

13
20

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

FACULTAD DE QUIMICA

EFFECTO DEL DETERIORO EN EL ESTADO

VITREADO DEL EMBRION DE MAIZ

T E S I S M A N C O M U N A D A
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A N
LAURA ARMENDARIZ GARAY.
YANIRA ESPIRITU VILLANUEVA.

MEXICO D.F.

1993.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	1
I. INTRODUCCION	2
II. ANTECEDENTES	5
1. CONTRIBUCION DE REACCIONES NO ENZIMATICAS AL DETERIORO DE SEMILLAS	
a) Peroxidación de lípidos	5
b) Oscurecimiento no enzimático	7
2. IMPORTANCIA DEL AGUA EN LOS SERES VIVOS	7
3. TOLERANCIA A LA DESECACION Y SUS MECANISMOS	8
a) Protección de las membranas por azúcares	9
b) Protección del citoplasma y el estado vitreado	11
III. HIPOTESIS	13
IV. METODOLOGIA	
1. MATERIALES Y REACTIVOS	15
2. METODOS	
a. Equilibrio de las semillas a contenidos de humedad constante	17
b. Aislamiento del embrión	17
c. Preparación de la harina	17
d. Preparación y cuantificación de soluciones patrón de carbohidratos	18
e. Preparación de las mezclas representativas	19
f. Preparación de muestras para calorimetría	22
g. Calorimetría Diferencial de Barrido	23
h. Determinación de Humedad de las Muestras	24

V. RESULTADOS

1. Determinación de la presencia del estado vitreado en embriones de maíz	26
--	-----------

2. El estado vitreado en los carbohidratos del embrión de maíz	29
---	-----------

VI. DISCUSION	38
----------------------	-----------

VII. CONCLUSIONES	43
--------------------------	-----------

VIII. BIBLIOGRAFIA	45
---------------------------	-----------

INDICE DE TABLAS.

	Página
T-1. SOLUCIONES PATRON DE CARBOHIDRATOS	18
T-2. CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS EN EMBRIONES DE SEMILLAS DE MAIZ.	20
T-3. CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS EN EMBRIONES DE SEMILLAS DE MAIZ ALMACENADAS.	21
T-4. PREPARACION DE LAS MEZCLAS REPRESENTATIVAS	22
T-5. CONTENIDO DE AZUCARES EQUILIBRADOS A DIFERENTES HUMEDADES RELATIVAS	31
T-6. TEMPERATURA DE TRANSICION VITREA DE LAS MEZCLAS DE CARBOHIDRATOS EQUILIBRADOS CON HUMEDAD RELATIVA DE 66%	35
T-7. TEMPERATURA DE TRANSICION VITREA DE LAS MEZCLAS DE CARBOHIDRATOS EQUILIBRADAS CON HUMEDAD RELATIVA =33%	36

INDICE DE FIGURAS .

F-1. CURVA CALORIMETRICA DE HARINA DE EMBRION DE MAIZ	27
F-2. CURVA CALORIMETRICA DE HARINA DE EMBRION DE MAIZ DESLIPIDIZADA	28
F-3. CURVA CALORIMETRICA DE CARBOHIDRATOS REPRESENTATIVOS DEL EMBRION DE MAIZ	33
F-4. GRAFICA DE Cp CONTRA TEMPERATURA DE AZUCARES REPRESENTATIVOS DE EMBRION DE MAIZ.	34

RESUMEN

Las semillas son seres vivos que se encuentran en estado seco. La preservación de su viabilidad y vigor en almacén depende de los mecanismos de protección que eviten ó disminuyan los eventos deletéreos que pueden ocurrir, tales como: destrucción de la integridad celular, disminución de actividad enzimática, reacciones de oscurecimiento, lipoperoxidaciones, etc.

El embrión de la semilla seca se encuentra en estado vítreo. Este es un líquido de alta viscosidad en el que la movilidad molecular esta disminuída, con lo cual se podrían evitar las reacciones deletéreas. Dadas estas características el estado vítreo podría constituir un mecanismo de protección contra el deterioro de las semillas. En este trabajo se analizó esta posibilidad a través de determinar las características del estado vítreo por los carbohidratos solubles, principales agentes vitrificantes, de embriones de semillas de maíz control y deteriorados, cuya composición es diferente. Se encontró que a temperatura ambiente y con contenidos de humedad menores ó iguales al 8%, los carbohidratos solubles del embrión de maíz forman estado vítreo, mientras que en los carbohidratos presentes en semillas deterioradas, el estado vítreo se presentó a temperaturas por abajo de la ambiental. Lo anterior sugiere que la disminución en germinabilidad y vigor de las semillas durante el almacenamiento esta asociada a la pérdida de la capacidad de la semilla para formar un estado vítreo a temperatura ambiente.

I. INTRODUCCION.

Los granos de cereales constituyen la fuente de energía alimentaria mas económica del mundo, y proporcionan las dos terceras partes o mas de la energía humana (1). Los más importantes son el trigo, centeno, cebada, maíz, avena y arroz (1). La preponderancia de los cereales como plantas alimenticias, se debe a su capacidad de adaptación a una extensa variedad de suelos y condiciones climáticas, su relativa facilidad de cultivo y su alta rentabilidad (1).

México ocupa el quinto lugar entre los países productores de maíz, a pesar de esto, se ve en la necesidad de importar para satisfacer sus necesidades de consumo (2). El maíz, dependiendo de sus características morfológicas y composición química presenta una amplia variedad de usos (3):

El *Zea mays* saccharata o maíz azucarado posee granos dulces debido a que el almidón se ha transformado parcialmente en dextrina y azúcares; por esta característica se cosecha en estado tierno para consumirse como verdura ya sea en forma directa o enlatado, también se utiliza para preparar pinole, harinas dulces para hacer galletas y para la obtención de mieles, jarabes y bebidas alcohólicas (3).

El *Zea mays* everta o maíz perlado, al cocerse a altas temperaturas, se dilata en pequeñas masas de grato sabor conocidas como palomitas de maíz (3).

El *Zea mays* amilacea o maíz cacahuacintle, por tener un cariopside blando se utiliza para hacer harinas y pozole (3).

El *Zea mays* indurata o maíz cristalino, por tener consistencia vítrea y cristalina del endospermo al ser molido, conserva su consistencia en diminutos granos y no se pulveriza, es la variedad mas utilizada para hacer tortillas, tamales, atoles y otros alimentos típicos de la cocina mexicana (3).

Otras aplicaciones del maíz en la industria alimentaria lo constituyen su utilización en obtención de aceites comestibles y como forraje para ganado (3). Como se puede observar el maíz presenta una amplia variedad de usos en la industria alimentaria, a pesar de que su valor nutritivo es bajo por ser un alimento deficiente de niacina y con un contenido relativamente bajo de proteínas, siendo éstas, pobres en los aminoácidos lisina y triptofano (1).

Los almidones de maíz sirven para blanquear el papel, lubricar, separar los metales, diluir los tintes de las telas o fijar el color y como adhesivos en cajas y empaques de cartón corrugado (3). Las féculas y glucosas se aprovechan para la fabricación de caramelo y chicles y en la formación de las cápsulas utilizadas para algunos medicamentos (3).

Por las características anteriormente mencionadas en cuanto a el uso del maíz, es importante evitar al máximo las pérdidas de este cereal; para lo cual es necesario conocer los factores que influyen en su preservación y las causas de su deterioro.

Las pérdidas mas reconocidas que ocurren durante el manejo y conservación de los granos y semillas son ocasionadas por factores físicos y de operación (humedad, temperatura, manejo deficiente durante el transporte, almacenamiento e industrialización) y por factores biológicos (insectos, hongos, aves y roedores) que no solamente reducen la cantidad sino también la calidad al contaminarlos con sus desechos orgánicos (4).

El maíz se debe almacenar con un control adecuado de HUMEDAD RELATIVA Y TEMPERATURA para evitar su deterioro. Contenidos de humedad altos en el grano favorecen las reacciones bioquímicas destructivas y su contaminación, por el contrario, contenidos de humedad excesivamente bajos y sin un control adecuados del grado de madurez de la semilla pueden ocasionar

la pérdida de la capacidad de germinación lo cual implicaría pérdidas en su productividad (5).

Durante el almacenamiento, especialmente a humedad relativa (H R) mayor del 50% y temperatura de 20°C, las semillas se deterioran y aún cuando la semilla esté viva y mantenga su capacidad para germinar, el deterioro da lugar a individuos de menor talla que la normal y, con poca adecuación para sobrevivir los rigores del campo (5). A este tipo de semillas se les llama de bajo vigor (6). Biológicamente, el vigor de la semilla se basa en su constitución genética, pues establece el potencial fisiológico máximo. La susceptibilidad al deterioro y la pérdida de vigor se determinan tanto por las características genéticas de la especie, como por todos aquellos eventos que ocurren durante el desarrollo de la semilla: cosecha, secado y almacenamiento (6).

El deterioro de las semillas durante el almacenamiento involucra cambios físicos y químicos de los componentes de las semillas, tales como destrucción de integridad celular, disminución de actividades enzimáticas, peroxidación de lípidos y reacciones no enzimáticas (7, 8, 9, 10). La velocidad de estos cambios varía en diferentes especies y en diferentes cultivares de la misma especie (11, 12), lo que sugiere la existencia de un mecanismo de protección contra el deterioro. El embrión de la semilla en estado seco se encuentra en estado vítreo (13,14). El estado vítreo es un líquido de alta viscosidad en el que la movilidad molecular está disminuida y su estabilidad depende de la composición química, humedad y temperatura. Dado estas características, el estado vítreo podría constituir un mecanismo de protección contra el deterioro. Si esto es así, la disminución en germinabilidad y vigor de las semillas durante el almacenamiento estaría asociada a la pérdida del estado vitreado. En el presente trabajo se analizó la relación entre deterioro de la semilla de maíz en almacén y la transición del estado vitreado.

II. ANTECEDENTES

Las semillas presentan su máximo potencial de germinación al momento de la cosecha, a medida que el tiempo de almacenamiento se incrementa, pierden vigor gradualmente y finalmente mueren (15). El envejecimiento o la pérdida de vigor se manifiesta por un retraso en la germinación (tiempo en que surge la radícula) o bien por una reducción en el porcentaje de germinación (viabilidad) y un incremento en la susceptibilidad al estrés ambiental (16, 17, 18, 19). Este envejecimiento de las semillas involucra muchos cambios físicos y químicos en los componentes de la semilla, tales como destrucción de la integridad celular, reducción en actividades enzimáticas, peroxidación de lípidos (7, 8, 9, 20), disminución en la cantidad de proteína extraíble (8), y un aumento en las lesiones del DNA como rompimiento de cromosomas (8).

El metabolismo celular aparentemente no contribuye en forma importante al deterioro de la semilla en almacén, debido a que este último se realiza cuando el contenido de humedad de la semilla es menor a 20 % (expresado en base seca) y el metabolismo se inicia a contenidos de humedad por arriba del 20 %.

1. CONTRIBUCION DE REACCIONES NO ENZIMATICAS AL DETERIORO DE SEMILLAS.

a) Peroxidación de lípidos.

En presencia de oxígeno, las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos espontáneamente se oxidan produciendo radicales libres y/o hidroperóxidos. La velocidad de esta reacción es acelerada por un tipo de enzimas llamadas lipooxigenasas, las cuales se encuentran presentes en las semillas. Una vez que un

radical libre es formado, generalmente por el ataque del oxígeno, una cadena de reacciones se inicia, la cual produce a su vez ciclos de reacciones y mas radicales libres.

Las biomembranas representan el sitio clave para la formación y acción de los radicales libres. Las membranas poseen una mayor area superficial y generalmente son mas insaturadas que los lípidos de almacenamiento (21). Existe evidencia experimental que demuestra que la peroxidación de lípidos conduce a una reducción de la integridad membranal, la cual se detecta por un aumento en la conductividad del medio en el que las semillas se germinan. En general, se ha demostrado que las semillas deterioradas (cuando son germinadas) pierden por escurrimiento mayor cantidad de sustratos, que las semilla control.

Los daños causados por radicales libres se realizan en regiones cercanas a su lugar de formación, ya que su vida media es muy corta, sin embargo durante la lipoperoxidación también se forman especies químicas estables, tal es el caso de los 4-hidroxiálquenos. Estos aldehidos reaccionan con grupos sulfhidrilos lo cual conduce a una inactivación de las proteínas. Estos compuestos proveen un mecanismo para efectos deletorios a larga distancia causada por radicales libres (22).

Algunos componentes celulares asociados al sitio de formación de radicales pueden ser Co-oxidados por transferencia de radicales libres resultantes de la oxidación de lípidos, y esto constituye otro mecanismo de formación de radicales libres en los sistemas celulares. Por ejemplo, se ha comprobado que la peroxidación de lípidos causa que las proteínas se polimerizen (23) y ademas causa mutaciones en bacterias (24). Por tanto la lipoperoxidación es capaz de dañar a un organismo vivo por lo menos en tres formas:

- a) Destrucción de lípidos de membrana.
- b) Co-oxidación de componentes celulares.
- c) Formación de aldehídos citotóxicos.

b) Oscurecimiento no enzimático.

La reacción de Maillard y su precursor la reacción de Amadori, son reacciones que ocurren entre los azúcares reductores y los grupos amino. Estas reacciones no enzimáticas proceden lentamente en solución (25), pero se aceleran en condiciones de baja disponibilidad de agua (estado seco), debido a efectos de concentración de solutos. En sistemas secos, la reacción de Maillard procede optimamente a actividades acuosas entre 0.30 y 0.90 (10, 26). El deterioro de algunas semillas está asociado con una disminución gradual del contenido de rafinosa (27), y un aumento en los contenidos de monosacáridos (28), lo cual incrementa la disponibilidad de azúcares reductores para la reacción de Maillard.

Las consecuencias deleterias de tal reacción serían pérdida de actividad enzimática (10) y pérdida de funcionalidad de ácidos nucleicos.

2. IMPORTANCIA DEL AGUA EN LOS SERES VIVOS.

La vida depende en gran parte del agua. Aproximadamente 70 % del peso de la mayoría de las células vivas se encuentra constituido por agua (27).

El agua posee una serie de propiedades importantes que la hacen única y singularmente adecuada como medio para las actividades celulares (28). Dentro de estas propiedades, se encuentran, su polaridad y su capacidad de formar puentes de hidrógeno, esto la convierte en un disolvente excelente para muchos compuestos iónicos y polares. Además, participa en la estabilización de

macromoléculas biológicas y organelos celulares de naturaleza anfipática, mediante la formación de micelas o bicapas, originadas por el carácter polar del agua, que provoca que los grupos cargados se orienten hacia la superficie externa, mientras que los grupos hidrofóbicos se encuentran ocultos y no quedan expuestos al contacto con la misma. Tal es el caso de los fosfolípidos, las proteínas, y los ácidos nucleicos, entre otros muchos componentes celulares (25, 26). El ordenamiento micelar ocasionado por la presencia del agua, es de gran importancia en las membranas biológicas que se encuentran constituidas por fosfolípidos y proteínas y cuya función depende del arreglo estructural de estos (27, 28).

El agua es el medio en el que se llevan a cabo el transporte de elementos nutritivos, las reacciones bioquímicas y la transferencia de energía química (27, 28). Las estructuras tridimensionales de las proteínas, que determinan su actividad biológica, se mantienen por las propiedades del agua y sus interacciones con ésta (27, 28).

El elevado calor específico del agua es útil para la célula ya que permite que el agua actúe como regulador calorífico manteniendo así constante la temperatura de el organismo (28).

3. TOLERANCIA A LA DESECACION Y SUS MECANISMOS.

Dada esta clara interdependencia entre hidratación y vida resulta paradójico que algunos organismos puedan sobrevivir a la deshidratación extrema; tal es el caso de algunas semillas, polen, levaduras, líquenes, esporas de hongos y bacterias, algas y musgos; se dice que estos organismos que se encuentran en estado de anhidrobiosis (29). Dado que el agua es un componente de importancia trascendental en los seres vivos, la capacidad de estos organismos

para resistir la eliminación de agua debe descansar en la habilidad que posean para estabilizar todos los componentes vitales potencialmente lábiles a la deshidratación, es decir estos organismos deben contar con mecanismos específicos de tolerancia a la desecación. Se ha propuesto que estos mecanismos descansan en el efecto protector de los azúcares a las membranas y en la capacidad de estos políoles para formar un estado vitreado (13, 14, 30, 31).

a) Protección de las membranas por los azúcares.

La presencia del estado de tolerancia a la desecación requiere de un período de acondicionamiento durante el desarrollo del organismo. Lo cual hace razonable creer que la adquisición de dicha tolerancia comprenda algunas transformaciones metabólicas y la síntesis de nuevos productos, entre los que pueden encontrarse a los azúcares (32).

Se ha observado que en los embriones de las semillas angiospermas tolerantes a la desecación, los azúcares constituyen el 20% en peso seco y conforme se va perdiendo dicha tolerancia se observa una disminución en la reserva de los oligosacáridos, rafinosa y estaquiosa (33). También se ha reportado pérdida de rafinosa y sacarosa durante el almacenamiento prolongado de semillas de maíz, al mismo tiempo que disminuye la viabilidad de dichas semillas, lo cual hace concluir, que en estos organismos, el estado de tolerancia a la desecación se encuentra asociado con la acumulación de sacarosa usualmente acompañada por grandes oligosacáridos como la rafinosa y la estaquiosa (34, 35).

La importancia de los azúcares en la desecación se ha corroborado al liofilizar microsomas transportadores de Ca^{2+} sin un azúcar estabilizante y

posteriormente rehidratarlos, bajo estas condiciones se observa una reducción en el transporte de Ca^{2+} y un desacoplamiento en la actividad ATPasa (36, 37). En cambio, cuando se liofilizan los mismos microsomas en presencia de cantidades tan pequeñas como 0.3 g trehalosa/g de membrana al rehidratarlos, no se distinguen morfológicamente de las vesículas frescas siendo similares tanto su actividad de ATPasa como el transporte de calcio (36, 37). La función de estas vesículas también se puede preservar cuando se secan en presencia de otros azúcares como sacarosa, (comunmente encontrada en organismos tolerantes a la desecación), celobiosa, glucosa y rafinosa (39), requiriéndose por lo menos el triple de éstos para alcanzar el mismo grado de protección de la trehalosa. La desventaja de la sacarosa en relación a la trehalosa es la gran tendencia de la primera a cristalizar en presencia de bajos contenidos de humedad. con lo que sus grupos polares no quedan expuestos para facilitar la estabilización de las membranas (42); sin embargo este efecto se puede eliminar por la presencia de oligosacáridos como la rafinosa y la estaquiosa, los cuales se ha demostrado que evitan dicha cristalización (43).

La preservación de la integridad funcional de los microsomas por los azúcares durante el secado puede ser atribuida al hecho de que el azúcar previene el rompimiento de la bicapa y por consiguiente el desplazamiento de las proteínas transportadoras.

Sin embargo es posible que exista una interacción directa del azúcar con la proteína, lo cual contribuye a la estabilidad de esta última. La idea de esta interacción surgió al examinar el espectro infrarojo (IR) de microsomas (39), ya que se encontró que la banda vibracional de los grupos $\text{C}=\text{O}$, que podrían ser grupos carbonilo de las proteínas o de los lípidos es desplazada por la deshidratación de 1733 a 1750 cm^{-1} atribuyéndose este efecto a la pérdida de los puentes de hidrógeno entre el agua y el grupo $\text{C}=\text{O}$ (39). En cambio al adicionar

trehalosa antes de la deshidratación, se evita el desplazamiento de la frecuencia vibracional de los grupos carbonilos. Esto sugiere que la trehalosa forma puentes de hidrógeno con las proteínas deshidratadas, sustituyendo así los puentes de hidrógeno del agua con las proteínas (39) y con los fosfolípidos (40).

b) Protección del citoplasma y el estado vitreado.

Ha sido propuesto que los azúcares que ayudan a mantener la preservación de la viabilidad en el estado seco, se encuentran en estado vitreado, logrando así interactuar con las membranas, como se mencionó anteriormente y al mismo tiempo brindar protección a el citoplasma (41).

La formación de un estado vitreado es la creación de una solución líquida con la viscosidad de un sólido, donde la solución asume propiedades mecánicas de un sólido plástico, cuando la viscosidad llega al punto en que la difusión de agua es precluida (Velocidades de difusión = 10 nm s^{-1} . (33).

De tal manera que, el estado vitreado presentaría una serie de beneficios para los organismos con bajo contenido de agua, entre los que se encuentran: una disminución considerable en las reacciones que requieren difusión; se evita el colapsamiento por llenado del espacio intracelular y permitir las interacciones entre las interfaces para estabilizar los componentes celulares (41).

En general los estados vitreados son reportados en base a su temperatura de transición vítrea, la cual, en términos termoanalíticos se define como la temperatura a la que la capacidad calorífica es la mitad entre los estados líquido-líquido y líquido-vitreo, correspondiendo usualmente a un punto cercano al punto de inflexión en la capacidad calorífica.

A la temperatura de transición vítrea, hay una disminución en la viscosidad, el volumen libre y la movilidad de las moléculas de la matriz amorfa se incrementa

causando un cambio endotérmico y un cambio en la capacidad calorífica (C_p) esto puede ser detectado por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), como un cambio en la pendiente, seguido de una recuperación de la misma pendiente en la gráfica de flujo de calor contra temperatura (o tiempo) (42).

Se ha demostrado que moléculas biológicas como los carbohidratos y las proteínas son capaces de formar estado vitreado a bajos contenidos de humedad, siendo la temperatura de formación de este estado, extremadamente sensible al contenido de agua, ya que ésta actúa como plastificante y al aumentar su porcentaje disminuye dicha temperatura (42, 43, 44).

Las semillas se encuentran en estado vitreado como lo muestra el hecho de que los embriones de maíz analizados por Calorimetría Diferencial de Barrido, muestran dos tipos de transiciones vítreas, asignándose la primera a la fracción lipídica, y la segunda a los carbohidratos presentes en el embrión. En este mismo estudio se corroboró la importancia del contenido de humedad observando que al aumentar el contenido de humedad de la semilla se reduce la temperatura de la transición vítrea (13). Posteriormente se reportó que mezclas de azúcares similares a aquellas encontradas en embriones tolerantes a la desecación, forman estado vitreado (43).

III. HIPOTESIS

Un corolario al mecanismo de tolerancia a la desecación descrito en la sección anterior es el suponer que es este mismo mecanismo el que protege a la semilla contra el deterioro. Esta hipótesis se basa en el hecho de que la transición entre el estado vítreo de la semilla y el estado devitrificado descrito por un diagrama de fase, es dependiente del contenido de agua y temperatura (30,31). La pérdida de este estado físico permitiría el establecimiento de reacciones deletereas como el oscurecimiento no enzimático y la formación de radicales libres.

Las condiciones de humedad relativa y temperatura a las cuales se almacenan las semillas producen un ligero incremento en el contenido de humedad de las mismas. Esto facilitaría la pérdida del estado vítreo. Otra evidencia experimental que apoya la propuesta de que el estado vítreo protege a los lípidos y proteínas de reacciones deletereas es el hecho de que durante el almacenamiento de ciertos productos alimenticios el estado vítreo efectivamente limita la reacción de Maillard (44) y la reacción entre los radicales libres y lípidos (45).

Si el estado vítreo protege a la semilla contra el deterioro en almacén, entonces el estado vítreo deberá perderse o disminuir durante el deterioro, este evento deberá preceder o coincidir con la disminución en vigor o viabilidad de la semilla. Además cultivares que muestren diferente sensibilidad al deterioro deberán presentar estados vítreos cualitativa o cuantitativamente diferentes.

Los carbohidratos solubles presentes en el embrión son los principales responsables del estado vitrificado del citoplasma (42, 46, 47).

El objetivo de este trabajo es demostrar que el deterioro de semillas esta asociado a la pérdida del estado vítreo de la semilla. Para lo cual se determinó el efecto del almacenamiento en el estado vítreo del embrión y la capacidad de los

carbohidratos solubles, presentes en el embrión de semillas control y deterioradas de maíz para formar estado vítreo.

IV. METODOLOGIA

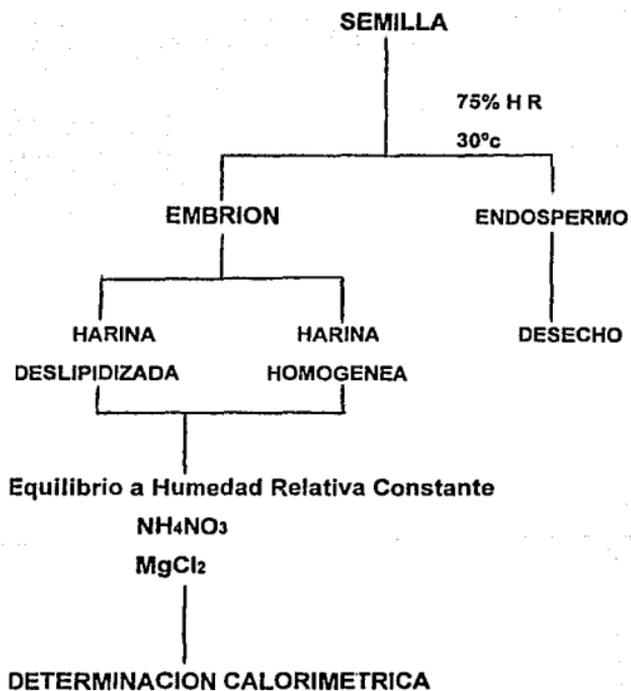
1. MATERIALES Y REACTIVOS.

En este estudio se utilizaron embriones de semillas de maíz control y deteriorados (*Zea mays*) de tres diversos cultivares: Tepecintle 100 (T100), Pepitilla 1346 (P1346) y A6, (Cultivar; semillas de un lote con variabilidad genética). Los dos primeros donados por el Dr. S. Taba del Banco de Germoplasma de maíz (CIMYT) y el último donado por el Dr. A. Carballo (Centro de Genética, Colegio de Posgraduados, Montecillo, México). El comportamiento de estos materiales en almacen es contrastante y la composición de carbohidratos solubles en los embriones de semilla control y deteriorados ha sido determinado por el grupo de la Dra. I. Bernal-Lugo (tabla 2 y 3)

Las semillas deterioradas se obtuvieron por envejecimiento acelerado almacenando las semillas a 75% Humedad Relativa y 30 °C (34).

En el caso de los experimentos realizados con mezclas representativas de azúcares, los utilizados fueron: sacarosa, rafinosa, glucosa y fructuosa todos de grado analítico y obtenidos de Sigma, (U.S.A).

2. METODOS.



a. Equilibrio de las semillas a contenidos de humedad constante. Las semillas de cada lote se colocaron en cámaras de HUMEDAD que consistían en frascos de vidrio con una malla para retener las semillas. Los frascos contenían una solución de NaCl para obtener así una humedad relativa de 75%. Las semillas se mantuvieron en las cámaras durante 21 días a 4 °C

b. Aislamiento del embrión. Para aislar el embrión de las semillas, con una navaja se hicieron dos cortes en V en la región del embrión. Posteriormente con la misma navaja se eliminaron del embrión los residuos de almidón provenientes del endospermo.

c. Preparación de la harina. Los embriones extraídos se molieron en un mortero con nitrógeno líquido para facilitar el proceso, la harina así obtenida se hizo pasar por una malla No. 25 para obtener un tamaño de partícula homogénea

Estas harinas se guardaron en frascos de vidrio con tapa de rosca sellados con papel plástico adherente (parafilm), a 4 °C para su uso posterior .

d. Preparación y cuantificación de soluciones patrón de carbohidratos.

Se pesaron por separado en balanza analítica marca Sartorius diversas cantidades de los azúcares mencionados en la tabla 1. A cada muestra de carbohidratos se le adicionaron tres mililitros de agua desionizada, se disolvieron y aforaron a cinco mililitros con la misma agua. La concentración final de los azúcares en la solución se determinó por un método enzimático empleando un kit de la compañía Boheringer (N° de catálogo, 428167 y 716260)

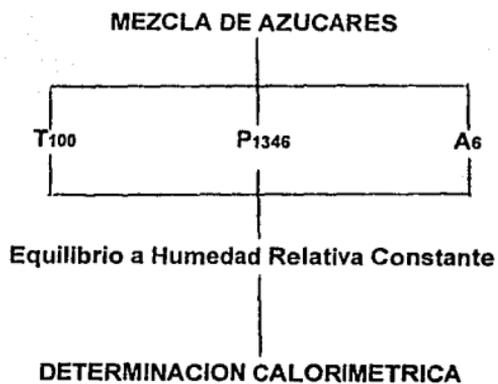
Las soluciones se guardaron a -20°C en frascos viales de vidrio con tapa de rosca, sellados con parafilm.

TABLA 1
SOLUCIONES PATRON DE CARBOHIDRATOS.

AZUCAR	PESO (mg)	[FINAL] ¹ mg/ml
FRUCTUOSA	472	60.54
GLUCOSA	707	65.33
SACAROSA	3033	392.90
RAFINOSA	700	106.00

[FINAL]¹= Concentración final determinada por método enzimático empleando un kit de la compañía Boheringer.

e. Preparación de las mezclas representativas.



Las composiciones de carbohidratos reportadas para harina de embriones de semillas de maíz de los cultivares T₁₀₀, P₁₃₄₆, y A₆, se muestran en las tablas 2 y 3).

TABLA 2
CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS EN EMBRIONES DE SEMILLAS DE
MAIZ CONTROL ¹

AZUCAR(mg/g harina deslpidizada)						FRACCION		
CULTIVAR	FRUC	GLUC	SAC	RAF	TOTAL	SAC	RAF	MS
T ₁₀₀	1.64	4.20	152.00	36.63	194.47	0.78	0.18	0.03
P ₁₃₄₆	0.55	4.56	146.50	24.60	176.26	0.83	0.13	0.03
A ₆	1.18	3.73	187.60	15.05	207.03	0.90	0.07	0.02

¹ Cero meses de almacenamiento.

fFRUC=Fructuosa

GLUC=GlucosaRAF=Rafinosa

MS=Monosacáridos

SAC=Sacarosa

TABLA 3
CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS EN EMBRIONES DE SEMILLAS DE
MAIZ ALMACENADAS ²

AZUCAR(mg/g harina destipidizada)						FRACCION		
CULTIVAR	FRUC	GLUC	SAC	RAF	TOTAL	SAC	RAF	MS
T ₁₀₀	0.81	2.90	201.90	45.90	251.50	0.80	0.18	0.01
P1346	1.88	6.04	201.80	33.40	243.12	0.83	0.13	0.33
A6	3.98	12.96	169.70	12.29	198.93	0.085	0.06	0.08

2= Almacenamiento en 75% de HR y 30°C, durante tres meses para A6 y durante 4 meses para las semillas del cultivar P1346 y T100.

NOTA: Las tablas 2 y 3 fueron obtenidas de la referencia (34)

Las mezclas representativas de los azúcares de cada cultivar se obtuvieron adicionando las cantidades requeridas de las soluciones estandares, con pipeta Gilson de 20, 200 y 1000 microlitros, para cada muestra, los volúmenes utilizados en cada caso se muestran en la Tabla 4.

TABLA 4
PREPARACION DE MEZCLAS REPRESENTATIVAS.

MICROLITROS DE SOLUCION ESTANDAR.				
MUESTRA	FRUCTUOSA	GLUCOSA	SACAROSA	RAFINOSA
T 100 C	27.00	39.30	387.00	371.00
T 100 D	13.40	32.00	514.00	433.00
P 1346 C	9.10	61.40	373.00	232.00
P 1346 D	155.90	184.30	415.30	199.00
A 6 C	19.49	39.00	478.00	142.00
A 6 D	65.74	137.50	432.00	116.00

NOTA: En cada mezcla se completo un volumen de 1100 microlitros con agua bidestilada.

C= semillas control

D= semillas deterioradas

Una vez preparadas las muestras se guardaban en tubos eppendorf a una temperatura de -20°C.

f. Preparación de las muestras para calorimetría.

De las mezclas de azúcares se tomaron 30 microlitros y se colocaron en paneles de aluminio herméticos (Du Pont 050390) previamente pesados. Los paneles se colocaron en cajas de plástico que contenían solución saturada de nitrato de amonio, y cloruro de magnesio con la finalidad de tener humedades relativas de 66% y 33% respectivamente. La caja se cerro herméticamente y sello con parafilm y se mantuvo dentro de una estufa a 29°C durante 72 horas para lograr así la estabilización de humedad en las muestras.

g. Calorimetría Diferencial de Barrido.

El estado vítreo presenta variaciones en función de la temperatura, debido a esta propiedad se decidió estudiarlo mediante el uso de equipos termoanalíticos. De entre estos se eligió el Calorímetro Diferencial de Barrido (DSC) por ser un sistema adiabático que presenta una alta sensibilidad a las variaciones del calor requerido para aumentar la temperatura y con esto a las diferencias en la capacidad calorífica permitiendo así, observar las transiciones vítreas con un grado de precisión y exactitud bastante aceptables. En este caso, la sensibilidad, precisión y exactitud del equipo se consideraron parámetros importantes por lo complejo de los sistemas a estudiar. Otro factor importante en la elección del equipo analítico fué la cantidad de muestra requerida y el tiempo de análisis de la misma y en el DSC se requieren muestras pequeñas (5 a 10 mg) y tiempos cortos (30 a 40 min / muestra), en relación a otras técnicas. Las determinaciones calorimétricas se realizaron en un DSC marca DuPont modelo 2000 empleando termopares de cromel/alumel y utilizando como referencia un panel vacío con las mismas características de los paneles de muestra. Previamente a las corridas se realizó la calibración del equipo con materiales puros reportados en la literatura tales como: In, Sn, Zn, Ac Benzoico, sacarosa, etc. Las corridas se hicieron en un intervalo de temperaturas de -120°C a 80°C , manteniendo una isoterma de 3 minutos antes y después del calentamiento. En todas las corridas se utilizaron paneles herméticos de aluminio, sellados. La celda se enfrió con nitrógeno líquido utilizando un accesorio de enfriamiento manual.

Caracterización de las transiciones vítreas. Las transiciones vítreas de la muestras se identificaron por el cambio de pendiente en la curva de flujo de calor

contra temperatura y posterior recuperación de la pendiente inicial. Además, para corroborar las mismas se obtuvieron las curvas de Capacidad calorífica contra temperatura.

Las temperaturas con las cuales se caracterizó cada transición son las siguientes (48):

Temperatura Inicial. (Ti). Se consideró como temperatura de formación del estado vítreo (Ti), la temperatura a la cual la pendiente del termograma de flujo de calor contra temperatura empezaba a disminuir.

Temperatura final. (Tf). Se consideró como temperatura de fusión del estado vítreo (Tf) la temperatura a la cual la gráfica recobraba su pendiente inicial (la pendiente volvía a ser la misma que antes de la transición).

Temperatura media. (Tg). Se consideró como temperatura del estado vitreado (Tg) a la temperatura de la curva que correspondía a la mitad de la variación del flujo de calor de la transición vítrea.

La variación en la capacidad calorífica durante la transición vítrea se determinó calculando la diferencia del flujo de calor (cal/g) y dividiéndolo entre la diferencia de las temperaturas inicial y final de la transición

h. Determinación de Humedad de las Muestras. La determinación de humedad de las muestras se hizo por dos métodos diferentes:

a) Terminada cada corrida, se hicieron tres perforaciones de igual tamaño en las tapas de los paneles y estos se colocaban en una estufa de vacío a 90 °C hasta

peso constante y la humedad se calculaba por la pérdida de peso en relación al peso de la muestra.

b) Se prepararon muestras iguales a las empleadas para hacer las corridas, los paneles sin tapar se colocaron en una estufa de vacío a 90°C hasta peso constante y de la misma forma que en el inciso anterior se calculo la humedad de las muestras.

V. RESULTADOS.

1. DETERMINACION DE LA PRESENCIA DEL ESTADO VITREADO EN EMBRIONES DE MAIZ.

Para estudiar las características del estado vitreado en diferentes cultivares de maíz, se determinaron por Calorimetría Diferencial de Barrido, las características calorimétricas de la harina de embrión de maíz control.

Un termograma característico se muestra en la figura 1, donde se distinguen tres regiones. La región I entre -85°C a -50°C , la región II de -50°C a -5°C y la región III de 10°C a 30°C . En la región I se distinguen dos exotermias continuas. En la región II se observa un pico endotérmico múltiple que abarca un intervalo de temperatura muy amplio (-50°C a 10°C), con una temperatura de pico máximo entre -10°C y -20°C y dentro de su area incluye un pico endotérmico de menor tamaño centrado a 0°C . En la región III se observa una pequeña transición vítrea (10°C a 15°C) y un pico endotérmico con una temperatura de pico máximo en 20°C .

En estudios previos (27 y 28) se ha reportado que las transiciones calorimétricas que presentan los embriones de maíz a temperaturas menores de 0°C se deben a la fusión de los lípidos (región II, figura 1).

Para corroborar esto, se corrierón muestras de harina de embrión deslipidizada bajo las mismas condiciones. En estas gráficas las señales a temperaturas menores de 0°C no se presentaron en el termograma, comprobando así que estos se debían a los lípidos del embrión, (figura 2). La transición vítrea de la región III, aún se observa, pero como una señal muy débil.

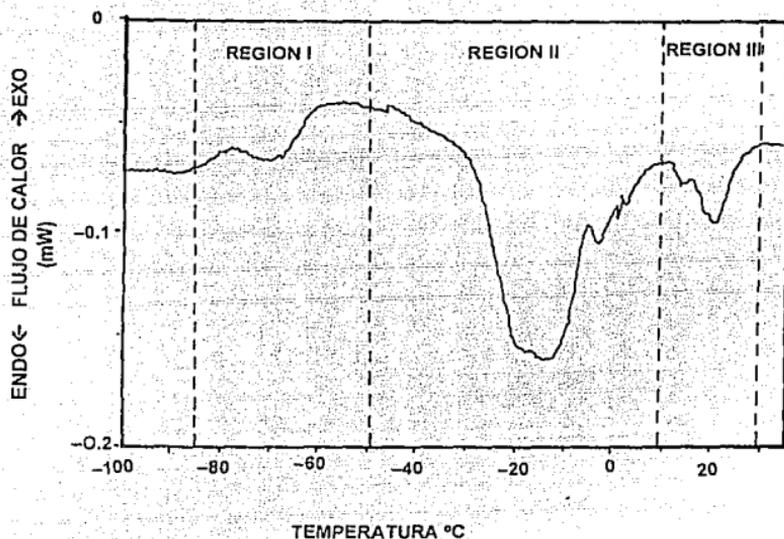


FIGURA 1. CURVA CALORIMETRICA DE HARINA DE EMBRION DE MAIZ.

Curva calorimétrica de harina de embrión de maíz cultivar T103 control con 18% de humedad. En el termograma se distinguen tres regiones: Región I de -85 a -50°C, Región II de -50 a 10°C y Región III de 10 a 30°C. Las variaciones del flujo de calor en función de la temperatura encontradas en las Regiones I y II son asignadas básicamente a la porción lipídica del embrión.

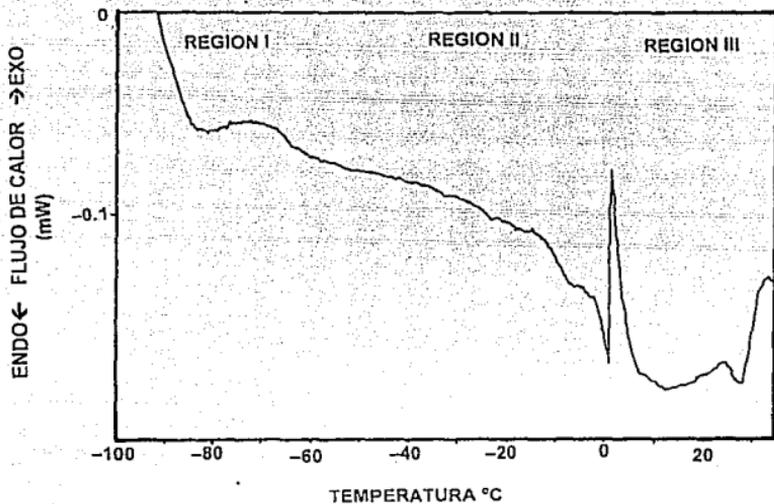


FIGURA 2. CURVA CALORIMETRICA DE HARINA DE EMBRION DE MAIZ DESLIPIDIZADA.

Representa las variaciones del flujo de calor al aumentar la temperatura de una muestra de harina de embrión de maíz deslipidizada del cultivar T100 control con 18 % de humedad.

Observandose en 0°C la fusión del agua

En general los resultados obtenidos en estos experimentos concuerdan con los reportados en la literatura (38), sin embargo, lo complejo del sistema biológico y las múltiples transiciones originadas por los diversos componentes del sistema, hace que las transiciones vitreas de los carbohidratos que son el objetivo de este estudio, sean difíciles de observar, ya que la cantidad de estos en la semilla en relación a la cantidad de los lípidos es sumamente baja, por lo que se decidió eliminar las influencias de los demás componentes del sistema y trabajar con muestras in vitro de acuerdo a las cantidades de azúcares encontrados en los diferentes lotes de semillas, logrando así evitar las limitaciones en la cantidad de carbohidratos, aumentar la señal del estado vitreado y eliminar las transiciones no deseadas.

2. EL ESTADO VITREADO EN LOS CARBOHIDRATOS DEL EMBRION DE MAIZ.

La composición química de los carbohidratos solubles presentes en los diferentes cultivares de maíz se muestra en la tabla 2 (metodología). En los lotes control, el contenido de rafinosa es menor en A6, que en P1346 o T100. Este último es el cultivar que tiene mayor contenido de rafinosa. Inicialmente todos los cultivares tienen bajo contenido de monosacáridos y alto de sacarosa el cual expresado en mg/g es prácticamente el mismo en los cuatro cultivares. Al deteriorarse las semillas (tabla 3, metodología), hay un aumento en la cantidad de monosacáridos en P1346 y A6, un aumento notorio en contenido de rafinosa y sacarosa en P1346 y aumento de sacarosa en T100.

En todos los casos el aumento con respecto al control es significativo a ($p=0.05$, ANOVA).

Cuando se deshidratan los azúcares en solución forman un estado vítreo (45). El estado vitreado es un estado inestable que puede existir como un líquido-sólido de alta viscosidad o como un líquido de alta viscosidad. La temperatura a la cual ocurre la transición se denomina temperatura de transición del estado vítreo (T_g) y depende de la composición química y cantidad de humedad (45).

Para inducir la formación del estado vitreado en las mezclas de carbohidratos y controlar el contenido de humedad en el mismo, las soluciones representativas de los diversos cultivares se equilibraron a dos humedades relativas, 33% y 66%. En ambas atmósferas los sistemas modelo perdieron agua, la fracción retenida dependió del porcentaje de humedad relativa en que se equilibró y de la composición química (tabla 5). En muestras equilibradas a HR de 33% el Contenido de Humedad (CH) varió entre 5-11% (base seca) mientras que en las muestras equilibradas a 66% de HR, el CH fué entre 13-23% (tabla 5).

En la tabla 5 también se muestra el CH de los diversos carbohidratos que componen la mezcla. Rafinosa resulto ser el azúcar más afín por agua seguido de los monosacáridos. Sacarosa fué el carbohidrato con menor afinidad por agua y la mezcla de rafinosa-sacarosa (4:1) presentó afinidad intermedia entre sacarosa-rafinosa. La mezcla de azúcares que presentó mayor retención de humedad fué la correspondiente a A₆ deteriorado y la de menor retención de humedad la de A₆ control (tabla 5). A HR de 33 % el contenido de humedad de la muestra depende de la composición química, por ejemplo T₁₀₀control y P₁₃₄₆ control contienen cantidades de sacarosa similares, expresada como fracción del total (tabla 2) y sus contenidos de humedad son similares (tabla 5), A₆ control presenta mayor contenido de sacarosa que los dos anteriores y su contenido de humedad fué menor.

TABLA 5
CONTENIDO DE HUMEDAD¹ DE AZUCARES EQUILIBRADOS A
DIFERENTES HUMEDADES RELATIVAS².

CULTIVAR	HUMEDAD RELATIVA	
	66 %	33 %
T ₁₀₀ CONTROL	17.94±0.2	7.66 ±0.2 ⁻
T ₁₀₀ DETERIORADO	15.55±0.1	6.60±0.1
P ₁₃₄₆ CONTROL	13.34±0.1	7.70±0.1
P ₁₃₄₆ DETERIORADO	15.31±0.2	8.47±0.4
A ₆ CONTROL	20.90±0.3	5.05±0.6
A ₆ DETERIORADO	23.30±0.2	8.23±0.3
SAC + RAF (4 : 1)	17.40±0.2	7.06±0.4
RAFINOSA	25.52±0.3	10.85±1.04
SACAROSA	11.62±0.4	4.70±0.25
GLUCOSA	17.11±0.3	5.90±0.3
FRUCTUOSA	18.02±0.3	6.10±0.1

¹ % en base seca ² Las HR de 66% y 33% se obtuvieron con soluciones saturadas de nitrato de amonio y cloruro de magnesio respectivamente. .-Los datos son el promedio de tres determinaciones ± Desviación estándar.

En las mezclas representativas de semillas deterioradas los contenidos de sacarosa son similares, sin embargo su contenido de humedad no lo es. Este resultado parece estar asociado a la presencia de monosacáridos los cuales son más afines por agua que la sacarosa pero un poco menos que la rafinosa. En P1346 D y A6 D la fracción de monosacáridos más rafinosa es similar y mayor que en T100 D.

En atmósfera de 66% de HR el contenido de humedad de las mezclas es mayor que en 33% y diferente para cada muestra, y con excepción de T100D la modificación en la composición de la mezcla de azúcares incrementa el contenido de humedad. Aparentemente en el caso de A6 D y P1346 D el aumento en CH respecto a los controles respectivos está asociado a un aumento en el contenido de monosacáridos.

Con el fin de determinar el T_g, una vez equilibrados a cierto contenido de humedad los carbohidratos presentes en las mezclas representativas de los diferentes cultivares de maíz, se analizaron por DSC. En todos los termogramas se observó la señal típica de una transición vítrea (figura 3). Para corroborar que dicha transición era debido a la presencia de un estado amorfo o vitreado se obtuvieron las gráficas de Cp (calor específico) contra temperatura, en las cuales se observó que el Cp aumentaba al subir la temperatura de manera prácticamente imperceptible, sin embargo, al llegar a la temperatura de la transición hay un aumento mayor en los valores de Cp al aumentar la temperatura, para posteriormente recuperar los aumentos iniciales (figura 4). En la misma gráfica se obtuvo el calor total en función de la temperatura mostrando este un aumento uniforme hasta la temperatura de la transición donde se observa una pendiente mayor.

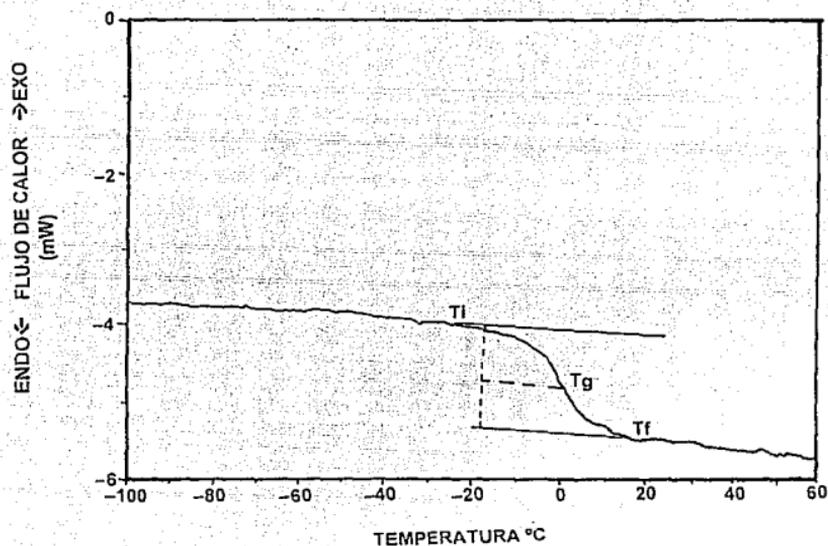


FIGURA 3. CURVA CALORIMETRICA DE CARBOHIDRATOS REPRESENTATIVOS DEL EMBRION DE MAIZ.

Transición vítrea medida por Calorimetría Diferencial de Barrido de una muestra representativa del cultivar Tico control con un contenido de humedad de 33%. En el trazo se muestra la temperatura del inicio de la fusión (Ti), la temperatura de la transición vítrea (Tg) y la temperatura final o temperatura de fusión del estado vítreo (Tf).

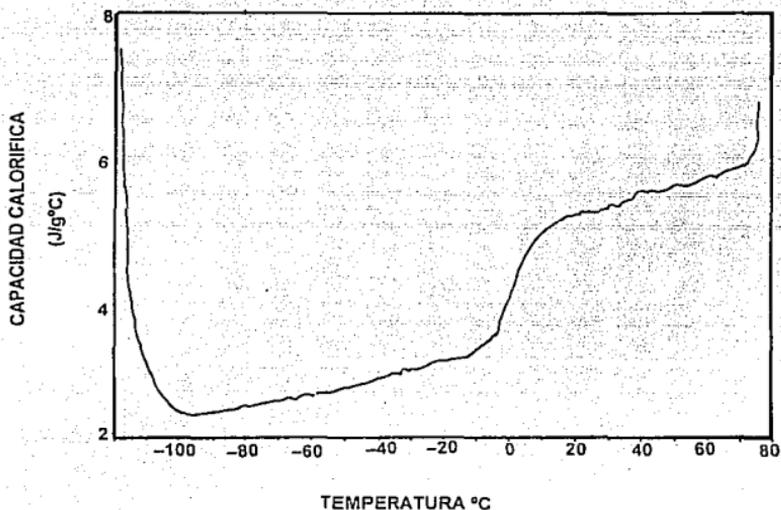


FIGURA 4. GRAFICA DE CAPACIDAD CALORIFICA CONTRA TEMPERATURA DE AZUCARES REPRESENTATIVOS DE EMBRION DE MAIZ.

En la gráfica se observa la muestra representativa del cultivar A6 deteriorado con un H R=33% mostrando la variación de la capacidad calorífica al aumentar la temperatura durante un calentamiento que trae consigo una transición vítrea.

TABLA 6
TEMPERATURAS DE TRANSICION VITREA DE LAS MEZCLAS DE
CARBOHIDRATOS EQUILIBRADAS CON HR = 66 %

MUESTRA	TEMPERATURA °C		
	Ti	Tf	Tg
T100 C	-40.20±0.70	-16.05±0.32	-25.40±0.40
T100 D	-43.80±0.40	-12.33±0.28	-26.71±0.52
P1346 C	-45.78±0.06	-13.43±1.13	-27.22±0.15
P1346 D	-42.40±0.03	-14.40±1.09	-25.80±0.20
A6 C	-49.05±0.06	-17.87±0.98	-29.21±0.48
A6 D	-42.10±0.45	-16.89±0.89	-28.30±0.56

NOTA: Los datos son el promedio de tres determinaciones ± Desviación estándar.

El intervalo de temperatura en el cual se presenta la transición vítrea dependió de la humedad relativa en que se equilibró la muestra. En muestras equilibradas a 66% de HR, la transición se presentó a temperaturas menores (tabla 6), que en muestras equilibradas a 33 % HR (tabla 7).

En los termogramas de las muestras de carbohidratos equilibradas con una HR de 33%, se observó que, la temperatura final de la transición vítrea se presenta a temperaturas por arriba de 0°C. En T100 control el estado vítreo se funde a mayor temperatura en relación con las otras dos muestras controles y de igual manera en T100 deteriorado en relación con las otras dos muestras deterioradas (tabla 7).

TABLA 7
TEMPERATURAS DE TRANSICION VITREA DE LAS MEZCLAS DE
CARBOHIDRATOS EQUILBRADAS CON HR=33%

TEMPERATURAS EN °C.				
MUESTRA	Ti	Tf	Tg	ΔCp mcal/g°C
T100 C	-22.8±0.05	18.7±1.09	1.2±0.56	1.2697±0.14
T100 D	-19.3±0.57	11.1±1.08	-1.7±0.28	1.7790±0.08
P1346 C	-23.6±0.70	13.3±0.05	1.9±1.2	3.2378±0.04
P1346 D	-18.1±0.05	8.2±0.54	-1.2±1.5	3.9976±0.18
A6 C	-26.3±0.52	16.8±0.55	-1.9±0.0	1.5994±0.13
A6 D	-13.3±0.0	10.95±0.47	1.3±0.51	2.1634±0.06

NOTA: Los datos son el promedio de tres determinaciones. ±Desviación estandar.

Sorpresivamente el Tg se mantuvo constante aún cuando la composición química y el contenido de humedad fueron muy diferentes, por ejemplo, la mezcla T100 control presenta un contenido de humedad del 7% y A6 control del 5% (tabla 5), en este último la relación sacarosa-rafinosa es de 12:1 mientras que en el primero es aproximadamente 4:1 y tanto el Tg de A6 control como el de T100 control fue similar al equilibrar en la misma humedad relativa (HR= 33%, tabla 7).

En cuanto a la variación en la capacidad calorífica durante la transición (ΔCp) se observarán valores menores en los controles que en los deteriorados y de los controles los valores más pequeños fueron los de T100 sucediendo de igual manera entre los deteriorados (tabla 7).

Aparentemente la mezcla de T100 y A6 control, ambas requieren menor cantidad de calor para aumentar su temperatura, que la que requiere P1346. El cambio en composición química inducido por el deterioro no modifica la capacidad calorífica de P1346, sin embargo en A6 D se observa un aumento notable. Este aumento también se observó en T100 D aunque se da en forma mas discreta (tabla 7)

VI. DISCUSION

Al analizar los termogramas de la harina de embrión de maíz, se encontró que las transiciones vítreas de los carbohidratos eran difíciles de observar y la reproducibilidad no era la adecuada para permitir hacer conclusiones. Esto se debió quizás a lo complejo del sistema biológico en estudio ya que la presencia de multicomponentes en el sistema, trae consigo diversos comportamientos térmicos los cuales se traslapan dificultando la interpretación de resultados. La magnitud de la señal vítrea es muy pequeña (0.1 mw) por lo que el equipo debe trabajarse a gran sensibilidad y estabilizar la línea base resulta difícil. Razones por las cuales se decidió trabajar únicamente con los carbohidratos solubles presentes en el embrión de semillas control y deterioradas.

La formación del estado vitreado en una solución de azúcares se induce por deshidratación, la cual se puede realizar por liofilización o a temperatura ambiente en atmósferas no saturadas de humedad (HR menor que 100%).

Durante la fase final de su desarrollo las semillas se deshidratan, lo cual induce la formación del estado vitreado. Esta deshidratación se realiza a temperatura ambiente. Por otro lado, las semillas almacenadas en condiciones óptimas presentan un contenido de humedad de entre el 5-8% y en condiciones deficientes de almacenamiento, alta HR y temperatura, el contenido es de entre el 13-18%. Tratando de mimetizar tanto las condiciones de secado natural de la semilla como su contenido de humedad en almacén, el estado vítreo de las mezclas de carbohidratos se indujo por deshidratación al equilibrio, a HR de 33% ($A_w=0.33$) y 66% ($A_w=0.66$). Con este diseño experimental también se estandariza el efecto de A_w en la T_g (52).

La composición de carbohidratos influyó en el contenido de humedad de las muestras equilibradas ya que unos carbohidratos presentan mayor capacidad de

hidratación como en el caso de la rafinosa en relación a la sacarosa o a los monosacáridos (tabla 5). Es notable el hecho de que en 33% HR, las mezclas T₁₀₀ D y A₆ C presentarán un menor contenido de humedad que el resto de las mezclas estudiadas (tabla 5). Este comportamiento anómalo parece deberse al hecho de que en ambas mezclas (T₁₀₀ D y A₆ C) el contenido de sacarosa es mayor. Este disacárido, presenta una gran tendencia a cristalizar y al hacerlo disminuye la afinidad del sistema por agua. La cristalización de sacarosa se evita o retarda incluyendo en el sistema otros compuestos con grupos OH (47). Bien podría ser que los contenidos de rafinosa y monosacáridos en A₆ C y T₁₀₀ D no fuesen suficientes para evitar la cristalización de una fracción de la sacarosa presente en estas mezclas.

Se ha postulado que las características de hidratación de los sacáridos correlaciona con el número de hidroxilos ecuatoriales (51). Los resultados de hidratación de los carbohidratos y sus mezclas están de acuerdo con esta sugerencia.

La T_g de un estado amorfo depende tanto de composición química como del contenido de humedad (51). Sin embargo, la T_g de las mezclas de carbohidratos aquí estudiadas no varían con la composición de carbohidratos (comparar T₁₀₀ y P₁₃₄₆, tabla 5) ni con el contenido de humedad al equilibrio (comparar A₆ y T₁₀₀, tabla 5) en una misma HR. Esto podría deberse a que en soluciones vítreas de composición heterogénea, la T_g que domina es la del componente que se encuentra por arriba del 80% y en todos los casos aquí estudiados fué sacarosa, mas aún los cambios de composición inducidos por el deterioro fué un aumento de monosacáridos menor del 20%.

La T_g de sacarosa decrece linealmente al aumentar A_w (52). Las T_gs de las mezclas de carbohidratos aquí estudiadas también decrecen al aumentar el A_w (comparar T₁₀₀ equilibrado a 33% HR con T₁₀₀ equilibrado a 66%HR, tabla 5).

En embriones de maíz los principales azúcares son sacarosa y rafinosa asociados a una pequeña proporción de monosacáridos (27). Se ha propuesto que a temperatura ambiente, estos carbohidratos se encuentran en estado vitreado cuando el contenido de humedad de la semilla es mayor del 8% (13, 31). Las Transiciones vítreas de las mezclas de carbohidratos aquí estudiadas presentan Tg mucho menores que los reportados por Williams y Leopold (1989) y por Bruni y Leopold (1992) para embriones de maíz. Esto puede deberse al hecho de que en la semilla la mayor proporción de agua se encuentra en la pared celular y por tanto el CH del citoplasma podría ser menor que 8% mientras que, en el sistema modelo hay un solo compartimento donde se encuentra alojada toda el agua presente en el sistema. La otra posibilidad es que en semillas de maíz, la formación del estado vítreo, se realice con la participación de los carbohidratos solubles, además de otros componentes del citoplasma como proteínas, almidón o dextrinas. Dado que el Aw de las semillas con un contenido de humedad de 8% (Bernal-Lugo I. 1993; comunicación personal) es similar a la Aw de las mezclas aquí estudiadas, esta última posibilidad se ve favorecida.

Durante el envejecimiento acelerado de maíz, la composición de carbohidratos solubles cambia (27, 28), sugiriendo que durante el deterioro la protección brindada por el estado vítreo también se modifica. La Tg de las mezclas representativas de semillas deterioradas fué similar a la que presentan las mezclas control, indicando que los cambios en composición química del estado amorfo inducidos durante el deterioro, no son suficientes para modificar sensiblemente la Tg. Los datos antes mencionados fueron interpretados en el sentido de que en semillas almacenadas a 30°C y 33% de HR la Tg no constituye un buen indicador para predecir su sensibilidad al deterioro. Sin embargo, la temperatura de fusión o colapso (Tf) del estado vítreo sí parece estar asociada con el mecanismo de protección que los carbohidratos solubles brindan

a la semilla durante el deterioro. Las semillas de T100 presentan mayor estabilidad al deterioro que las semillas P1346 y A6, coincidentemente con este hecho, se observó que la Tf en la mezcla T100 C fue mayor que para los otros cultivares. Al deteriorarse las semillas disminuye la Tf de las mezclas de carbohidratos. Esto parece deberse a los cambios en su composición. En P1346 y A6 el contenido de monosacáridos aumenta notablemente, así como el contenido de humedad. Ambos tipos de moléculas actúan como agentes plastificantes del estado vítreo, siendo esta la razón por la cual a la misma HR la Tf del sistema disminuye (tabla 5).

A temperaturas mayores que Tf los carbohidratos solubles se encuentran en estado líquido-viscoso (Rubbery) y la viscosidad relativa de estas mezclas puede ser calculada con la ecuación de Williams-Landell-Ferry (52)

$$\log \frac{\eta}{\eta_g} = \frac{-17.44(T - T_g)}{51.6 + T - T_g}$$

donde T es la temperatura a la cual se quiere hacer el cálculo, Tg es la temperatura media de la transición vítrea, η y ηg la viscosidad a T y Tg respectivamente. Resolviendo la ecuación 1 para cada uno de los cultivares a T=Tf, puesto que a esta temperatura la protección de la semilla brindada por el estado vítreo se pierde completamente, se encuentra que el cambio relativo en viscosidad a Tf (ηf/ηg) fué 1.75x10⁻⁵ para T100, 3.31x10⁻⁵ para P1346 y 2.18x10⁻⁵ para A6. La disminución de viscosidad se comporta de acuerdo a lo esperado. La viscosidad del sistema disminuye a temperaturas mayores de Tg pero este cambio fue casi 30 veces mayor en P1346 que en T100, por lo que una vez que se ha colapsado el estado vítreo, las reacciones deteriorativas, a una temperatura dada, se pueden realizar más rápidamente en P1346 que en T100. Este cambio es paralelo a la sensibilidad al deterioro mostrada por estos cultivares, formado por

los carbohidratos solubles, en semillas con diferente sensibilidad al deterioro son diferentes, y que estas diferencias son determinadas por la composición de azúcares solubles. Estos polioles parecen proteger a la semilla contra el deterioro en almacén, a través de modular la viscosidad del citoplasma. Para A₆ el cambio relativo en viscosidad a T_f fue similar al presentado por T₁₀₀. Sin embargo, la mezcla de A₆ es diferente de las otras dos en el sentido de que contiene una mayor proporción de sacarosa, y por tanto presenta una menor estabilidad (Bernal-Lugo I. 1993 comunicación personal). Mezclas representativas de A₆ C cristalizan en 1.5 meses, mientras que la de T₁₀₀ tarda más de tres meses.

VII. CONCLUSIONES

1) Los carbohidratos solubles, presentes en el embrión de la semilla de maíz son capaces de:

A) Formar un estado vítreo a temperatura ambiente siempre y cuando el contenido de humedad sea menor o igual al 8%.

B) Proteger el embrión contra el deterioro en el almacén a través de la formación del estado vítreo.

2) La efectividad de los carbohidratos solubles en la protección del embrión depende de la relación sacarosa-rafinosa. A mayor contenido de rafinosa, mayor protección.

3) En las semillas de maíz aquí estudiadas, la estabilidad del estado vitreado no se refleja en la Tg, sino en la Tf.

4) Una vez fundido el estado vítreo, los carbohidratos solubles continúan brindando protección al embrión a través de mantener una alta viscosidad en el citoplasma. Esto sucede siempre y cuando los carbohidratos no estén cristalizados.

5) Durante el deterioro, la Tg del estado vítreo de los carbohidratos solubles del embrión de maíz no se modifica, pero la Tf disminuye, indicando que el nuevo estado vítreo es más frágil.

6) Las condiciones de almacenamiento óptimas para semillas de maíz son: contenidos de humedad iguales o menores del 8% y temperaturas de entre 10 y

15°C. Sin embargo, el mantenimiento de un almacén de semillas en estas condiciones es inoperante desde el punto de vista económico y de diseño por lo que la otra alternativa es utilizar cultivares con alto contenido de rafinosa.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. **Kent N.L.** "Tecnología de los cereales". Edit. Acribia Zaragoza, España. (1971)
2. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI).1990. Anuario Estadístico.
3. Ciclos de Cultivo. SARH - INIA. México (1982).
4. **Pedreguera Q.P.** Efecto del deterioro en el crecimiento heterotrófico y el establecimiento de la autotrófia en plántulas de maíz. TESIS. Facultad de Ciencias. UNAM. (1992)
5. **Tiburcio T.L.** Caracterización bioquímica de la capa de aleurona de semillas de bajo vigor. TESIS. Facultad de Química. UNAM (1986)
6. Association of Official Seed Analysts. 1983. Seed vigor testing handbook.
7. **Wilson D.O. y Mc Donald M.B.** The lipid peroxidation model of seed aging seed Sci. Technol. **14**: 269-300. (1986)
8. **Priestley D.A.** Seed Aging. Comstock Publication Association. Ithaca N.Y. (1986)
9. **Basavarajappa B.S., Shetty H.S. y Prakash H.S.** Membrane Deterioration and Other Biochemical Changes Associated with Accelerated Aging of Maize Seeds. Seed Sci. Technol. **19**: 279 - 286. (1991)
10. **Wettlaufer S.H. y Leopold A.C.** Relevance of Amadori and maillard products to seed deterioration. Plant Physiol. **97**: 165-169. (1991)
11. **Barton L.V.** Seed preservation and longevity. London. Leonard Hill. (1961)
12. **Justice O.L. y Bass L.N.** Principles and practice of seed storage, USDA Handbook, 506. (1978)
13. **Williams R.J. y Leopold A.C.** The glassy state in corn embryos. Plant Physiol. **89**: 977-981. (1989)

14. **Bruni F. y Leopold A.C.** Glass transition in soybean seed: Anhydrous Biology. *Plant Physiol.* **96**: 660-663- (1991)
- 15 **Harman G.E. y Mattick L.R.** Association of lipid peroxidation with seed aging and death. *Nature*, **260**: 323-324. (1966)
16. **Byrd H.W. y Delouche J.C.** Proc. Assoc. off Seed Anal. **61**,41. (1971)
17. **Woodstock L.W.** Physiological and biochemical tests for seed vigor. *Seed Sci: Technol.* **1**: 127-157. (1973)
18. **Douglas J.E.** En cereal seed technology; Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome. 87-107. (1975)
19. **Mc Donald M.B.** Proc Assoc. of seed anal. 1976. **65**: 109-120. (1976)
20. **Dawidowicz G. y Podstolski F.** Age related changes in the ultrastructure and membrane properties of *Brassica napus* L. seeds. *Ann Bot.* **69**: 39-46. (1992)
21. **Mead J.F.** Free radical mechanisms of lipid damage and consequences for cellular membranes. En *Free radicals in Biology* (ed.W.A. Pryor),Vol **1**: 51-68. (1976)
22. **Beneditti A., Comparti M., y Esterbauer H.** Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originativa from peroxidation of liver microsomal lipids. *Biochimica et Biophysica Acta* **620**: 281-296. (1980)
23. **Funes J. y Karel M.** "Lipids". **16**: 347. (1981).
24. **Yamaguchi T. y Yamashita Y.** Mutagenic activity of autoxidized linolenic and linoleic acid. *J Agric. Biol. Chem.* **43**: 2225-2226. (1979)
25. **Cerami A. y Vlassara H.** Glucose and aging. *Sci Amer.* **256**: 90-97. (1987)
26. **Eicher K. y Karel M.** The influence of water content and water activity on the sugar amino browning.reaction. *J Agric. Food Chem.* **20**: 218-223. (1972)
27. **Bernal-Lugo I. y Leopold A.C.** Changes in soluble carbohydrates during seed storage. *Plant Physiol.* **98**: 1207-1219. (1992)

28. **Bernal-Lugo I. y Díaz L.F.** Mecanismos de protección celular durante la desecación de la semilla. (1993)
29. **Crowe J.H. y Clegg J.S.** (eds). Anhydrobiosis, Dowden, Hutechinson y Ross, Stroudsberg. Academic Press. N.Y. (1973)
30. **Crowe J.H. y Crowe L.M.** Stabilization of membranes in anhydrobiotic organisms. En Leopold A.C. ed. Membranes, metabolism and dry organisms. Comstock Public. Assoc. Ithaca N.Y. 180-209. (1986)
31. **Bruni F. y Leopold A.C.** The glassy state in seeds. TESIS. Doctorado. Ithaca Cornell University. (1990)
32. **Madin K., Crowe J.H. y Loomis S.H.** "Metabolic transitions in Anematode During Anhydrobiosis. Dry Biological systems". Academic Press. New York. (1978)
33. **Koster K.L. y Leopold A.C.** Sugars and desiccation tolerance in Seeds. *Plant Physiol.* **88**: 829-832. (1988)
34. **Díaz L.F.** Contenido de carbohidratos y sensibilidad al deterioro de algunas semillas de maíz. Tesis. Maestría. Facultad de Química UNAM. (1993)
35. **Amuti K.S. y Pollard C.J.** Soluble carbohydrates of Dry and Developing Seeds. *Phytochem.* **16**: 526-532. (1977)
36. **Crowe J.H., Crowe L.M. y Jackson S.A.** Preservation of structural and functional activity in lyophilized sarcoplasmic reticulum. *Arch. Biochem. Biophys Acta.* **220**: 477-484 (1983)
37. **Crowe J.H., Crowe L.M. y Chapman D.** Preservation of membranes in anhydrobiotic organism: the role of trehalose. *Science* **223**: 701-703. (1984)
38. **Leopold A.C. y Vertucci C.W.** En "Membranes Macromolecules and Stability in the Dry State". Cornell University Press Ithaca. (1987)
39. **Caffrey M., Fonseca V. y Leopold A.C.** Sugar-lipid interaction. Relevance to anhydrous biology. *Plant. Physiol.* **86**: 754-758. (1988)

40. **Strauss G. y Hauser H.** Stabilization of lipid bilayer vesicles during freezing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83:** 2422-2426. (1986)
41. **Burke M.J.** The Glassy State and Survival Anhydrous Biological Systems. En Leopold A.C. (Ed) *Membranes, Metabolism and Dry Organism.* Ithaca. Cornell University Press. (1986)
42. **Koster K.L.** Glass Formation and Dessication Tolerance in Seeds. *Plant. Physiol.* **96:** 302-304. (1991)
43. **Ross Y. y Karel M.** Phase Transition of Mixtures of amorphous Polissaccharides and Sugars. *Biotechnol Prog.* **7:**49-53. (1990)
44. **Ross Y. y Karel M.** Diferential Scanning Calorimetry Study of Phase Transition Affecting The Quality of Dehidrated Materials. *Biotechnol Prog.***6:** 159-163. (1990)
45. **Karmas R., Buera M.P. y Karel M.** Effect of glass transitions on rates of nonenzymatic browning in food systems. *J. Agric. Food Chem.* **40:**873-879. (1992)
46. **Hirsh A.G.** Vitrification in plant as a natural form of cryoprotection. *Cryobiology* **24:** 214-228. (1987)
47. **Green J.L. y Angell C.A.** Phose relations and vitrification in saccharide-water solution and trehalose anomaly. *J. Phys Chem.* **93:**2880-2882. (1989)
48. **Lombardi G.** For better thermal analysis. *ICTA.* Segunda edición. 18-20. (1980)
49. **Mackenzie R.C.** *Thermochemical acta.* **28:** 1. (1979)
50. **Vertucci W.C.** A calorimetric study of the changes in lipids during seed storage under dry conditions. *Plant Physiol.* **99:** 310-316. (1992)
51. **Levine H. y Slader L.** Principles of Cryostabilization technology from structure property relationships of carbohidrates/water systems-A review *Cryo-letters* **9:** 21. (1988)

52. Slade L. y Levine H. Beyond water activity: Recent advances based on alternative approach to the assesment of food quality and safety. Critical Rw. food Sci.and nutr. 30:115-360. (1991)

53. Kawai H., Sakurai Y.,Inahue Y.Chujo R. y Kobayashi S. Hidration oligosaccharides Anomalies Hidration ability of trehalose. Cryobiology. 29:599-606. (1992)

**ESTA TESTA NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**