



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
AREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN

**“Estudio de la actividad antioxidante de un extracto
acuoso de Cilantro (*Coriandrum sativum*) sobre la
inhibición de la formación de compuestos
fluorescentes durante la glicación de proteínas, en
función del pH”**

T E S I S

Que para obtener el título de
Licenciada en Nutrición

P R E S E N T A

Deysee Aída Jarillo Avilés

Bajo la Dirección de:

Dra. María Teresa Sumaya Martínez



Pachuca, Hgo., Agosto 2008.

El éxito

El éxito es el resultado de pensar, visualizar, planear y llevar a la acción aquello que deseamos.

Los pensamientos alimentados por el deseo y la motivación hacen que las cosas ocurran.

La imagen que tienes de ti mismo es responsable de la manera en que la gente te ve y te trata.

El éxito se manifiesta en pequeños eventos diarios, no sólo en el lograr grandes ambiciones.

Tu propia mente es lo que genera la derrota, y también el éxito.

Pon cuidado al elegir tus pensamientos; ellos son los constructores de tu vida.

Cuando la mente piensa en el éxito, el mundo exterior hace eco de esos pensamientos.

Planta la semilla de la meditación y cosecha el fruto de la paz mental.

Es importante aprender a calmar los vientos de tu mente para disfrutar de mayor paz interior.

Cuando sea obvio que las metas no pueden ser alcanzadas, no ajustes las metas; enfócate en ajustar las acciones que debes tomar para alcanzarlas.

Cuando en tu mente abundan los pensamientos negativos encuentras sólo fracasos. La abundancia de pensamientos positivos en nuestra mente, hace que se materialicen en el mundo.

Autor Anónimo.

AGRADECIMIENTOS

*Doy gracias a **Dios** por darme la vida, por mi familia y por cada una de las personas que me rodean.*

*Esta tesis esta dedicada a toda mi familia pero sobre todo a mi **Hijo** porque fue mi inspiración y la luz al final del túnel para no darme por vencida.*

*Quiero agradecer a mi **Mamá** por amarme, por su constante apoyo en todo momento y consejos para no desistir.*

*A mi **Esposo** por apoyarme en todo momento, por amarme y resistir el constante estrés que esto generaba.*

*A mi **Mamá Conchita** por sus consejos y sus rezos a todas las adversidades.*

*A mis **Hermanos Julio, Herbart y Cristian** por apoyarme en todo momento, aconsejarme y hasta regañarme cuando fue necesario.*

*A mi **Papá** por el apoyo brindado.*

*A mis **Suegros y Cuñada** por su apoyo y palabras de aliento en cada momento.*

*A mi directora de tesis **Dra. Ma. Teresa Sumaya** por enseñarme tantas cosas para la realización de esta tesis, a ser paciente y constante ya que fue todo un reto el proceso, que llegó a un fin bastante exitoso.*

*Al **Dr. Ernesto Alanís** por su enseñanza, consejos y apoyo, ya que fue alguien importante en la realización de esta tesis.*

*Al **Dr. Hugo Nájera** por sus observaciones constructivas en la elaboración de esta tesis.*

*Al **Dr. Jorge Alberto Mendoza** que a pesar de tener poco tiempo de haberme conocido, me enseñó bastantes cosas y por el apoyo brindado.*

*A mi amiga **Almita Loubeth** por ser mi mejor amiga, por ser un apoyo a pesar de estar lejos, gracias por tu amistad.*

*A mi amiga **Julieta de Loyola**, por apoyarme siempre en la elaboración de esta tesis y por sus consejos siempre que los necesite.*

*A **Lirio y Juan Pablo** por su colaboración y amistad.*

*Al **Dr. Raúl Vieyra y la Dra. Lupita** por las facilidades otorgadas y su comprensión en la elaboración de esta tesis.*

*Al **Lic. Manuel Cabrera e Ing. Alejandro** por sus atinados consejos y facilidades brindadas.*

*A **Olga, Luza, Blanca y todas aquellas personas** que hicieron posible la culminación de este trabajo y que no me dejaron desistir para alcanzar el éxito.*

Con cariño Deysee

INDICE GENERAL

| | |
|---|-----|
| INDICE GENERAL | I |
| INDICE DE FIGURAS | IV |
| INDICE DE TABLAS | VI |
| INDICE DE ABREVIATURAS | VII |
| RESUMEN | 1 |
| SUMMARY | 2 |
| 1 MARCO TEORICO | 3 |
| 1.1 Reacción de Maillard. | 3 |
| 1.1.1 Efecto del pH en la Reacción de Maillard. | 7 |
| 1.1.2 Algunos efectos benéficos y tóxicos de los productos de la reacción de Maillard. | 7 |
| 1.1.3 Productos de la Reacción de Maillard tóxicos. | 9 |
| 1.2 Glicación in vivo. | 9 |
| 1.3 Inhibidores de la formación de los Productos de la Reacción de Maillard. | 11 |
| 1.4 Actividad antioxidante. | 12 |
| 1.5 Actividad antioxidante en especias. | 13 |
| 1.5.1 Cilantro (<i>Coriandrum sativum</i>). | 14 |
| 2 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN | 16 |
| 3 JUSTIFICACIÓN | 17 |
| 4 OBJETIVO GENERAL | 18 |
| 4.1 Objetivos específicos. | 18 |
| 5 HIPÓTESIS | 19 |
| 6 METODOLOGIA | 20 |
| 6.1 Diseño metodológico | 20 |
| 6.2 Reactivos y Equipo. | 20 |

| | |
|--|-----------|
| 6.3 Recepción de la materia prima | 21 |
| 6.4 Elaboración del extracto acuoso de cilantro (EAC) | 22 |
| 6.5 Determinación de compuestos fenólicos totales (CFT) | 23 |
| 6.6 Determinación de la actividad antirradical por el método 1,1-difenil-2-picrilhidracil (DPPH●). | 24 |
| 6.7 Determinación de la actividad antioxidante por el método de β -caroteno y ácido linoléico. | 26 |
| 6.8 Evaluación de la actividad quelante del EAC. | 28 |
| 6.9 Determinación de actividad hemolítica. | 30 |
| 6.10 Determinación de la cinética de inhibición de la formación de compuestos fluorescentes PRM. | 31 |
| 6.11 Análisis estadístico. | 32 |
| 7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 33 |
| 7.1 Efecto de la concentración de CFT sobre la actividad antirradical del EAC. | 33 |
| 7.2 Efecto de la concentración del EAC sobre el porcentaje de protección de color de una emulsión de β -caroteno y ácido linoléico. | 34 |
| 7.3 Efecto de la concentración de CFT sobre la actividad quelante del EAC. | 35 |
| 7.4 Efecto de la concentración del EAC sobre la actividad hemolítica. | 36 |
| 7.5 Efecto de la concentración de CFT del EAC sobre la inhibición de la formación de compuestos fluorescentes durante la glicación del sistema peptona y ribosa (SPR). | 37 |
| 7.6 Cinética de la formación de compuestos fluorescentes a diferentes pH durante la glicación del SPR. | 39 |
| 7.7 Cinética de inhibición de la formación de compuestos fluorescentes durante la glicación del SPR en presencia del EAC a pH 9.2. | 41 |

| | |
|---|----|
| 7.8 Cinética de la inhibición de la formación de compuestos fluorescentes durante la glicación del SPR en presencia del EAC a pH 7.4. | 42 |
| 7.9 Cinética de la inhibición de la formación de compuestos fluorescentes durante la glicación del SPR en presencia del EAC a pH 7.0. | 43 |
| 7.10 Cinética de la inhibición de la formación de compuestos fluorescentes durante la glicación del SPR en presencia del EAC a pH 4.2. | 44 |
| 7.11 Cinética de la formación de compuestos pardos a diferentes pH (9.2, 7.4, 7 y 4.2) durante la glicación del SPR. | 45 |
| 7.12 Cinética de la inhibición de la formación de compuestos pardos durante la glicación del SPR en presencia del EAC a pH 9.2. | 46 |
| 7.13 Cinética de la inhibición de la formación de compuestos pardos durante la glicación del SPR en presencia del EAC a pH 7.4. | 47 |
| 7.14 Cinética de la inhibición de la formación de compuestos pardos durante la glicación del SPR en presencia del EAC a pH 7.0. | 48 |
| 7.15 Cinética de la inhibición de la formación de compuestos pardos durante la glicación del SPR en presencia del EAC a pH 4.2. | 49 |
| 7.16 Cinética de la formación de compuestos fluorescentes y compuestos pardos durante la glicación del SPR en presencia del EAC a los diferentes pH analizados. | 51 |
| CONCLUSIONES | 55 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS | 56 |
| ANEXOS | 64 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Esquema simplificado de la reacción de Maillard. | 5 |
| Figura 2. Concentración de reactantes y productos de la reacción de Maillard en función al tiempo de calentamiento | 6 |
| Figura 3. Algunos efectos benéficos y tóxicos de los productos de la reacción de Maillard. | 8 |
| Figura 4. Glicación <i>in vivo</i> . | 10 |
| Figura 5. Curva estándar de ácido gálico utilizada durante el método de CFT. | 24 |
| Figura 6. Esquema de la reacción colorimétrica de DPPH● en presencia de un compuesto con actividad antirradical. | 25 |
| Figura 7. Curva estándar de Trolox utilizada durante el método del DPPH● | 26 |
| Figura 8. Esquema de la reacción colorimétrica de la emulsión β-caroteno y Ácido linoléico en presencia de un compuesto con actividad antioxidante. | 27 |
| Figura 9. Efecto de la concentración de CFT sobre la actividad antirradical del EAC. | 33 |
| Figura 10. Efecto de la concentración del EAC sobre el porcentaje de protección de color de una emulsión de β-caroteno y ácido linoléico. | 34 |
| Figura 11. Efecto de la concentración de CFT sobre la actividad quelante del EAC. | 35 |
| Figura 12. Efecto de la concentración del EAC sobre la actividad hemolítica. | 36 |
| Figura 13. Efecto de la concentración de CFT del EAC sobre la inhibición de la formación de compuestos fluorescentes del SPR. | 37 |
| Figura 14. Efecto de la concentración de CFT del EAC sobre la inhibición de la formación de compuestos fluorescentes durante la glicación del SPR y sobre la actividad antirradical. | 38 |
| Figura 15. Cinética de la formación de compuestos fluorescentes a diferentes pH | |

| | |
|---|----|
| durante la glicación del SPR. | 39 |
| Figura 16. Cinética de la inhibición de la formación de compuestos fluorescentes durante la glicación del SPR en presencia del EAC a pH 9.2. | 41 |
| Figura 17. Cinética de la inhibición de la formación de compuestos fluorescentes durante la glicación de SPR en presencia del EAC a pH 7.4. | 42 |
| Figura 18. Cinética de la inhibición de la formación de compuestos fluorescentes durante la glicación del SPR en presencia del EAC a pH 7.0. | 43 |
| Figura 19. Cinética de la inhibición de la formación de compuestos fluorescentes durante la glicación del SPR en presencia del EAC a pH 4.2. | 44 |
| Figura 20. Cinética de la formación de compuestos pardos a diferentes pH durante la glicación del SPR. | 45 |
| Figura 21. Cinética de la inhibición de la formación de compuestos pardos durante la glicación de SPR en presencia del EAC a pH 9.2. | 46 |
| Figura 22. Cinética de la inhibición de la formación de compuestos pardos durante la glicación del SPR en presencia del EAC a pH 7.4. | 47 |
| Figura 23. Cinética de la inhibición de la formación de compuestos pardos durante la glicación del SPR en presencia del EAC a pH 7.0. | 48 |
| Figura 24. Cinética de la inhibición de la formación de compuestos pardos durante la glicación del SPR en presencia del EAC a pH 4.2. | 49 |
| Figura 25. Cinética de la formación de compuestos fluorescentes y compuestos pardos durante la glicación del SPR en presencia del EAC a pH 9.2 | 51 |
| Figura 26. Cinética de la formación de compuestos fluorescentes y compuestos pardos durante la glicación del SPR en presencia del EAC a pH 7.4. | 52 |
| Figura 27. Cinética de la formación de compuestos fluorescentes y compuestos pardos durante la glicación del SPR en presencia del EAC a pH 7.0. | 53 |
| Figura 28. Cinética de la formación de compuestos fluorescentes y compuestos pardos durante la glicación del SPR en presencia del EAC a pH 4.2. | 54 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Características del cilantro (<i>Coriandrum Sativum</i>). | 15 |
| Tabla 2. Soluciones amortiguadoras utilizadas. | 22 |
| Tabla 3. % de inhibición de compuestos fluorescentes y compuestos pardos durante la glicación en presencia del EAC en las diferentes soluciones amortiguadoras. | 49 |
| Tabla 4. Solución amortiguadora de carbonato-bicarbonato (pH 9.2) 0.2M. | 64 |
| Tabla 5. Solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.4) 0.2M | 65 |
| Tabla 6. Solución amortiguadora de fosfato-citrato (pH 7.0) 0.2M. | 65 |
| Tabla 7. Solución amortiguadora de acetatos (pH 4.2) 0.2M. | 65 |

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------------------------|---|
| AGEs (por sus siglas en ingles) | Productos Terminales de la Glicación Avanzada |
| BHA | Butilato de hidroxianisol |
| BHT | Butilato de hidroxitolueno |
| CFT | Compuestos Fenólicos Totales |
| DPPH• | 1,1-difenil-2-picrilhidracil |
| EAC | Extracto acuoso de cilantro |
| EAG | Equivalentes de Ácido Gálico |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetracético |
| G | Inmunoglobulinas |
| LDL | Lipoproteína de baja densidad |
| μmol ET/L | Micromoles Equivalentes de Trolox |
| PRM's | Productos de la reacción de Maillard |
| PVDF | Fluoruro de Polivinilideno |
| SPR | Sistema Peptona Ribosa |
| Trolox | Carboxílico 6-hidroxi-2, 5, 7,8-tetrametilcromo |

RESUMEN

El empleo de altas temperaturas durante la cocción de alimentos se ha asociado a la formación de diversos Productos de la Reacción de Maillard (PRM) con efecto tóxico, los cuales pueden tener una incidencia en la prevalencia de las complicaciones diabéticas (neuropatías, retinopatías, etc).

La formación de PRM tóxicos se deriva de la reacción de Maillard o glicación de proteínas considerada una reacción de obscurecimiento no enzimático, la cual puede efectuarse en diversas condiciones y esta influenciada por el pH, temperatura, actividad acuosa, presencia de metales como cobre y hierro, entre otros factores.

Estudios *in vitro* han utilizado extractos de algunas plantas con propiedades antioxidantes para lograr la inhibición de PRM.

En este estudio se evaluó como afecta la concentración de compuestos fenólicos totales de un extracto acuoso de cilantro sobre la actividad antioxidante, la actividad quelante y la inhibición de la formación de los compuestos fluorescentes durante la glicación de un sistema de peptona de gelatina y ribosa (SPR) en función del pH. Los métodos para evaluación de la actividad antirradical y antioxidante utilizados fueron el atrapamiento del radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidracil (DPPH•) y la protección contra la oxidación de una emulsión de β -caroteno-Acido linoléico.

Se concluyó que el extracto acuoso de cilantro contiene una importante actividad antirradical, antioxidante y quelante. Conforme aumenta la concentración del extracto acuoso de cilantro existe una mayor inhibición de la formación de compuestos fluorescentes durante la glicación del sistema peptona y ribosa.

Palabras clave: PRM tóxicos, glicación de proteínas, antioxidantes vegetales, pH.

SUMMARY

The use of high temperatures during food is boiling associated to the formation of diverse products of Maillard's Reaction Products (MRP's) with a toxic effect, which can have high incident in the prevalence of diabetic complications (neuropathies, retinopathies, etc).

The formation of toxic MRP's is caused as result of by the reaction of Maillard or protein glycation, considered as a non-enzymatic browning reaction, which can be carried out in different conditions and is influenced by the pH, temperature, water activity and the presence of metals such as cooper and iron among others.

In *vitro* studies have used extracts from plants with antioxidants properties in order to obtain the inhibition of MRP's.

In the present study was evaluated how the concentration of total phenolic compounds from an aqueous extract of Coriander (*Coriandrum sativum*) affects the antioxidant activity, the chelating activity and the inhibition of fluorescent compounds formation during the glycation of a peptone gelatin and ribose system (PRS) at different pH conditions. The used evaluation methods for antioxidant activity the chelating activity were 1,1-diphenyl-2-picrylhidracyl (DPPH·) free radical quenching and protection against the oxidation of a β -carotene/linoleic acid emulsion.

As conclusions the Coriander aqueous extract presents a high free radical trapping, antioxidant and chelating activity. Also, as it is increased the Coriander extract concentration it results in a higher inhibition of the formation of fluorescent compounds during the glycation of the peptone-ribose system.

Key words: antioxidant , pH dependable peptone gelatine.

1 MARCO TEORICO

Recientemente, en Estados Unidos y en países europeos el consumo de alimentos elaborados a altas temperaturas se ha asociado en la incidencia de ciertas enfermedades como Diabetes Mellitus tipo 2 y algunos tipos de cáncer (Goldberg y col., 2004; Mottran y col., 2002).

Existen diversos productos de la glicación de proteínas con efecto tóxico, que se producen debido al empleo de altas temperaturas durante la cocción de alimentos (Goldberg y col., 2004; Mottran y col., 2002).

1.1 Reacción de Maillard.

La reacción de Maillard se produce durante la glicación de proteínas la cual, comienza con la reacción de los grupos amino de proteínas, péptidos o aminoácidos libres (especialmente residuos amino de la cadena lateral de lisina, arginina e histidina) y con los grupos carbonilo de azúcares reductores (cetosas o aldosas) (Ames, 1990).

La reacción de Maillard es considerada una reacción de pardeamiento no enzimática que se presenta en 3 etapas:

- 1) En la etapa temprana, los grupos amino libres de proteínas (p.e. ϵ -NH₂ de la lisina), péptidos y amino ácidos reaccionan con el grupo carbonilo del azúcar reductor formando una base reversible de Schiff, posteriormente por medio de rearrreglos moleculares se convierte a un compuesto de Amadori con enlaces covalentes (Jing y Kitts, 2002).
- 2) En la etapa intermedia de la reacción se forman compuestos no coloridos que absorben la luz UV, así como compuestos fluorescentes (Ames, 1990).

Algunos compuestos fluorescentes son precursores de la formación de los pigmentos pardos. Delgado-Andrade y col (2004) identificaron algunos

compuestos fluorescentes PRM durante el procesamiento de cereales tales como: hidroximetifurfural, furfural, glucosilisomaltol y furosina.

- 3) En la etapa avanzada, se forman compuestos volátiles (aldehídos) y polímeros pardos de alto peso molecular (>1200 Daltons) denominados melanoidinas (Davies y Labuza, 1997).

El color ocurre debido a la formación de grupos cromóforos, de componentes poliméricos de alto peso molecular conocidos como melanoidinas (Borrelli y col 2002). El esquema simplificado de la reacción de Maillard se ilustra en la figura 1.

La reacción de Maillard que tiene como base la interacción entre azúcares reductores y aminoácidos libres o grupos aminos terminales de las proteínas, se lleva a cabo a través de la formación de una base de Schiff, seguido del reordenamiento de Amadori, la formación de cetosaminas, una enolización y la reacción de Strecker (Borreli y col., 2002).

Cabe resaltar que la reacción de Maillard esta influenciada por diversos factores como el pH, la temperatura, la naturaleza de los reactivos que intervienen, la actividad del agua, el tipo y la concentración de sales, la presencia de iones metálicos (Cu^{2+} y Fe^{3+}), etc (Ledl y Schleicher, 1999; Wijckreme y col.,1997). La modificación de uno de estos factores puede cambiar la ruta, velocidad y los productos finales de reacción (Davies y Labuza, 1997).

En la figura 2 se muestra la concentración relativa de reactantes y PRM en relación al tiempo de calentamiento. Se observa que la concentración de grupos aminos y carbonilos disminuye, la formación de compuestos fluorescentes aumenta y en la etapa final se observa el aumento de la concentración de pigmentos pardos o melanoidinas (Davies y Labuza, 1997).

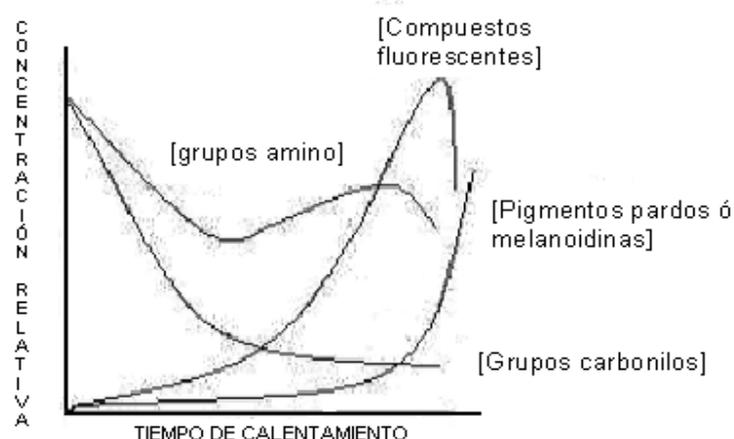


Figura 2. Concentración de reactantes y productos de la reacción de Maillard en función al tiempo de calentamiento (Davies y Labuza, 1997).

1.1.1 Efecto del pH en la Reacción de Maillard.

A medida que la reacción de Maillard avanza, se observa una disminución del pH debido a una pérdida de aminoácidos básicos (Friedman, 1996).

Todas las reacciones que se desarrollan en el transcurso de la reacción de Maillard dependen del pH. La degradación de cetosaminas por enolización se favorecen a pH alcalinos, mientras que la degradación de cetosaminas por deshidratación para la formación de hidroximetilfurfural se favorece a pH ácidos (Ames, 1990).

La influencia del pH se manifiesta sobre la reactividad de los compuestos participantes en la reacción. La reactividad del grupo amino disminuye fuertemente a medida que la acidez del medio aumenta (Georgescu y Leonte, 1998). Es así como la formación de compuestos hidrogenados heterocíclicos (pirrolinas y pirazina) son favorecidos en medio básico. En principio un pH inicial básico favorecerá el desarrollo de la reacción de Maillard y el pardeamiento (Ames, 1990).

1.1.2 Algunos efectos benéficos y tóxicos de los productos de la reacción de Maillard (PRM).

Los PRM son de diversa naturaleza química y presentan propiedades benéficas ó tóxicas (Figura 3). Varios estudios se han enfocado a evaluar la toxicidad de algunos PRM tales como: compuestos heterocíclicos, furanos, tioterpenos, tiazoles, piridinas, pirazinas, pirroles, oxazoles y quioxalina, los cuales han sido asociados con el desarrollo del cáncer por su reacción mutagénica (Shibamoto, 1983; Mottram, 1998). Por ejemplo, Lee y Shibamoto, (2002) reportaron la formación de aminas heterocíclicas mutagénicas durante el asado de la carne.

En contraste, la reacción de Maillard confiere características sensoriales agradables a los alimentos, dado que propicia la formación de compuestos, sabor y color (Ericsson, 1981; Friedman, 1996).

Estudios recientes, han reportado un aspecto benéfico menos conocido de esta reacción que es la formación de compuestos con actividad antioxidante cuando se utilizan pH neutros de reacción y temperaturas moderadas de cocción (<95°C), dichos compuestos no presentan citotoxicidad en células durante pruebas *in vitro* (Sumaya-Martínez y col., 2004).

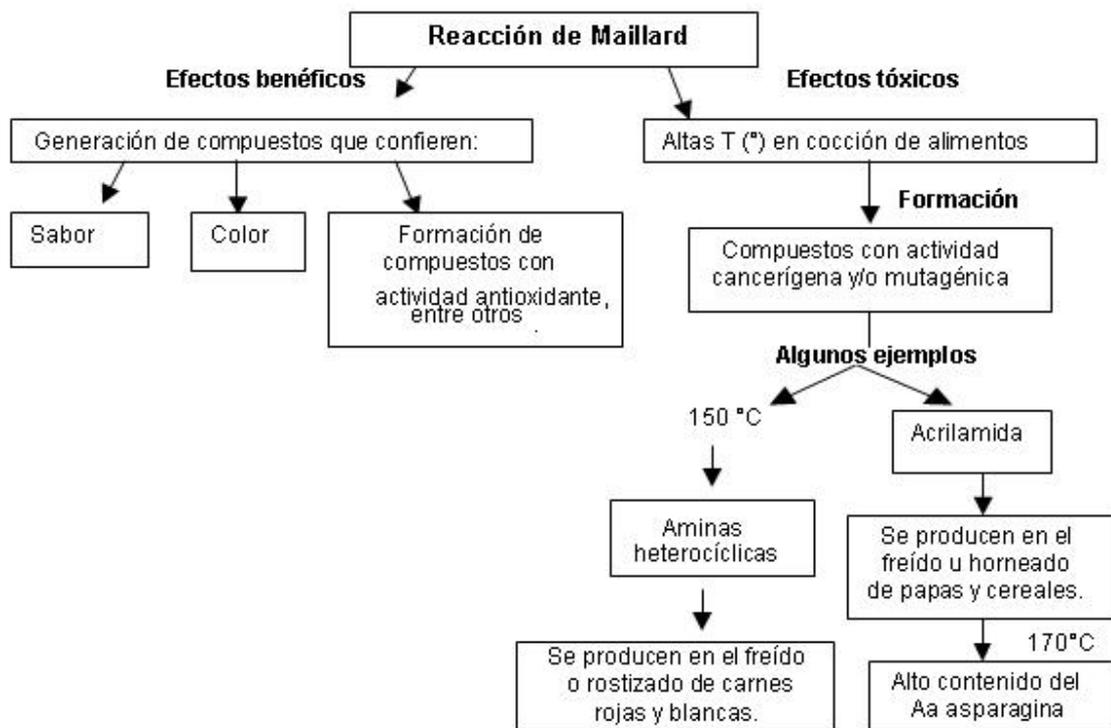


Figura 3. Algunos efectos benéficos y tóxicos de los productos de la reacción de Maillard. Ericsson 1981; Friedman 1996; Sumaya-Martínez y col., 2004; Monti y col., 2001; Mottran y col., 2002.

Como se mencionó en el párrafo anterior, durante la cocción de alimentos la glicación de proteínas genera diferentes tipos de compuestos (algunos de ellos volátiles y otros de alto peso molecular como las melanoidinas) que les proporciona características sensoriales muy agradables de olor y sabor. Sin embargo, al mismo tiempo pueden formarse compuestos de naturaleza tóxica, cuando los alimentos se

someten a altas temperaturas de cocción (>120 °C) como en el freído, el rostizado, el asado y el horneado (Goldberg y col., 2004).

1.1.3 Productos de la Reacción de Maillard tóxicos.

Los PRM tóxicos comprenden una gran diversidad de moléculas complejas (muchas de estas aún no han sido identificadas), y han sido relacionadas con el aumento de las complicaciones diabéticas (tales como las neuropatías, retinopatías entre otras). Además, otros PRM tóxicos como la acrilamida y las aminas heterocíclicas pueden presentar actividad neurotóxica o cancerígena (Goldberg y col., 2004; Mottran y col., 2002; Skog y col., 1998).

La acrilamida es un compuesto neurotóxico que se forma durante la cocción de alimentos ricos en almidones y del aminoácido asparagina tales como papas, cereales y granos, cuando estos alimentos se calientan a temperaturas >120°C se induce la formación de acrilamida como producto de la reacción de Maillard entre la glucosa y asparagina (Mottran y col., 2002; Petersen, 2002). Durante el freído o rostizado de las carnes y pescados se generan aminas heterocíclicas debido a la reacción de Maillard entre aminoácidos, azúcares y creatinina. Diversos autores encontraron relación entre el consumo de aminas heterocíclicas y la incidencia de cáncer de estómago y colon en humanos y modelos animales (Skog y col., 1998; Sugimura y col., 2004).

1.2 Glicación *in vivo*.

La glicación de proteínas se lleva a cabo en el organismo a menor velocidad, produciendo una gama heterogénea de compuestos llamados Productos Finales de la Glicación Avanzada (AGEs por sus siglas en ingles). Los AGEs se forman por la glicación no enzimática de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos en la circulación sanguínea (Vlassara y Palace, 2002) (Figura 4).

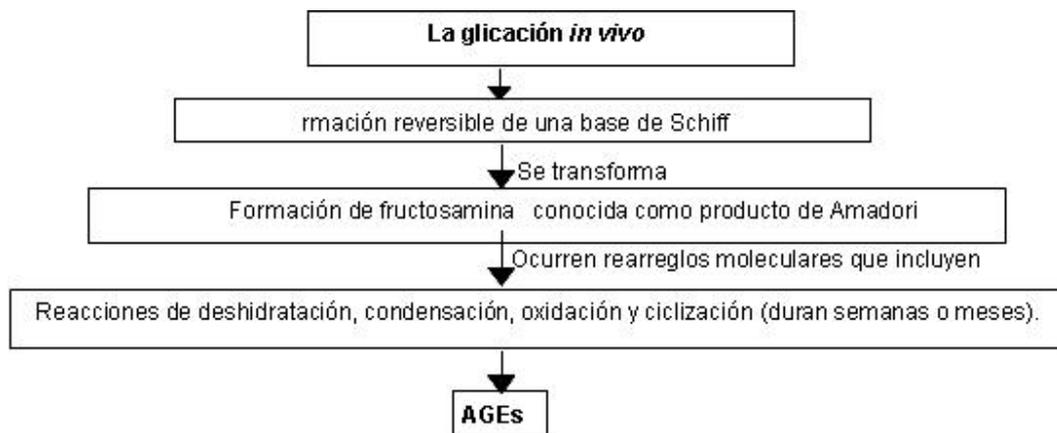


Figura 4. Glicación in vivo (Méndez, J, 2003).

Los efectos patológicos de los AGEs están relacionados con su capacidad de formar enlaces covalentes de entrecruzamiento con proteínas, modificando su función biológica (Gugliucci, 2000).

Durante la glicación de proteínas se forman otras moléculas como compuestos dicarbonilos y radicales libres de oxígeno altamente reactivos. Ambos fenómenos (la glicación de proteínas y el estrés oxidativo) activan la respuesta inflamatoria celular e inician la respuesta del sistema inmune (Vlassara, 2001; Sakata y col., 1999; Vitek y col., 1994).

En personas diabéticas la hiperglicemia provoca altos niveles circulantes de AGEs, lo que promueve las complicaciones ligadas a la diabetes tales como neuropatías, retinopatías, insuficiencia renal, etc (Uribarri y col., 2003).

El daño principal por AGEs en pacientes diabéticos ocurre en tejidos y órganos ricos en colágena, donde la entrada de glucosa no esta regulada por insulina: riñón, retina y endotelio vascular. Por ejemplo, el estrechamiento en los vasos sanguíneos en diabéticos puede deberse en parte a la acumulación de proteínas del plasma (albúmina, lipoproteína de baja densidad (LDL) e inmunoglobulinas (G) en el

subendotelio, estas proteínas son secuestradas por entrecruzamientos covalentes proteína-AGE en el colágeno de las membranas basales (Gugliucci, 2000).

Recientemente, se ha demostrado que los AGEs pueden ser introducidos al organismo a través de la dieta en forma de PRM tóxicos y en cantidades que puede exceder a los producidos por la hiperglicemia. Del contenido total de PRM en los alimentos un 10% es absorbido por el organismo lo que aumenta significativamente los niveles de AGEs en la sangre y en los tejidos (Koschinsky y col., 1997).

1.3 Inhibidores de la formación de los Productos de la Reacción de Maillard.

La inhibición de la formación de los productos de la glicación de proteínas ó reacción de Maillard puede seguir tres mecanismos hasta el momento reportados:

- 1) Por atrapamiento de grupos carbonilos.
- 2) Por atrapamiento de radicales libres.
- 3) Por quelación de metales.

(He y col., 1999; Price y col., 2001; Miyata y col., 2002, Stitt y col., 2002)

Se ha reportado el efecto inhibitorio de extractos antioxidantes de plantas y flavonoides sobre la formación de los productos de la glicación a 37°C en sistemas modelo utilizando Albúmina Sérica Bovina-Fructosa y Hemoglobina-Glucolactona, respectivamente (Kim y Kim, 2003; Wu y Yen, 2005).

Además, se ha mostrado el efecto inhibitorio de la Epicatequina (un flavonoide de origen vegetal) en la formación de algunos compuestos volátiles productos de la reacción de Maillard en un modelo glicina-glucosa (Totlani y Peterson, 2005).

Monti y colaboradores (2001) demostraron que en un sistema modelo de creatinina-glicina-glucosa el aceite de oliva (el cual contiene compuestos fenólicos con actividad antioxidante), inhibió la formación de aminos heterocíclicos cancerígenos a una temperatura de 180°C durante 30 min.

1.4 Actividad antioxidante.

Un antioxidante es una molécula que previene la formación descontrolada de radicales libres o inhibe sus reacciones con estructuras biológicas (Chihualif y col., 2002; Rhian, 2004).

Los antioxidantes pueden clasificarse en enzimáticos y no enzimáticos (Rhian, 2004). En los antioxidantes enzimáticos se encuentran, la superóxido dimutasa, la catalasa y el glutatión peroxidasa. Los antioxidantes no enzimáticos constituyen un grupo heterogéneo de moléculas hidrófobas e hidrofílicas que atrapan radicales libres. Tales como las vitaminas, glutatión, ergoteína y flavonoides polifenólicos, estos últimos pertenecientes al grupo de los compuestos fenólicos en donde también encontramos flavanoles, flavonoles (taninos o proantocianidinas) y no flavonoides (ácidos fenólicos, ácidos benzoicos y cinámicos, estibenos y reveratrol) (Chihuailaf y col., 2002).

Los antioxidantes dietarios disminuyen los efectos adversos de las especies reactivas de oxígeno (sustancias químicamente inestables que se producen en el envejecimiento normal) en el cuerpo humano; como el ácido ascórbico también llamado vitamina C que es un compuesto hidrosoluble que actualmente es considerado como un nutriente antioxidante (Katleen y col. 1998). También existen antioxidantes sintéticos como butilhidroxitolueno (BHT) y el butilhidroxianisol (BHA) que se adicionan a los alimentos susceptibles a la oxidación lipídica, sin embargo, algunos estudios han demostrado que estos antioxidantes sintéticos poseen efectos citotóxicos en concentraciones de 890 mg/kg y 700 mg/kg de peso en ratas, aprobado en por el Departamento de Alimentos y Medicamentos de EUA (FDA, por sus siglas en inglés) (Lewis, 1989). La SSA permite 200 mg/kg de BHT en humanos, lo cual significa que, una persona de 50 kg necesita 222 kg de BHT para que el producto sea tóxico. Por lo que los antioxidantes naturales han despertado interés para emplearlos como sustitutos de los antioxidantes sintéticos (Oyeneho y

Hettiarachchy, 1993; Azizah y col., 1999; Choi y col., 2000, Azizah y col., 1999 en Tomás-Barberán y col., 2004).

La actividad antioxidante se puede evaluar por diferentes métodos y cada procedimiento evalúa un fenómeno y/o mecanismo diferente. El analizar por dos o más métodos la actividad antioxidante de un extracto es muy común en los reportes científicos ya que proporciona información complementaria. La actividad antioxidante de un extracto complejo estará dada por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes, de la interacción entre ellos y del ambiente en que están inmersos, ya que puede producirse eventualmente efectos potencializadores o inhibidores (Frankel y Meyer, 2000).

Existe evidencia científica de que los compuestos antioxidantes de frutas y vegetales (principalmente de naturaleza fenólica) pueden prevenir el daño oxidativo celular, con lo cual se reduce el riesgo de cáncer, enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes, etc (Stintzing y col., 2001; Lee y col., 2002; Prior, 2003).

1.5 Actividad antioxidante en especias.

Shahidi y col., (1992), demostraron que el efecto antioxidante de las plantas aromáticas se debe principalmente a la presencia de grupos hidroxilo en los compuestos fenólicos. En algunos estudios de especias se han aislado una amplia variedad de compuestos antioxidantes fenólicos como el canfeno (Azuma y col., 1999). Meyer y col., (1998), demostraron que algunas frutas y vegetales contienen compuestos en común: 3,4-dihidroxy, ácido caféico, ácido clorogénico y neoclorogénico, los cuales tienen una alta actividad antioxidante. Además, la actividad antioxidante en las especias puede deberse a su contenido de vitaminas (ácido ascórbico y vitamina A, β -caroteno, α -tocoferol principalmente y licopeno (un carotenoide con provitamina A) el cual puede presentar un papel importante en el

incremento total de la actividad antioxidante (Vinson y col., 1995a; Matos y col., 2001; Arab y Steck, 2000; Matos y col., 2001; Giovanucci y col., 2002).

Una especia de uso cotidiano en la comida mexicana es el cilantro (*Coriandrum sativum*). Esta especia presenta actividad antioxidante, siendo una de las más consumidas en la población mexicana (Al-Mamary, 2002).

En *Coriandrum sativum* se han reportado compuestos con propiedades antioxidantes como el Canfeno y los compuestos fenólicos más abundantes son: flavonoides tales como Apigenina, luteolina (flavonas) y linalol (Silker y Voldgaard, 2003).

1.5.1 Cilantro (*Coriandrum sativum*).

El cilantro, de uso común en la zona mediterránea, latinoamericana y el sudeste asiático. Planta de la familia de las Umbelíferas (Umbelliferae). El nombre coriandro viene del latín coriandrum, que a su vez deriva del griego korios, que quiere decir chinche, refiriéndose al desagradable olor del cilantro cuando sus frutos aún están verdes. El cilantro ha tenido muchos usos curativos desde tiempos milenarios, ya que los romanos lo utilizaban como antipirético, digestivo y como analgésico para el dolor de cabeza. Los chinos creían que las infusiones de cilantro proveían la inmortalidad y poseía propiedades afrodisíacas (Chithra y col., 1997).

Fue una de las primeras especias que se introdujo en América, para la conservación de carnes y como hierba medicinal. En algunos países se le conoce como perejil chino o japonés y sus frutos maduros se usan para condimentar. En países de Latinoamérica como México, Venezuela y Colombia, se usan principalmente las hojas frescas enteras o picadas; además del uso culinario, en muchas culturas (India, Grecia, China y Japón) se usa el cilantro como remedio casero, atribuyéndole propiedades estomacales, antiespasmódicas, como estimulante del apetito, en halitosis y recientemente se le han asociado propiedades anti Salmonella, entre otros (Wong y Kitts 2006).

El cilantro alcanza de 20 a 70 cm de altura. Es de color verde oscuro, tallos rectos, lampiños, de olor penetrante y hojas compuestas. Las hojas de cilantro contienen ácido ascórbico, minerales, tales como calcio, potasio, magnesio, fósforo, sodio (Vicent, 2006). En la tabla 2 se muestran algunas características del cilantro.

Tabla 1. Características del cilantro (*Coriandrum Sativum*). (Alonso y Allue 2003). Rubatzky j y Yamaguchi, 1997. Justesen y Knuthsen, 2001. Silker y Voldgaard, 2003.

| Principales constituyentes | Idiomas |
|--|---|
| <p>Composición de cilantro 100g (hojas)</p> <p>Agua: 90%, Carbohidratos: 5g.</p> <p>Proteínas: 2.40g, Lípidos: 0.50g. Fibra.</p> <p>Minerales: Calcio 134 mg, Fósforo 48 mg, Hierro 5.5mg, Potasio 542 mg, Sodio 28 mg, Magnesio, Manganeso.</p> <p>Vitaminas: Vitamina A 2800UI, Vitamina K, Tiamina 0.10 mg, Riboflavina 0.10 mg, Niacina 1.10 mg, Ácido ascórbico, Beta-caroteno.</p> <p>Los aceites esenciales: Decanal, Dodecanal, Decano, Huleno, Cerofileno, Llinanol, Taninos, Ácido málico, Canfeno. 3,4-Dimethoxyquercetin, 3-Methocy-Quercetin, 2-Dodecanal, Nonyl-Aldehyde, Octanol, Pentadecanal, Tetradecanal, Toluene, Tridecanal, Undecanal, Ácido caféico, Ácido oxálico, Quercetina, Arginina, Fenilalanina, Isoleucina, Leucina, Lisina, Metionina, Treonina, Triptófano, Valina.</p> <p>Flavonoides: Apigenina y Luteolina (flavonas).</p> | <p>-Castellano: Cilantro.</p> <p>-Latín: Coriandrum sativum.</p> <p>-Francés: Coriandre.</p> <p>-Inglés: Coriander.</p>  |

2 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Diversos trabajos *in vitro* han reportado que los extractos de algunas plantas con propiedades antioxidantes puede reducir la formación de los PRM, sin embargo, dichos estudios se han realizado a temperaturas de 37° C y a pH neutros. Por lo que resultaría importante verificar el efecto inhibitorio de la formación de PRM a temperaturas mas elevadas (90-95° C) y en función del pH.

En la actualidad no existen estudios del efecto de la actividad antioxidante del cilantro (*coriandrum sativum*) sobre la inhibición de la formación de compuestos fluorescentes durante la glicación de proteínas en función del pH.

3 JUSTIFICACIÓN

Estudios recientes han mostrado que algunos PRM tóxicos en los alimentos pueden ser naturaleza tóxica y presentar actividad neurotóxica, cancerígena ó promover algunas complicaciones diabéticas.

Siendo la población mexicana una alta consumidora de la especia cilantro (*Coriandrum sativum*), resulta importante estudiar su efecto inhibitorio sobre la formación de PRM fluorescentes a temperaturas de ebullición (90-95° C) y en función del pH.

Este trabajo proporcionara información sobre el efecto de un extracto vegetal antioxidante sobre la inhibición de la formación de PRM fluorescentes, durante la glicación de proteínas.

4 OBJETIVO GENERAL.

Estudiar el efecto de un extracto acuoso de cilantro (*Coriandrum sativum*) con actividad antioxidante sobre la inhibición de la formación de compuestos fluorescentes durante la glicación de un modelo empleando peptona de gelatina con ribosa, en función del pH.

4.1 Objetivos específicos.

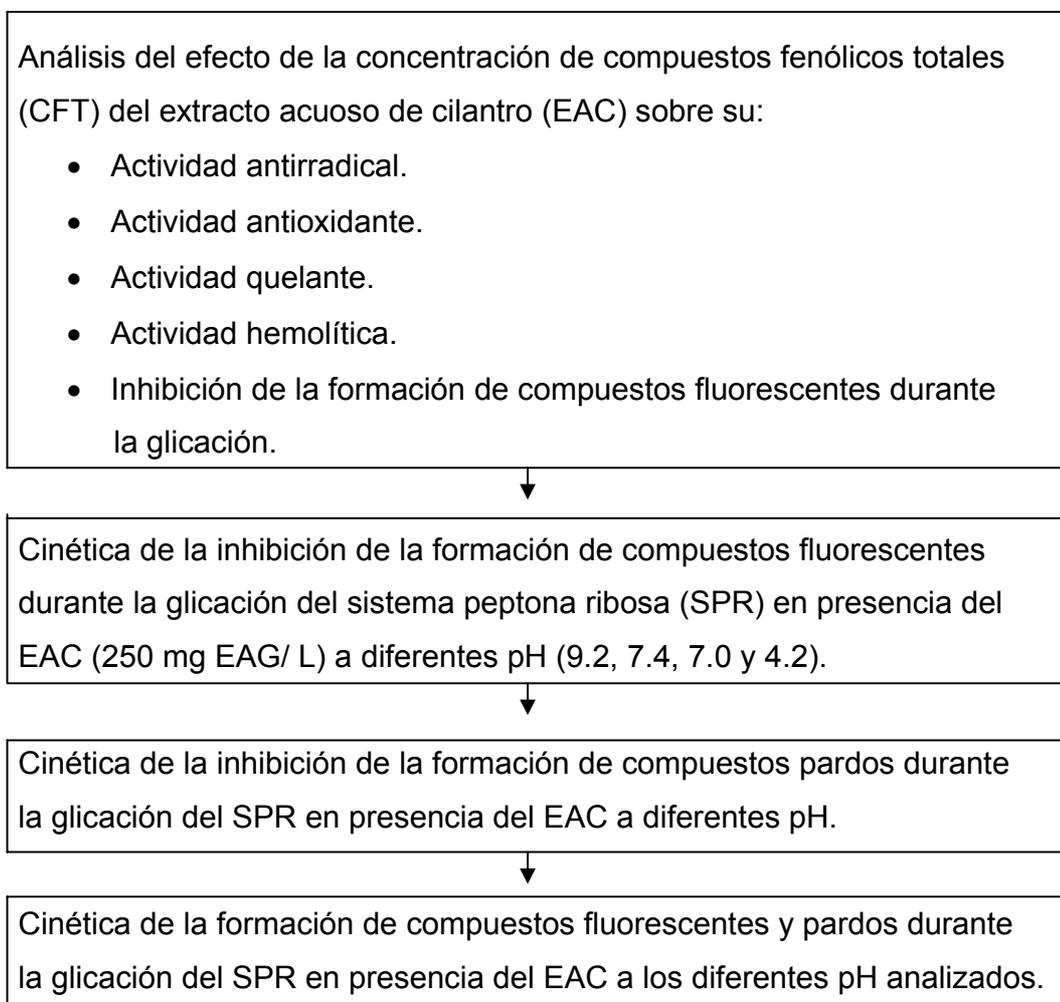
- Determinación de la actividad antioxidante del extracto acuoso del cilantro por dos metodologías: con base en el atrapamiento del radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidracil (DPPH•) y por la protección contra la oxidación de una emulsión de β -caroteno-Acido linoléico.
- Estudiar el efecto de la concentración de compuestos fenólicos totales en un extracto acuoso de cilantro, sobre la actividad antioxidante, la actividad quelante y la inhibición de la formación de los compuestos fluorescentes durante la glicación de un sistema de peptona de gelatina y ribosa (SPR).
- Evaluar la inhibición de la formación de compuestos fluorescentes durante la glicación de un sistema empleando peptona de gelatina y ribosa (SPR) en función de diferentes pH: 9.2, 7.4, 7.0, 4.2.

5 HIPÓTESIS

La actividad antioxidante y quelante de un extracto acuoso de cilantro inhibirá la formación de compuestos fluorescentes durante la glicación de una peptona de gelatina con ribosa, y dicha inhibición estará en función del pH.

6. METODOLOGIA

6.1 Diseño metodológico



6.2 Reactivos y Equipo

Reactivos.

- Monofosfato de sodio monohidratado.
- Bifosfato de sodio dodecahidratado.
- 1,1-difenil-2-picrilhidracil (DPPH°).
- Carboxílico 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcromo (TROLOX).
- Folin-Ciocalteu.

- Carbonato de Sodio
- Ácido gálico.
- β -caroteno.
- Butilhidroxitolueno (BHT).
- Ácido etilendiaminotetracético EDTA.

Equipo

- Ultra congelador marca ThermoForma -75 °C.
- Potenciómetro marca Hanna pH 211 Instruments.
- Matraz bola(Büchi).
- Balanza semianalítica modelo Adventurer (OHAUS) China;
- Vortex modelo Genie 2 (DAIGGER, USA); j
- Microcentrifuga modelo Mikro 22R (Hettich), Alemania;
- Lector de microplacas espectrofotométrico modelo Power Wave XS (UV-Biotek) software KCjunior USA.
- Rotavapor modelo R-200 (Büchi).
- Baño termostático modelo WBS (Fried Electric) Israel.
- Espectrofotómetro (Agilent Technologies) con el software Bioquímica 1843 Alemania filtros PVDF.}

6.3 Recepción de la materia prima y preparación de la muestra.

La unidad de estudio fuer de cilantro adquirida en la central de abastos situada en Pachuca Hidalgo, las cuales fueron transportadas al laboratorio donde se lavaron con agua desionizada y posteriormente se almacenaron en refrigeración a 4 °C por 1 día para su posterior análisis.

Posteriormente se pesó el cilantro antes de obtener el extracto acuoso de cilantro (EAC) para conocer el peso inicial de la especia y así conocer la cantidad de agua perdida posterior a la liofilización. Posteriormente se congeló la muestra en el Ultra

congelador a -75°C , durante 24 horas para su liofilización a 0.027 bar de vacío y a -42°C durante 24 hrs.

Las muestras se colocaron en bolsas especiales para congelarlas y utilizarlas en los experimentos subsecuentes. En la tabla 2 se presenta las soluciones amortiguadoras utilizadas en este estudio. En el anexo 1 se detalla la preparación de cada uno.

Tabla 2. Soluciones amortiguadoras utilizadas.

| Tipo de soluciones amortiguador | pH | Reactivos utilizados |
|---------------------------------|-----|---|
| Carbonato-bicarbonato 0.1 M. | 9.2 | Carbonato de sodio anhidro. Bicarbonato de sodio. Agua desionizada. |
| Fosfatos 0.1 M. | 7.4 | Monofosfato de sodio monohidratado. Monofosfato de sodio dodecahidratado. Agua desionizada. |
| Fosfato-citrato 0.1 M. | 7.0 | Ácido cítrico. Ácido acético. Fosfato de sodio dibásico. Agua desionizada. |
| Acetato 0.1 M. | 4.2 | Ácido acético Acetato de sodio. Agua desionizada. |

6.4 Elaboración del extracto acuoso de cilantro (EAC).

Se pesó 2g de *Coriandrum Sativum* y se agregaron 40 mL de soluciones amortiguador en 2 tubos de poliestireno y se calentó para crear un baño María, cuando el agua empezó a ebulir se introdujeron los tubos de poliestireno con la muestra durante 15 minutos.

Posteriormente se retiraron los tubos del baño y se colocaron en hielo para enfriar rápidamente, después los tubos se llevaron a un mismo peso y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se filtró a través de filtros de Fluoruro de Polivinilideno (PVDF) con un poro de 0.45 micras.

Se realizó el mismo procedimiento para los diferentes soluciones amortiguador a diferentes pH.

6.5 Determinación de Compuestos Fenólicos Totales (CFT).

Los compuestos fenólicos totales se determinaron utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu, el cual es una mezcla de ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico, la cual es reducida a óxidos azules de tungsteno y molibdeno durante la oxidación fenólica. Esta inhibición ocurre bajo condiciones alcalinas mediante la presencia de carbonato de sodio. La coloración azul es monitoreada a una longitud de onda de 765 nm y refleja la cantidad de polifenoles, usualmente expresado como Equivalentes de Ácido Gálico (EAG) (Georgé y col., 2005).

Se tomó una alícuota de 100 μL y se colocó en un vial eppendorf, se le agregaron 500 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu (1:10 en agua desionizada) y 400 μL de carbonato de sodio (Na_2CO_3 al 7.5%). Posteriormente, se agitó en vortex y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 30 min. Después se tomaron 200 μL de cada muestra y se colocaron en la microplaca tomando como blanco agua. Se realizó la medición a 765nm en el lector de microplacas KC junior.

Curva estándar de ácido gálico.

La concentración de compuestos fenólicos totales se obtuvo a partir de una curva estándar de ácido gálico y se expresaron mg/L. Para la elaboración de la curva se preparó una solución de ácido gálico a 400 mg/L. A partir de esta solución se realizaron las siguientes diluciones con agua desionizada: 0, 100, 200, 300 mg de ácido gálico/L (Figura 5). Enseguida se tomaron 100 μL de cada concentración y se colocaron en viales aplicando el método de CFT.

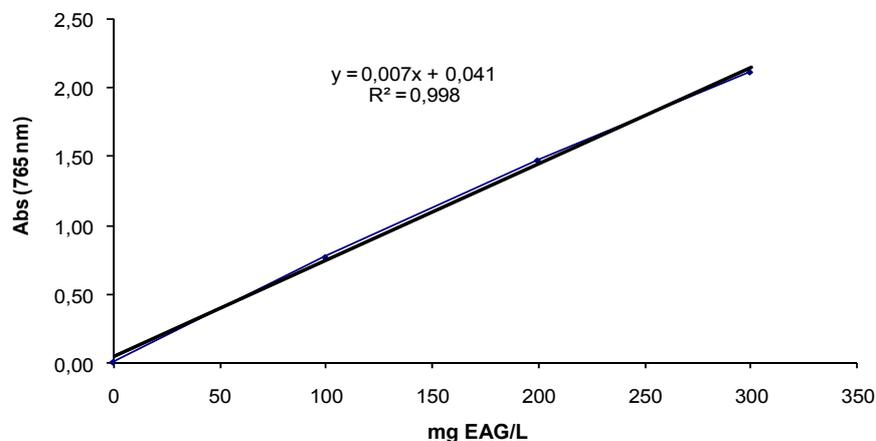


Figura 5. Curva estándar de ácido gálico utilizada durante el método de CFT.

6.6 Determinación de la actividad antirradical por el método del 1,1-difenil-2-picrilhidracil (DPPH[•]).

El reactivo DPPH[•] (1,1-difenil-2-picrilhidracil) es un radical libre estable, que en solución etanólica, presenta una coloración violeta fuerte y su máxima absorbencia se obtiene a una longitud de onda de 520 nm. Si se adiciona a este medio una sustancia susceptible de atrapar radicales libres, el electrón no apareado del DPPH[•] se aparea e inmediatamente presenta una decoloración de la solución que puede ir hasta amarillo en razón del número de electrones apareados (Figura 6).



Figura 6. Esquema de la reacción colorimétrica de DPPH• en presencia de un compuesto con actividad antirradical.

La actividad antirradical con base en el DPPH• fue evaluada de acuerdo al procedimiento reportado por Morales y Jiménez-Pérez (2001).

La actividad antioxidante se expresó en $\mu\text{mol ET/L}$ (Equivalentes de Trolox). El Trolox (Carboxílico 6-hidroxi-2, 5, 7,8-tetrametilcromo) es una molécula que presenta una fuerte actividad antirradical.

Se realizaron análisis preliminares para obtener el factor de dilución adecuado las concentraciones del EAC, debido a que las muestras sin diluir presentaron una alta actividad antirradical y la decoloración del DPPH• era máxima y se llevaba a cabo en forma inmediata, lo que resultaba en valores de absorbencia fuera de la curva estándar de Trolox.

El procedimiento se inició preparando una solución de DPPH• a una concentración de 7.4 mg/100 mL en etanol, se disolvió con 100 mL de etanol y se agitó por 10 min.

Posteriormente se colocaron 100 μL de las diluciones a diferentes concentraciones (800, 600, 400, 250, 50) en viales, se les agregó 500 μL de la solución de DPPH•, enseguida se agitó y la muestra se dejó reposar a temperatura ambiente durante una hora. Después se centrifugaron los viales eppendorf a 10000 rpm por 5 min a 4°C y se midió la absorbencia del sobrenadante utilizando un lector de microplacas UV a una longitud de onda de 520nm.

Se realizó una curva estándar de TROLOX.

Curva estándar de Trolox.

La capacidad antirradical de las muestras se reportó en μmol equivalentes de Trolox, para lo cual se realizó una curva estándar de Trolox con las siguientes concentraciones de Trolox en etanol: 0, 50, 100, 200, 300 μmol Trolox/L. La prueba se realizó tomando 100 μL de cada concentración y 500 μL de solución preparada de DPPH^\bullet , colocándola en un vial y se dejó actuar por una hora para leer en las mismas condiciones que las muestras (Figura 7).

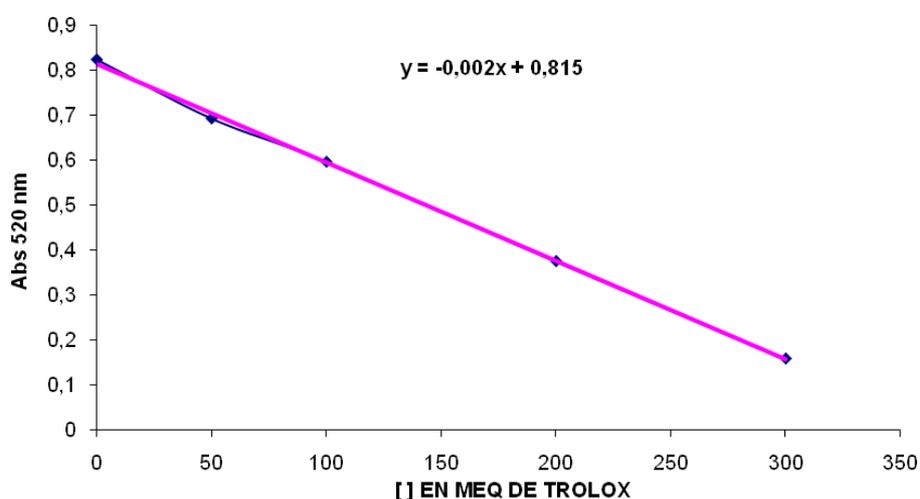


Figura 7. Ejemplo de una curva estándar de Trolox utilizada durante el método del DPPH^\bullet .

6.7 Determinación de la actividad antioxidante por el método de β -caroteno y ácido linoléico.

Se fundamenta con base en la protección contra la oxidación de una emulsión de β -caroteno y Ácido linoléico expuesta a un medio oxidante. En presencia de una sustancia antioxidante la emulsión se estabiliza o se decolora muy lentamente, sin embargo, en ausencia de un antioxidante la emulsión se decolora rápidamente. Es decir la actividad antioxidante es evaluada, según su efecto protector sobre la

decoloración de la emulsión de β -caroteno- Ácido linoléico bajo el efecto combinado de la luz, oxígeno y calor (Vankar y col., 2006) (Figura 8).

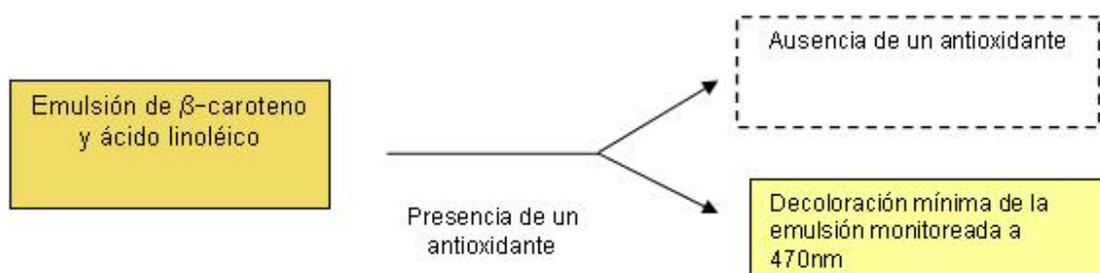


Figura 8. Esquema de la reacción colorimétrica de la emulsión β -caroteno y Ácido linoléico en presencia de un compuesto con actividad antioxidante.

La técnica del β -caroteno inicialmente se realizó con las muestras en soluciones amortiguador de fosfatos a pH de 7.4 pero, debido a que este experimento no se pudo leer en el espectrofluorómetro por la turbidez en los tubos, se procedió a hacer extracto acuoso del cilantro en agua a las siguientes diluciones: 800, 600, 400, 250, 50 mg EAG/ L de té cilantro en agua.

Se inició con la preparación de las siguientes soluciones:

β -caroteno.

Solución de butilhidroxitolueno (BHT 0.1).

Posteriormente se procedió a la elaboración de la emulsión colocando 2 mL de β -caroteno en un matraz bola (Büchi), el cloroformo se evaporó a 40°C por 15 seg., utilizando un rotavapor, enseguida se agregó 40 μ L de ácido linoléico, 400 μ L de Tween 20 y 100 mL de agua desionizada. Para la formación de la emulsión el matraz bola se agitó vigorosamente en el rotavapor durante 1 min.

Para la realización de la prueba se colocaron 200 μ L de muestra por triplicado en tubos de ensaye de 10 mL colocados en una gradilla de manera alterna, en cada tubo con muestra se le añadió 5 mL de la emulsión, se agitaron vigorosamente y se

sumergieron en agua a 50°C en un baño termostático, se utilizó como estándar de protección antioxidante la solución de BHT (0.1%) y tomando como blanco el agua desionizada y el β -caroteno. Se tomaron lecturas a los siguientes tiempos: 0, 15, 30, 60 y 90 min. Posteriormente se colocó 200 μ L de cada tubo en la microplaca, donde se leyó en el espectrofotómetro a una absorbencia de 470 nm.

Por cada dilución se llevó a cabo un factor de corrección con el objeto de evitar alteraciones en la lectura debido al color propio de la muestra, este factor de corrección se realizó de la siguiente manera: colocando 20 μ L de muestra original en un vial eppendorf añadiendo 500 μ L de agua desionizada. El resultado de la lectura espectrofotométrica se restó a la absorbencia de la prueba anterior. La actividad antioxidante de las muestras fue calculada mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Protección contra la decoloración} = \frac{\text{Absorbencia } \beta\text{-caroteno después de 90 min} \times 100}{\text{Absorbencia de } \beta \text{ caroteno inicial}}$$

6.8 Evaluación de la actividad quelante del EAC.

Para la determinación de la actividad quelante, se utilizó el método reportado por Guicin y colaboradores (2003), el cual se basa en la reacción de la molécula quelante de referencia con el ion ferroso (Fe^{2+}), posteriormente el ion ferroso que no fue quelado o secuestrado reacciona con la Ferrozina generando color, el cual es medido espectrofotométricamente a una longitud de onda 562 nm.

Para la determinación de la actividad quelante se realizaron las siguientes soluciones:

- Solución de cloruro férrico II tetrahidratado 2 mM.
- Solución de Ferrozina (sal ácida de sodio disulfónico 3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-4', 4'') 5 mM.

- Solución de EDTA (Ácido etilendiaminotetracético) 0.1 M.
- Las soluciones se cubrieron con papel opaco para evitar la oxidación por luz.

Para las muestras del EAC se utilizaron 3 viales eppendorf con 100 μ L por cada concentración de compuestos fenólicos (medidos en EAG) quedando de la siguiente manera: 3 de 800, 3 de 600, 3 de 400, 3 de 250 y 3 de 50 mg EAG/ L. También se prepararon 6 viales eppendorf con 100 μ L cada uno, los cuales sirvieron como controles. A esto se le agregó 50 μ L cloruro férrico FeCl₂4H₂O y 450 μ l de metanol.

Se dejaron incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 200 μ l de Ferrozina a cada una de las muestras y controles y se agitaron vigorosamente. Se dejaron reposar durante 15 min y posteriormente se tomó una alícuota de 200 mL de muestra y se colocó en una microplaca donde se midió a una absorbencia de 562 nm.

La actividad quelante del EAC fue calculada mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{(\text{abs control} - \text{abs muestra})}{\text{abs control}} \times 100$$

Después se realizó el factor de corrección con el objeto de evitar alteraciones en la lectura debido al color propio del EAC, este factor de corrección se realizó de la siguiente manera: colocando 100 μ L de muestra en un vial añadiendo 900 μ L de agua desionizada. El resultado de la lectura espectrofotométrica se restó a la absorbencia (562nm) de la prueba anterior.

6.9 Determinación de actividad hemolítica.

Para la determinación cuantitativa de saponinas, se utilizó el método reportado por Guerra y colaboradores (2001) con modificaciones, en el cual, debido a la propiedad de las saponinas de romper la pared celular de los glóbulos rojos de la sangre (hemólisis) se midió el color desarrollado durante éste proceso.

En un matraz de 250 mL se colocaron 25 mL de una solución de citrato de sodio al 3 % y 225 mL de sangre de res recién recolectada.

En tubos se colocaron 5 mL de sangre preparada y se le agregaron 50 mL de suero fisiológico salino, posteriormente se centrifugaron a 2500 rpm durante 30 minutos.

Se decanto el sobrenadante y se vertieron 50mL de suero fisiológico salino, la mezcla se agitó vigorosamente y se centrifugó durante 30 minutos a 2500 rpm, este procedimiento se repitió 3 veces más.

El último precipitado se vertió en una bureta, el volumen fue de 4 mL los cuales se suspendieron en 76 mL de una solución de citrato de sodio al 3% para guardar la proporción 1:20.

Posteriormente se realizo una curva estándar de saponinas utilizando las siguientes concentraciones: 0.050, 0.045, 0.040, 0.035, 0.030, 0.025, 0.020 y 0.005, diluyendo con amortiguador de fosfatos a pH 7.4.

Para iniciar la determinación de saponinas del EAC se procedió a colocar en viales 600 μ L del extracto a diferentes concentraciones de compuestos fenólicos (900, 700, 500, 250 y 50 EAG), 600 μ L de solución de citrato de sodio al 6% y 100 μ L de glóbulos rojos, todo por triplicado. También se utilizaron 2 controles:

- Control a 0%: se preparó con 600 μ l de agua desionizada, 600 μ L de solución de citrato de sodio al 6% y 100 μ L de glóbulos rojos, todo por triplicado.
- Control a 100%: se utilizó 600 μ l de solución madre de saponinas al 0.1mg/mL, 600 μ L de solución de citrato de sodio al 6% y 100 μ L de glóbulos rojos, todo por triplicado.

•
Posteriormente, se utilizó como blanco, el cual se elaboró con: 600 μ L de agua desionizada, 600 μ L de solución de citrato de sodio al 6% y 100 μ L de glóbulos rojos.

El % de hemólisis se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ hemólisis} = \frac{(\text{abs muestra} - \text{abs del control a 0\%})}{(\text{abs del control a 100\%} - \text{abs del control a 0\%})} \times 100$$

6.10 Determinación de la cinética de inhibición de la formación de compuestos fluorescentes PRM.

El modelo de glicación utilizado fue el SPR: peptona de gelatina (2 g por 100 mL de soluciones amortiguador) y ribosa (2 g por cada 100mL de soluciones amortiguador) con los diferentes EAC preparados en las soluciones amortiguadoras mencionadas en el apartado 6.3, a diferentes pH (4.2, 7.0, 7.4, 9.2) a una temperatura de 92°C durante 180 minutos.

Se midió 40 mL de EAC a 250 mg EAG/L, se agregó 0.80 g de peptona de gelatina mas 0.80g de ribosa (SPR+EAC) y se colocó en 3 tubos de ensaye de 12 mL cada uno. Después a 40 mL de soluciones amortiguador se le agregó 0.80 g de peptona de gelatina y 0.80g de ribosa (SPR) los cuales, fueron colocados en 3 tubos de ensaye de 12mL cada uno.

Posteriormente los tubos de ensaye se colocaron en un baño a 92 °C. Después se tomaron muestras de 1 mL en los siguientes tiempos 15' 30', 60', 90', 120', 150' y 180', se colocaron en viales eppendorf y se dejaron enfriar.

Después, se determinó la formación de compuestos fluorescentes de cada muestra a una longitud de onda de excitación 360 nm y de emisión a 420 nm (Birlouez-Aragon y col., 1998). Finalmente, se determinó la formación de compuestos pardos por medio de la medición de la absorbencia a 420 nm.

Se realizó el mismo procedimiento para los EAC a diferentes pH.

6.11 Análisis estadístico.

Los datos de los diferentes experimentos fueron analizados por pruebas ANOVA con media de Duncan a un nivel de significancia de $p < 0.05$, así como también análisis de correlación para la cual se utiliza el paquete estadístico SPSS versión 12. La recopilación de datos se llevo a cabo por medio de Excel versión Windows vista.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Efecto de la concentración de CFT sobre la actividad antirradical del EAC.

En la Figura 9 se presenta la actividad radical del EAC ($\mu\text{mol ET/L}$) en función de su concentración en CFT expresados en mg EAG/L. Se observa que a una mayor concentración en compuestos fenólicos totales se presenta una mayor actividad antirradical y existe una correlación lineal entre ellas ($r^2=0.9$).

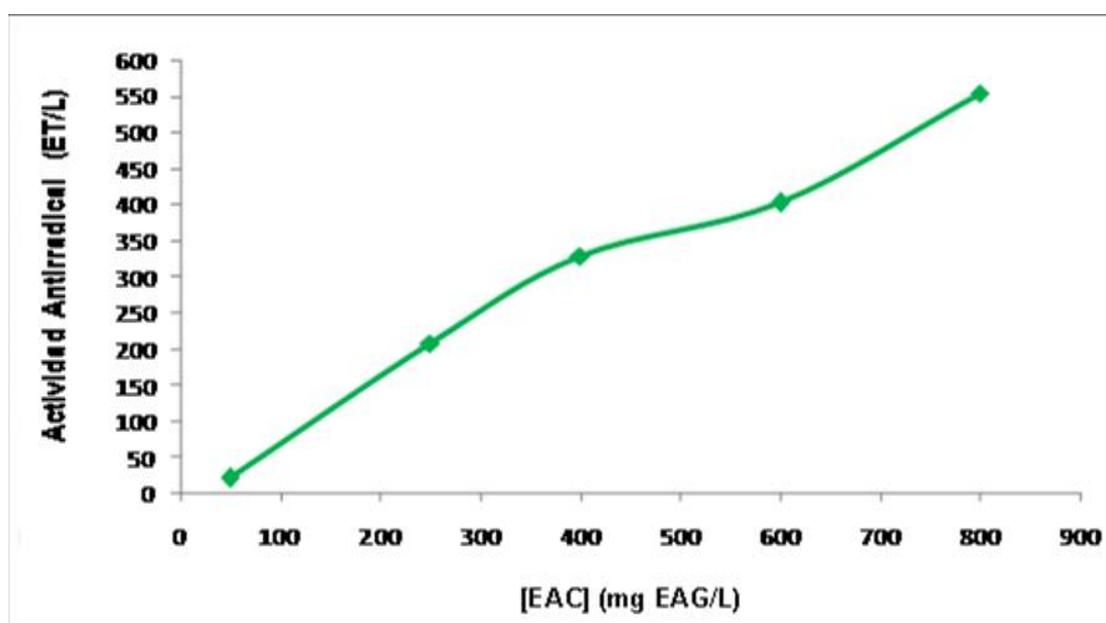


Figura 9. Efecto de la concentración de CFT sobre la actividad antirradical del EAC.

Wangensteen y colaboradores (2004) reportaron una correlación ($r^2=0.8$) entre la actividad antirradical de un extracto acuoso de cilantro con su contenido en compuestos fenólicos. Por su parte, Hinneburg y colaboradores (2006) en estudios con diversos extractos de especias, mostraron que existía una correlación lineal entre su contenido de compuestos fenólicos totales y la actividad antioxidante que presentaban ($r^2=0.8$).

7.2 Efecto de la concentración del EAC sobre el porcentaje de protección de color de una emulsión de β -caroteno y ácido linoléico.

En la Figura 10 se presenta la protección de color de una emulsión de β -caroteno y ácido linoléico en función de la concentración de EAC en mg EAG/L de CFT. La máxima protección de color (83.7%) se presenta a una concentración de 250 mg EAG/L. Se observa que no existe un efecto para las concentraciones de EAC analizadas con respecto al porcentaje de protección de color de la emulsión de β -caroteno y ácido linoléico, debido a que no existe una diferencia significativa ($p < 0.5$) en los valores obtenidos.

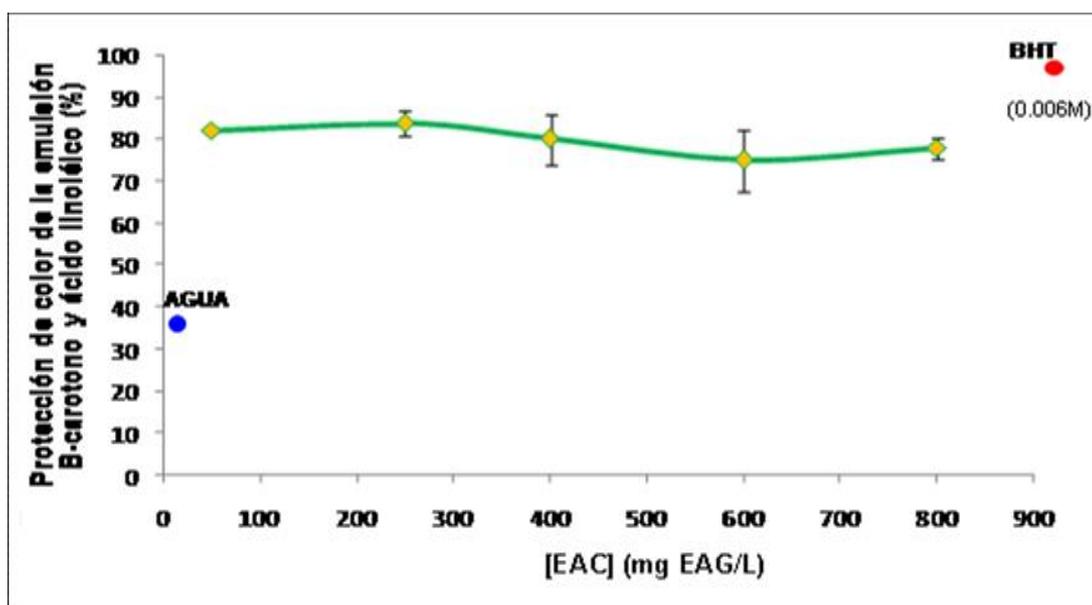


Figura 10. Efecto de la concentración del EAC sobre el porcentaje de protección de color de una emulsión de β -caroteno y ácido linoléico.

La actividad antioxidante del extracto acuoso de cilantro obtenida en este estudio (83.7%) es mayor que la reportada por Melo y colaboradores (2003), dado que se encontró una protección contra la decoloración de un modelo de β -caroteno y ácido linoléico de 69.8 %.

7.3 Efecto de la concentración de CFT sobre la actividad quelante del EAC.

En la Figura 11 se presenta la actividad quelante del EAC en función de su concentración de CFT. Se observa que a partir de 250 mg EAG/L se presenta el mayor porcentaje de actividad quelante, no existiendo un Efecto para las concentraciones mayores a 250 mg EAG/L ya que conforme aumenta la concentración de CFT del EAC, la actividad quelante resultante no presenta un aumento significativo ($p < 0.5$) y dicha actividad es menor que al EDTA (0.1M)

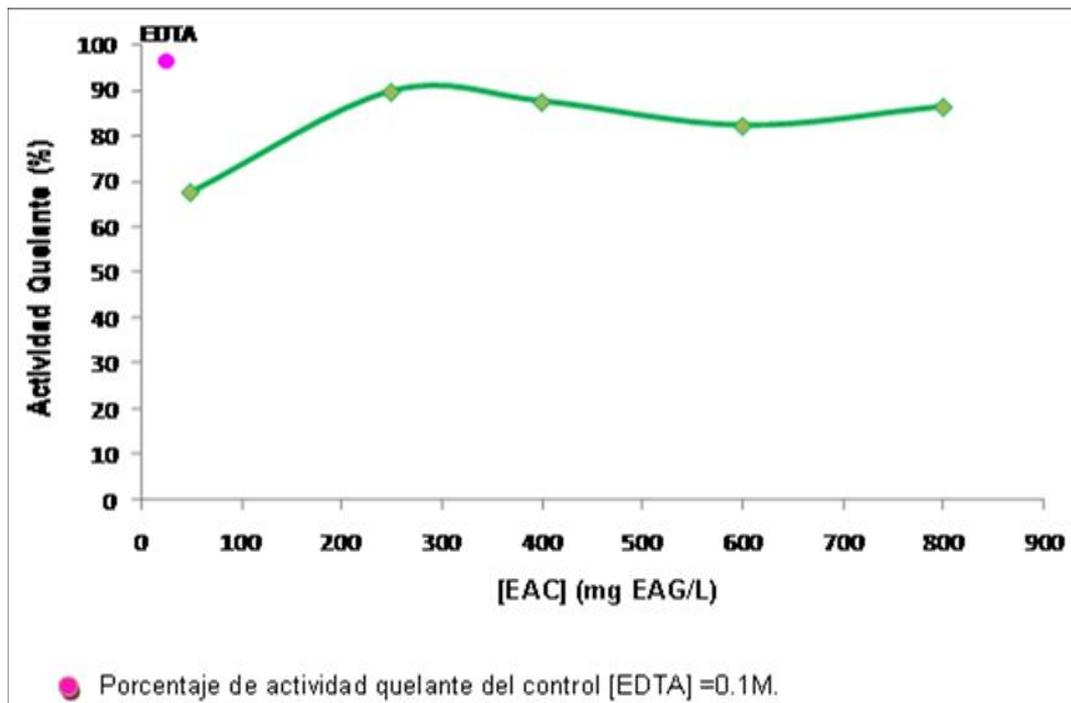


Figura 11. Efecto de la concentración de CFT sobre la actividad quelante del EAC.

7.4 Efecto de la concentración del EAC sobre la actividad hemolítica.

En la figura 12 se observa que entre mayor sea la concentración del EAC (mg EAG/L) se presenta un mayor porcentaje de hemólisis. Existe una correlación lineal entre el contenido de CFT y el % de Hemólisis ($r^2=0.9$, $p < 0.01$).

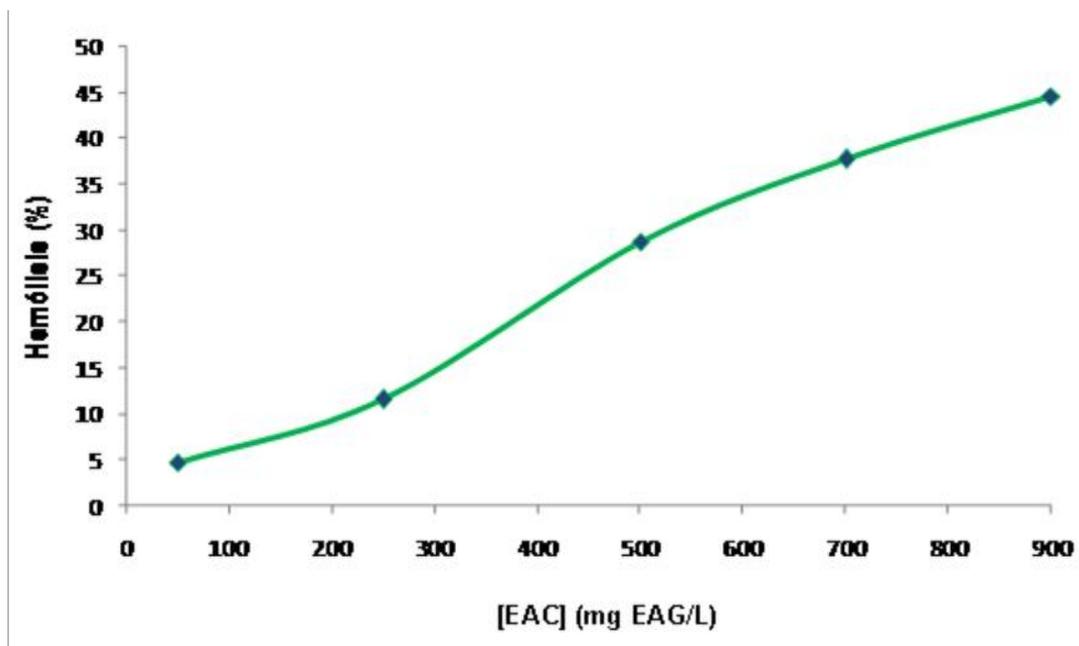


Figura 12. Efecto de la concentración del EAC sobre la actividad hemolítica.

No se han reportado estudios sobre la actividad hemolítica del cilantro.

7.5 Efecto de la concentración de CFT del EAC sobre la inhibición de la formación de compuestos fluorescentes durante la glicación del sistema peptona y ribosa (SPR).

En la figura 13 se observa que conforme aumenta la concentración del EAC existe una mayor inhibición de la formación de compuestos fluorescentes durante la glicación del sistema peptona y ribosa (SPR).

Existe una correlación con función potencial ($r^2 = 0.9$) entre el contenido de compuestos fenólicos totales y la formación de compuestos fluorescentes.

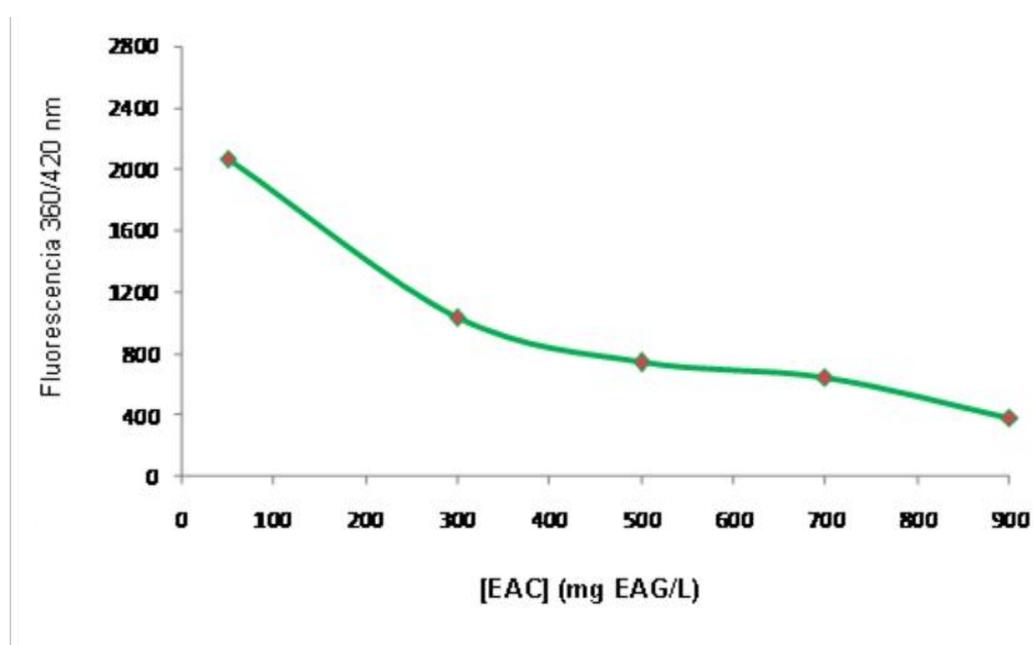


Figura 13. Efecto de la concentración de CFT del EAC sobre la inhibición de la formación de compuestos fluorescentes del SPR.

Durante la glicación SPR, se observa que cuando mayor es la concentración del EAC (mg EAG/L) menor es la formación de compuestos fluorescentes, lo cual significa que probablemente el EAC inhibe la formación de compuestos fluorescentes en la etapa intermedia de la reacción de Maillard.

Al combinar las Figuras 9 y 13 se obtiene la Figura 14 donde se observa que durante la glicación del SPR conforme aumenta la actividad antirradical del extracto mayor es la inhibición de la formación de compuestos fluorescentes (correlación de Pearson = -0.952, $p < 0.02$).

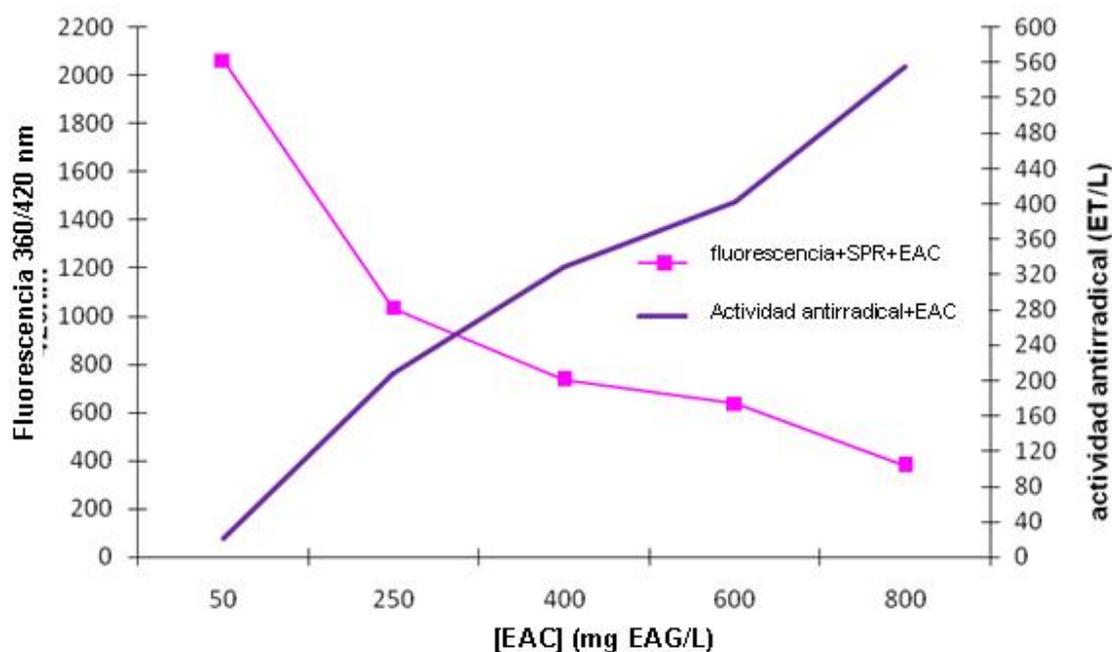


Figura 14. Efecto de la concentración de CFT del EAC sobre la inhibición de la formación de compuestos fluorescentes durante la glicación del SPR y sobre la actividad antirradical.

Por lo que se confirmó que un mecanismo para inhibir los productos de la reacción de Maillard es por medio del atrapamiento de radicales libres. Schamberger y Labuza (2005) observaron que en un sistema modelo glucosa-glicina al adicionar los flavonoides con actividad antioxidante del té verde (epicatequina (EC) y la epigallocatequina galato (EGCG) a 0.001 M, adicionados en la leche sometida a un proceso térmico de UHT se redujo la formación de compuestos fluorescentes y compuestos pardos producto de la reacción de Maillard y estos autores proponen que estos flavonoides (EC y EGCG) podrían ser usados en la industria alimentaria con el fin antes mencionado.

7.6 Cinética de la formación de compuestos fluorescentes a diferentes pH durante la glicación del SPR.

En la figura 15 se puede observar que durante la glicación de SPR a pH ácido (4.2) es menor la formación de compuestos fluorescentes que durante la glicación a pH alcalino (9.2). Durante la glicación del SPR a pH neutros, con un soluciones amortiguador de fosfatos (pH 7.4) es mayor la formación de compuestos fluorescentes que con un soluciones amortiguador de fosfato-citrato (pH 7), debido a que el soluciones amortiguador de fosfatos promueve la reacción de Maillard (Bell, 1997).

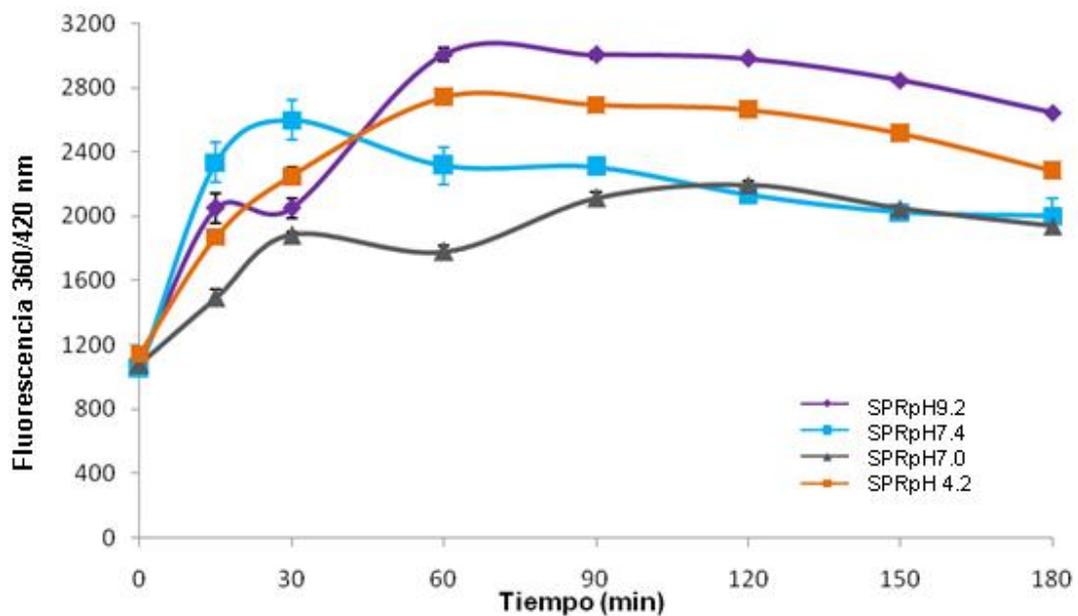


Figura15. Cinética de la formación de compuestos fluorescentes a diferentes pH durante la glicación del SPR.

Georgescu y Leonte, (1998) refieren que a medida que la acidez del medio aumenta menor es la reactividad del grupo amino y por lo tanto la reacción de Maillard avanza de manera mas lenta.

De acuerdo a estudios previos en un sistema modelo el soluciones amortiguador fosfato tiene un efecto catalítico en la reacción de Maillard (Burton y McWeeny, 1963; Potman y Van Wijk, 1989). Watkins y colaboradores (1987) refieren que el soluciones amortiguador fosfato puede actuar como un catalizador bifuncional de la reacción nucleofílica del grupo amino con el grupo carbonilo debido a la habilidad simultánea del anion fosfato de donar y aceptar protones.

7.7 Cinética de la inhibición de la formación de compuestos fluorescentes durante la glicación del SPR en presencia del EAC a pH 9.2.

En la figura 16 se observa que durante la glicación del SPR a pH 9.2 la mayor formación de compuestos fluorescentes se presenta en el minuto 60, posteriormente no existe diferencia significativa entre las subsecuentes concentraciones a los diferentes tiempos estudiados, probablemente porque a partir del minuto 60 se presenta la etapa avanzada de la reacción de Maillard en el sistema estudiado.

También se observa que la formación de compuestos fluorescentes durante la glicación del SPR en presencia del EAC es significativamente menor que durante la glicación SPR sin el extracto.

Al minuto 180 se presentó una inhibición de la formación de compuestos fluorescentes a pH 9.2 en un porcentaje de 41%.

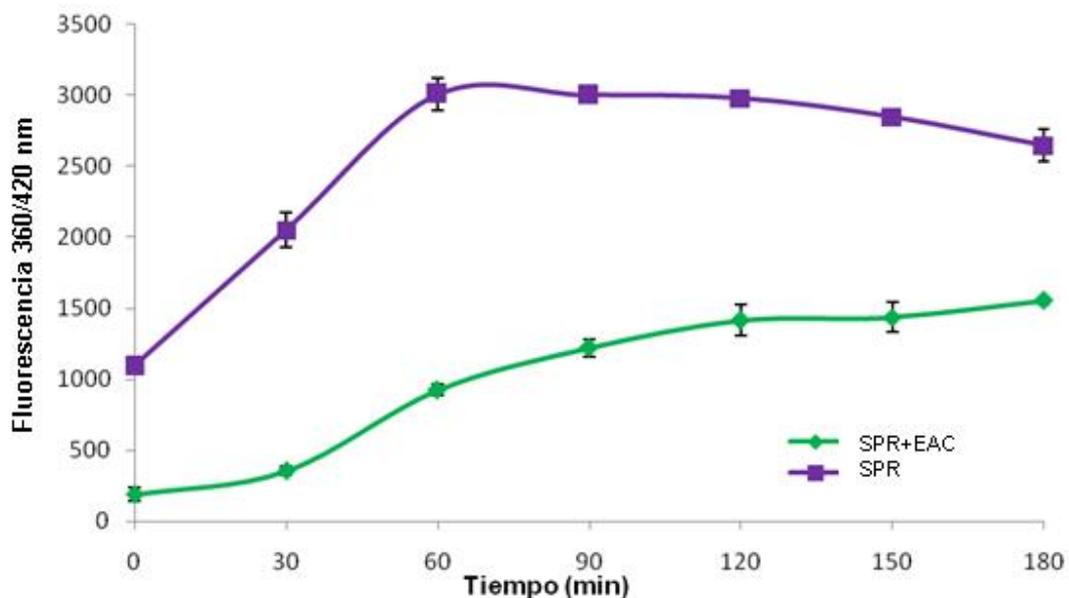


Figura 16. Cinética de la inhibición de la formación de compuestos fluorescentes durante la glicación del SPR en presencia del EAC a pH 9.2.

7.8 Cinética de la inhibición de la formación de compuestos fluorescentes durante la glicación de SPR en presencia del EAC a pH 7.4.

En la figura 17 se observa en ambas cinéticas que al minuto 60 se presenta la mayor formación de compuestos fluorescentes, posteriormente no existe diferencia significativa entre las concentraciones a los diferentes tiempos estudiados, probablemente porque a partir del minuto 60 se presenta la etapa avanzada de la reacción de Maillard en el sistema estudiado.

La formación de compuestos fluorescentes durante la glicación del SPR en presencia del EAC es significativamente menor que durante la glicación SPR sin el extracto.

Al minuto 180 se presentó una inhibición de la formación de compuestos fluorescentes del 52%.

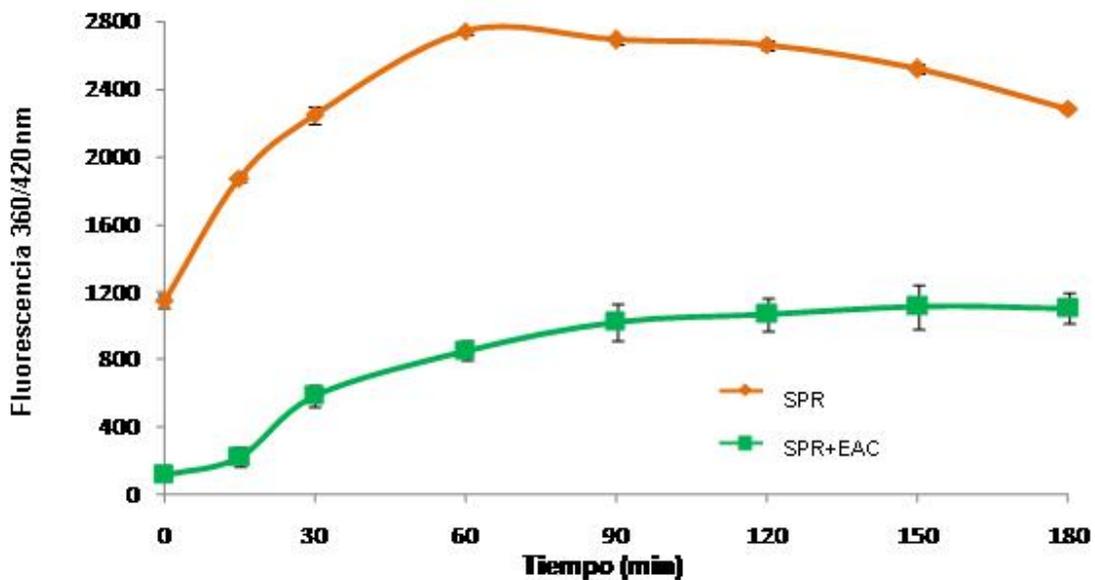


Figura 17. Cinética de la inhibición de la formación de compuestos fluorescentes durante la glicación del SPR en presencia del EAC a pH 7.4.

7.9 Cinética de la inhibición de la formación de compuestos fluorescentes durante la glicación del SPR en presencia del EAC a pH 7.0.

En la figura 18 se observa en ambas cinéticas que al minuto 30 se presenta la mayor formación de compuestos fluorescentes, posteriormente no existe diferencia significativa entre las concentraciones a los diferentes tiempos estudiados, probablemente porque a partir del minuto 30 se presenta la etapa avanzada de la reacción de Maillard en el sistema estudiado.

La formación de compuestos fluorescentes durante la glicación del SPR en presencia del EAC es significativamente menor que durante la glicación SPR sin el extracto.

Al minuto 180 se presentó una inhibición de la formación de compuestos fluorescentes a pH 7 a un porcentaje de 40%.

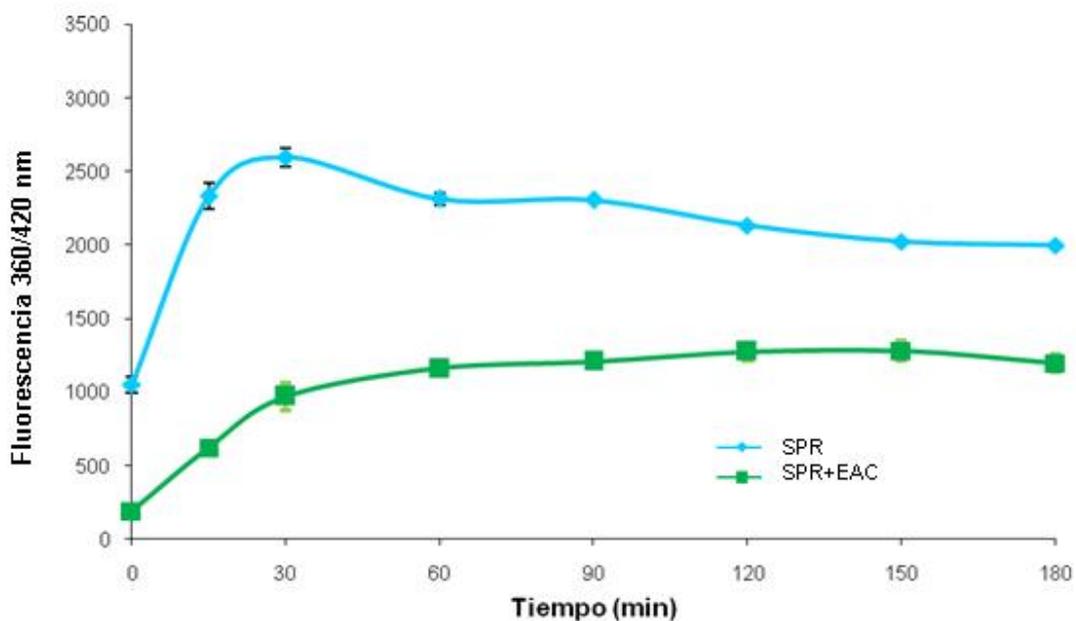


Figura 18. Cinética de la inhibición de la formación de compuestos fluorescentes durante la glicación del SPR en presencia del EAC a pH 7.0.

7.10 Cinética de la inhibición de la formación de compuestos fluorescentes durante la glicación del SPR en presencia del EAC a pH 4.2.

En la figura 19 se observa que durante la glicación del SPR a pH 4.2 la mayor formación de compuestos fluorescentes sucede al minuto 30, posteriormente no existe diferencia significativa entre las concentraciones a los diferentes tiempos estudiados, probablemente porque a partir del minuto 30 se presenta la etapa avanzada de la reacción de Maillard en el sistema estudiado.

La formación de compuestos fluorescentes durante la glicación del SPR en presencia del EAC es significativamente menor que durante la glicación SPR sin el extracto.

Al minuto 180 se presentó una inhibición de la formación de compuestos fluorescentes a pH 4.2 a un porcentaje de 53%.

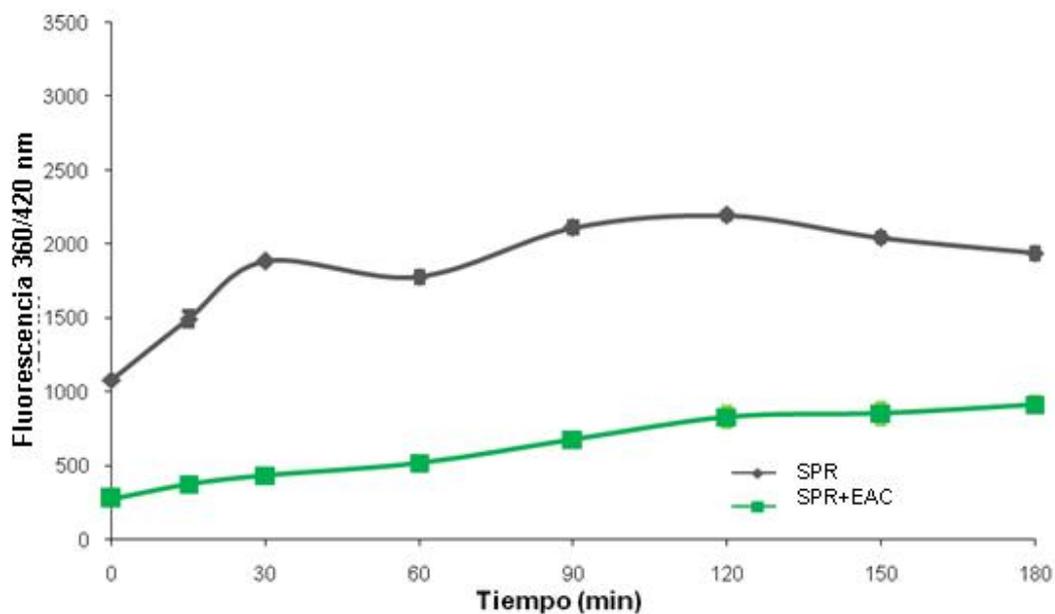


Figura 19. Cinética de la inhibición de la formación de compuestos fluorescentes durante la glicación del SPR en presencia del EAC a pH 4.2.

7.11 Cinética de la formación de compuestos pardos a diferentes pH (9.2, 7.4, 7.0 y 4.2) durante la glicación del SPR.

En la figura 20 se observa que la formación de compuestos pardos durante la glicación del SPR es mayor a pH alcalino (9.2) y que la menor formación de compuestos pardos se presenta a pH ácido (4.2).

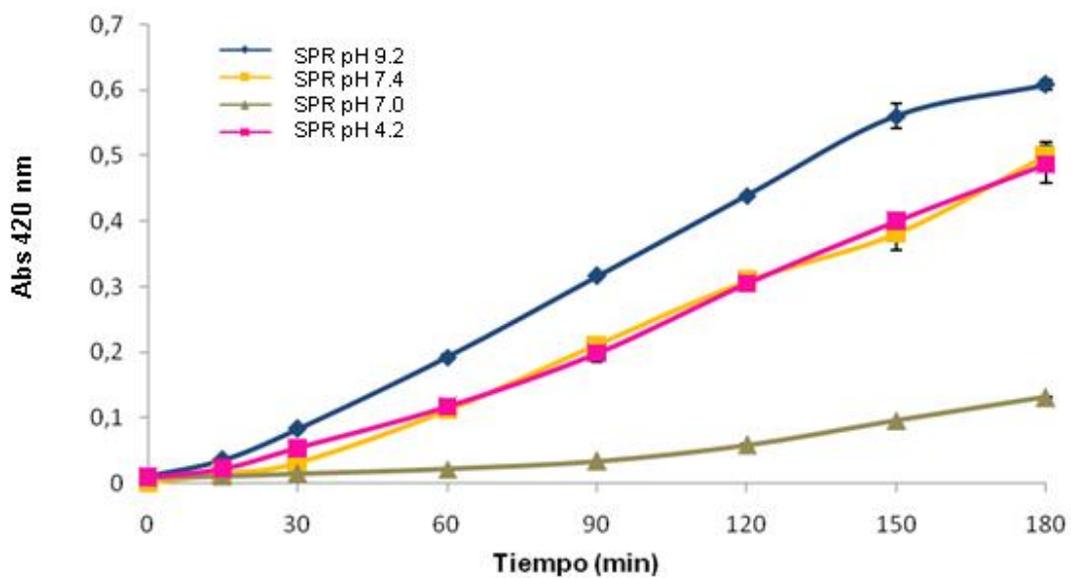


Figura 20. Cinética de la formación de compuestos pardos a diferentes pH durante la glicación del SPR.

Según Ames 1990, los compuestos pardos se favorecen a pH alcalino (9.2).

No se observó diferencia significativa entre la formación de compuestos pardos durante la glicación en presencia de soluciones amortiguador de fosfato-citrato (pH 7.0) y soluciones amortiguador de fosfatos (pH 7.4).

7.12 Cinética de la inhibición de la formación de compuestos pardos durante la glicación de SPR en presencia del EAC a pH 9.2.

En la figura 21 se observa que en ambas cinéticas a partir del minuto 15 la formación de compuestos pardo aumenta constantemente.

No existe diferencia significativa entre la formación de compuestos pardos durante la glicación del SPR con el EAC que sin el extracto a los diferentes tiempos estudiados

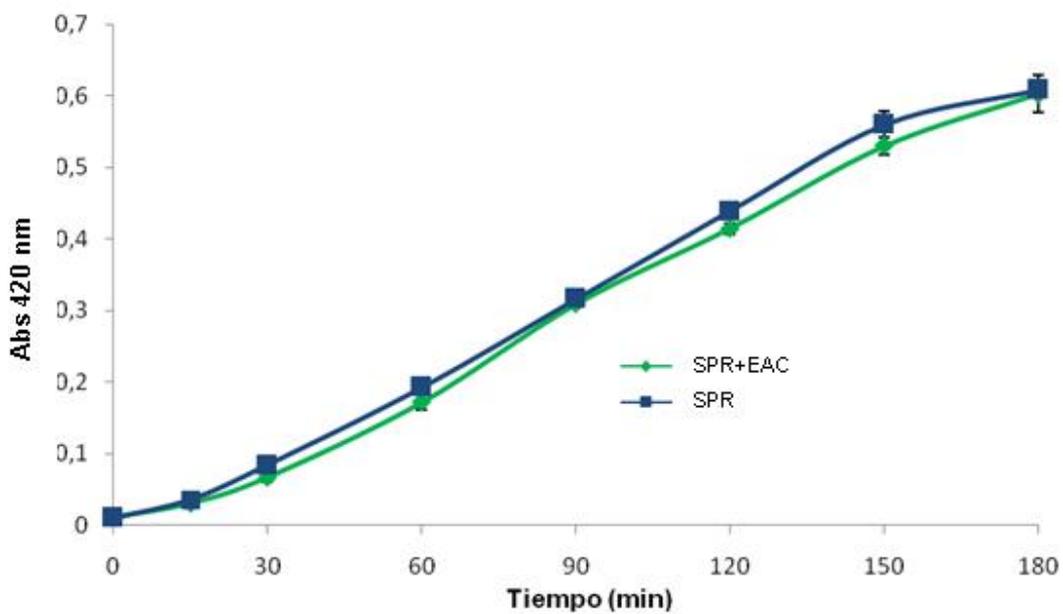


Figura 21. Cinética de la inhibición de la formación de compuestos pardos durante la glicación del SPR en presencia del EAC a pH 9.2.

7.13 Cinética de la inhibición de la formación de compuestos pardos durante la glicación del SPR en presencia del EAC a pH 7.4.

En la figura 22 se puede observar que en ambas cinéticas a partir del minuto 30 la velocidad de formación de compuestos pardos aumenta significativamente ($p > 0.5$), por lo que se verifica que a partir del minuto 30 la reacción comienza la etapa avanzada de la reacción de Maillard.

No existe diferencia significativa entre la formación de compuestos pardos durante la glicación del SPR con el EAC que sin el extracto a los diferentes tiempos estudiados.

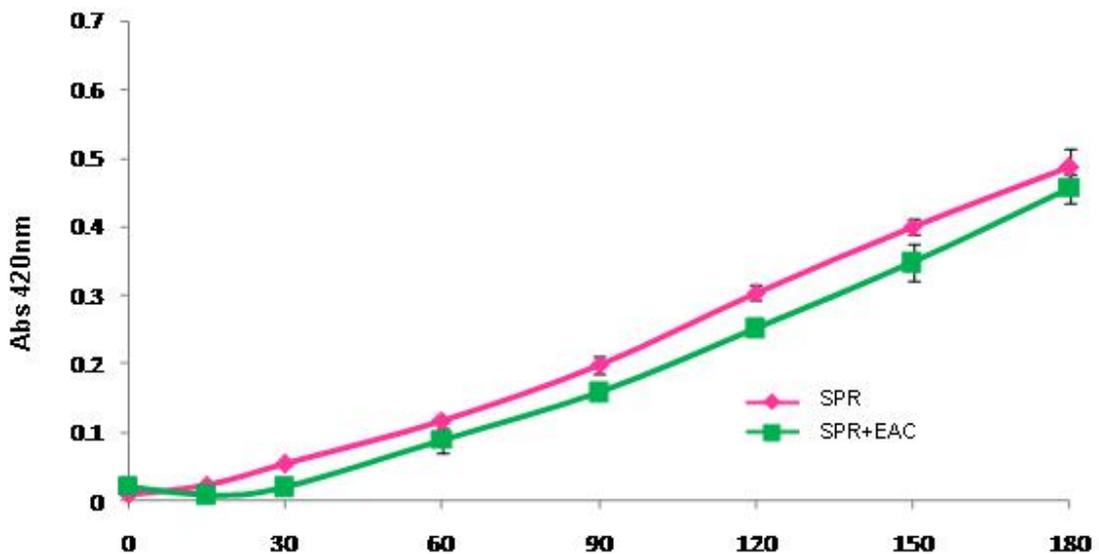


Figura 22. Cinética de la inhibición de la formación de compuestos pardos durante la glicación del SPR en presencia del EAC a pH 7.4.

7.14 Cinética de la inhibición de la formación de compuestos pardos durante la glicación del SPR en presencia del EAC a pH 7.0.

En la figura 23 se observa que la formación de compuestos pardos durante la glicación de SPR en presencia del EAC es menor que durante la glicación sin el extracto, a partir del minuto 60 la reacción comienza la etapa avanzada de la reacción de Maillard.

Al minuto 180 se presentó una inhibición de la formación de compuestos pardos a pH 7 en un porcentaje de 13%.

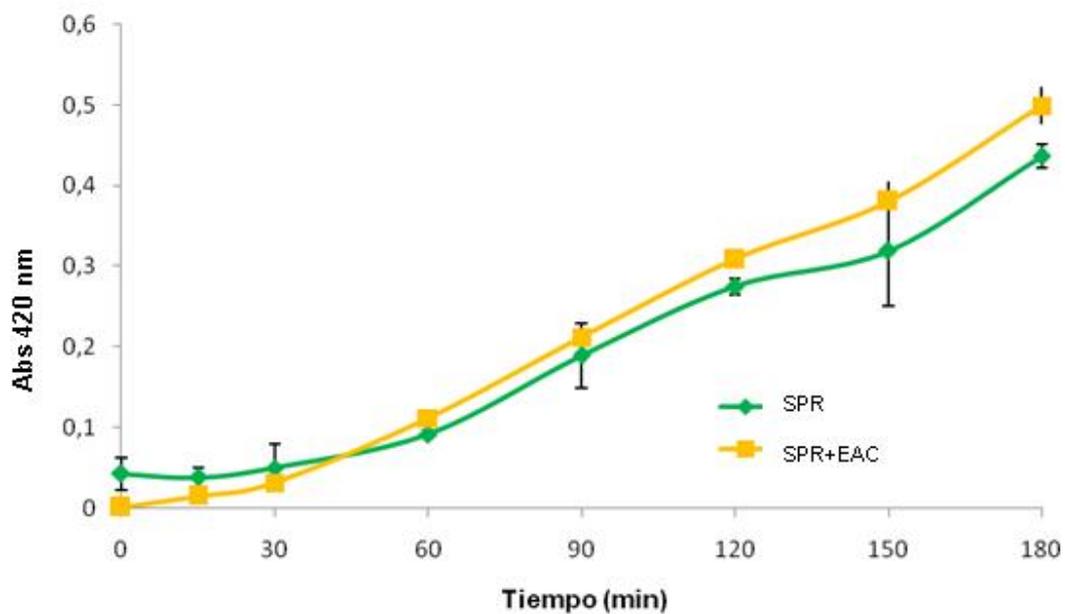


Figura 23 Cinética de la inhibición de la formación de compuestos pardos durante la glicación del SPR en presencia del EAC a pH 7.0.

7.15 Cinética de la inhibición de la formación de compuestos pardos durante la glicación del SPR en presencia del EAC a pH 4.2.

En la figura 24 se observa que a partir del minuto 60 la formación de compuestos pardos durante la glicación de SPR en presencia del EAC es menor, que durante la glicación sin el extracto.

Al minuto 180 se presentó una inhibición de la formación de compuestos pardos a pH 4.2 en un porcentaje de 24% (Tabla 5).

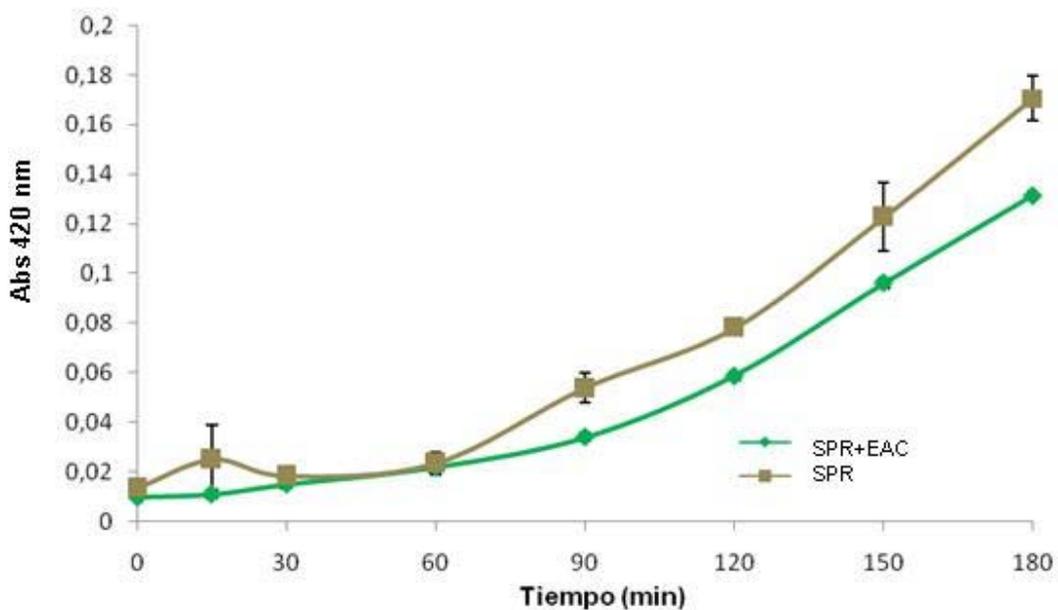


Figura 24. Cinética de la inhibición de la formación de compuestos pardos durante la glicación del SPR en presencia del EAC a pH 4.2.

Tabla 3. % de inhibición de compuestos fluorescentes y compuestos pardos durante la glicación en presencia del EAC en las diferentes soluciones amortiguadoras.

| pH | % Inhibición de compuestos fluorescentes | % Inhibición de compuestos pardos |
|------------|---|--|
| 9.2 | 41 | 0 |
| 7.4 | 52 | 0 |
| 7.0 | 40 | 13 |
| 4.2 | 53 | 24 |

7.16 Cinética de la formación de compuestos fluorescentes y compuestos pardos durante la glicación del SPR en presencia del EAC a los diferentes pH analizados.

La progresión de la reacción de Maillard durante la glicación del SPR en presencia del EAC, se puede observar durante el desarrollo de compuestos fluorescentes y los compuestos pardos en función del tiempo.

En la figura 25 Se observa que desde el inicio de la glicación del SPR en presencia del EAC a pH 9.2 existe una formación progresiva de compuestos fluorescentes y compuestos pardos por lo que la etapa avanzada de la reacción de Maillard esta presente desde los primeros tiempos de glicación, lo cual explica que el EAC no inhibe la formación de compuestos pardos.

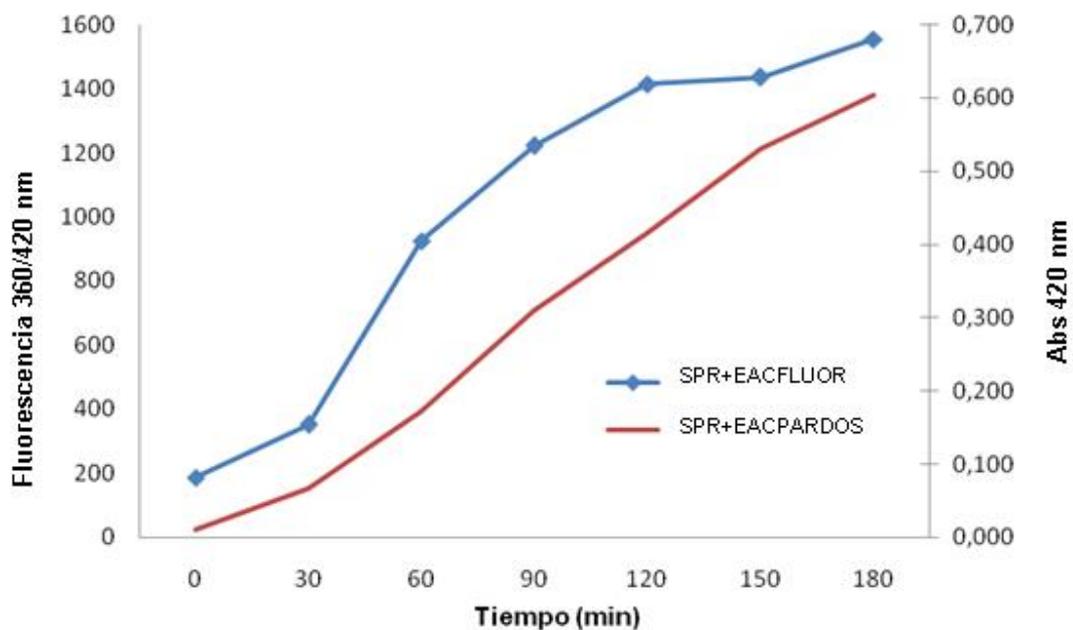


Figura 25. Cinética de la formación de compuestos fluorescentes y compuestos pardos durante la glicación del SPR en presencia del EAC a pH 9.2.

En la figura 26 se observa que desde el inicio de la glicación del SPR en presencia del EAC a pH 7.4 existe una formación progresiva de compuestos fluorescente. A partir del minuto 30 la formación de compuestos pardos se presenta rápidamente.

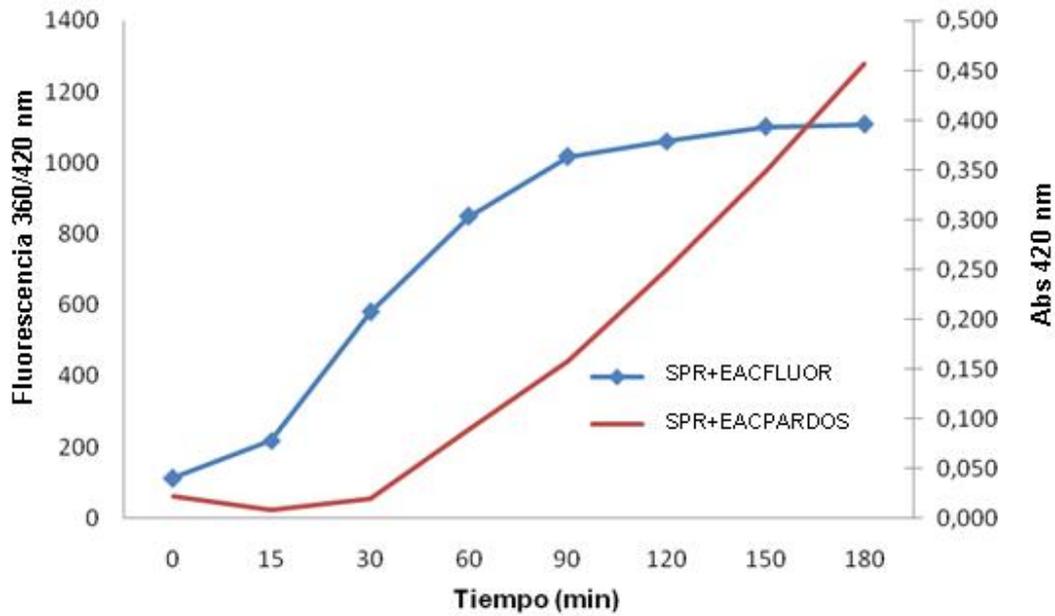


Figura 26 Cinética de la formación de compuestos fluorescentes y compuestos pardos durante la glicación del SPR en presencia del EAC a pH 7.4.

En la figura 27 en la línea azul se observa que la formación de compuestos fluorescentes durante la glicación del SPR en presencia del EAC a pH 7.0 aumenta constantemente desde el inicio hasta el minuto 30 donde se presenta la mayor formación de compuestos fluorescentes, posteriormente no existe diferencia significativa entre las concentraciones a los diferentes tiempos estudiado. A partir del minuto 60 la formación de compuestos pardos se presenta rápidamente, sin embargo alcanza una menor concentración en comparación con el pH 7.4, lo que significa que existe una ligera inhibición de la formación de compuestos pardos durante los primeros minutos.

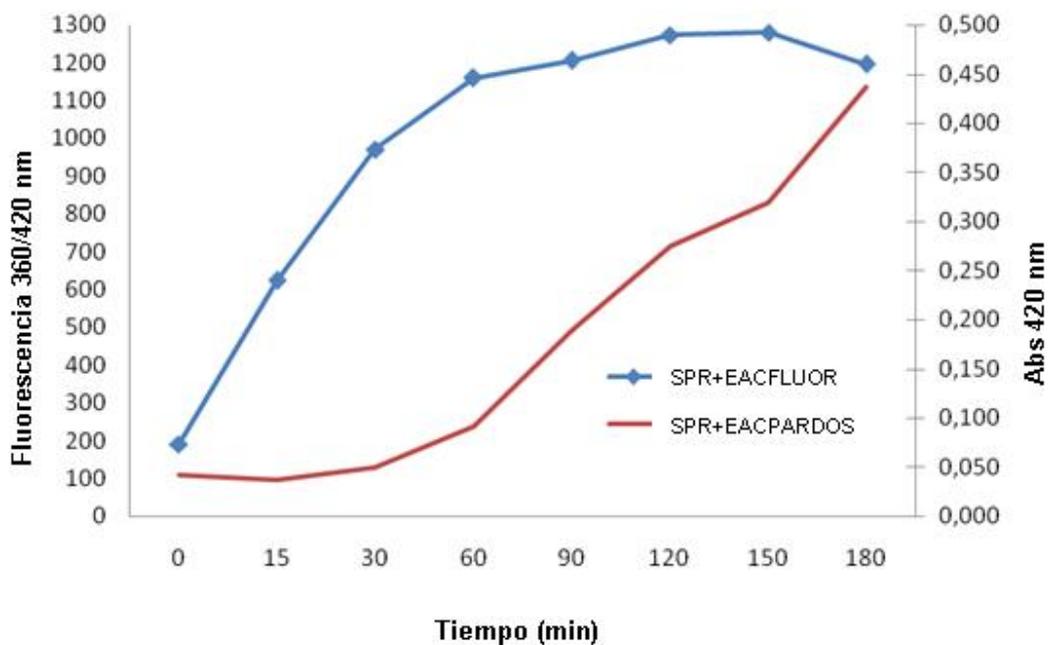


Figura 27. Cinética de la formación de compuestos fluorescentes y compuestos pardos durante la glicación del SPR en presencia del EAC a pH 7.0.

En la figura 28 en la línea azul se observa que la formación de compuestos fluorescentes durante la glicación del SPR en presencia del EAC a pH 4.2 aumenta constantemente a partir del tiempo 0, en la línea naranja la formación de compuestos pardos durante la glicación del SPR en presencia del EAC se presenta a partir del minuto 60, lo que significa que dada las condiciones de acidez la reacción de Maillard avanza de manera mas lenta que en los diferentes pH's estudiados, por lo que la actividad antiradical del EAC pueden tener una mayor influencia en la inhibición de los productos de la glicación.

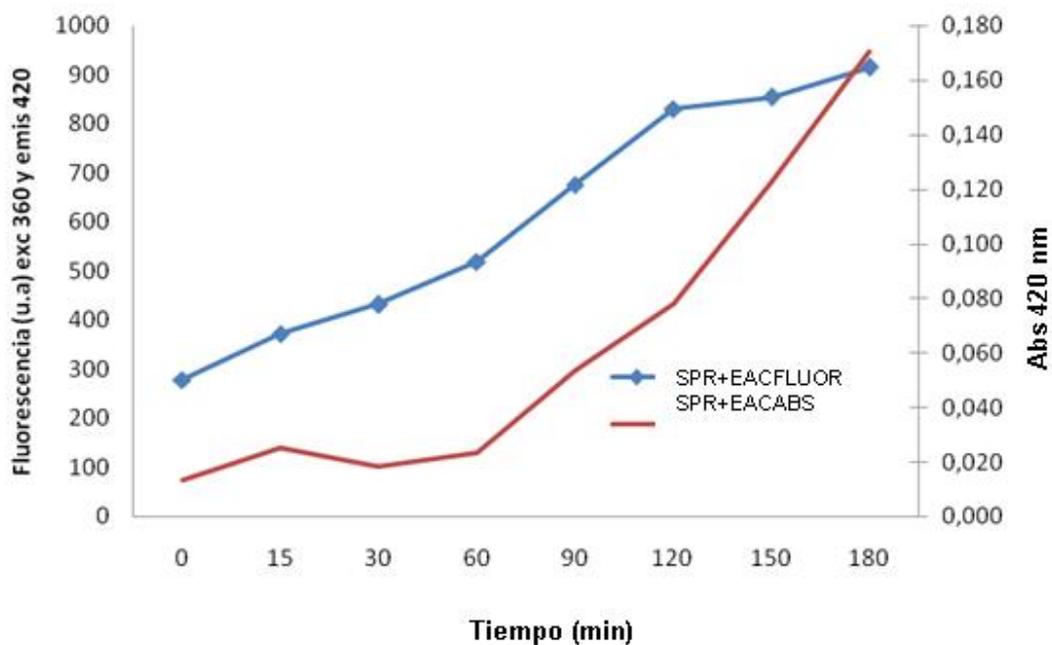


Figura 28. Cinética de la formación de compuestos fluorescentes y compuestos pardos durante la glicación del SPR en presencia del EAC a pH 4.2.

CONCLUSIONES

- El extracto acuoso de cilantro contiene una importante actividad antirradical, antioxidante y quelante.
- A mayor concentración del extracto acuoso de cilantro existe una mayor inhibición de la formación de compuestos fluorescentes durante la glicación del sistema peptona y ribosa.
- Se comprobó que el mecanismo que resulta en la inhibición de la formación de compuestos fluorescentes del sistema peptona ribosa en presencia del extracto acuoso de cilantro a pH 7.4 es del atrapamiento de radicales libres.
- En los pH analizados se encontró una importante inhibición (>40%) de compuestos fluorescentes en presencia del extracto acuosos de cilantro después de 180 minutos de glicación.
- A pH 9 y pH 7.4 no se presentó una inhibición de la formación de compuestos pardos durante la glicación.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Al- Mamary M. 2002. Antioxidant Activity of Commonly Consumed Vegetables in Yemen. *Mal J Nutr* 2: 179-189.
- Alonso M. y Allue J. 2005. Plantas medicinales, resumen legislativo: En: Vanaclocha B, Cañigüeral S. *Fitoterapia, Vademécum de prescripción*. Barcelona: Masson; Revista de Fitoterapia, Dirección : <http://fitoterapia.net> acceso : septiembre 2005.
- Ames, J. 1990. Control of the Maillard reaction in food systems. *Trends in Food Science & Technology* 1: 150-154.
- Azuma K, Ippoushi K, Higashio H, Terao J. 1999. Evaluation of antioxidative activity of vegetable extracts in linoleic acid emulsion and phospholipid bilayers, *J. Sci. Food and Agric.* 79: 2010-2016.
- Barbosa G., Melo A. y Mancini F. 2004. Antioxidant compounds from coriander (*Coriandrum sativum* L.) etheric extract. Nutrition Department, Federal University of Pernambuco (UFPE), Rua Prof. Nelson Chaves, s/n. CEP 50670-901, Recife PE, Brazil, Home Economic Department, Rural Federal University of Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmão, CEP 52171-900, Recife, PE, Brazil. Food and Experimental Nutrition Department, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes No. 580, CEP 05508-900, São Paulo, SP, Brazil.
- Bell, L. 1997. Maillard reaction as influenced by soluciones amortiguador type and concentration. *Food Chemistry*, 59: 143-147.
- Birlouez-Aragon, I., Nicolas, M., Metais, A., Mar Chond, N., Grenier, J. y Calvo, D. 1998. A rapid fluorometric method to estimate the heat treatment of liquid milk . *International Dairy Journal*. 8: 771-777.
- Borrelli R., Fogliano V., Monti S. y Ames J. 2002. Characterization of melanoidinas from a glucose – glycine model system. *Eur Food Res Technol* 3: 210-215.

- Burton, H. y MacWeeny, D. 1963. Non-enzimatic browning reactions: Consideration of sugar stability. *Nature*, 197: 266-268.
- Chihuailaf, R., Contreras, P. y Wittwer, F. 2002. Patogénesis del estrés oxidativo: consecuencias y evaluación en salud animal. *Vet. Mex.* 3: 265-283.
- Chithra, V y Leelamma, S. 1997. Effect of Coriander Seeds (*Coriander Sativum*): Mechanism of Action. *Plant Foods* 2: 167-72. Revisado el 03-11-07.
- Davies, C. y Labuza, T. 1997. The Maillard reaction : application to confectionery products. *Confectionery Science.* 35-66.
- Delgado-Andrade, C., Rufián-Henares J. y Morales F. 2005. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Instituto del Frío Madrid, Spain.
- Ericsson C, 1981. Maillard reaction in Food: Chemical, Physiological and Technological aspects. En C. Erikson, *Progress in Food Nutrition and Science*, 5: 441-451, Pergammon Press, Oxford.
- Friedman M, 1996. Food browning and its prevention: An overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 3: 631-653.
- Frankel, E y Meyer, A. 2000. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multidimensional food.
- Gehardt, S., Rosend, R. y Matthews, R. 1988. Nutritive value of foods. *Usdahnis, home and garden bull.* 72, u.s. government printing office, Washington, dc, u.s.a., 72p
- Georgé, S., Brat, P., Atler, P. y Amiot, M. 2005. Rapid Determination of Polyphenols and vitamin C in Plan-Derived Products. *J. Arric. Food Chem.* 53. (5) : 1370-1373.
- Georgescu, L. y Leonte, M. 1998. Inhibition des radicaux Maillard par les composés polyphénoliques. *Industrie alimentaire Friedman M, et agr.* Volume 115.
- Guerra de L., J., Nogueiras C., Delgado, C. y Hernández S. 2001. Determinación cuantitativa de saponinas y azúcares reductores del *Agave brittoniana* T. Facultad de Química y Farmacia, Universidad Central de las Villas, Facultad de Química, Universidad de la Habana, Universidad de cienfuegos. Vol XIII N.3: 39-42.

- Giovannucci, E., Rimm, E., Liu, Y., Stampfer, M. y Willett, W. 2002. A prospective study of tomato products, lycopene, and prostate cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 94 (5) : 391-398.
- Goldberg, T., Cai W., Peppas, M., Dardaine, V., Baliga, B., Urribani, J., y Vlassara, H. 2004. Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *Journal of the American Dietetic Association*, 104, 1287-1291.
- Gugliucci, A. 2000. Glicación de proteínas : rol protagónico de la hiperglicemia en las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. *Revista médica del Uruguay*. 1: 58-75.
- Guicin, I., Buyukokuroglu, M. y Kufrioglu, O. 2003. Metal Chelating and hydrogen peroxide scavenging effects of melatonin. *J. Agric. Food Chem.* 5 : 1370-1373.
- He, C., Sabol, J., Mitsuhashi, T., Vlassara, H. 1999. Dietary Glycotoxins. Inhibition of reactive products by aminoguanidine facilitates renal clearance and reduce tissue sequestration. 48: 1308-1315.
- Hinnenburg, I., Dorman, P., Hitunen R. 2006. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and species. 1-8
- Hodge, J. 1953. Chemistry of browning reactions in model systems. *J. Agric. Food Chem*, 1 (15) : 928-943.
- Jing, H. y Kitts, D. 2002. Chemical and biochemical properties of casein-sugar Maillard reaction products. *Food and Chemical Toxicology*. 40: 1007-1015.
- Justesen, U y Knuthsen, P. 2001. Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. *Food Chemistry*.: 73: 245-250.
- Kathleen, M. y Escole-Stump, S. 1998. Vitaminas. en: *Nutrición y Dietoterapia de Krause*. Mc Graw Hill. Mexico: 77-172.
- Kim, H. y Kim, K. 2003. Protein glycation inhibitory and antioxidative activities of some plant extracts in vitro. *J. Agric. Food Chem.* 5 : 1586-1591.

- Koschinsky, T., He C., Mitsuhashi T., Bucala., Liu C., Buenting C., Heitman K. y Vlassara H. 1997. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): An environmental risk factor in diabetic nephropathy. Proc. Natl Aca. Sci. 94:6474-6479.
- Ledl, F. y Schleicher E. 1999. The Maillard reaction in food and in human body, new results in chemistry, biochemistry and medicine. Angew Chem Int Ed Engl 29: 565-706.
- Lee, K. y Shibamoto, T. 2002. Toxicology and antioxidant activities of non-enzymatic browning reaction products: review. Food Reviews International, 18: 151-175.
- Lewis, R. 1989. Food Additives Handbook. Van Nostrand Reinhold. USA. 86: 96-102.
- Linder, E. 1995. Toxicología de los alimentos., ACRIBIA, S.A., ZARAGOZA, (España); Editorial Thieme Verlag. 10-12.
- Matos, H., Capelozzi, U., Gomes, O., Mascio, P. y Medeiros, M. 2001. Lycopene inhibits DNA damage and liver necrosis in rats treated with ferric nitrilotriacetate. Arch Biochem Biophys. 2: 171-177.
- Melo, E., Martins, B., Mancini, F., Barbosa, G. 2003. In vivo antioxidant effect of aqueous and etheric coriander (*Coriandrum sativum* L.) extracts. Nutrition Department, Federal University of Pernambuco, Brazil, Food and Experimental Nutrition Department, University of São Paulo, Brazil.
- Mendez, J. 2003. Productos finales de glicación avanzada y complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. Gac. Med. Mex., 1: 49-55.
- Meyer, A., Donovan, J., Pearson, D., Waterhouse, A., y Frankel, E. 1998. Fruit hydroxycinnamic acids inhibit human low-density lipoprotein oxidation *in vitro*. J Agric Food Chem 46: 1783-1787.
- Miyata, T., Ypersele de Strihou C., Ueda, Y., Ichimori, K., Inagi, R., Onogi, H., Ishikawa, N., Nangaku, M. y Kurokawa, K. 2002. Angiotensin II receptor antagonists and angiotensin-converting enzyme inhibitors lower *in vitro* the formation of advanced glycation end products : Biochemical mechanisms.

- Monti, S., Ritieni, A., Sacchi, R., Skog, K., Borgen, E. y Fogliano, V. 2001. Characterization of phenolic compounds in virgin olive oil and their effect on the formation of carcinogenic/mutagenic heterocyclic amines in a model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 8: 3969-3975.
- Morales, F. y Jimenez-Perez, S. 2001. Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Food Chemistry*. 72 : 119-125.
- Mottram, D. 1998. Flavour Formation in Meat and Meat Products: A Review. *Food Chem.* 62, 415-424.
- Mottram, D., Wedzicha, B. y Dodson, A. 2002. Food Chemistry: Acrylamide is formed in the Maillard reaction, *Nature* 419: 448-449.
- Omura, Yoshiaki. 1995. Acupuncture Electrotherapy Res. 96; 21:2(133-60). *Acupunct Electrother Res.* Aug-Dec. 20 (3-4) : 195-229.
- Petersen, B. 2002. Exposure and biomarkers. JIFSAN/NCFST Acrylamide in Food Workshop. http://www.jifsan.umd.edu/acrylamide_workshop.html.
- Price, D., Rhett, P., Thorpe, S., y Baynes, J. 2001. Chelating activity of advanced glycation end-product inhibitors. *The Journal of biological chemistry*. 52: 48967-48972.
- Prior, L. 2003. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative Damage. *Am. J. Clin. Nutr.* 78: 570-578.
- Potman, R. y Van, T. 1989. Mechanistic studies of the Maillard reaction with emphasis on phosphate-mediated catalysis. In T.H. Parliament, R.J. McGorriny C.T. Ho (Eds). *Thermal generation of aromas*. Washington, DC: American Chemical Society. 182-195.
- Rhian, M. 2004. Especies Reactivas de Oxígeno, Estrés Oxidativo Vascular y Señalización Ledox en la hipertensión. *Hipertensión*. 44: 248-252.
- Rubatzky, V. y Yamaguchi, M. 1997. *World vegetables. Principles, production, and nutritive values*. Second Edition. Chapman and Hall, New York, NY, U.S.A. 843.

- Sakata, N., Imanaga, Y., Meng, J., Tahikawa, Y., Takebayashi, S., Hagai, R. y Horiuchi, S. 1999. Increased advanced glycation end products in atherosclerotic lesions of patients with end-stage renal disease. *Atherosclerosis*. 142: 67-77.
- Schamberger, G. y Labuza, T. 2005. Effect of green tea flavonoids on Maillard browning in UHT milk. Department of Food Science and Nutrition, University of Minnesota, 1334 Eckles Avenue, St. Paul MN 55108, USA.
- Shahidi, F., Janitha, P. y Wanasundara, P. 1992. Phenolic Antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 67: 103.
- Shibamoto, T., 1983. Heterocyclic Compounds in Browning and Browning/Nitrite Model Systems: Occurrence, Formation Mechanisms, Flavor Characteristics and Mutagenic Activity. In *Instrumental Analysis of Foods*; Charalambous, G., Inglett, G. E., Eds.; Academic Press: New York. 229-278.
- Silker, I. y Voldgaard, A. 2003. Vitaminer, mineraler og andre næringsstoffer. *Udgivet af Livsgnisten v/ Irene Silke. Kilde*. 502: 1-13.
- Skog, K., Johansson, M. y Jagerstad, M. 1998. Carcinogenic heterocyclic amines in model systems and cooked foods: a review on formation, occurrence and intake. *Food Chem. Toxicol.* 36: 879-896.
- Stintzing, F., Shieber, A. y Carle, R. 2001. Phytochemical and Nutritional Significance of Cactus Pear. *Eur. Food. Res. Technol.* 212: 396-407.
- Stintzing, F., Herbach, K., Mosshammer, M., Carle, R., Yiw, S., Akoh, C., Bunch, R. y Felker, P. 2005. Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia* spp) clones. *Journal Agriculture and Food Science* 2: 442-451.
- Stitt, A., Gardiner, A., Thomas, A., Nathan, C., Frizzell, N., Duffy, N., Boyle, C., Januszczewsky, S., Andrzej, B., John, S. y Thorpe R. Suzanne. 2004. The AGE Inhibitor Pyridoxamine Inhibits Development of Retinopathy in Experimental Diabetes. *Diabetes*. 51: 2826-2832.
- Sugimura, T., Wakabayashi, K., Nakagama, H. y Nagao, M. 2004. Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer Science*. 95: 290-299.

- Sumaya-Martínez, T., Guerard, F., Thomas, S. y Binet, A. 2004. Effect of Maillard reaction conditions on the increase in free radical scavenging activity of browning products obtained from tuna waste hydrolysate. III International congress on Pigments in Food. 14-17 Junio, Quimper, Pigments Publishing. Université de Bretagne Occidentale. ISBN: 2-95215116-0-1.
- Tomás-Barberán, F., Llorach, R., Espín, J. y Ferreres, F. 2004. Agri-Food Residues as a Source of Phytochemicals. En : Total Food Proceedings. Norwich 42-48.
- Totlani, V. y Peterson, D. 2005. Reactivity of epicatechin in aqueous and glucosa Maillard reaction models : quenching of C2, C3 and C4 sugar fragments. J. Agr. Food Chem.
- Uribarri, J., Peppas, M., Cai, W., Oldberg, T., He C. y Vlassara H. 2003. Restriction of dietary glycotoxins reduces excessive advanced glycation end products in renal failure patients. J. Am Soc Nephrol. 14: 728-731.
- Vankar, P., Tiwari, V., Singh, L. y Swapana, N. 2006. Antioxidant properties of some exclusive species of Zingiberaceae Family of Manipur EJEAFChe. 2: 1318-1322.
- Vicent, M. 2006. Revista: Botanical. Dirección : <http://www.botanical-online.com/medicinalscoriandersativumcastella.htm> acceso: marzo/ 2006.
- Vinson, J., Dabbagh, Y., Serry, M. y Jang, J. 1995. Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an *in vitro* oxidation model for heart disease. J Agric Food Chem. 43: 2798-2799.
- Vitek, P., Bhattacharya, K., Glendening, J., Stopa, E., Vlassara, H., Bucala R., Manogue, K. y Cerami, A. 1994. Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. Proc Natl Acad Sci USA. 91: 4766-4770.
- Vlassara, H. 2001. The AGE-receptor in the pathogenesis of diabetic complications. Diabetes/Metab Rev; 17: 436-443.
- Vlassara, H. y Palace, M. 2002. Diabetes and advanced glycation endproducts. J. Intern Med. 251 : 87-101.

- Wangensteen, H., Samuelsen, A. y Malterud, K. 2004. Antioxidant activity in extracts from coriander. *Food Chem.* 88: 293-297.
- Watkins, N., Neglia-Fisher, C., Dyer, D., Suzanne, R., Thorpe, R., y Baynes, J. 1987. Effect of phosphate on the kinetics and specificity of glycation of protein. *Journal of Biological Chemistry.* 15: 7207-7212.
- Wijckre, A., Krejpcio, Z. y Kitts, D. 1999. Hydroxyl scavenging activity of glucose, fructose, and ribose-lysine model Maillard products. *Journal of Food Science.* 39: 457-461.
- Wong, P. y Kitts D. 2006. Studies On The Dual Antioxidant And Antibacterial Properties Of Parsley (*Petroselinum Crispum*) And Cilantro (*Coriandrum Sativum*) Extracts. *Food-chemistry.* 3: 505-515. Revisado el 03-11-07. Disponible en: http://top25.sciencedirect.com/?journal_id=03088146
- Wu, C. y Yen, G. 2005. Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the formation of Advanced Glycation End Products. *J. Agric. Food Chem.* 53:3167-3173.

ANEXO 1

Preparación de las soluciones amortiguadoras a diferentes pH (9.2, 7.4, 7.0, 4.2).*Elaboración de solución amortiguadora de carbonato-bicarbonato a pH 9.2:*

Reactivos usados: Carbonato de sodio anhidro, Bicarbonato de sodio, Agua desionizada.

Sol. A: 0.2 M Ácido acético 2.12 mL en 100 mL de agua desionizada.

Sol. B: 0.2 M Acetato de sodio 4.2g en 250 mL de agua desionizada.

Para obtener medio litro de solución amortiguadora de carbonato-bicarbonato se utilizó la tabla 4.

Tabla 4. Solución amortiguadora de carbonato-bicarbonato (pH 9.2) 0.2M.

*Se le agregaron 250mL de agua desionizada para convertirlo a 0.1M.

| pH | Sol A mL | Sol B mL | Agua desionizada |
|-----|----------|----------|------------------|
| 9.2 | 20 | 230 | 250 |

Elaboración de solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.4:

Reactivos usados: Monofosfato de sodio monohidratado (NaH_2PO_4), Monofosfato de sodio dodecahidratado (Na_2HPO_4), agua desionizada.

Sol. A: NaH_2PO_4 0.2 M 27.59 g en 1 L de agua desionizada.

Sol. B: Na_2HPO_4 0.2 M 28.39 g en 1 L de agua desionizada.

Para obtener un litro de solución amortiguadora de fosfatos se utilizó la tabla 5.

Tabla 5. Solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.4) 0.2M.

*Se le agregaron 500mL de agua desionizada para convertirlo a 0.1M.

| pH | Sol A mL | Sol B mL | Agua desionizada |
|-----|----------|----------|------------------|
| 7.4 | 95 | 405 | 500 |

Elaboración de solución amortiguadora de fosfato-citrato a pH 7:

Reactivos usados: Ácido cítrico, Ácido acético, Fosfato de sodio dibásico, Agua desionizada.

Sol. A: 0.2 M Ácido cítrico 3.84g en 100 mL de agua desionizada.

Sol. B: 0.2 M Fosfato de sodio dibásico 13.41g en 250 mL de agua desionizada.

Para obtener medio litro de solución amortiguadora de fosfato-citrato se utilizó la tabla 6.

Tabla 6. Solución amortiguadora de fosfato-citrato (pH 7.0) 0.2M.

*Se le agregaron 250mL de agua desionizada para convertirlo a 0.1M.

| pH | Sol A mL | Sol B mL | Agua desionizada |
|----|----------|----------|------------------|
| 7 | 32.5 | 217.5 | 250 |

Elaboración de solución amortiguadora de acetatos a pH 4.2:

Reactivos usados: Ácido acético, Acetato de sodio, Agua desionizada.

Sol. A: 0.2 M Ácido acético 2.89mL en 250mL de agua desionizada.

Sol. B: 0.2 M Acetato de sodio 1.64g en 100mL de agua desionizada.

Para obtener medio litro de solución amortiguadora de acetatos se utilizó la tabla 7:

Tabla 7. Solución amortiguadora de acetatos (pH 4.2) 0.2M.

*Se le agregaron 250mL de agua desionizada para convertir a 0.1M.

| pH | Sol A mL | Sol B mL | Agua desionizada |
|-----|----------|----------|------------------|
| 4.2 | 205 | 45 | 250 |