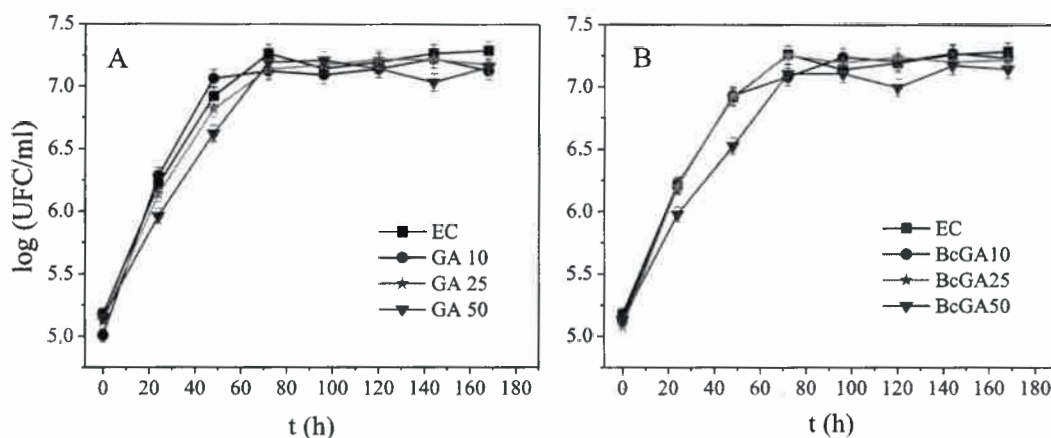


Figura 6.11. Curva de crecimiento de *EC* en leche, a 4 °C con y sin adición de (A) GA y (B) Bc-GA.

El análisis estadístico de los valores logarítmicos de UFC/ml, indicó que no existe diferencia estadísticamente significativa, con un nivel de confianza del 95 %, entre las variables respecto del control sin GA, y tampoco entre sí (Datos no presentados). Esto es representado gráficamente en la Figura 6.11 (A). Sin embargo, los valores de %R (Tabla 6.6), demostraron que la adición de 50 μM de GA, causó una reducción del 35 %. Por otra parte, la adición de BcGA 50 μM, produjo un efecto AM estadísticamente significativo (con un nivel del 95,0 % de confianza), respecto del crecimiento de *EN*, sin adición de la MC, y a su vez, presenta diferencias con las curvas de crecimiento con adición de BcGA 10 y 25 μM. Es importante destacar, que la AAM de BcGA 50 μM es comparable a la de GA 50 μM, causando una reducción de aproximadamente el 34 % en la μ de *EN* (Tabla 6.6), lo que indica que la AAM provendría exclusivamente del material de pared del encapsulado, es decir, GA.

4.4.4. Actividad Antimicrobiana Frente a *Pseudomonas spp.*

La cepa 11, de la Tabla 6.3, corresponde a un bacilo Gram negativo, catalasa y oxidasa positivo, crece en agar Cetrimide, produciendo un cambio en la coloración, crecen a 42 °C, produce un pigmento verdoso. Las características morfológicas y la identificación taxonómica, nos indican que pertenece al género *Pseudomonas spp.*

Se determinó si la adición de GA y BcGA, ejerce efecto antimicrobiano sobre el desarrollo de la cepa 11, a través de la técnica de recuento en placa. Los resultados se expresan en log (UFC/ml), Figura 6.12.

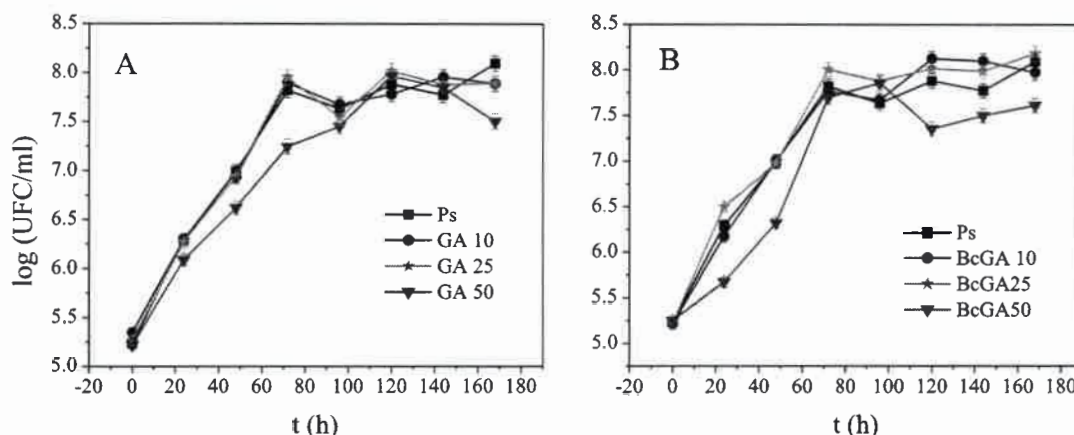


Figura 6.12. Curva de crecimiento de *Ps* en leche, a 4 °C con y sin adición de (A) GA y (B) Bc-GA.

La adición de GA 50 μM, causó una reducción en la velocidad de crecimiento de la cepa 11 del 24 % (Tabla 6.6), mostrando diferencias significativas (con un nivel del 95 % de confianza), respecto del control sin adición, y comparado con la adición de 10 y 25 μM de GA (Figura 6.12 (A)). Resultados similares fueron obtenidos con la adición de BcGA 50 μM, con un %R del 20 % (Tabla 6.6), mostrando diferencia estadísticamente significativa (con un nivel de confianza del 95 %) con los valores logarítmicos de las curvas sin adición y con adición de BcGA 10 y 25 μM. Esto puede ser observado en la Figura 6.12 (B).

Tabla 6.6. Velocidad de crecimiento de microorganismos aislados ($\mu \pm SD$ (h^{-1})), con y sin adición de GA y BcGA, con sus respectivos porcentajes de reducción de la velocidad de crecimiento (%R).

[AAM] (μM)	Cepa <i>GO</i>		[AAM] (μM)	Cepa <i>GO</i>	
[GA]	$\mu \pm SD$ (h^{-1})	%R	[Bc-GA]	$\mu \pm SD$ (h^{-1})	%R
0	0,012 \pm 0,001	-	0	0,012 \pm 0,002	-
10	0,011 \pm 0,002	15	10	0,011 \pm 0,001	15
25	0,010 \pm 0,001	38	25	0,009 \pm 0,001	30
50	0,007 \pm 0,001	43	50	0,007 \pm 0,001	39
Cepa <i>EB</i>			Cepa <i>EB</i>		
[GA]	$\mu \pm SD$ (h^{-1})	%R	[Bc-GA]	$\mu \pm SD$ (h^{-1})	%R
0	0,045 \pm 0,001	-	0	0,045 \pm 0,001	-
10	0,044 \pm 0,001	3	10	0,047 \pm 0,003	NI
25	0,042 \pm 0,003	7	25	0,039 \pm 0,004	15
50	0,020 \pm 0,002	25	50	0,036 \pm 0,001	21
Cepa <i>EC</i>			Cepa <i>EC</i>		
[GA]	$\mu \pm SD$ (h^{-1})	%R	[Bc-GA]	$\mu \pm SD$ (h^{-1})	%R
0	0,084 \pm 0,001	-	0	0,084 \pm 0,001	-
10	0,065 \pm 0,001	23	10	0,067 \pm 0,005	21
25	0,060 \pm 0,001	30	25	0,066 \pm 0,003	34
50	0,055 \pm 0,001	35	50	0,055 \pm 0,0001	34
Cepa <i>Ps</i>			Cepa <i>Ps</i>		
[GA]	$\mu \pm SD$ (h^{-1})	%R	[Bc-GA]	$\mu \pm SD$ (h^{-1})	%R
0	0,073 \pm 0,003		0	0,073 \pm 0,003	
10	0,077 \pm 0,002	NI	10	0,076 \pm 0,001	NI
25	0,081 \pm 0,003	NI	25	0,072 \pm 0,003	1
50	0,055 \pm 0,002	24	50	0,058 \pm 0,001	20

(NI): No inhibe

En la actualidad, el mayor interés por alimentos naturales y mínimamente procesados, ha impulsado el empleo y la aplicación de agentes antimicrobianos de origen natural, entre ellos se encuentra los de origen animal, como proteínas, enzimas líticas tales como lisozima, hidrolasas tales como lipasas y proteasas [119] y polisacáridos como el quitosano [120]. Los de origen vegetal, incluyen compuestos fenólicos provenientes de cortezas, tallos, hojas, flores, ácidos orgánicos presentes en frutos y fitoalexinas producidas en plantas [119]. Y los compuestos producidos por m.o., como metabolito secundarios de su desarrollo, tal como las bacteriocinas producidas por BAL [121].

Para poder emplear los antimicrobianos de origen natural en alimentos, es necesario comprobar su eficacia, en medios microbiológicos y en productos alimenticios. Los métodos que se utilizan para evaluar la actividad de los antimicrobianos, se pueden dividir en: pruebas “*in vitro*” y pruebas de aplicación. Estas

últimas, también conocidas como “métodos de barrido”, incluyen cualquier prueba en la que el compuesto no se aplica de manera directa al sistema alimenticio; generalmente, este tipo de pruebas, proveen información preeliminar para determinar la eficacia del compuesto. Mientras que, las pruebas “*in vitro*”, incluyen pruebas en las que el agente antimicrobiano se aplica directamente al producto [122]. En el caso de los antimicrobianos naturales, Zaika [123] señala que el medio en que se prueba su eficacia, la especie, aceite o extracto a evaluar y el microorganismo afectan significativamente los resultados de las pruebas.

Las pruebas “*in vitro*” proporcionan información valiosa acerca de la efectividad de un compuesto, y pueden ser evaluados de igual manera, las variables que afectan a la AAM, de la cual depende del tipo, género, especie y m.o. a probar. También el tipo de pared celular es un factor a considerar.

Una variable asociada a la efectividad de un agente antimicrobiano en los alimentos, es el número inicial de m.o. en el sistema, principalmente se debe a que la mayoría de los antimicrobianos son bacteriostáticos más que bactericidas [124]. El número inicial de microorganismos, debe ser consistente para obtener resultados reproducibles. El efecto de la temperatura es muy importante durante la incubación y la exposición del alimento. En la mayoría de los casos, el incremento de la temperatura de la exposición incrementa la actividad del antimicrobiano. La temperatura de incubación debe ser la óptima para el microorganismo en estudio.

A diferencia de lo que ocurre con el empleo de antibióticos, los agentes antimicrobianos de origen vegetal no contribuyen al desarrollo de cadenas de resistencia o alteran el ambiente del alimento de manera que crezcan otros organismos patógenos [123].

Existe un número importante de trabajos de investigación acerca de la AAM de extractos, aceites, especias y condimentos, es difícil obtener estimaciones cuantitativas y hacer comparaciones de sus efectos debido, al menos parcialmente, a la gran variedad de métodos que se han utilizado para evaluar su efectividad [123]. En general, la bibliografía demuestra que las especias (tales como canela, clavo, diferentes tipos de pimientas, laurel, orégano, romero, salvia, tomillo, entre otros), al igual que la mayoría de los compuestos antimicrobianos naturales, son más efectivos frente a organismos Gram positivos, que frente a bacterias Gram negativas [124]. Esto concuerda con los

resultados obtenidos en el presente trabajo, dado que se observan que los porcentajes de reducción de la μ de los m.o. Gram positivos como *GO* y *EC* son mayores que los de bacilos Gram negativos *EN* y *Ps*.

Para que los antimicrobianos alcancen su diana o sitio de acción, deben atravesar la cubierta bacteriana. Las bacterias Gram negativas ofrecen mayor resistencia que las Gram positivas a la entrada de antimicrobianos, ya que poseen una membrana celular externa, que rodea la capa de péptidoglucano (Figura 6.13). Esa membrana, es una bicapa lipídica que contiene fosfolípidos y lipolisacáridos, y desempeña un importante papel de barrera o tamiz, a través de la cual, moléculas con un peso molecular mayor de 600 a 1.000 Da, no son capaces de penetrar, por ejemplo los glucopéptidos [125]. En la misma existen un gran número de proteínas, que representan en torno al 40% de su peso total, entre las cuales se encuentran las porinas, proteínas triméricas o monoméricas que forman conductos o poros hidrófilos que permiten el acceso al péptidoglucano. A su vez, la membrana externa ha mostrado muy baja permeabilidad a compuestos hidrofóbicos, lo que ha sido atribuido a la presencia de lipopolisacáridos lipofílicos [126,127]. Sin embargo, ha sido demostrado que compuestos altamente lipofílicos, como esteroides, penetran relativamente fácil, a través de la membrana externa de muchas bacterias [128]. En las bacterias Gram positivas, que carecen de membrana externa, se estima que el límite de exclusión es de 100 kDa, mucho mayor que el tamaño de la mayoría de los antimicrobianos [129].

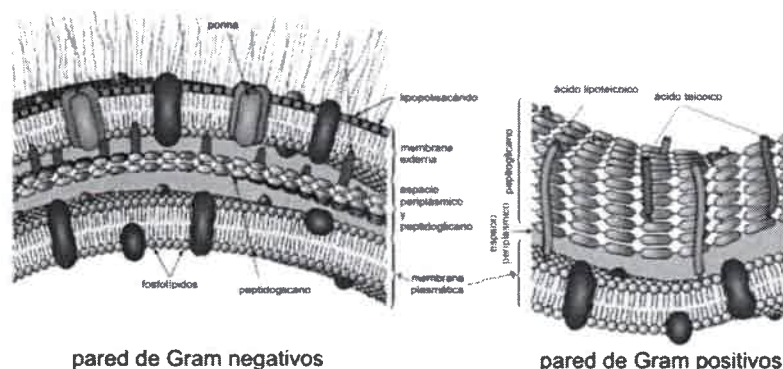


Figura 6.13. Representación esquemática de la envoltura celular de bacteria Gram positiva y Gram negativa [130].

En conclusión, la interacción de compuestos lipofílicos con la membrana biológica, resulta en cambios en la estructura de la misma, afectando su funcionamiento, no sólo como barrera selectiva, sino también como matriz para enzimas. Los efectos de toxicidad “no específicos” de compuestos lipofílicos, son probablemente debidos a las interacciones lípido-lípido y lípido-proteína [131].

La AAM observada para los microencapsulados analizados en este trabajo de tesis, proviene principalmente del biopolímero GA, que constituye la pared de la MC. Sin embargo, frente a *EN* y *EC*, se observa que el BcGA, ejerce un efecto potenciador sobre la AAM de GA, ya que únicamente la adición de 50 μM de BcGA, causó un efecto significativo de reducción de la μ , respecto a la concentración equivalente, en GA y comparado al crecimiento del m.o. sin adición de AM.

En relación a la AAM de CAR un estudio que ya fue mencionado anteriormente, realizado por Hayashi, y col. [71], los resultados demostraron que la AAM del sistema bovino lactoperoxidasa frente a *Salmonella enteritidis*, aumentó de 1,4 a 3,8 unidades de log, por la adición de extracto de zanahoria. De igual modo, BC, también indujo un incremento en dicha actividad, indicando que BC es uno de los mayores potenciadores de la AAM del sistema lactoperoxidasa. Por el método de difusión de disco, Tao y col., [132], demostraron la AAM de CAR obtenido del extracto metanólico de la corteza de pomelo Shatian (*Citrus grandis* Osbeck). La más alta AAM fue observada contra *E. coli*, seguido de *S. aureus*, y en menor medida contra *B. subtilis*. Los extractos de CAR también tuvieron elevada actividad antifúngica, contra *S. cereviceae*, y moderada frente a *Rhizopus oryzae*.

Para concluir, si bien no se conoce el mecanismo exacto por el que ocurre, ha sido demostrado en el presente capítulo (tanto por pruebas de aplicación, como “*in vitro*”) y en la bibliografía, que BcGA y GA ejercen un importante efecto antimicrobiano, frente a bacterias Gram positivas y en menor medida a Gram negativas.

5. CONCLUSIÓN

El futuro de los antimicrobianos de origen natural, se encuentra determinado por la actitud del consumidor actual ante los preservantes químicos. Los antimicrobianos de



origen natural, se consideran como fuentes potencialmente seguras, pero su uso real en los productos alimenticios, se ha reglamentado en pocos casos.

A partir de los resultados obtenidos, queda demostrado, que los CAR polares (Asta, Canta, Bix y Vit. A), ejercen una mayor AAM respecto de los más apolares: Bc, Apo8, Apo12 y Lic, frente a los tres microorganismos de referencia estudiados. También se demostró que el proceso de microencapsulación potenció la AAM de los CAR. Por la elevada AAM presentada por la GA sobre las velocidades de crecimiento microbiano, los resultados obtenidos dejan en evidencia, que la adición de CAR MC en GA, ejercen un efecto bacteriostático, causando una reducción de la velocidad de crecimiento, sin provocar inhibición del crecimiento, lo cual concuerda con numerosos estudios sobre la AAM de compuestos naturales. Dicha actividad es fundamentalmente aportada por el material de pared de la cápsula.

Finalmente, se pudo comprobar que el efecto antimicrobiano de la adición de CAR MC en GA, producen la reducción de la velocidad de crecimiento de m.o. que se desarrollan normalmente en leche.

Estos resultados, aportan un importante avance en la investigación de la capacidad antimicrobiana de compuestos naturales, como son los CAR y un biopolímero como GA, ambos ampliamente utilizados en la industria alimenticia.

6. REFERENCIAS

1. Blocher, J.C., Busta, F.F. 1985. Multiple modes of inhibition of spore germination and outgrowth by reduced pH and sorbate. *Journal of Applied Bacteriology*. 59, 467-478.
2. Booth, I.R., Kroll, R.G. 1989. The preservation of foods by low pH. In *Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures*. Ed. Gould, G.W. Elsevier, London. 119-160.
3. Bracey, D., Holyoak, C.D., Coote, P.J. 1998. Comparison of the inhibitory effect of sorbic acid and amphotericin B on *Saccharomyces cerevisiae*: is growth inhibition dependent on reduced intracellular pH?. *Journal of Applied Microbiology*. 85, 1056-1066.

4. Krebs, H.A., Wiggins, D., Sole, S., Bedoya, F. 1983. Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. *Biochemical Journal*. 214, 657-663.
5. Eklund, T. 1985. The effect of sorbic acid and esters of *para*-hydroxybenzoic acid on the proton motive force in *Escherichia coli* membrane vesicles. *Journal of General Microbiology*. 131, 73-76.
6. De Wit, J.N., Van Hooydonk, A.C.M. 1996. Structure, functions and applications of lactoperoxidase in natural antimicrobial and systems. *Netherlands Milk and Dairy Journal*. 50, 227-244.
7. Borch, E., Wallentin, C., Rosen, M., Bjorck, L. 1989. Anti-bacterial effect of the lactoperoxidase/thiocyanate/hydrogen peroxide system against strains of *Campylobacter* isolated from poultry. *Journal of Food Protection*. 52, 638-641.
8. Siragusa, G.R., Johnson, M.G. 1989. Inhibition of *Listeria monocytogenes* growth by lactoperoxidase–thiocyanate–H₂O₂ antimicrobial system. *Apply and Environmental Microbiology*. 55, 2802-2805.
9. Juven, B.J., Pierson, M.D. 1996. Antibacterial effects of hydrogen peroxide and methods for its detection and quantification. *Journal of Food Protection*. 59, 1233-1241.
10. Moradas-Ferreira, P., Costa, V., Piper, P., Mager, W. 1996. The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. *Molecular Microbiology*. 19, 651-658.
11. Russel, A.D. 1991. Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics: food additives and food and pharmaceutical preservatives. *Journal of Applied Bacteriology*. 71, 191-201.
12. Hart, J.R., 1984. Chelating agents as preservative potentiators. In: *Cosmetic and Drug Preservation: Principles and Practice*. Ed. Kabara, J.J. Marcel Dekker, New York. 323-337.
13. Graham, A.F., Lund, B.M., 1986. The effect of citric acid on growth of proteolytic strains of *Clostridium botulinum*. *Journal of Applied Bacteriology*. 61, 39-49.
14. Wan, J., Wilcock, A., Coventry, M.J., 1998. The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescence*. *Journal of Applied Microbiology*. 84, 152-158.

15. Samy, R.P., Ignacimuthu, S., Sen, A., 1998. Screening 34 Indian medicinal plants for antibacterial properties. *Journal of Ethnopharmacology*. 62, 173-181.
16. Fuglsang, C.C., Johansen, C., Christgau, S., Adler-Nissen, J., 1995. Antimicrobial enzymes: applications and future potential in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*. 6, 390-396.
17. Beuvier, E., Buchin, S. 2004. Raw milk cheeses. In Cheese chemistry, physics and microbiology. 3rd ed.. Eds. Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., and Guinee, T.P. Elsevier Academic Press, The Netherlands. Amsterdam. 1, 319-345.
18. Michel, V., Hauwuy, A., Chamba, J.F. 2001. La flore microbienne de laits crus de vache: diversité et influence des conditions de production. *Le Lait*. 81, 575-592.
19. Awad, S. 2006. Texture and flavour development in Ras cheese made from raw and pasteurised milk. *Food Chemistry*. 97, 394-400.
20. Bouton, Y., Buchin, S., Duboz, G., Pochet, S., Beuvier, E. 2009. Effect of mesophilic lactobacilli and enterococci adjunct cultures on the final characteristics of a microfiltered milk Swiss-type cheese. *Food Microbiology*. 26, 183-191.
21. Chambers, D. H., Esteve, E., Retiveau, A. 2010. Effect of milk pasteurization on flavor properties of seven commercially available French cheese types. *Journal of Sensory Studies*. 25, 494-511.
22. Coorevits, A., De Jonghe, V., Vandroemme, J., Reekmans, R., Heyrman, J., Messens, W., De Vos, P., Heyndrickx, M., 2008. Comparative analysis of the diversity of aerobic spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional dairy farms. *Systematic and Applied Microbiology*. 31, 126-140.
23. LeJeune, J.T., Rajala-Schultz, P.J., 2009. Food safety: unpasteurized milk: a continued public health threat. *Clinical Infectious Diseases*. 48, 93-100.
24. Marth, E.H. 2001. Applied Dairy Microbiology, 2nd Edition. Eds. Marth, E.H. and Steele, J.L. Marcel Dekker, Inc. New York, NY. 10016. ISBN: 0-8247-0536-X
25. Sven-Olof Enfors. 2008. Food microbiology: Chapter 3. Spoilage of different types of food. KTH Biotechnology. Stockholm.

26. Sørhaug, T., Stepaniak, L. 1997. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. Review Article. *Trends in Food Science & Technology*. 8, 2, 35-41.
27. Munsch-Alatossava, P., Alatossava, T. 2006. Phenotypic characterization of raw milk-associated psychrotrophic bacteria. *Microbiological Research*. 161, 334-346.
28. Demarigny, Y. 1996. Rôle de la flore du lait cru et des paramètres technologiques sur l'évolution des caractéristiques biologiques, microbiologiques et sensorielles des fromages à pâte pressée cuite. Ph.D. thesis. ENSBANA, Dijon, France.
29. Desmasures, N., Bazin, F., Gueguen, M. 1997. Microbiological composition of raw milk from selected farms in the Camembert region of Normandy. *Journal of Applied Microbiology*. 83, 53-58.
30. Desmasures, N., Gueguen, M. 1997. Monitoring the microbiology of high quality milk by monthly sampling over two years. *Journal of Dairy Research*. 64, 271-280.
31. Richard, J. 1981. Influence de diverses methodes de nettoyage des machines à traire sur la "qualité de conservation" du lait cru à base température. *Le Lait*. 61, 354-369.
32. Desmasures, N., Opportune, W., Gueguen, M. 1997. *Lactococcus* spp., yeasts, and *Pseudomonas* spp. on teats and udders of milking cows as potential sources of milk contamination. *International of Dairy Journal*. 7, 643-646.
33. Thomas, S.B., Thomas, B.F. 1973. Psychrotrophic bacteria in refrigerated bulk-collected raw milk. *Dairy Industries*. 38, 61-70.
34. Sørhaug, T., Stepaniak, L. 1997. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Trends in Food Science and Technology*. 8, 35-41, y referencias allí citadas.
35. Jay, J.M. 2000. Taxonomy, role and significance of microorganisms in food. Modern Food Microbiology, Aspen Publishers, Gaithersburg MD, USA. P 13.
36. Iramain, M., Pol, M., Korol, S., Herrero, M., Fortunato, M.S., Bearzi, C., Chavez, J., Maldonado May, V. 2005. *Pseudomonas aeruginosa* en agua y leche cruda: Informe Preliminar. Comunicación Corta. *InVet*. 7, 1, 133-137. ISSN:1668-3498

37. Braun, P., Sutherland, J.P. 2003. Predictive modeling of growth and enzyme production and activity by a cocktail of *Pseudomonas* spp., *Shewanella putrefaciens* and *Acinetobacter* sp. *International Journal of Food Microbiology*. 86, 271-282.
38. Jaspe, A., Fernandez, L., Palacios, P., Sanjose, C. 1995. Interaction between *Pseudomonas fluorescens* and Lactic Starter Hansen No. 44 in milk at 7°C. *Milchwissenschaft*. 50, 607-610.
39. Desmasures, N. 1995. Etude de laits de haute qualité: caractérisation et aptitudes microbiologiques à la transformation en camembert au lait cru. Ph.D. thesis. Institute of Biochemistry and Applied Biology, University of Caen, Caen, France.
40. Fricker, M., Skanseng, B., Rudi, K., Stessl, B., Ehling-Schulz, M. 2011. Shift from farm to dairy tank milk microbiota revealed by a polyphasic approach is independent from geographical origin. *International Journal of Food Microbiology*. 145, 24-30.
41. Braun, P., Fehlhaber, K., Klug, C., Kopp, K. 1999. Investigations into the activity of enzymes produced by spoilage-causing bacteria: a possible basis for improved shelf-life estimation. *Food Microbiology*. 16, 531-540.
42. Chena, L., Daniela, R.M., Coolbear, T. 2003. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milkpowders. *International Dairy Journal*. 13, 255-275.
43. Matta, H., Punj, V. 1999. Isolation and identification of lipolytic, psychrotrophic, spore forming bacteria from raw milk. *International Journal of Dairy Technology*. 52, 59-62.
44. Macrae, A.R. 1983. Extracellular microbial lipases. In: *Microbial enzymes and biotechnology*. Ed. Fogarty W.M. Applied Science Publishers, USA. New York. 225-249.
45. Daniel, R.M., Toogood, H.S., Bergquist, P.L. 1995. Thermostable proteases. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 13, 51-100.

- 46 Craven, H.M., Mac Cauley, B.J. 1992. Microorganisms in pasteurized milk after refrigerated storage, I: identification of types. *Journal of Dairy Technology*. 47, 38-45.
47. Shah, N.P. 1994. Psychrotrophs in milk: a review. *Milchwissenschaft*. 49, 432-437.
48. Duthoit, F., Godon, J.J., Montel, M.C. 2003. Bacterial community dynamics during production of registered designation of origin Salers cheese as evaluated by 16S rRNA gene single-strand conformation polymorphism analysis. *Applied Environmental Microbiology*. 69, 3840-3848.
49. Ghozzi, R., Morand, P., Ferroni, A., Beretti, J.L., Bingen, E., Segonds, C., Husson, M.O., Izard, D., Berche, P., Gaillard, J.L. 1999. Capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism analysis for rapid identification of *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative nonfermenting bacilli recovered from patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 37, 3374-3379.
50. Ercolini, D., Hill, P.J., Dodd, C.E.R. 2003. Bacterial community structure and location in stilton cheese. *Applied Environmental Microbiology*. 69, 3540-3548.
51. Randazzo, C.L., Torriani, S., Akkermans, A.D.L., De Vos, W.M, Vaughan, E.E. 2002. Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Applied Environmental Microbiology*. 68, 1882-1892.
52. Hernan-Gomez, S., Espinosa, J.C., Ubeda, J.F. 2000. Characterization of wine yeasts by temperature gradient gel electrophoresis (TGGE). *FEMS Microbiology Letters*. 193, 45-50.
53. Zoetendal, E.G., Akkermans, A.D.L., De Vos, W.M. 1998. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied Environmental Microbiology*. 64, 3854-3859.
54. Ogier, J.C., Son, O., Gruss, A., Tailliez, P., Delacroix-Buchet, A. 2002. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperatura gradient gel electrophoresis. *Applied Environmental Microbiology* 68, 3691-3701.

55. Zhu, X.Y., Zhong, T., Pandya, Y., Joerger, R.D. 2002. 16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens. *Applied Environmental Microbiology*. 68, 124-137.
56. Lafarge, V., Ogier, J-C., Girard, V., Maladen, V., Laveau, J-Y., Gruss, A., Delacroix-Buchet, A. 2004. Raw Cow Milk Bacterial Population Shifts Attributable to Refrigeration. *Applied and Environmental Microbiology*. 5644-5650.
57. Gonçalves Machado, S., Bazzolli, D.M, Vanetti, M.C. 2013. Development of a PCR method for detecting proteolytic psychrotrophic bacteria in raw milk. *International Dairy Journal*. 29, 8-14.
58. Barbano, D.M., Ma, Y., Santos, M.V. 2006. Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life. *Journal of Dairy Science*. 89, 15-19.
59. Kuetea, V., Alibert-Francob, S., Eyong, K.O., Ngameni, B., Folefoc, G.N., Nguemeving, J.R., Tangmouo, J.G., Fotso, G.W., Komguem, J., Ouahouo, B.M., Bolla, J.M., Chevalier, J., Ngadjuic, B.T., Nkengfack, A.E., Pagès, J.M. 2010. Antibacterial activity of some natural products against bacteria expressing a multidrug-resistant phenotype. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 37, 156-61.
60. Serra, A.T., Matias, A.A., Nunes, V.M., Leitão, M.C., Brito, D., Bronze, R., Silva, S., Pires, A., Crespo, M.T., San Romão, M.V., Duarte, C.M. 2008. In vitro evaluation of olive- and grape-based natural extracts as potential preservatives for food. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 9, 311-319.
61. Tajkarimi, M.M., Ibrahima, S.A., Cliver, D.O. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*. 21, 1199-1218.
62. Gutiérrez-Larraínzar, M., Rúa, J., Caro, I., De Castro, C., De Arriaga, D., García-Armesto, M.R., Del Valle, P. 2012. Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of natural phenolic compounds against foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Food Control*. 26, 555-563.
63. Da Silva Malheiros, P., Sant'Anna, V., Utpott, M., Brandelli, A. 2012. Antilisterial activity and stability of nanovesicle-encapsulated antimicrobial peptide P34 in milk. *Food Control*. 23, 42-47.

64. Liebler, D.C. 1993. Antioxidant Reactions of Carotenoids. *Annals New York Academy Science*. 691, 20-31.
65. Montenegro, M.A., Nazareno, M.A., Durantini, E.N., Borsarelli, C.D. 2001. Singlet Oxygen Quenching Ability of Carotenoids in a Reverse Micelle Membrane Mimetic System. *Photochemistry Photobiology*. 75, 353-361.
66. Montenegro, M.A., Rios de O, A., Mercadante, A.Z., Borsarelli, C.D. 2004. Model Studies on the Photosensitized Isomerization of Bixin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 52, 367-373.
67. Palozza, P., Krinsky, N.I. 1992. Antioxidant Effects of Carotenoids in vivo and in vitro. *Method Enzymology*. 213, 403.
68. Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., Bourke, P. 2009. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiology*. 26, 142-150.
69. Fleischera, T.C., Ameadea, E.P.K., Mensaha, M.L.K., Sawerb, I.K. 2003. Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa Orellana*. *Fitoterapia*. 74, 136-138.
70. Priya, S., Maheswari, P. 2012. Carotenoids From The Feathers Waste Of Gallus Gallus And Its Antimicrobial Activity. *Pollution Research*. 31, 4, 507-509.
71. Makoto Hayashi, Supaporn Naknukool, Shigeru Hayakawa, Masahiro Ogawa, Al-Baarri Ahmad Ni'matulah. 2012. Enhancement of antimicrobial activity of a lactoperoxidase system by carrot extract and b-carotene. *Food Chemistry*. 130, 541-546.
72. Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. 1995. Carotenoids. Isolation and Analysis. Vol 1A. Eds: Britton, G., Liaaen-Jensens, S., Pfander, H. Birkhäuser Verlag, Basel.
73. Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., Saurel, R. 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*. 40, 1107-1121
74. Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J. 1991. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriology*. 173, 2, 697-703.

75. Ribosomal Data Project. <http://rdp.cme.msu.edu/>.
76. Basic Local Alignment Search tool. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>.
77. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. <http://www.bacterio.net/>.
78. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 17, 234-238.
79. Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, S.C., Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *The American Journal of Clinical Pathology*. 45, 4, 493-496.
80. Cavalieri, S.J., Harbeck, R.J., McCarter, Y.S., Ortez, J.H., Rankin, I.D., Sautter, R.L., Sharp, S.E., Spiegel, C.A Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Ed. Coyle, M.B. Departments of Laboratory Medicine and Microbiology University of Washington, Seattle, Washington.
81. Davies, B.H. 1976. In Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. Ed. Goodwin, T.W. Academic Press: London. 2, 38-165.
82. Código Alimentario Argentino (Ley No 18284, Decreto No 2126/71). Marzochi Ediciones
83. ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods, of the International Union of Microbiological Societies). Microorganismos de los Alimentos, Volumen 1. Su significado y métodos de enumeración. 2da Edición. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza España. ISBN: 84-200-0908-3.
84. Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H., Stiles, M.E. 1999. Enterococci at the crossroads of food safety?. *International Journal of Food Microbiology*. 47, 1-24.
85. Gelsomino, R., Vancanneyt, M., Condon, S., Swings, J., Cogan, T.M. 2001. Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheesemaking factory. *International Journal of Food Microbiology*. 71, 177-188.
86. Kagkli, D.M., Vancanneyt, M., Hill, C., Vandamme, P., Cogan, T.M. 2007. Enterococcus and Lactobacillus contamination of raw milk in a farm dairy environment. *International Journal of Food Microbiology*. 114, 243-251.

87. Facklam, R., Elliott, J.A. 1995. Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, Gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci. *Clinical Microbiological Review*. 8, 479-495.
88. Woodford, N., Johnson, A.P. 1994. Glycopeptide resistance in Gram-positive bacteria: from black and white to shades of grey. *Journal of Medical Microbiology*. 40, 375-378.
89. Teuber, M., Perreten, V., Wirsching, F. 1996. Antibiotikum resistente Bakterien: eine neue Dimension in der Lebensmittel mikrobiologie. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technology*. 29, 182-199.
90. Klein, G., Pack, A., Reuter, G., 1998. Antibiotic resistance patterns of enterococci and occurrence of vancomycin-resistant enterococci in raw minced beef and pork in Germany. *Applied Environmental and Microbiology*. 64, 1825-1830.
91. Phillips, J.D., Griffiths, M.W. 1990. Pasteurized dairy products: the constraints imposed by environmental contamination. In: Food contamination from environmental sources. Eds. Nriagu, J.O. and Simmons, M.S. Wiley, USA. New York. 23, 387-456.
92. García-Armesto, M.R., Sutherland, A.D. 1997. Temperature characterization of psychrotrophic and mesophilic *Bacillus* species from milk. *Journal of Dairy Research*. 64, 261-270.
93. Mallet, A., Guéguen, M., Kauffmann, F., Chesneau, C., Sesboué, A., Desmasures, N. 2012. Quantitative and qualitative microbial analysis of raw milk reveals substantial diversity influenced by herd management practices. *International Dairy Journal*. 27, 13-21.
94. Stackebrandt, E., Rainey, F.A., Ward-Rainey, N.L. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 47, 479-491.
95. Schumann, P., Weiss, N. Stackebrandt, E. 2001. Reclassification of *Cellulomonas cellulans* (Stackebrandt and Keddie 1986) as *Cellulosimicrobium cellulans* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51, 1007-1010.

96. Brown, J.M., Steigerwalt, A.G., Morey, R.E., Daneshvar, M.I., Romero, L-J., McNeil, M.M. 2006. Characterization of clinical isolates previously identified as *Oerskovia turbata*: proposal of *Cellulosimicrobium funkei* sp. nov. and emended description of the genus *Cellulosimicrobium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56, 801-804
97. Lund, A.M., Mostert, J.F., Carelsen, M.A., Lategan, B. 1992. Proteolytic and lipolytic psychrotrophic *Enterobacteriaceae* in pasteurised milk and dairy products. *The South African Journal of Dairy Science*. 24, 7-10.
98. O'Brien, J.K., Marshall, R.T. 1996. Microbiological quality of raw ground chicken processed at high isostatic pressure. *Journal of Food Protection*. 59, 146-150.
99. Ternström, A., Molin, G. 1987. Incidence of potential pathogens on raw pork, beef and chicken in Sweden, with special reference to *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Journal of Food Protection*. 50, 141-146.
100. Lindberg, A. M., Ljunghb, A., Ahrné, S., Löfdahl, S., Molin, G. 1998. *Enterobacteriaceae* found in high numbers in fish, minced meat and pasteurised milk or cream and the presence of toxin encoding genes. *International Journal of Food Microbiology*. 39, 11-17.
101. Kratz, A., Greenberg, D., Barki, Y., Cohen, E., Lifshitz, M. 2003. *Pantoea agglomerans* as a cause of septic arthritis palm tree thorn injury; case report and literature review. *Archives of Disease in Childhood*. 88, 542-544.
102. Aguado García, J.M., Lumbreras Bermejo, C. 1998. Infecciones por enterobacterias. *Medicine*. 7, 3622-3628.
103. Griffin S. 2000. Aspects of antimicrobial activity of terpenoids and the relationship to their molecular structure. Richmond, NSW, Australia.
104. Wieslaw, I., Gruszecky, W., Kazimierz Strzalka. 2005. Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1740. 108-115.
105. Gabrielska, J., Gruszecky, W. 1996. Zeaxanthin (dihidroxy- β -carotene) but not β -carotene rigidifies lipid membranes: a ¹H-NMR study of carotenoid-egg phosphatidylcholine liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1285, 167-174.

106. Inoue, Y., Shiraishi, A., Hada, T., Hirose, K., Amashima, H., Shimada, J. 2004. The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. *FEMS Microbiology Letters*. 237, 325-331.
107. Sikkema, J., DeBont, J., Poolman, B. 1995. Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. *Microbiological Reviews*. 59, 201-222.
108. Harrop, A.J., Hocknull, M.D., Lilly, M.D. 1989. Biotransformations in organic solvents: a difference between Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Biotechnology Letters*. 11, 807-810.
109. Vermuë, M., Sikkema, J., Verhuel, A., Bakker, R., Tramper, J. 1993. Toxicity of homologous series of organic solvents for the Gram-positive bacteria *Arthrobacter* and *Nocardia* sp. And the Gram-negative bacteria *Acinetobacter* and *Pseudomonas* sp. *Biotechnology and Bioengineering*. 42, 747-758.
110. Clark, D.T., Gazi, M.I., Cox, S.W., Eley, B.M., Tinsley, G.F. 1993. The effects of *Acacia arabica* gum on the in vitro growth and protease activities of periodontopathic bacteria. *Journal of Clinical Periodontology*. 20, 238-243.
111. Onishi, T., Umemura, S., Yanagawa, M., Matsumura, M., Sasaki, Y., Ogasawara, T. Ooshima, T. 2008. Remineralization effects of gum arabic on caries-like enamel lesions. *Archives of oral Biology*. 53, 257-260.
112. Tyler, V., Brady, L., Robbers, J. 1977. Pharmacognosy. 7th ed. Eds. Lea and Febiger. Philadelphia. 66-80.
113. Kirtikar, K.R., Basu, B.D. 1984. Indian medicinal plants. 2nd edition. Delhi, Periodical Expert Book Agency. 3, 1596-1598.
114. Saini, M., Saini, R., Roy, S., Kumar, A. 2008. Comparative pharmacognostical and antimicrobial studies of acacia species (Mimosaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*. 2, 12, 378-386, ISSN 1996-0875.
115. Gruszecki, W., Strzalka, K. 2005. Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1740, 108-115.
116. Jezowska, I., Wolak, A., Gruszecki, W.I., Strzalka, K. 1994. Effect of betacarotene on structural and dynamic properties of model phosphatidylcholinemembranes: II. A ³¹P-NMR and ¹³C-NMR study. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1194, 143-148.

117. Van der Meer, W. 1984. Physical aspects of membrane fluidity. In: Physiology of membrane fluidity. Vol. I. Ed. Shinitzky M. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. 53-71.
118. Brenner, R.R. 1984. Effect of unsaturated acids on membrane structure and enzyme kinetics. *Progress in Lipid Research*. 23, 69-96.
119. Beuchat, L.R. 2001. Control of foodborne pathogens and spoilage microorganisms by naturally occurring antimicrobials. Microbial Food Contamination. Eds. Wilson, C.L. and Droby, S. CRC Press. London, UK. Chapter 11, 149-169.
120. Davidson, P.M., Zivanovic, S. 2003. The use of natural antimicrobials. Food Preservation Techniques. Eds. Zeuthen, P. and Bogh-Sorensen, L. Woodhead, Cambridge, UK. 5-30.
121. Nettles, C.G., Barefoot, S.F. 1993. Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection*. 56, 338-356.
122. Raibaudi, R.M., Fortuna, R.S., Belloso, O.M., 2006. Uso de agentes antimicrobianos para la conservación de frutas frescas y cortadas. Universidad de Leida.
123. Zaika, L.A. 1988. Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determinations. *Journal of Food Safety*. 9, 97-118.
124. Rodríguez Saucedo, E.N. 2011. Uso de Agentes Antimicrobianos Naturales en la Conservación de Frutas y Hortalizas. *Ra Ximhai*, revista Social, cultural y desarrollo sustentable. Universidad Autónoma Indígena de México. Mochicahui, El Fuerte, Sinaloa. 7, 1, 153-170.
125. Nikaido, H., Vaara, M. 1987. Outer membrane. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. Eds. Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Low, K.B., Magasanik, B. Schaechter, M. and Umberger, H.E. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 7-22
126. Nikaido, H., Rosenberg, E.Y., Foulds, J. 1983. Porin channels in *Escherichia coli*: studies with β -lactams in intact cells. *Journal of Bacteriology*. 153, 232-240.
127. Nikaido, H., Vaara, M. 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiological Review*. 49, 1-32.

128. Plésiat, P., Nikaido, H. 1992. Outer membranes of Gram-negative bacteria are permeable to steroid probes. *Molecular Microbiology*. 6, 1323-1333.
129. Calvo, J., Martínez-Martínez, L. 2009. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 27, 1, 44-52.
130. Sánchez de Rivas, C. 2006. Antibiótico de ayer, hoy y mañana. *Revista Química viva*. 5, 2, 63-77. ISSN 1666-7948
131. Verma, S.P., Rastogi, A. 1990. Organic pesticides modify lipid-lipid and lipid-protein domains in model membranes. A laser Raman study. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1027, 59-64.
132. Tao, N., Geo, Y., Fei Ge, Y.L. 2010. Carotenoids form the Peel of Shantian Pummelo (*Citrus grandis* Osbeck) and Its antimicrobial Activity. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science*. 7, 1, 110-115.

PARTE III.

Conclusiones

CAPÍTULO 7

Conclusiones Generales

En el presente trabajo de tesis se ha intentado demostrar el efecto protector de CAR MC, sobre alteraciones químicas, fotoquímicas y microbiológicas en productos lácteos. En particular, la AAO y AAM que ejercen los CAR al ser adicionados a leche.

Se comprobó que los CAR MC actúan como desactivantes de EROS como HO^{*} y O₂^{*-}, siendo Apo8-GA el CAR más eficiente, debido a una localización más favorable en la MC, y una mayor accesibilidad de las especies reactivas al interior de la misma. Por otro lado, se demostró la capacidad de GA para desactivar O₂(¹Δ_g) por una vía física, ejerciendo AAO catalítica, con una mínima degradación. Además, se pudo determinar que GA es capaz de desactivar el ³RF*, incluso en condiciones aeróbicas, compitiendo con el oxígeno, lo que estaría asociado a la fracción proteica de GA, específicamente al aminoácido tirosina, a través de un mecanismo de transferencia de electrones. La AAO que posee el biopolímero por sí mismo indica, que el proceso de microencapsulación no sólo protegerá la molécula AOx contenida en el interior de la MC, sino que además, potenciará el efecto protector de la misma, en el alimento que sea adicionado.

En cuanto al efecto protector de los microencapsulados sobre la degradación oxidativa de la leche, a partir de los resultados obtenidos se pudo comprobar, que tanto Bc-GA como GA, ejercen una reducción aproximada del 30% sobre la fotodegradación de la vitamina RF, lo que sería explicado por la AAO de los constituyentes de las MC, en particular, por la capacidad de desactivación de O₂(¹Δ_g) tanto por Bc-GA como por GA, por la desactivación del ³RF causada por GA, y adicionalmente, por un efecto de filtro interno que podría deberse a la absorción de una fracción de la radiación emitida por la lámpara fluorescente por parte de las MC. Frente a la oxidación lipídica fotoinducida, se demostró el efecto fotoprotector de GA por la inhibición de la formación de TBARs en leche de alrededor de 55%, y la inhibición de la formación de

peróxidos del 35%, lo que puede deberse a la capacidad de desactivar EROS, en particular HO[•], el cual es uno de los principales iniciadores en la oxidación lipídica. No se observaron grandes modificaciones en la composición de ácidos grasos totales de leche, por acción de la luz. Sin embargo, se demostró que la adición de GA evita la fotooxidación de los principales ácidos grasos insaturados de la leche, ácido linoleico y oleico. Con respecto a la generación de compuestos volátiles, se observó que GA ejerce un efecto de inhibición sobre la máxima producción de los indicadores de off-flavors en la leche, tales como pentanal, hexanal, heptanal, siendo el mismo de un 25%.

Los resultados obtenidos del estudio de la AAM de CAR puros, demostraron, que los CAR polares (Asta, Canta, Bix y Vit. A), ejercen una mayor AAM respecto de los apolares: Bc, Apo8, Apo12 y Lic, frente a tres cepas de referencia de los m.o. *Bs*, *Ps*, y *Mc*, y además, dicha actividad se vió potenciada por el proceso de microencapsulación debido a una mayor AAM presentada por GA. La adición de CAR MC, ejerce un efecto bacteriostático, causando una reducción de la μ , sin provocar su inhibición o muerte, y es fundamentalmente aportada por el material de pared de la cápsula. Además, dicho efecto también fue demostrado frente al crecimiento de microorganismos que se desarrollan normalmente en leche, al emplear m.o. aislado de leche cruda.

En base a todo lo anteriormente expuesto, se puede concluir que los BcGA y GA, ejercen un moderado efecto protector sobre las alteraciones nutricionales (oxidación de vitaminas, proteínas y lípidos) y organolépticas (desarrollo de off-flavor), siendo en parte aportado, por el material de pared GA. Además se ha realizado un importante avance en la investigación de la AAM de compuestos naturales, como son los CAR y un biopolímero como GA, ambos ampliamente utilizados en la industria alimenticia, como colorante y agente estabilizante, respectivamente.

En definitiva, creemos que el presente trabajo aporta resultados que sustentan y prueban la hipótesis de que la incorporación de productos naturales como CAR MC, en leche y productos lácteos, disminuiría o retardaría el deterioro durante el período de almacenamiento de estos alimentos.

13331