

ARTÍCULO ORIGINAL

Determinación de carboximetilisina en alimentos tostados y horneados**Determination of carboximetilysine in toasted and baked foods****Mesías M*, López Pérez N, Guerra-Hernández E, García-Villanova B.**

Departamento de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. Campus Universitario de Cartuja. 18071 Granada. Fax: 34-958249577, Tel.: +34-958240663.

mmesias@ugr.es

RESUMEN

La carboximetilisina (CML) es un indicador de etapas avanzadas de la reacción de Maillard. Su formación en los alimentos dependerá directamente de la composición de los mismos, pero también de la temperatura y tiempo de calentamiento al que se ven sometidos durante el procesado. Concretamente, se ve favorecida cuando el tratamiento térmico es más severo, de ahí que esté presente en alimentos tostados u horneados como los productos de panadería o bollería. En el presente trabajo se analizó el contenido de CML en 9 tipos de alimentos: pan integral, pan de molde tostado a diferentes tiempos, colines, torta de inés rosales, palmera, caracola, suizo y medianoche y galleta integral más o menos horneadas. La determinación de CML se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, previa reducción, hidrólisis y derivatización. Los valores de CML determinados en las muestras del estudio oscilaron entre 1,38 mg/100 g muestra (palitos no integrales) y 10,4 mg/100 g de muestra (galleta más tostada). El pan de molde mostró un incremento en el contenido de CML paralelo al tiempo de tostado, pasando de 6,31 mg/100 g sin tostar, a 6,44 mg/100g con 1 minuto de tostado y a 8,95 mg/100 g con 6 minutos de tostado. En conclusión, es importante conocer la cantidad de CML que contiene un alimento, para controlar su ingesta, especialmente en los sometidos a tostado u horneado, ya que, como se ha comprobado en este estudio, el contenido de CML incrementa paralelamente al tratamiento térmico.

PALABRAS CLAVE: CML, alimentos tostados, alimentos horneados, reacción de Maillard.**ABSTRACT**

Carboximetilysine (CML) is an indicator of advanced stages of Maillard reaction. Its formation in foods depends on their composition but, moreover, on temperature and time of thermal treatment whom they are submitted during processed. Particularly, it is favored when thermal treatment is more severe, with the result that it is present in toasted or baked foods such as bakery products. In the present study, CML content in 9 different foods was analyzed: integral bread, sliced bread which was toasted at different times, breadsticks, "inés rosales" cake, heart-shaped pastry, flaky pastry, bun with sugar and bun and integral biscuit more or less baked. Determination of CML was carried out by GC-MS, after reduction, hydrolysis and derivatization. CML values in studied samples ranged from 1.38 mg/100 g of sample (no integral breadsticks) to 10.4 mg/100 g of sample (more toasted biscuit). In sliced bread a relationship between CML content and time of toasting was observed, increasing from 6.31 mg/100 g without toasting to 6.44 mg/100 g with 1 min and to 8.95 mg/100 g with 6 min of toasting. In conclusion, it is important to know CML content in foods in order to control its intake, especially in toasted or baked foods since, as it has been tested in this study, CML content is related to the thermal treatment.

KEYWORDS: CML, toasted foods, baked foods, Maillard reaction.

Fecha de recepción (Date received): 15-04-2010

Fecha de aceptación (Date accepted): 10-06-2010

Ars Pharm 2010; 51 .Suplemento 3: 23-29.

INTRODUCCIÓN

El pardeamiento no enzimático es un conjunto de reacciones producidas en los alimentos como consecuencia, principalmente, del tratamiento térmico. La reacción de Maillard es una de ellas, y ocurre cuando grupos amino de aminoácidos, péptidos o proteínas se combinan con grupos carbonilos de azúcares reductores o lípidos oxidados, originando los denominados productos de la reacción de Maillard (PRM). Estos productos, especialmente en las etapas avanzadas de la reacción, son compuestos de tono oscuro y están asociados al pardeamiento de los alimentos. La importancia de esta reacción química, especialmente por parte de la industria alimentaria, es la frecuencia con que se produce en los alimentos durante procesos como horneado, fritura, tostado, etc., dando lugar a cambios en el color, olor, sabor y textura y, en consecuencia, afectando a las propiedades sensoriales de los alimentos. Los compuestos volátiles formados y los solubles contribuyen al sabor y al olor, mientras que los menos solubles se asocian a la producción de colores y texturas¹. Muchos de estos cambios son deseados, como el tostado del café, horneado del pan, fabricación del chocolate, asado y fritura de la carne, etc², haciendo al alimento más atractivo para su consumo, aunque también pueden estar relacionados con la aparición de sustancias aromáticas o polímeros pardos indeseados, especialmente durante el almacenamiento³, o con disminuciones de las propiedades nutricionales^{4,5}.

La carboximetilisina (CML) es un indicador de etapas avanzadas de la reacción de Maillard. Su formación en los alimentos dependerá directamente de la composición de los mismos, pero también de la temperatura y tiempo de calentamiento al que se ven sometidos durante el procesado⁶. Concretamente, la formación de CML se ve favorecida cuando el tratamiento térmico es más severo, de ahí que esté presente en alimentos tostados u horneados como los cereales y derivados, productos de panadería o productos de bollería⁷. En estos alimentos la concentración de CML es bastante elevada, ya que el desarrollo de la reacción de Maillard se ve favorecido debido al alto contenido de azúcares reductores en los cereales o a su producción durante el tratamiento térmico como consecuencia de la hidrólisis del almidón o de los azúcares añadidos^{8,9,10}. Por otra parte, el desarrollo de la reacción induce una deficiencia de lisina, principal aminoácido limitante en los cereales, por lo que, consecuentemente, se produce una deficiencia de la calidad de la proteína¹¹.

En los últimos años se ha estudiado la posible asociación entre la ingesta de CML y el desarrollo de ciertas enfermedades, como la diabetes tipo-2 o las enfermedades cardiovasculares.^{12,13,14} Recientemente, Birlouez-Aragón y col. han realizado una intervención nutricional en individuos sanos a los que se les administraron dietas ricas y pobres en productos de la reacción de Maillard (PRM)¹⁵. El consumo de dietas ricas en PRM, con un contenido 2,5 veces superior de CML respecto al de las dietas pobres en PRM, condujo a un aumento en los niveles plasmáticos de dicho indicador, que correlacionaron con los marcadores bioquímicos indicadores de un elevado riesgo en el desarrollo de diabetes mellitus.

Por todos estos motivos, el objetivo del presente trabajo fue determinar el contenido de CML en galletas, productos de bollería y productos de panadería. Así mismo, estudiar la influencia del tiempo de tostado sobre la formación de dicho compuesto en una muestra de pan de molde.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras. Se analizaron los siguientes tipos de alimentos: productos de panadería (pan integral, palitos integrales, palitos no integrales y pan de molde); productos de bollería (torta de Inés rosales, palmera, caracola, suizo y medianoche) y galletas integrales. Las muestras de medianoche y galleta integral fueron horneadas a diferentes tiempos, de forma que se analizaron medianoches y galletas más o menos horneadas. Por otra parte, el pan de molde se sometió a distintos tiempos de tostado, 1 minuto y 6 minutos. Con todo esto se pretendió ver la influencia del tiempo y la temperatura de los distintos tratamientos térmicos sobre el contenido de CML en los distintos productos.

Las muestras fueron obtenidas en distintos establecimientos comerciales. Se trituraron mediante una picadora Moulinex ® y se procedió a la determinación de humedad y de CML.

Determinación de humedad: La determinación de humedad se realizó midiendo la pérdida de peso en estufa a 105°C hasta peso constante.¹⁶

Determinación de CML: La determinación de CML se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, previa reducción, hidrólisis y derivatización, según el método de Liardon y col.¹⁷ con algunas modificaciones.

- *Reducción:* Se pesan 0,3 g de muestra y se adicionan 1,5 mL de tampón borato 0,2 M pH 9,5. A continuación se añade 1 mL de borohidruro sódico y se deja en reposo durante 4 horas a temperatura ambiente.

- *Hidrólisis ácida:* Una vez transcurridas las 4 horas, se adicionan a cada muestra 2,5 mL de HCl 37%, muy lentamente, y se mantienen en la estufa a 110 °C durante 20 horas. Finalmente se filtran y se procede a la derivatización.

- *Derivatización:* En un tubo pyrex se depositan 300 µL de muestra hidrolizada y 300 µL del patrón interno (N-metil-lisina, 20000 ppb), desecándose en el rotavapor Büchi R-114 a 60 °C. Se adicionan 750 µL de una mezcla de isopropanol-cloruro de acetilo y 150 µL de etanotiol y se lleva a estufa a 110 °C durante 30 minutos. A continuación, la muestra se deseca con N₂, se le adicionan 300 µL de anhídrido trifluoroacético y se lleva de nuevo a estufa a 110 °C durante 10 minutos. Se deseca con N₂, se añaden 300 µL de acetato de etilo y se filtra utilizando filtros Millipore de 0,20 µm.

- *Análisis cromatográfico:* La CML fue determinada mediante cromatografía de gases-masas, utilizando un cromatógrafo de gases Trace 2000 (Thermo Electron Corporation) equipado con una columna capilar ZB-5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm) y acoplado a un detector de trampa iónica Polaris Q. Se utilizó el modo de inyección splitless. El programa de

Tª utilizado fue el siguiente: 2 minutos a 60 °C, rampa de 5 °C/minuto hasta 240 °C y rampa de 100 °C/minuto hasta 300 °C durante 5 minutos. El helio fue utilizado como fase móvil a un flujo de 2,1 mL/minuto. El método de detección utilizado fue por ionización química negativa con Tª de la fuente a 160 °C. Los datos fueron integrados y cuantificados con el software Xcalibur (Thermo Electron Corporation).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El contenido de CML en las muestras del estudio osciló entre 1,38 mg/100 g en los palitos no integrales y 10,4 mg/100 g en la galleta integral (Tabla 1). Si expresamos los resultados por cada 100 g de proteína, el rango determinado fue de 15,3-108,6 mg. Dado que la CML es un indicador de etapas finales de las reacciones de pardeamiento no enzimático, cabría esperar una correlación con el contenido de humedad, lo que indicaría la extensión del tratamiento térmico. Sin embargo, esta correlación no se observó ($r=0,006$), probablemente debido a la variabilidad de los ingredientes utilizados en la elaboración de los mismos. Hay que indicar que la CML no sólo proviene de la oxidación del compuesto de Amadori, primera etapa en la reacción de Maillard, sino que puede producirse por la condensación de la lisina con los productos de degradación de los azúcares (glioxal y metilglioxal) y del ácido ascórbico y con los productos de oxidación de los lípidos.¹⁸

Tabla 1. Contenido de humedad (%) y CML (mg/100 g muestra) en las muestras analizadas.

Grupo	Muestra	Humedad	CML
PANADERÍA	Pan integral	24,1	1,84
	Palitos integrales	3,3	2,55
	Palitos no integrales	4,5	1,38
	Pan de molde integral	27,2	6,31
	Torta de Inés Rosales	4,6	2,16
	Palmera	5,5	1,95
BOLLERÍA	Caracola	12,5	9,10
	Suizo	18,4	2,65
	<i>Medianoche</i>		
	Más tostada	22,2	2,44
	Menos tostada	22,7	3,03
GALLETERÍA	<i>Galleta integral</i>		
	Más tostada	5,5	10,4
	Menos tostada	6,5	6,95

Los resultados obtenidos en el pan de molde son similares a los observados por otros autores.^{7,19} Sin embargo, las muestras de galletas analizadas mostraron valores superiores a los observados por Charissou y col.⁹, quienes también encontraron una alta variabilidad en sus datos. No se han encontrado referencias bibliográficas para muestras de bollería, que presentaron valores similares excepto para la caracola, en la que se obtuvo un valor tres veces superior (9,1 mg/100 g) al observado en el suizo o en las medianoches. Este producto se elabora con masa hojaldrada de elevada proporción de grasa, al igual que la palmera, para elaborar el denominado “plastón”. La caracola, además, contiene crema pastelera, piñones, azúcar y fruta confitada, ingredientes que incluyen todos los tipos de precursores de la CML, lo que justificaría el elevado contenido de este compuesto en la muestra.

El pan de molde mostró un incremento en el contenido de CML paralelo al tiempo de tostado, pasando de 6,31 mg/100 g sin tostar, a 6,44 mg/100 g con 1 minuto de tostado y a 8,95 mg/100 g con 6 minutos de tostado (Tabla 2). En este caso sí existió correlación con la humedad ($r=0,99$), lo que indica que a igualdad de ingredientes, es el binomio temperatura-tiempo el que influye en la generación de CML. Capuano y col. no encontraron una tendencia similar a la nuestra en panes tostados a distinta temperatura y tiempo.⁷ En la elaboración de las galletas, el empleo de diferentes tiempos de horneado, también produjo un mayor contenido de CML, resultados igualmente observados por Charissou y col.⁹ en galletas con distintos ingredientes, temperaturas y tiempos de horneado. En productos de bollería (medianoche), el empleo de diferentes tiempos de horneado no refleja la tendencia anterior. En este caso, el alto contenido de humedad de los productos de bollería hace que la proporción de corteza/miga sea pequeña y por tanto, no se vea reflejado en la medida del producto total, ya que hay que tener en cuenta que son necesarias temperaturas superiores a 100°C para generar este compuesto.

Tabla 2. Contenido de humedad (%) y CML mg/100 g muestra) en pan de molde tostado a diferentes tiempos.

Muestra	Humedad	CML
Sin tostar	27,2	6,31
Tostado 1 min	26,3	6,44
Tostado 6 min	5,1	8,95

CONCLUSIONES

Es importante conocer la cantidad de CML que contiene un alimento, debido a la relación entre la ingesta de este compuesto y el desarrollo de ciertas enfermedades. Hay que prestar especial atención al grupo de los alimentos sometidos a tostado u horneado, ya que, como se ha comprobado en este estudio, el contenido de CML puede incrementarse paralelamente al tratamiento térmico.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado bajos los proyectos de investigación AGL-2006-12656/ALI, financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología y P06-CTS-1900, financiado por la Junta de Andalucía.

BIBLIOGRAFIA

1. Rizzi, G.P. (1994). The Maillard reaction in foods. En T.P. Labuza, G.A. Reineccius, V. Monnier, J. O'Brien, J. Baynes (Eds.), *Maillard Reaction in Chemistry, Food and Health*. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry.
2. O'Brien, J.; Morrissey, P.A. (1989). Nutritional and Toxicological aspects of Maillard Browning reaction in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 28, 211-248.
3. Baltes, W. (1982). Chemical changes in food by the Maillard reaction. *Food Chemistry* 9, 59-73.
4. Seiquer, I.; Díaz-Alguacil, J.; Delgado-Andrade, C.; López-Frías, M.; Muñoz Hoyos, A.; Galdó, G.; Navarro, M.P. (2006). Diets rich in Maillard reaction products affect protein digestibility in adolescent males aged 11-14 y. *The American Journal of Clinical Nutrition* 83, 1082-1088.
5. Mesías, M.; Seiquer, I.; Delgado-Andrade, C.; Galdó, G.; Navarro, M.P. (2009). Intake of Maillard reaction products reduces iron bioavailability in male adolescents. *Molecular Nutrition and Food Research* 53: 1551-1560.
6. Hardy, J.; Parmentier, M.; Fanni, J. (1999). Functionally of nutrients and thermal treatments of food. *The Proceedings of the Nutrition Society* 58: 579-585.
7. Capuano, E.; Ferrigno, A.; Acampa, I.; Ait-Ameur, L.; Fogliano V. (2008): Characterization of the Maillard reaction in bread crisps. *European Food Research and Technology*, 228: 311-319.
8. Charissou, A.; Ait-Ameur, L.; Birlouez-Aragon, I. (2007a). Evaluation of a gas chromatography/mass spectrometry method for the quantitation of carboxymethyllysine in food samples. *Journal of Chromatography A* 1140: 189-94.
9. Charissou, A.; Ait-Ameur, L.; Birlouez-Aragón, I. (2007b). Kinetics of formation of three indicators of the Maillard reaction in model cookies: influence of baking temperature and type of sugars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 4532-4539.
10. Hegele, J.; Parisod, V.; Richoz, J.; Forster, A.; Maurer, S.; Krause, R.; Henle, T.; Büttler, T.; Delatour, T. (2008). Evaluating the extent of protein damage in dairy products: simultaneous determination of early and advanced glycation-induced lysine modifications. *Annals of the*

- New York Academy of Sciences 1126: 300-306.
11. Ramírez-Jiménez, A.; García-Villanova, B.; Guerra-Hernández, E. (2001). Effect of toasting time on the browning of slice bread. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81: 513-518.
 12. Knecht, K.J.; Dunn, J.A.; Mcfarland, K.F.; McCance, D.R.; Lyons, T.J.; Thorpe, S.R.; Baynes, J.W. (1991). Effect of diabetes and aging on carboxymethyllysine levels in human urine. *Diabetes* 40: 190-196.
 13. Koschinsky, T.; He, C.J.; Mitsuhashi, T.; Bucala, R.; Liu, C.; Buenting, C.; Heitmann, K.; Vlassara, H. (1997). Orally absorbed reactive advanced glycation end products (glycotoxins): An environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 6474-6479.
 14. Meng, J.; Sakata, N.; Takebayashi, S.; Asana, T.; Futata, T.; Nagai, R.; Ikeda, K.; Horiuchi, S.; Myint, T.; Taniguchi, N. (1998). Glycooxidation in aortic collagen from STZ-induced diabetic rats and its relevance to vascular damage. *Atherosclerosis* 136: 355-365.
 15. Birlouez-Aragon, I.; Saavedra, G.; Tessier, F.J.; Galinier, A.; Ait-Ameur, L.; Lacoste, F.; Niamba, C.N.; Alt, N.; Somoza, V.; Lecerf, J.M. (2010). A diet based on high-heat-treated foods promotes risk factors for diabetes mellitus and cardiovascular diseases. *The American Journal of Clinical Nutrition* 91: 1220-1226.
 16. AOAC. (1980). *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C.
 17. Liardon, R.; Ledermann, S.; Ott, U. (1981). Determination of D-amino acids by deuterium labelling and selected ion monitoring. *Journal of Chromatography* 203: 385-395.
 18. Ames, J.M. (2008). Determination of N ϵ -(Carboxymethyl)lysine in foods and related systems. *Annals of the New York Academy Science* 1126: 20-24.
 19. Assar, S.H.; Moloney, C.; Lima, M.; Magee, R.; Ames, J.M. (2009). Determination of N ϵ -(carboxymethyl)lysine in food systems by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Amino acids* 36: 317-326.
-