



Subproductos agroindustriales y recursos autóctonos

Procesamiento y técnicas de análisis

L. Almilla-Beltrán, P. Buera,
B.H. Camacho-Díaz, J. Gabilondo
Compiladoras

 **INTA** Ediciones

Colección
INVESTIGACIÓN, DESARROLLO E INNOVACIÓN

Subproductos agroindustriales y recursos autóctonos

Procesamiento y técnicas de análisis

*L. Alamilla-Beltrán, P. Buera, B.H. Camacho-Díaz, J. Gabilondo
Compiladoras*



Ministerio de Agricultura,
Ganadería y Pesca
Argentina

*INTA Ediciones
Estación Experimental Agropecuaria San Pedro
2022*

66:63 Subproductos agroindustriales y recursos autóctonos : procesamiento y
Su16 técnicas de análisis / Compiladoras: L. Alamilla-Beltrán...[et al.] –
Buenos Aires : Ediciones INTA, Estación Experimental Agropecuaria
San Pedro, 2022.
295 p. : il. (PDF)

Otros compiladores: P. Buera, B.H. Camacho-Díaz, J. Gabilondo

ISBN 978-987-679-329-2 (digital)

i. Alamilla-Beltrán, L. ii. Buera, María del Pilar. iii. Camacho-Díaz, B.H. iv.
Gabilondo, J.

AGROINDUSTRIA – SUBPRODUCTOS – TECNOLOGIA – PROCESAMIENTO

DD-INTA

Este documento es resultado del financiamiento otorgado por el Estado Nacional, por lo tanto, queda sujeto al cumplimiento de la Ley N° 26.899.

Se enmarca dentro del Programa Nacional de Agroindustria y agregado de valor y el Proyecto Específico 1130043 “Estrategias para la Diferenciación de Alimentos y el Desarrollo de Nuevos Productos Alimentarios”.

Fue elaborado con la inestimable colaboración del Programa CYTED.

Diseño de tapa y diagramación:

Mariana Piola
Fedra Albarracín

*Este libro
cuenta con licencia*



Autores



Miembros de la Red Iberoamericana CYTED 415RT0495 en la Universidad de La Sabana, Bogotá Colombia. De izquierda a derecha: Antonio Jiménez-Aparicio, César Augusto Cortes-García, Cecilia Abirached, Tatiana Aguirre-Costa, Patricio Santagapita, Florencia Mazzobre, Diomedes Díaz-Suárez, Patricia Risso, Fernando Ferreira, Sergio Rozycki, Pilar Buera, Fabiano Freire-Costa, Julieta Gabilondo, Rafael Giménez-Martínez, Liliana Alamilla-Beltrán, Franco Vasile, Paz Robert-Canales, Luis Panizzolo, Mónica Nazareno, Diany Arzuga-Pernett, Oscar Vega-Castro, Erick Rojas-Balcazar, Brenda Camacho-Díaz.



Miembros de la Red Iberoamericana CYTED 415RT0495 en la Universidad de La Sabana, Bogotá Colombia. De izquierda a derecha: arriba: César Augusto Cortes-García, Diomedes Díaz-Suárez, Aldo Fernández-Varela, Franco Vasile, Patricio Santagapita, Luis Panizzolo, Cecilia Abirached, Micaela Galante, Fernando Ferreira, Fabiano Freire-Costa. Abajo: Camilo Sandoval, Arjana Serrano, Julieta Gabilondo, Ximena Quintanilla-Carbajal, Florencia Mazzobre, Paz Robert-Canales, Antonio Jiménez-Aparicio, Pilar Buera, Erick Rojas-Balcazar, Sergio Rozycki, Patricia Risso, Liliana Alamilla-Beltrán, Myriam Villarreal, Mónica Nazareno, Brenda Camacho-Díaz, Leonardo Martín Calderón, Diany Arzuga-Pernett, Rafael Giménez-Martínez (en cuclillas).

Instituciones participantes

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Argentina

Universidad de Buenos Aires. Argentina

Universidad Nacional del Litoral. Argentina

Universidad Autónoma Gabriel René Moreno. Bolivia

Universidad de Juiz de Fora. Brasil

Universidad de La Sabana. Colombia

Universidad de Chile. Chile

Universidad de Granada. España

Instituto Politécnico Nacional. México

Universidad de la República. Uruguay

Universidad Popular del César, Valledupar. Colombia

Universidad Nacional del Chaco Austral. Argentina

Universidad Nacional de Santiago del Estero. Argentina

Universidad de Antioquía. Colombia

Universidad Nacional de Rosario. Argentina

Contenidos

Parte 1. Aprovechamiento de subproductos agroindustriales y disminución de pérdidas	7
Capítulo 1: Valorización de residuos de aguacate	8
Capítulo 2: Importancia de los fotoquímicos en los residuos de aguacate	18
Capítulo 3: Descartes de flores comestibles como fuente de compuestos bioactivos: caso rosas	26
Capítulo 4: Revalorización del suero de quesería. Productos lácteos funcionales	35
Capítulo 5: Desarrollo de biopolímeros innovadores a partir de residuos naturales	47
Capítulo 6: Ejemplo de proyecto de extensión: Negocio logístico para la cadena para la cadena hortofrutícola de pequeños parceleros en la región de Azúcar Buena, Valledupar, Colombia	59
Parte 2. Valorización de recursos regionales	66
Capítulo 7: Aprovechamiento de flores comestibles de la región como fuente de compuestos bioactivos: caso tagetes	67
Capítulo 8: Biomoléculas provenientes de la semilla de chíca: características y potencial aplicación en alimentos	75
Capítulo 9: Revalorización de la quinua y sus aplicaciones en la industria	95
Capítulo 10: Aplicaciones tradicionales y potenciales de recursos de bosques tropicales, y de cuatro especies en particular	105
Capítulo 11: Aprovechamiento y análisis de fuentes lácteas no convencionales para el desarrollo de alimentos innovadores	115
Capítulo 12: Alternativas para ampliar el potencial de gomas de fuentes regionales	128
Capítulo 13: Uso de hidrocoloide no convencional como modificador de viscosidad y textura: goma espina corona	137
Parte 3. Herramientas tecnológicas y analíticas	150
Capítulo 14: Optimización de la molienda de algarrobo para fomentar el uso no maderable de fuentes autóctonas. Aplicaciones alimentarias	151
Capítulo 15: Extrusión para el desarrollo de alimentos innovadores: Caso de productos a base de maíz	160
Capítulo 16: Evaluación de cambios fisicoquímicos en fibras de agave obtenidas por organosolv asistido por microondas	175
Capítulo 17: Reología y Textura. Aplicación en Productos Lácteos	187
Capítulo 18: Calorimetría diferencial de barrido como herramienta para promover el aprovechamiento de subproductos y recursos naturales	212
Capítulo 19: Encapsulación de compuestos bioactivos: métodos y caracterización	230
Capítulo 20: Técnicas de análisis microestructural de alimentos: análisis digital de imágenes en microscopía electrónica de barrido y microscopía confocal de barrido láser	252
Capítulo 21: Evaluación de la bioaccesibilidad de compuestos bioactivos en alimentos funcionales: modelos de digestión in vitro	265
Capítulo 22: Nuevas técnicas para la búsqueda de actividad antioxidante en mezclas naturales con aplicación en alimentos	276
Capítulo 23: Uso de herramientas estadísticas en el diseño experimental para el aprovechamiento de subproductos agroalimentarios	284

Prólogo

En este volumen se abordan distintos aspectos clave para el aprovechamiento de subproductos agroindustriales y la valorización de recursos regionales.

Esta publicación surgió de las exposiciones y debates que tuvieron lugar en el marco de la Red Iberoamericana LACFUN-CYTED 415RT0495, del Área Desarrollo Sostenible, entre 2015 y 2019. En esta red participaron investigadores de ocho países (Argentina, Bolivia, Brasil Chile, Colombia, España, México y Uruguay) y además dos empresas (Rocío del Campo y Biofe, ambas de la Provincia de Santa Fe, Argentina) y se combinó con las actividades de un Proyecto de Desarrollo Tecnológico y Social (PDTS), financiado por CONICET (Argentina) y el CIN (Consejo Interuniversitario Nacional). Han sido invitados para contribuir a este libro los referentes internacionales relacionados con los temas abordados, relacionados con los grupos participantes. Especialmente, materializando el intercambio interredes, se ha invitado a miembros de la Red Iberoamericana de Alimentos Autóctonos Subutilizados (ALSUB-CYTED, 118RT0543), coordinada por la Dra. Sandra Sayago, a contribuir con un capítulo sobre análisis multivariado.

El desarrollo sostenible se basa en la necesidad de que exista un delicado equilibrio entre tres aspectos: el impulso económico de una región, la conservación del medio ambiente y el bienestar de la sociedad involucrada. Se plantea como uno de los objetivos de la FAO para contribuir a la seguridad alimentaria (ODS 2).

Las reuniones, que se realizaron en varios de los países miembros de la Red, tuvieron como objetivo el estudio y la difusión de los beneficios de la recuperación de subproductos agroindustriales y el aprovechamiento de recursos regionales para la producción de alimentos. Estos aspectos favorecen también la soberanía alimentaria, que es uno de los componentes de la seguridad alimentaria.

El libro está conformado por tres partes:

En la Parte 1 se discuten algunos casos sobre la utilización de subproductos agroindustriales, que además de contribuir a evitar pérdidas y desperdicios de alimentos, abren oportunidades para la obtención y desarrollo de nuevos productos, con potenciales propiedades funcionales. El aprovechamiento de desechos trae aparejado la disminución del impacto ambiental, y/o del costo de su tratamiento, a la vez que beneficia económicamente la organización por el agregado de valor a subproductos.

En la Parte 2 se tratan casos de valorización de recursos regionales con un rol central en el agregado de valor para el desarrollo económico de pequeños productores.

Por último, en la Parte 3 se discuten algunas herramientas para la obtención, caracterización e implementación de productos innovadores, que podrían producir impacto en las sociedades involucradas.

La tarea de impulsar el aprovechamiento de subproductos y de los recursos localmente disponibles para tender a la seguridad alimentaria requiere una acción concertada de los organismos de ciencia y técnica, la sociedad y los productores. Por ello, los temas se han analizado desde diversas perspectivas, con la participación de empresas que con vocación emprendedora han participado para acercar la investigación a la producción, y que sea posible llevar al mercado productos innovadores.

Hemos contado con el apoyo de programas que fomentaron la interrelación investigación-producción-desarrollo y con actores involucrados en la generación de estrategias de fomento a emprendimientos.

La creciente preocupación de los consumidores por el cuidado del medio ambiente, el reclamo de alimentos naturales y la legislación ambiental son fuerzas impulsoras importantes para la introducción de prácticas sostenibles en industrias procesadoras de alimentos, para impulsar el desarrollo de estos temas en los distintos niveles de educación y para promover su difusión al público en general.

A partir de 2021 la interacción de los grupos ha continuado en la Red AUIP (Asociación de Universitaria Iberoamericana de Posgrado), con el tema de Herramientas para una Economía Circular en Procesos Agroindustriales (riihec.org).

Agradecemos a todos los especialistas que han contribuido a la realización de este libro, a sus instituciones y al programa CYTED que ha hecho posible la interacción entre grupos de distintas latitudes, diferente formación y variada orientación temática, brindando las herramientas para la utilización integral de los recursos y contribuyendo a la seguridad alimentaria a través del desarrollo sostenible.

Dra. María del Pilar Buera
Investigadora Superior de CONICET, Argentina
FCEN-Universidad de Buenos Aires
Coordinadora Red Iberoamericana CYTED 415RT0495

Capítulo 22

Nuevas técnicas para la búsqueda de actividad antioxidante en mezclas naturales con aplicación en alimentos

Oscar Bernardo Micheloni¹, Abel Eduardo Farroni²

¹Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires. Departamento de Ciencias Básicas. Pergamino, Buenos Aires. Argentina

²Intituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Estación Experimental Agropecuaria Pergamino. Laboratorio de Calidad de Alimentos Suelos y Aguas. Argentina

Resumen

Los ensayos autográficos acoplados a cromatografía constituyen una herramienta interesante e innovadora en la búsqueda de compuestos activos en la preservación de alimentos a partir de extractos naturales. Como principio general de las autografías, luego del desarrollo de la cromatografía, se deposita sobre la placa un sistema de reactivos que revela la actividad buscada mediante un cambio de color localizado. El acoplamiento de una técnica de detección con una separativa es un diseño que permite la localización de los posibles compuestos activos presentes en mezclas complejas facilitando su aislamiento guiado por la actividad buscada, disminuyendo los costos y los tiempos. Las autografías químicas con revelado por aspersion fueron utilizadas con éxito para la detección de actividad antioxidante a partir de la captación de radicales libres en extractos acuosos obtenidos a partir de especies de crecimiento silvestre como *Nicotiana longiflora*, *Oxalis articulata*, que presentaron actividad captadora de DPPH, y *Sonchus oleraceus*, *Sphaeralcea bonariensis* y *Cichorium intybus* las cuales a su vez fueron positivas en el ensayo de ABTS. Las autografías enzimáticas pueden utilizarse para la búsqueda de actividad inhibitoria de las polifenoloxidasas. El uso de PPO fuentes naturales en el ensayo permite detectar compuestos que inhiban específicamente la enzima del alimento que se desea preservar, en este caso manzana, evitando la aparición de falsos positivos o negativos debidos a las diferencias de especificidad con la enzima comercial de hongos. La versatilidad de las autografías y su capacidad de separación las hace herramientas muy importantes en la búsqueda de una actividad específica en mezclas complejas como los extractos naturales.

1. Introducción

La investigación sobre el uso de antioxidantes es un tema complejo y se ha incrementado en los últimos tiempos. Existe un gran número de metodologías y variaciones de estas para medir la capacidad antioxidante en materiales vegetales. Los sistemas biológicos presentan la particularidad de poseer múltiples fuentes de actividad antioxidante como, por ejemplo: enzimas, como superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, polifenoloxidasa y catalasa; macromoléculas como albumina, ceruloplasmina, ferritina, otras proteínas; pequeñas moléculas o metabolitos secundarios como ácido ascórbico, glutatión, ácido úrico, tocoferoles, carotenoides, polifenoles; e incluso algunas hormonas (estrógenos, angiotensina, melatonina, etc.) (1). Existen diversos métodos espectrofotométricos para evaluar la actividad antioxidante, ya sea in vitro o in vivo (2–5). Una de las estrategias más aplicadas en las medidas in vitro de la capacidad antioxidante total de un compuesto, mezcla o alimento, consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical. Cuando la actividad antioxidante se manifiesta como la inhibición de una enzima, el abordaje consiste en evaluar la actividad enzimática remanente en presencia de la muestra (6–8). No obstante, las determinaciones de la capacidad antioxidante realizadas in vitro nos dan tan sólo una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas in vivo (9).

Los ensayos autográficos acoplados a cromatografía en placa han sido considerados como generadores de una nueva era en la ciencia de la separación y determinación de actividad de compuestos químicos presentes en los productos naturales (10). Pueden implementarse como una herramienta cualitativa simple, de bajo costo y llevarse adelante en laboratorios sencillos sin la necesidad de utilizar equipamientos complejos. Como principio general de las autografías, luego del desarrollo de la

cromatografía, se deposita sobre la placa un sistema de reactivos que revela la actividad buscada mediante un cambio de color localizado. Esto puede hacerse sumergiendo la placa en una solución reveladora, aplicando la solución sobre la placa en forma de aerosol o en forma de un gel delgado que contenga los reactivos necesarios. El acoplamiento de una técnica de detección con una separativa es un diseño que permite la separación de los posibles compuestos activos presentes en mezclas complejas facilitando su localización y el aislamiento guiado por la actividad buscada, disminuyendo los costos y los tiempos (11, 12). Las autografías pueden ser clasificadas en tres grupos: autografías a célula entera o bioautografías, autografías químicas y autografías macromoleculares o enzimáticas. Las autografías a "célula entera" o bioautografías fueron las primeras en utilizarse. Estos ensayos se basan en la evaluación de la capacidad inhibitoria del crecimiento de diferentes microorganismos y han sido mencionados como la metodología más eficiente para el descubrimiento de nuevos compuestos antimicrobianos (13). Las primeras bioautografías se implementaron usando como fase estacionaria papel para estimar la pureza de penicilinas (14). El uso de cromatografía en capa delgada CCD fue introducido recién en el año 1961 (15). Las autografías químicas existentes se utilizan para la determinación de actividad antioxidante, las mismas se basan en la medición de la capacidad captadora de radicales libres utilizando 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (16) o el radical estable del 2,2'-azino-bis(3-etil-5-metil-6-tiazolil-sulfonil)propano (ABTS) (17).

En las autografías macromoleculares o enzimáticas, se trata de poner en evidencia la inhibición de una enzima. En el caso del estudio de inhibidores enzimáticos se aplica sobre la placa cromatográfica una solución de tinción en forma líquida o de un gel delgado conteniendo los reactivos que permitan el desarrollo de una reacción de color partir de la actividad enzimática buscada, detectando, la presencia de la misma por un cambio de color respecto del fondo en el lugar donde está presente el compuesto activo. El uso de geles de agarosa permite controlar mucho mejor el pH y la concentración de enzimas y sustratos en el medio de reacción. En estos casos es importante tener en cuenta que el compuesto activo debe migrar desde la placa al gel y por lo tanto son importantes las interacciones y la hidrofobicidad de la placa. En cambio, cuando la solución reveladora se aplica por aspersión es esta la que difunde en la placa, el procedimiento es más simple que utilizar un gel, pero es más difícil controlar las condiciones y la homogeneidad de la aplicación. Existen diferentes autografías que se han desarrollado utilizando diferentes enzimas, la mayoría de ellas comerciales como β -glucosidasa (12, 18, 19), xantina-oxidasa (20), acetilcolinesterasa (21, 22), lipasa (23), tirosinasa de hongos (24, 25) y también naturales como polifenol oxidasa de manzanas (26). Para la aplicación en alimentos orientada hacia la búsqueda de compuestos con una actividad particular hacia una enzima que intervenga en el deterioro de estos es conveniente iniciar utilizando como fuente enzimática la enzima de ocurrencia natural presente en el alimento en estudio (26).

2. Detección de inhibidores de polifenoloxidasa

El pardeamiento enzimático conduce a importantes pérdidas económicas en muchos productos frescos, tales como manzanas, peras, bananas, papas y hongos comestibles (27). La estrategia más frecuentemente utilizada para su control es la inhibición de la enzima polifenol oxidasa (PPO) por mecanismos físicos o químicos. Sin embargo, esta no es la única enzima relacionada al pardeamiento. La enzima PPO cataliza la hidroxilación de monofenoles a o-difenoles y la oxidación de difenoles a o-quinonas que se polimerizan con azúcares, aminoácidos y proteínas formando compuestos de color oscuro (melaninas). La enzima peroxidasa (POD) puede oxidar fenoles a quinonas en presencia de peróxido de hidrógeno y la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), por su parte genera sustratos fenólicos, que pueden ser utilizados por la PPO y POD (28). Por lo tanto, el control del pardeamiento enzimático a partir de la búsqueda de inhibidores naturales de estas enzimas ofrece un importante campo de desarrollo. Estas investigaciones normalmente se llevan a cabo mediante métodos espectrofotométricos utilizando como fuente enzimática tirosinasa comercial de hongos. A pesar de que esta metodología tiene la ventaja de la medición cuantitativa, los extractos naturales al ser mezclas complejas y frecuentemente coloreadas dificultan las mediciones precisas de absorbancia (26). Además, la utilización de tirosinasa de hongos comercial para la búsqueda de inhibidores de la PPO de alimentos vegetales presenta el inconveniente de no poder abordar la diferente afinidad por los inhibidores que presentan las PPO de diferentes fuentes. Esto es debido a que las isoformas de la enzima PPO difieren entre las diferentes especies vegetales presentando distinta sensibilidad a cambios de pH y temperatura o diferente punto isoeléctrico (29). Recientemente, Mayr F. *et al.* (2019) (30)

propusieron que los ensayos espectrofotométricos de aislamiento bioguiado para detectar inhibidores de pardeamiento enzimático a partir de tirosinasa de hongos comercial presentan interferencias que pueden llevar a obtener falsos negativos descartando de esta manera fracciones de extractos que podrían tener compuestos con actividad inhibitoria.

Es aquí donde las autografías enzimáticas preparadas con el enzima blanco y acopladas a cromatografía en capa delgada cobran importancia para la identificación y separación preliminar de compuestos inhibidores. El desarrollo de estas metodologías requiere de la puesta a punto de la corrida cromatográfica y del sistema de revelado. Como primer paso se desarrolla una cromatografía del extracto en estudio y se elimina todo el solvente de corrida por evaporación. La secuencia de incorporación de reactivos debe ser puesta a punto en cada autografía en particular. Para el caso presentado en la Figura 2 los mejores resultados se obtuvieron depositando sobre la placa una solución de agar y 3-metil-2-benzothiazolinona hidrazona (MBTH) en buffer fosfatos 50 mM pH =6,8, sustrato (L-Dopa) y la enzima PPO extraída del alimento vegetal que se quiera estudiar, en este caso manzana. Esta enzima se extrajo en frío y en presencia de polivinilpirrolidona para eliminar compuestos fenólicos, luego se conservó liofilizada a -18 °C. La solución de enzima se cuantificó de manera de utilizar siempre el mismo valor de unidades enzimáticas por superficie de la placa. El MBTH cumple la función de mejorar el contraste entre el fondo coloreado y el área incolora donde la enzima ha sido inhibida ayudando a incrementar la sensibilidad del método. Este compuesto reacciona con la dopaquinona producida por la PPO y tiñe el fondo de la placa de color rojo ladrillo (Figura 1). En la zona donde existe un inhibidor natural de la enzima PPO, esta reacción no se desarrolla apareciendo una zona blanca.

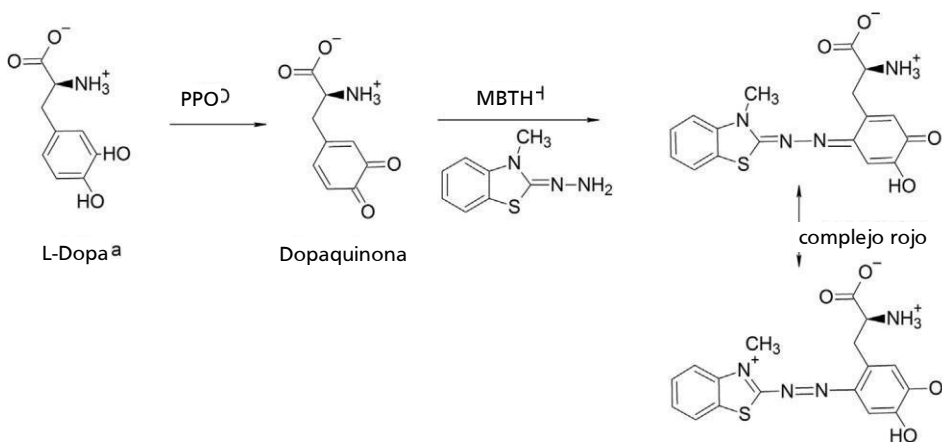


Figura 1. Oxidación de L-Dopa a dopaquinona catalizada por PPO y reacción con MBTH para producir complejo rojo

En la Figura 2 se observa la corrida de un extracto acuoso de ajo revelado con una autografía desarrollada para detectar inhibidores específicos de PPO de manzana además de otras formas de revelar la placa cromatográfica utilizando iluminación UV (26). La longitud de onda de 254 nm activa un fluoróforo verde aplicado sobre el fondo de la placa y su fluorescencia es opacada por los compuestos que corren en la calle donde se siembra la muestra haciéndolos visibles como manchas oscuras. Cuando la placa se ilumina a longitud de onda más larga como 365 nm los compuestos que emiten fluorescencia se observan brillantes sobre un fondo oscuro. De esta manera se pueden poner de manifiesto características que no son observables bajo luz visible. La presencia de un compuesto inhibidor de la PPO de manzana en el extracto acuoso de cebolla (*Allium cepa*) se encuentra marcada con un círculo amarillo en la zona de relación de frente (Rf)=0.55. Este compuesto no aparece destacado a 254 nm ni a 365 nm. Este sistema de revelado en particular es compatible con placas cromatográficas de fase normal y fase reversa. De esta manera se pueden realizar separaciones de compuestos en un amplio rango de polaridad haciendo más versátil la búsqueda de principios activos en diferentes tipos de extractos naturales.

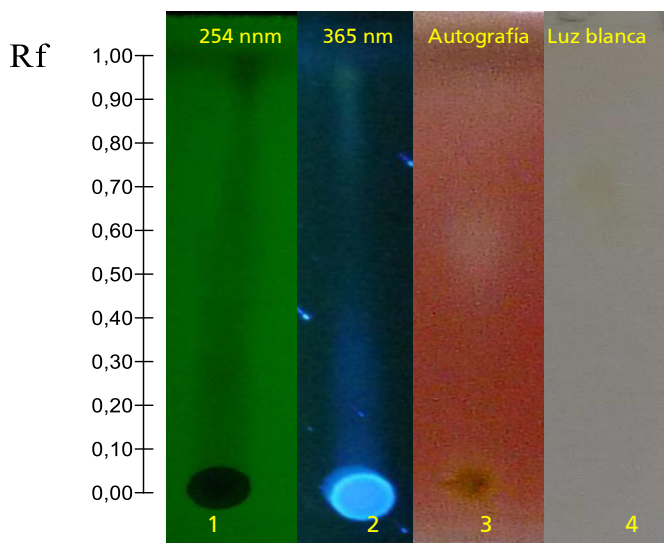


Figura 2. Autografía de extracto acuoso de *Allium cepa* en diferentes condiciones de revelado: 1) Luz UV 254 nm, 2) Luz UV 365 nm, 3) autografía y 4) Luz blanca. Fase móvil: acetona: metanol (90:10)

3. Autografías químicas

3.1 Autografía de DPPH

Este ensayo permite la detección de compuestos con actividad reductora que son capaces de captar radicales libres por medio de la donación de hidrógeno. El DPPH es un radical sintético estable. Esta estabilidad es debida a la deslocalización del electrón desapareado por toda la molécula que impide la dimerización, como sucede para la mayoría de los otros radicales libres. Esta deslocalización es la responsable de originar el color violeta que lo caracteriza. Cuando una solución de DPPH se mezcla con una sustancia capaz de donar un átomo de hidrógeno, se origina la forma reducida del DPPH (Figura 3). La coloración violeta se pierde y prevalece la coloración amarilla del grupo picril presente (31). Esta autografía química puede realizarse aplicando las soluciones de reactivos en forma de aerosol directamente sobre la placa. Se utiliza una solución etanólica de 2,2-Di (4-tert-octilfenil)-1-picril-hidrazilo (DPPH). Luego de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente los compuestos antioxidantes se observaran como puntos amarillos sobre un fondo color violeta (32).

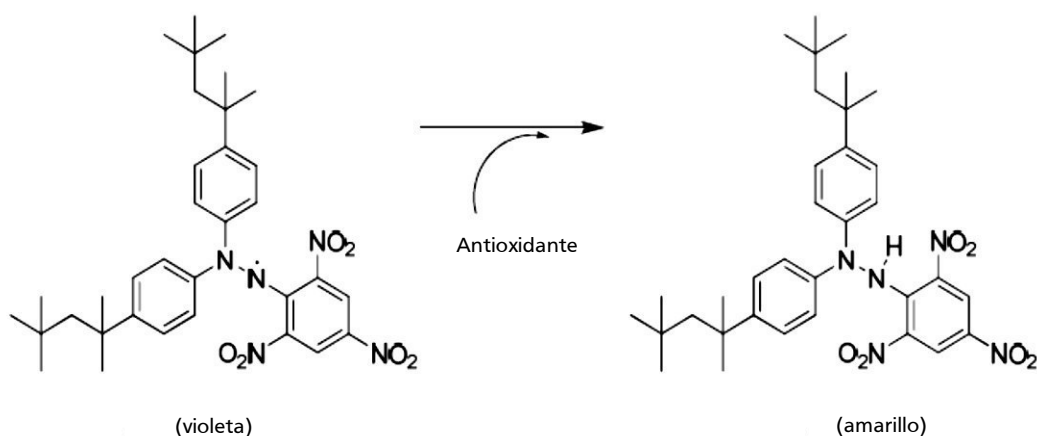


Figura 3. Reacción de captación de radical DPPH por parte de compuestos antioxidantes

La Figura 4 muestra la aplicación de estas autografías al estudio de capacidad antioxidante de extractos acuosos de las especies vegetales de ocurrencia natural, este caso se muestran los resultados de *Nicotiana longiflora* (NL) y *Oxalis articulata* (OA). Las placas cromatográficas se desarrollaron con metanol: acetato de etilo (90:10) y se revelaron aplicando un aerosol de DPPH al 0,04%. Ambas mostraron la presencia de compuestos con actividad antioxidante. NL (calle 1) mostró zonas con actividad antioxidante entre valores de Rf de 0 a 2. OA (calle 2) también mostró compuestos con actividad antioxidante entre valores de Rf de 0 a 0,25 y una zona activa con valor de Rf de 0,5. El revelado a 365 nm puso de manifiesto que varios compuestos o grupos de estos pueden separarse en los dos extractos. Al guiar el revelado con la actividad captadora de DPPH se observa que OA presenta una variedad mayor de compuestos activos que NL cuando se separan con esta fase móvil.

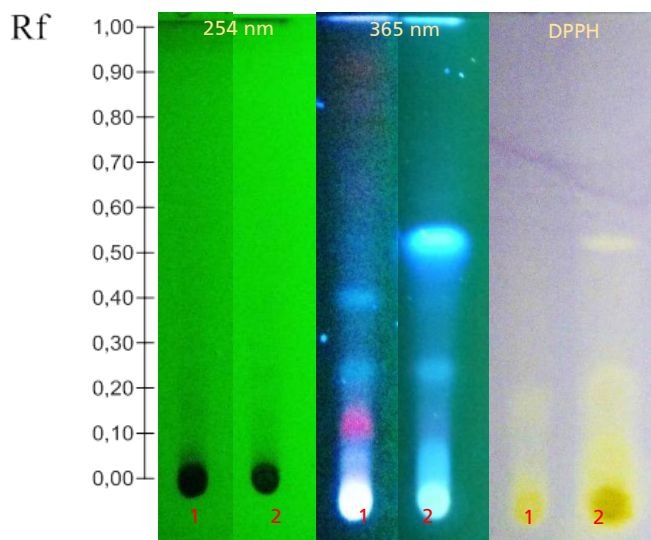


Figura 4. Comparación de cromatogramas con diferentes revelados UV (254 y 365 nm) y autografía DPPH. Calle 1 *Nicotiana longiflora*, calle 2 *Oxalis articulata*. Siembra 500 µg

3.2 Autografía de ABTS

Zampini *et al.* (2010) (17), han desarrollado una técnica autográfica en gel para detectar compuestos antioxidantes de extractos vegetales utilizando como aceptor de hidrógeno el radical ABTS^{•+} formado entre el ABTS y el persulfato de potasio (figura 5). Los compuestos reductores se pueden visualizar como puntos blancos en un fondo verde oscuro.

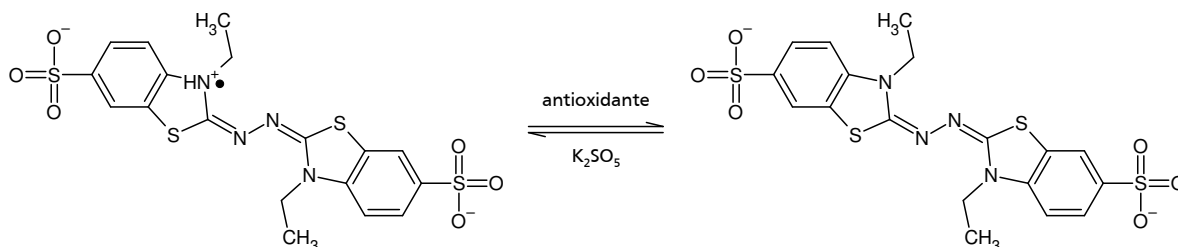


Figura 5. Reacción de formación de radical ABTS^{•+} con persulfato de potasio

En la Figura 6 se pueden observar las cromatografías de extractos acuosos de las especies vegetales *Sonchus oleraceus* (calle 1), *Sphaeralcea bonariensis* (calle 2) y *Cichorium intybus* (calle 3) desarrolladas con hexano: acetato etilo (30:70). En la placa revelada con la autografía se puede visualizar zonas de

color blanco que indican la presencia de compuestos que le ceden un hidrogeno al $ABTS^{+\cdot}$. *Sonchus oleraceus* mostró una importante zona con actividad antioxidante con un valor de Rf de 0,7 y algunos otros sectores con valores de Rf de 0 y superiores a 0,7. *Sphaeralcea bonariensis* mostró zonas con actividad antioxidante con valores de Rf entre 0 y 0,2 y 0,8. *Cichorium intybus* mostró zonas activas con valores de Rf de 0 y 0,75.

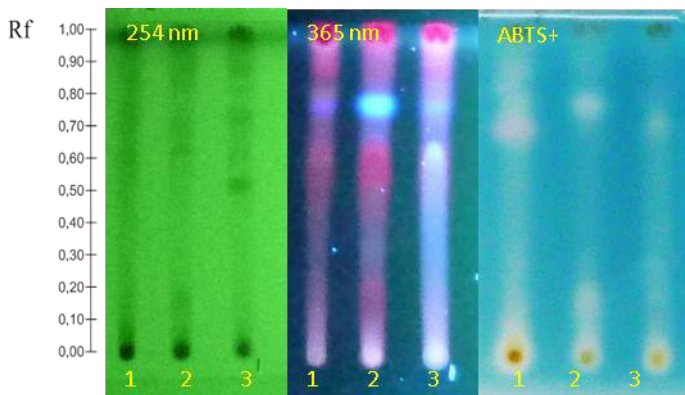


Figura 6. Autografía para capacidad captadora de $ABTS^{+\cdot}$. Placas desarrolladas con hexano: acetato de etilo (30:70), Extractos de *Sonchus oleraceus* (calle 1), *Sphaeralcea bonariensis* (calle 2) y *Cichorium intybus* (calle 3)

4. Consideraciones finales

La búsqueda de compuestos antioxidantes o inhibidores del pardeamiento a partir de fuentes naturales requiere de enfoques innovadores que permitan el procesamiento de muestras complejas de manera simple. Las técnicas autográficas son fáciles de realizar y no requieren grandes equipamientos de laboratorios y permiten una separación preliminar de los compuestos activos. Son versátiles en el sentido que pueden adaptarse a la búsqueda de inhibidores enzimáticos, compuestos con una actividad química específica como el caso de la captación de radicales libres o incluso la inhibición del crecimiento de un microorganismo. El diseño de la separación y el revelado deben realizarse cuidadosamente teniendo en cuenta el sistema en estudio y la actividad buscada. Cuanto más compleja sea la muestra más relevancia cobra la fase separativa, pueden realizarse corridas con diferentes solventes o incluso utilizar fase reversa ampliando mucho el rango de compuestos que puede separarse. La técnica de revelado puede adaptarse a las necesidades del sistema o las capacidades del laboratorio. Las técnicas por inmersión y aspersion tienen la ventaja de ser fáciles de hacer y rápidas además de no requerir equipamiento; pero es difícil calcular la concentración aplicada de los reactivos, se desperdicia mucho y pueden deformar las bandas cromatográficas. La aspersion además presenta dificultades para lograr homogeneidad de cobertura. Esto hace que sea más difícil de reproducir los resultados. La aplicación de la solución de tinción sobre las placas cromatográficas en forma de gel facilita la visualización de los halos, se puede calcular exactamente la concentración aplicada y hace más reproducible el experimento. Por otro lado, es más laboriosa no se puede automatizar y la sensibilidad puede verse afectada por la difusión. El adecuado control de las condiciones en el gel hace que las autografías enzimáticas puedan adaptarse a enzimas de diferentes fuentes, tanto comerciales como extraídas del alimento que se desea preservar. De esta manera se amplía el horizonte de aplicaciones y es posible sortear el problema de la diferente especificidad de los inhibidores evitando falsos resultados negativos o positivos. Finalmente, una vez detectados los compuestos activos, las autografías pueden repetirse modificando los solventes o fases de corrida. A partir de los resultados de las separaciones en TLC mono o bidimensional con diferentes fases móviles se puede guiar la puesta a punto de columnas preparativas para obtener fracciones enriquecidas en los activos que se hayan encontrado y de esta manera proceder a su identificación o elucidación estructural por técnicas como espectrometría de masas o resonancia nuclear magnética de alta resolución. En este trabajo se muestran extractos naturales obtenidos a partir de especies de crecimiento silvestre con actividad antioxidante o inhibidora de la PPO las cuales presentan más de un

compuesto activo. Estas mezclas son un interesante punto de partida para el control del pardeamiento enzimático en alimentos y el reemplazo de compuestos de origen sintético.

Referencias

1. Prior, R., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 4290-4302.
2. Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127, 183-198.
3. Cintra, R.M.G., & Mancini-Filho, J. (2001). Efeito antioxidante de especiarias: avaliação e comparação de métodos in vitro e in vivo. *Nutrire*, 22, 49-62.
4. Miller, N.J., & Rice-Evans, C.A. (1997). The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. *Food Chemistry*, 60, 331-337.
5. 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.
6. Kim, M.J., Kim, C.Y., & Park, I. (2005). Prevention of enzymatic browning of pear by onion extract. *Food Chemistry*, 89, 181-184.
7. Lee, M.Y., Lee, M.K., & Park, I. (2007). Inhibitory effect of onion extract on polyphenol oxidase and enzymatic browning of taro (*Colocasia antiquorum* var. esculenta). *Food Chemistry*, 105, 528-532.
8. Lee, M.K. (2007). Inhibitory effect of banana polyphenol oxidase during ripening of banana by onion extract and Maillard reaction products. *Food Chemistry*, 102, 146-149.
9. Kuskoski, E.M., Troncoso, A.M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicação de diversos métodos químicos para determinar a atividade antioxidantes em polpa de frutas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25, 726-732.
10. Dewanjee, S., Gangopadhyay, M., Bhattacharya, N., Khanra, R., & Dua, T. K. (2015). Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. *Journal of pharmaceutical analysis*, 5(2), 75-84. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2014.06.002>
11. Ramallo, I.A., García, P., & Furlan, R.L.E. (2015). A reversed-phase compatible thin-layer chromatography autography for the detection of acetylcholinesterase inhibitors. *Journal of Separation Science*, 38, 3788-3794.
12. Salazar, M.O., & Furlan, R.L.E. (2007). A rapid TLC autographic method for the detection of glucosidase inhibitors. *Phytochemical Analysis*, 18, 209-212.
13. Rahalison, L. *et al.*, (1991). Article in Phytochemical Analysis. *Phytochemical Analysis*, 2, 199-203.
14. Goodall, R.R., & Levi, A.A. (1947). A micro-chromatographic method for the detection and approximate determination of the different penicillins in a mixture. *Analyst*, 72, 277.
15. Fischer, R., & Lautner, H. (1961). On the paper chromatographic detection of penicillin preparations. *Archiv der Pharmazie und Berichte der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft*, 294, 1-7.
16. Wettasinghe, M., & Shahidi, F. (2000). Scavenging of reactive-oxygen species and DPPH free radicals by extracts of borage and evening primrose meals. *Food Chemistry*, 70, 17-26.
17. Zampini, I.C., Ordoñez, R.M., & Isla, M.I. (2010). Autographic assay for the rapid detection of antioxidant capacity of liquid and semi-solid pharmaceutical formulations using ABTS•+ immobilized by gel entrapment. *AAPS PharmSciTech*, 11, 1159-1163.
18. Ramallo, I.A., Gonzalez Sierra, M., & Furlan, R.L.E. (2012). Discovery of β -glucosidase inhibitors from a chemically engineered extract prepared through ethanolysis. *Medicinal Chemistry*, 8, 112-117.
19. Salazar, M.O., Micheloni, O., Escalante, A.M., & Furlan, R.L.E. (2011). Discovery of a β -glucosidase inhibitor from a chemically engineered extract prepared through sulfonylation. *Molecular Diversity*, 15, 713-719.
20. Ramallo, I.A., Zacchino, S.A., & Furlan, R.L.E. (2006). A rapid TLC autographic method for the detection of xanthine oxidase inhibitors and superoxide scavengers. *Phytochemical Analysis*, 17, 15-19.
21. Ramallo, I.A., Salazar, M.O., & Furlan, R.L.E. (2015). Thin layer chromatography-autography-high resolution mass spectrometry analysis: accelerating the identification of acetylcholinesterase inhibitors. *Phytochemical Analysis*, 26, 404-412.

22. Rhee, I.K., Van De Meent, M., Ingkaninan, K., & Verpoorte, R. (2001). Screening for acetylcholinesterase inhibitors from amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of chromatography. A*, 915, 217–223.
23. Hassan, A.M.S. (2012). TLC bioautographic method for detecting lipase inhibitors. *Phytochemical Analysis*, 23, 405–407.
24. García, P., & Furlan, R.L.E. (2015). Multiresponse optimisation applied to the development of a TLC autography for the detection of tyrosinase inhibitors. *Phytochemical Analysis*, 26, 287–292.
25. Wangthong, S., Tonsiripakdee, I., Monhaphol, T., Nonhabenjawan, R., & Wanichwecharungruang, S.P. (2007). Post TLC developing technique for tyrosinase inhibitor detection. *Biomedical chromatography*, 21, 94–100.
26. Micheloni, O.B., Farroni, A.E., García, P., & Furlan, R.L.E. (2018). Rapid autographic method for detection of enzymatic browning inhibitors based on enzyme immobilization. *Food Chemistry*, 269, 638–643.
27. Whitaker, J.R., & Lee, C.Y. (1995). Recent Advances in Chemistry of Enzymatic Browning. In: *Enzymatic Browning and Its Prevention* Chapter 1. ACS Symposium Series. Vol. 600. p. 2-7.
28. Yingsanga, P., Srilaong, V., Kanlayanarat, S., Noichinda, S., & McGlasson, W.B. (2008). Relationship between browning and related enzymes (PAL, PPO and POD) in rambutan fruit (*Nephelium lappaceum* Linn.) cvs. Rongrien and See-Chompoo. *Postharvest Biology & Technology*, 50, 164–168.
29. Yoruk, R., & Marshall, M.R. (2003). Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. *Journal of Food Biochemistry*, 27, 361–422.
30. Mayr, F. *et al.*, (2019). Mushroom Tyrosinase-Based Enzyme Inhibition Assays Are Not Suitable for Bioactivity-Guided Fractionation of Extracts. *Journal of natural products*, 82, 136–147.
31. Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating anti-oxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26, 211–219.
32. Blois, M.S. (1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, 181, 1199–1200.