



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
POSTGRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

DESARROLLO DE METODOLOGÍAS DE ENCAPSULACIÓN
UTILIZANDO AISLADO PROTEICO DE SUERO LÁCTEO
MODIFICADO CON AZÚCARES PARA LA PROTECCIÓN DE
INGREDIENTES
ACTIVOS EN ALIMENTOS

Tesis Doctoral presentada ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela por la **MSc. María de Jesús Alfaro Arismendi** para optar al título de Doctor en Ciencias. Mención Ciencia y Tecnología de Alimentos.

Tutor: Dr. Varoujan Yaylayan

Caracas – Venezuela
Marzo 2012



VEREDICTO

Resumen

La encapsulación, es una técnica que consiste en atrapar o envolver materiales, ingredientes sensibles o inestables, en una matriz o pared de pocos micrómetros de tamaño. Existen actualmente diversas tecnologías para obtenerlas. El objetivo de la presente investigación fue el de evaluar los parámetros de la encapsulación de ingredientes activos, utilizando el aislado proteico de suero lácteo (WPI) modificado con carbohidratos (lactosa y galactosa), empleando tanto las técnicas de homogenización a alta presión como la del ultrasonido. Se utilizaron las condiciones de la reacción de Maillard para la preparación de las muestras; algunas de ellas fueron tratadas con calor a 80 °C x 20 min y/o el agregado de enzima tripsina 0,25% p/v de proteína. Se determinó el grado de hidrólisis proteica, grado de glicación, color, solubilidad proteica, actividad anti-radical (DPPH, Polifenoles), cantidad de proteínas, capacidad emulsificante y su estabilidad. Posteriormente se prepararon dos emulsiones como vehículo con las técnicas mencionadas, y a las muestras en estudio les fue agregado el compuesto d-limoneno. Se evaluó la estabilidad de las emulsiones por su índice de crema, capacidad de emulsificación (quick scan), tamaño de partícula, y capacidad de atrapar el ingrediente alimenticio por CG/MS. Igualmente se estudió la capacidad de formación de microesferas y de atrapamiento de diversos materiales con una muestra de albúmina de suero de bovino (BSA) (sin aplicar la reacción de Maillard), por la técnica de ultrasonido. Los resultados de la evaluación del material bajo la reacción de Maillard mostraron: grado de hidrólisis (máx. 12,61%), color desde el amarillo hasta el marrón dependiente de la temperatura, tiempo y carbohidrato, y disminución de la solubilidad proteica. La muestra conjugada WPI-galactosa (sin tratamiento de calor ni enzimático) presentó un grado de glicación de 39%. Las muestras WPI-T+E-Galactosa, WPI-Galactosa y WPI-T+E-Lactosa, presentaron una adecuada actividad anti-radical. La actividad emulsificante que se observó en las muestras disminuyó lentamente. Se observó inestabilidad en la crema formada en las emulsiones, migración de partículas y su separación gravitacional, con coalescencia. La muestra WPI-T+EL presentó capacidad de atrapamiento del d-limoneno (aprox. del 100%), en los sistemas. Los resultados para ambas técnicas fueron comparables. El material proteico, BSA, desarrolló microesferas con la técnica de ultrasonido, los parámetros potencia aplicada y pulso no fueron consistentes para su formación. **Palabras claves:** encapsulación proteica, reacción de Maillard, aislado proteico de suero lácteo, lactosa, galactosa, homogenización, ultrasonido, microesferas, BSA

Development of methods of encapsulation using whey protein isolate modified with sugars for the incorporation and protection of bio-ingredients in food systems.

Abstract

Encapsulation technology for diverse materials or unstable or sensitive ingredients consists in trapping these in a matrix or wall of a few micrometers. Currently there are many technologies used. The object of this research is to evaluate the parameters of the encapsulation of active ingredients using the whey protein isolate modified with carbohydrates (lactose and galactose) with the techniques of high pressure homogenization or ultrasound. With the Maillard reaction for the preparation of samples, some were heat treated at 80 ° C x 20 min and / or with the addition of 0.25% trypsin p_{xv} protein. The degree of protein hydrolysis, degree of glycation, color, protein solubility, antiradical activity (DPPH, Polyphenols), protein concentration, emulsifying index and stability were determined. After two emulsions were prepared as vehicles with the technique referred, limonene was added. The stability of the emulsions was evaluated by used of GC / MS for creaming index, emulsion capacity (quick scan), particle size and capacity of trapping the ingredient. The ability of microsphere formation and entrapment of various materials with a sample of bovine serum albumin (BSA) (without applying the Maillard reaction), was studied using the ultrasound technique. The results of evaluation of the material with the Maillard reaction showed: degree of hydrolysis (max. 12.61%), color (yellow to brownish, dependent on temperature, time and carbohydrates), and decreased protein solubility. The WPI-galactose conjugate sample (no heat or enzymatic treatment) showed a degree of glycation of 39%. The samples WPI-T+ E-Galactose, WPI-Galactose and WPI-T + E-Lactose, presented adecuated antiradical activity. Emulsifying activity of the samples decreased slowly, instability was observed in the cream formed in the emulsions and particle migration and gravity separation with coalescence. The WPI -T + EL present an entrapment capacity of d-limonene (approx. 100%), for both systems. The results for both techniques were comparable. The protein material, BSA, clearly developed microspheres with the ultrasound technique, the parameters pulse and power applied were not consistent in their formation.

Keywords: protein encapsulation methods, Maillard reaction, whey protein isolate, lactose, galactose, homogenization, ultrasound, food microspheres, BSA

RECONOCIMIENTO

Deseo expresar un reconocimiento muy especial a los Dres. Varoujan Yaylayan y Patrick Fustier quienes con sus valiosos aportes y asesorías hicieron posible la culminación satisfactoria de la presente investigación.

AGRADECIMIENTOS

A la UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA Y AL CONSEJO DE DESARROLLO CIENTÍFICO Y HUMANÍSTICO por su valiosa política de mejoramiento del Personal Docente y de Investigación que me permitió realizar mis estudios Doctorales, en pro de la Excelencia Académica.

A MCGILL UNIVERSITY y al FOOD RESEARCH AND DEVELOPMENT CENTER (CRDA) / AGRICULTURE AND AGRI-FOOD CANADÁ por permitirme realizar esta investigación en sus instalaciones, dándome todo el apoyo profesional, estratégico, materiales, implementos y equipo.

A los Profesores que laboran en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA) de la UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA por mi formación profesional, a la Facultad de Farmacia- UCV, por su apoyo.

Agradecimientos muy especiales a los Dres. Varoujan Yaylayan, Patrick Fustier, J.R. Jocelyn Paré, Hassan Sabik, Aloa Achouri, Ali Taherian, por sus valiosas asesorías y gran dedicación, conocimientos y experiencias, legado de muchos años de fructíferas investigaciones; contribución fundamental en el éxito de la investigación propuesta.

A la Dra. Alírica Suárez durante la fase primera de mis estudios. A las Dras. Elevina Pérez y Elizabetta Tomé, por todo su apoyo. Gracias por toda su colaboración.

A mis compañeros y amigos del CRDA y McGill University, Paula, Bárbara, Bao, Sahúl, Mohamed, Soraya, Chockry, Than, Carolina. A los de la UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA, en especial a Carlos Enrique y Elizabeth, a todos aquellos que fueron de una u otra forma co-partícipes de este trabajo, les estoy agradecida por darme su apoyo para convertir este proyecto en un hecho tangible.

Índice de Contenido

	Pag.
<i>Veredicto</i>	<i>ii</i>
<i>Resumen</i>	<i>iii</i>
<i>Abstract</i>	<i>iv</i>
<i>Reconocimiento</i>	<i>v</i>
<i>Agradecimientos</i>	<i>vi</i>
<i>Índice de Tablas</i>	<i>x</i>
<i>Índice de Figuras</i>	<i>xii</i>
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
II.I. Rol de la proteína (aislado proteico de suero lácteo, WPI) y la modificación de sus propiedades funcionales con carbohidratos (galactosa y lactosa)	6
II.I. I. Propiedades funcionales de las proteínas	6
II.I.II. Proteínas y Carbohidratos	14
II.I.III. Modificaciones de las proteínas	28
II.I.IV. Reacción de Maillard	32
II.I.V. Actividad antioxidante de los productos de reacción de Maillard	50
II.II. Estabilidad física y química del d-limoneno encapsulado en emulsiones preparadas con proteína aislada de suero lácteo (WPI) modificadas con azúcares	57
II.II.I. Emulsión Aceite: Agua	57
II.II.II. Estabilidad de las emulsiones	64
II.II.III. Encapsulación	68
II.II.IV. Estabilidad de un encapsulado	81
II.III. Metodología basada en ultrasonido para la encapsulación de compuestos	85

II.III.I.	Ultrasonido	85
III.	OBJETIVOS	103
III.I.	General	103
III.II.	Específicos	103
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS	105
IV.I.	Material	105
IV.I.I.	Productos de reacción de Maillard	105
IV.II.	Determinación de la hidrólisis de las proteínas tratadas con enzima tripsina	109
IV.III.	Determinación del grado de glicación: método de fluorescamina	111
IV.IV.	Evaluación del color de los productos de Maillard	112
IV.V.	Solubilidad proteica a pH 6,8	114
IV.VI.	Determinación de la actividad anti- radical	114
IV.VII.	Actividad antioxidante de polifenoles usando el sistema β -caroteno/ ácido linoleico	116
IV.VIII.	Determinación de proteínas	117
IV.IX.	Determinación de la capacidad de emulsificación	117
IV.X.	Desarrollo de la emulsión utilizando un homogenizador de alta presión	119
IV.XI.	Desarrollo de la emulsión utilizando ultrasonido	120
IV.XII.	Determinación de la degradación del d-limoneno en la emulsión aceite-agua	125
IV.XIII.	Índice de estabilidad de crema	127
IV.XIV.	Determinación de la estabilidad de la emulsión (Quick Scan).	128
IV.XV.	Tamaño de Partícula	130
IV.XVI.	Encapsulamiento utilizando una proteínas modelo (BSA) y una metodología basada en ultrasonido	133
IV.XVI.I	Material	133
IV.XVI.II.	Acondicionamiento de la muestra de BSA	133

IV.XVI.III.	Metodología de encapsulamiento con ultrasonido	134
IV.XV.	Estadística	137
V.	DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	138
V.I.	Productos del aislado proteico de suero lácteo	138
V.II.	Determinación del grado de hidrólisis de la proteína	143
V.III.	Determinación del grado de glicación de los productos. Método fluorescamina.	148
V.IV.	Formación de pigmentos marrones de los productos de reacción de Maillard.	152
V.V.	Determinación de la actividad anti-radical. Método 2,2- difetil-1-picrilhidrazil (DPPH-).	155
V.VI.	Determinación de la capacidad antioxidante. Método de polifenoles, sistema caroteno/ ácido linoleico	161
V.VII.	Capacidad emulsificante de los productos de la reacción de Maillard	162
V.VIII.	Solubilidad de la proteína a pH 6,8	167
V.IX.	Emulsiones de los productos en experimentación	171
V.X.	Emulsión obtenida con un equipo homogenizador de alta presión	178
V.XI.	Emulsiones obtenidas con ultrasonido	179
V.XII.	Índice de formación de crema de las emulsiones	184
V.XIII.	Estabilidad de la crema de las emulsiones	189
V.XIV.	Determinación del tamaño de partícula	193
V.XV.	Estabilidad de las emulsiones en experimentación.	197
V. XVI.	Determinación de la capacidad de retención del compuesto d-limoneno	205
V.XVII.	Obtención de microcápsulas de albúmina de suero de bovino (BSA)	213
VI.	CONCLUSIONES	224
VII.	ANEXOS	227
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	229

Índice de Tablas

Tablas	Pág
Tabla 1. Composición química proteica del Aislado Proteico de Suero Lácteo (WPI)	106
Tabla 2. Identificación de los productos iniciales procesados bajo la reacción de Maillard, tratamiento previo y carbohidrato adicionado	108
Tabla 3. Grado de Hidrólisis (GH) y grupos amino libres de proteínas (AN) (tripsina 0,25% conc.proteína)	145
Tabla 4. Valores Remanentes de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH %)	159
Tabla 5. Índice de actividad emulsificante ($m^2 \cdot g^{-1}$)	166
Tabla 6. Estabilidad de la emulsión	168
Tabla 7. Contenido de proteínas (6,38)	172
Tabla 8. Condiciones de trabajo del ultrasonido	172
Tabla 9. Valores del Índice de Crema Emulsión alta presión/ Ultrasonido (mL).	181
Tabla 10. Tamaño de partículas en muestras con tratamiento de Homogenización	190
Tabla 11. Tamaño de partícula en muestras con tratamiento de Ultrasonido	196
Tabla 12. Emulsión goma arábica, diámetro de partículas	196
Tabla 13. Condiciones de ultrasonido de la muestra BSA con interfases aire y decano	210
Tabla 14. Condiciones de ultrasonido, muestra BSA/decano y Benzaldehído	215

Tabla 15. Condiciones de la muestra BSA con interfase de aceite de canola y la adición de diversos compuestos 219

Índice de Figuras

Figuras	Pág
Figura 1. Formación de compuestos de Amadori Fuente: Meyer (1975)	34
Figura 2. Re-arreglo de Amadori Fuente:www.food-info.net	36
Figura 3. Acondicionamiento del material de trabajo	110
Figura 4. Espectrofotómetro Labscan tricromático VI-A30	113
Figura 5. Determinador de Proteínas LECO Instruments	118
Figura 6. Homogenizador Polytron	121
Figura 7. Homogenizador de alta presión Emulsiflex-C5	122
Figura 8. Muestras Homogenizadas por ultrasonido	124
Figura 9. Cálculo del índice de crema de las muestras	129
Figura 10. Reporte del (Back Scattering) de una emulsión	131
Figura 11. Tubos del equipo Quick Scan con muestras de experimentación	132
Figura 12. Cámara y equipo de ultrasonido	135
Figura 13. Equipo de ultrasonido, Model DMC750, Sonics	136
Figura 14. Curva estándar de ácido glutámico. Método OPA	144
Figura 15. Curva estándar WPI. Método fluorescamina	151
Figura 16. Pigmentación de los productos conjugados de Maillard. En orden descendiente: WPI-Lactosa, WPI-Galactosa, WPI+T-Lactosa, WPI+T-Galactosa, WPI+TE-Lactosa, WPI+TE-Galactosa Días en evaluación = 1,2,4,6	153
Figura 17. Valores de diferencia de cromaticidad (DE), de las muestras para el tiempo total de análisis. En orden: WPI-L, WPI-G, WPI+T-L, WPI+T-G, WPI+TE-L, WPI+TE-G.	156

Figura 18.	Curva estándar de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)	158
Figura 19.	Gráficos del sistema betacaroteno/ linoleíco. Evaluados en día 0 y 2.	163
Figura 20.	Gráficos del sistema betacaroteno/ linoleíco. Evaluados en día 0 y 2.	164
Figura 21.	Solubilidad proteica de las muestras a pH 6,8, en un tiempo total de seis días	169
Figura 22.	Emulsiones. I.Goma arábica; II. WPI; III. WPI-Térmico+Enzima-Lactosa;IV.WPI-Térmico +Enzima + Galactosa y V. WPI + Galactosa	175
Figura 23.	Tubos de quick scan, emulsiones de las muestras. En orden: I. Goma arábica (1%) (GA); II. WPI ; III. WPI+GA (1%); IV. WPI-T+E-Lactosa; V. WPI-T+E-Lactosa + GA (1%); VI. WPI-T+E-GA; VII. WPI-T+E-Galactosa+ GA (1%)	176
Figura 24.	Emulsión obtenida con ultrasonido	180
Figura 25.	Índice de Crema. Emulsión Homogenizador de alta presión. En orden: I. WPI, II. WPI+L, III. WPI+G, IV. WPI-TE+L, V. WPI-TE+G	185
Figura 26.	Índice de Crema-Emulsión Homogenizador de alta presión (21°C/60 días). En orden: I. AG, II. WPI, III. WPILTE, IV. WPIGTE, V. WPIG	186
Figura 27.	Índice de Crema-Emulsión Ultrasonido, WPI (21°C/1días)	186
Figura 28.	Índice de Crema-Emulsión Ultrasonido, WPILTE(21°C/1 días)	187
Figura 29.	Índice de Crema-Emulsión Ultrasonido, WPIGTE, WPIG (21°C/1 días)	187
Figura 30.	Tubos de quick scan En orden: I.WPI-G, II.WPIT+E-G, III.WPIT+E-L, IV. WPI, V. Goma Arábica	198
Figura 31.	Tubos de quick scan. En orden: I.WPI-G, II.WPIT+E-G, III.WPIT+E-L, IV. WPI con ultrasonido	198
Figura 32.	Perfil de % BS de la emulsión de WPI	200

Figura 33.	Perfil de % BS de la emulsión de ultrasonido WPI	200
Figura 34.	Perfil de % BS de la emulsión de Goma arábica (1%)	201
Figura 35.	Emulsiones obtenidas con homogenización a alta presión. En orden: I. AG (1%), II. WPI, III. WPI +AG (1%), IV. WPIT+E-L, V. WPIT+E-L + AG (1%), VI. WPIT+E-G, VII. WPIT+E-G + AG (1%)	203
Figura 36.	Perfil de % BS de la emulsión de WPI+GA (1%)	204
Figura 37.	Cromatograma de los estándares	207
Figura 38.	Degradación del Limoneno. Homogenización a alta presión	208
Figura 39.	Degradación del Limoneno. Ultrasonido	209
Figura 40.	Productos de degradación del d-limoneno (carvon y terpineol), en la emulsión de homogenización a alta presión	211
Figura 41.	Productos de degradación del d-limoneno (carvon y terpineol), en la emulsión de ultrasonido	212
Figura 42.	Micrográficas ópticas, arriba: muestra control, abajo: BSA/solución con decano como interfase, se observan microesferas (amplitud = 700µm).	216
Figura 43.	Micrografía óptica, se observan las microesferas de muestra BSA/decano con agregado de benzaldehído	220
Figura 44.	Micrografía electrónica (30kV X 5000), muestra BSA/decano con agregado de benzaldehído.	221

I.Introducción

La diversidad de alimentos alrededor del mundo, aunado a la globalización y estandarización, ha provocado un incremento en la producción, aparición de dietas mucho más simplificadas, novedosas, de mayor multiplicidad, y el reemplazo de aquellas presentaciones comunes, obsoletas o típicas. Este crecimiento mundial requiere transición, variedad, modificación, procedimientos y producción integral de los alimentos, usando para esto la denominada heterogeneidad en la fabricación, el mejoramiento continuo de la eficiencia y la tecnología, esperándose como resultado la obtención de una mayor disponibilidad de los mismos, y algunas veces bajos costos, asimismo ésta demanda de productos espera obtener sustitutos más competitivos, beneficios nutricionales, e idóneos. Así, esta conjuntamente diversidad humana existente, conocidos como nuevos consumidores, exigen además de atributos relevantes, desarrollo de productos más convenientes, novedosos, de fácil manejo, atractivos, nuevas dietas para consumo, significando esto en la actualidad una particular situación que debe ser abordada.

El área de la encapsulación proteica, técnica actual, podría dar respuestas a algunos de estos planteamientos, ésta consiste en atrapar materiales en

cápsulas de pocos micrómetros de tamaño, dando lugar a presentaciones con diversas e importantes aplicaciones. Los materiales ha atrapar, abarcan sabores, olores, fragancias, sistemas de liberación de drogas, agentes de diagnóstico médico. La técnica permite que ingredientes sensibles puedan ser físicamente envueltos por una matriz protectora o un material denominado “tipo pared”, como una manera de proteger o cubrir a éstos de reacciones adversas, pérdidas volátiles o deterioro nutricional (Hogan *y col.*, 2001). Incluye además, encapsular compuestos inestables dentro de una matriz estable, para prevenir la oxidación, u otros cambios químicos durante el almacenamiento, lograr programar la cesión del principio activo, cambiar algunas de las propiedades físicas con el fin de resguardarlo, hacerlo compatible de algún componente de la formulación, o proporcionar una cubierta a sustancias que sean fácilmente alterables (facilitar la estabilidad), modificar propiedades, enmascarar caracteres organolépticos y/o evitar que las sustancias se evaporen por ser volátiles.

La técnica data del año 1931, de la cual se publicó un trabajo relacionado a la formación de microcápsulas de gelatina y el procedimiento denominado “coacervación”, ha sufrido diversas variaciones tan sólo en el transcurso de los años 40 (Pedroza, 2002), luego de estos inicios se han desarrollado diferentes aplicaciones en el campo de la alimentación, como por ejemplo la

encapsulación de aromas, vitaminas, entre otros compuestos, y en la agricultura, especialmente encapsulación de pesticidas y fertilizantes (Doane y *col.*, 1977). Diversos métodos han sido propuestos para la producción de microcápsulas, los cuales pueden ser divididos en tres grupos: Procesos físicos: secado por aspersión, extrusión y recubrimiento por aspersión (Reineccius, 1991), procesos fisicoquímicos: como la coacervación simple o compleja y atrapamiento de liposomas y procesos químicos: polimerización interfasial e inclusión molecular (Madene y *col.*, 2006).

La selección del proceso que conlleve a la encapsulación, debe tomar en consideración el tamaño promedio de la partícula requerida, las propiedades fisicoquímicas del agente encapsulante, la sustancia a encapsular, así como la aplicación del material encapsulado, el mecanismo de liberación deseado y el costo. El producto resultante de la encapsulación recibe diferentes denominaciones que atienden a su morfología y estructura interna, existiendo como factor común el tamaño micrométrico. La obtención de un tipo de estructura u otro, dependerá conjuntamente de las propiedades mencionadas y del proceso tecnológico elegido. Por lo demás, las conocidas proteínas alimenticias, las cuales poseen propiedades funcionales, son de gran interés para los fabricantes de productos farmacéuticos, alimenticios y de cosméticos,

esto debido a que las mismas son influenciadas por su estructura molecular, sus interacciones inter e intra-molecular (McClements, 1995), modificadas por las condiciones del medio en donde se encuentren, por el método empleado en su obtención y por el origen del que provienen, y cuyas propiedades físico-químicas se derivan de su composición de aminoácidos, de la secuencia y el tipo de estructura (Pour-El, 1981), influenciando esto su consideración como un buen material para el encapsulamiento de ingredientes nutricionales, Conjuntamente existe la disposición de explorar las ventajas de la combinación de las proteínas e hidrocoloides como ingredientes funcionales, a través del desarrollo de complejos para ser utilizados como emulsificadores, estabilizadores o cubiertas, la interacción entre las proteínas y carbohidratos en los alimentos provocan una notable atención, esto atribuido a la naturaleza de la reacción, conocida como glicación proteica y la modificación de algunas de las propiedades funcionales de las proteínas que ocurre, luego de su conjugación. Esta combinación denominada glicación o glicosilación no enzimática, ocurre sin la presencia de enzimas, reacción descubierta por el químico francés L. Maillard en 1912 estudiando la pérdida de lisina (aminoácido esencial), en los alimentos conservados cuando éstos son ricos en proteínas y glúcidos (Maillard, 1912), siendo en la actualidad considerada de importancia en la industria alimentaria, ya que en muchos casos determinan la textura y

vida útil de productos alimenticios, y su funcionalidad comúnmente envuelve el control reológico del medio (Manzocco y Maltini, 1999).

De manera, que el objetivo de la presente investigación fué el de evaluar los parámetros de encapsulación de ingredientes activos utilizando el aislado proteico de suero lácteo modificado con carbohidratos (lactosa y galactosa) empleando las técnicas de homogenización a alta presión y ultrasonido, se aplicó las condiciones de la reacción de Maillard para la preparación de las muestras. Se determinó el grado de hidrólisis proteica, grado de glicación, color, solubilidad proteica y la capacidad emulsificante y estabilidad de las muestras preparadas. Posteriormente se prepararon dos emulsiones como vehículo de las muestras en estudio a las cuales les fue agregado el ingrediente d-limoneno, para evaluar así, la capacidad de atrapamiento del material y su estabilidad por la metodología escogida. Igualmente se estudió la capacidad de formación de microesferas y de atrapamiento de diversos materiales con una muestra de albúmina de suero de bovino (BSA) (sin aplicar la reacción de Maillard), utilizándose la técnica de ultrasonido.

II. Revisión bibliográfica

II.1. Rol de la proteína (aislado proteico de suero lácteo, WPI) y la modificación de sus propiedades funcionales con carbohidratos (galactosa y lactosa).

II.1.1 Propiedades funcionales de las proteínas

La funcionalidad de las proteínas se conoce como la expresión de sus propiedades físico-químicas, la cual afectará su comportamiento en los sistemas alimenticios, ya sea durante la preparación, proceso, almacenamiento o consumo, aportando características deseadas en el alimento (Badui, 1999). Pueden clasificarse en tres grupos principales: propiedades de hidratación (interacciones proteína-agua), propiedades dependientes de las interacciones proteína-proteína y propiedades interfaciales. El primer grupo incluye propiedades de absorción y retención de agua, adhesión, dispersibilidad, solubilidad y viscosidad. El segundo grupo interviene en fenómenos como precipitación, gelificación y formación de diferentes estructuras (fibras y pastas proteicas). El tercer grupo de propiedades se refiere a los cambios en la tensión superficial que afectarán la emulsificación y características espumantes de las proteínas. Estos grupos no son totalmente independientes pueden interrelacionarse; como ejemplo, la gelificación no solamente implica las

interacciones proteína-proteína, sino también a las interacciones proteína-agua; la viscosidad y solubilidad dependen, una y otra de las interacciones proteína-agua y de las proteína-proteína (Cheftel *y col.*, 1989).

Estas propiedades están relacionadas con los aspectos químicos básicos (Cheftel *y col.*, 1989), y debe tenerse en cuenta que en la preparación de ciertos productos, son expuestas a tratamientos importantes provocando que su estructura y funcionalidad inicial se vean afectadas. Sus cadenas polipeptídicas (moléculas proteicas) se encuentran estabilizadas por numerosas interacciones, tales como fuerzas hidrofóbicas, puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas que les proporcionan una disposición espacial y una orientación de las cadenas laterales de los aminoácidos constitutivos, así como también de propiedades funcionales especiales. Se ha tratado de determinar y explicar, el comportamiento funcional, pero la complejidad de los diversos sistemas alimenticios, aún no permite comprender de forma clara como una estructura proteica concreta condiciona la propiedad funcional del alimento, la dificultad surge por el hecho de que frecuentemente, la estructura inicial de la proteína se modifica, cuando el ingrediente proteico o la proteína alimenticia se transforma en el complejo alimenticio final (Cheftel *y col.*, 1989).

Las principales propiedades funcionales más comunes: solubilidad, viscosidad, retención de agua y aceite, emulsificación y formación de espuma (Kinsella y Whitehead, 1989), son afectadas por la temperatura, la tasa de calentamiento, tiempo y tipo de calentamiento (Zayas, 1997; Boyer *y col.*, 1997; citado por Hayta *y col.*, 2002). Además, la solubilidad proteica, depende fundamentalmente del pH, fuerza iónica, tipo de solvente y temperatura, siendo influenciada por su composición y secuencia de amino ácidos, peso molecular, conformación y contenido de grupos polares y no polares, capacidad de retención de agua, ésta última se debe principalmente a la facilidad con que interacciona con el agua a través de puentes de hidrógeno, muchas de las propiedades funcionales están relacionadas a ésta interacción, la cual determina funciones como: retención y enlace de agua, hinchamiento, solubilidad, propiedad emulsificante, viscosidad, gelificación y sinéresis (Cheftel *y col.*, 1989). La solubilidad, bajo ciertas condiciones, da un indicio de las aplicaciones potenciales de las proteínas (Cheftel *y col.*, 1989), un producto soluble, es más fácil de incorporar, que uno insoluble; así, las proteínas con baja solubilidad tendrán un uso restringido en la elaboración de productos alimenticios (Kinsella, 1979).

Las condiciones del medio en donde se encuentren, las modifican, ya sea por

el método empleado para su obtención, el origen del que provienen, conociéndose, que las propiedades físico-químicas que presentan se derivan de la composición de aminoácidos, secuencia y tipo de estructura: primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria (Pour-El, 1981). Así, la capacidad de formación de enlaces dependerá de la composición y conformación de la molécula proteica. El índice de retención de aceite, por ejemplo, dependerá del tipo de alimento donde se encuentre, y tendrá influencia sobre la textura, calidad y propiedades del alimento, absorber o retener grasas e interactuar con los lípidos en emulsiones, siendo de sumo interés en las formulaciones alimenticias.

Venktesh y Prakash (1993), señalan, que las proteínas alimenticias, sufren durante su preparación y empleo, una infinidad de tratamientos ya sea físico o químico, si los tratamientos son moderados, pueden originar modificaciones en la conformación, mientras que los energéticos, inciden y actúan sobre la estructura, afectando adversamente las propiedades funcionales de las mismas. Entender las variaciones que ocurren en las propiedades funcionales como resultado del tratamiento térmico podría ayudar a mejorar la utilización las proteínas para usos específicos.

Muchos de los procesos usados para la extracción de harinas, concentrados, y aislados a partir de semillas, causan desnaturalización alterando sus propiedades funcionales, igualmente la presencia de otros compuestos en el medio como carbohidratos, lípidos, fibra, entre otros, pueden influenciar las propiedades funcionales de las proteínas (McWatters y Cherry, 1977).

De acuerdo con Carbonaro *y col.*, (1997); Derich (1982); citado por Meng y Ching-Yung, (2002), los tratamientos térmicos de los alimentos normalmente además de ocasionar cierta desnaturalización, provocan la reducción de sus funciones. Las estructuras secundarias, terciarias o cuaternarias de proteínas se desorganizan dependiendo de la temperatura y tiempo del tratamiento térmico aplicado. En el caso de emulsiones de huevo se ha determinado que la pérdida de ésta capacidad depende de la temperatura del calentamiento utilizado, del tiempo y de la interacción que ocurre entre estos efectos (Chung y Ferrier, 1995). Se ha encontrado que el tratamiento con calor disminuye marcadamente la solubilidad proteica, en leguminosas, probablemente debido a la desnaturalización y subsiguiente agregación proteica. Durante la desnaturalización térmica de proteínas globulares, se ha observado la exposición de sus residuos hidrofóbicos, conduciendo esto al aumento de la superficie hidrofóbica (Kato y Nakai, 1980; citado por Meng y Ching-Yung,

2002), con un fuerte calentamiento, estos grupos expuestos pueden verse envueltos en interacciones que dan lugar a la formación de un agregado. Según, los autores Venkatesh y Prakash, (1993), los cambios en las propiedades de las proteínas como resultado del calentamiento o aplicación de presión, pueden deberse a la modificación en la asociación-disociación y/o desnaturalización de las mismas, así como en las propiedades de superficie, densidad de carga y propiedades de hidrofobicidad. Todos estos cambios dan como resultados una significativa modificación del perfil de solubilidad de la proteína además de cambios en la funcionalidad de la misma.

Kinsella y Whitehead, (1989), indican, que las proteínas de suero lácteo, en particular la β -lactoglobulina (β -Lg), ha sido ampliamente usada en la tecnología de alimentos debido a las propiedades funcionales que presenta tales como, gelificación, capacidad de formación de espuma y características de emulsificación. La desnaturalización térmica de la β -Lg, la cual ocurre en un proceso de dos etapas, el desplegamiento de la proteína globular nativa, y la subsiguiente agregación de los oligómeros a través de reacciones de intercambio tiol-disulfuro, son de particular importancia por su funcionalidad, y su uso como ingrediente alimenticio en numerosos productos.

Durante el calentamiento o almacenamiento de productos lácteos, un número significativo de residuos de lisina son modificados, mediante uniones covalentes con lactosa formándose los denominados productos de reacción de Maillard (glicosilación no enzimática o glicación) (Henle, 2005). El impacto de esta reacción sobre las propiedades funcionales de las proteínas ha sido ampliamente estudiada (Mulsow *y col.*, 2009), y la mayor parte de éstas influyen sobre el carácter sensorial del alimento. De manera que se ha señalado, que el poseer estas propiedades, las convierten en un buen material de revestimiento para el encapsulamiento de ingredientes alimenticios (Shahidi *y Han*, 1993), además, por sus propiedades químicas y fisicoquímicas, el arreglo de los diferentes grupos químicos, propiedades anfifílicas, capacidad de asociación e interacción con una gran variedad de sustancias, amplios pesos moleculares, flexibilidad de la cadena molecular, así como sus excelentes propiedades de solubilidad, viscosidad, emulsificación y formación de película (Kim *y col.*, 1996). El conocimiento de la funcionalidad de la proteína, puede ser obtenida cuando el constituyente proteico del sistema teórico a ensayar es una proteína única, purificada y de estructura natural conocida, sin embargo, la mayor parte de los ingredientes proteicos disponibles para uso industrial, son mezclas de proteínas las cuales contienen apreciables cantidades de otros compuestos como: carbohidratos, lípidos, sales minerales, polifenoles.

Pedroza, (2002), señala que las proteínas aisladas del suero de leche, se han usado previamente para la formación de paredes de microcápsulas, utilizándose la técnica del secado por aspersión. Resultando ser adecuadas para este proceso, debido a que aún en altas concentraciones producen una baja viscosidad, alta capacidad emulsificante, generando microcápsulas de tamaño tan pequeño como $< 2 \mu\text{m}$, además estos péptidos pueden utilizarse solos o combinados con carbohidratos para modificar las propiedades de la pared y el tamaño de las partículas. El uso de proteínas de suero de leche puede tener efecto sobre la morfología de las microcápsulas haciéndolas más esféricas y de suave superficie al ser comparadas con las producidas por mezclas de galactomananos, xiloglucanos, pectinas y quitosanos, y con sacáridos. Los galactomananos y xiloglucanos, derivados de goma guar, a menudo han sido usados como modelos de polisacáridos y oligosacáridos, debido a que en la actualidad han sido bien caracterizados, siendo su presencia favorable, para el mencionado uso, asimismo actúan como espesantes, enlazantes, y agentes estabilizantes en los alimentos. Estos polisacáridos tienen un residuo reactivo, un grupo carbonilo al final de la cadena, el cual es fácilmente atacado por el grupo ϵ -amino de las proteínas (Kato, 2002).

II.I.II. Proteínas y Carbohidratos

Las interacciones entre las proteínas y los carbohidratos en los alimentos, han provocado una atención considerable a través del tiempo, esto se atribuye a la naturaleza de las reacciones de la glicación proteica y a la modificación de algunas de las propiedades funcionales que presentan las proteínas luego que han sido conjugadas con carbohidratos.

Estos biopolímeros (proteínas y polisacáridos) son considerados ingredientes funcionales esenciales, los cuales en algunos casos determinan la textura y la vida útil de una gran cantidad de productos alimenticios. Comúnmente la funcionalidad de estos, comprende el control reológico localizado en medios acuosos, causado ya sea por la agregación y/o gelificación (Manzocco y Maltini, 1999).

Badui (1999), ha señalado que las proteínas, conocidas como compuestos de superficies activas, pueden funcionar como agentes emulsificantes efectivos, esto debido que al ser compuestos identificados como poli-electrólitos, le imparten una estabilidad coloidal a la emulsión, por la combinación de mecanismos electrostáticos y esféricos. Por otro lado, los carbohidratos, por

evaluación de su comportamiento, poseen propiedades que afectan las características del alimento conjuntamente con las denominadas propiedades sensoriales, así los diferentes usos que presentan los azúcares, están basados en las propiedades derivadas de su estructura química, donde se observan un gran número de hidroxilos altamente hidrófilos, los cuales poseen la capacidad de hidratarse y formar puentes de hidrogeno, generalmente aportando dulzor, capacidad espesante y/o de gelificación, propiciando reacciones de oscurecimiento y de fermentación, inhibiendo el crecimiento microbiano, confiriendo viscosidad y textura a los alimentos, (tales como son la inversión de la sacarosa, cuya cristalización influye en la textura), higroscopicidad, solubilidad, estado amorfo, estados vítreos (Bohinski, 1978). El análisis químico de los carbohidratos evidencia el contenido de carbono, hidrógeno y oxígeno, y la presencia en algunos de nitrógeno y azufre, comportándose como compuestos no hidratados. En la actualidad, el nombre de carbohidratos es utilizado para designar una clase de compuestos que son aldehídos o cetonas polihidroxiladas, o sustancias capaces de producir estos compuestos por hidrólisis, incluyendo azúcares, almidones, celulosa, y otros compuestos, solubles en agua. Son clasificados de acuerdo a la cantidad de carbonos presentes o por el grupo funcional que ésta adherido, pueden sufrir reacciones de esterificación, aminación, reducción, u oxidación, lo cual le otorga a cada

estructura una propiedad específica. La fórmula química general de un monosacárido no modificado se conoce como $(\text{CH}_2\text{O})_n$, donde n es cualquier número igual o mayor a tres. Poseen un grupo carbonilo en uno de los átomos de carbono y grupos hidroxilo en el resto, por lo que pueden considerarse polialcoholes, clasificándose de acuerdo a tres características diferentes: la posición del grupo carbonilo, el número de átomos de carbono que contiene y su quiralidad, los monosacáridos más pequeños poseen tres átomos de carbono. Los disacáridos ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) son glúcidos formados por dos moléculas de monosacáridos, que al ser hidrolizados producen dos monosacáridos libres, siendo éstos unidos mediante un enlace glucosídico (covalente), los cuales luego de una reacción de deshidratación producirán la pérdida de un átomo de hidrógeno de uno de los monosacárido y un grupo hidroxilo del otro monosacárido, con la formación de una molécula de agua (Bohinski,1978).

La galactosa, ejemplo de monosacárido, se encuentra formada por seis átomos de carbono, denominada hexosa, es convertida a glucosa en el hígado con aporte energético, formando parte de los glucolípidos y glicoproteínas de las membranas celulares. Desde el punto de vista químico es una aldosa, debido a que presenta un grupo químico funcional identificado como un aldehído (CHO) ubicado en el primer carbono. Al igual que la glucosa, la galactosa es una

piranosa ya que teóricamente puede derivarse un anillo de seis lados formado por 5 átomos de carbono y 1 de oxígeno, llamado píranos (Bohinski, 1978).

Otro carbohidrato, la lactosa, conocido disacárido, consiste de fragmentos de galactosa y glucosa enlazados por un enlace glicosídico β -1 \rightarrow 4, cuyo nombre sistemático es β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)-D-glucosa, y donde el fragmento de glucosa puede estar en la forma α -píranos como en la de β -píranos, mientras que el de galactosa puede tener solo la forma β -píranos, de aquí se deduce que la α -lactosa y β -lactosa se refieren a las formas anoméricas solo del anillo glucopiranososa, así, se encuentran dos configuraciones, las cuales dependen de la forma del cierre del anillo de la glucosa, la α -lactosa y la β -lactosa, encontrándose éstas en equilibrio (Bohinski, 1978).

El equilibrio entre las dos formas de la lactosa es considerado de importancia, ya que la α -lactosa y la β -lactosa difieren en muchas de sus propiedades, siendo la más obvia, desvían en distinto ángulo el plano de giro de la luz polarizada. Las dos formas isoméricas, la α - y la β -, difieren en la configuración por el grupo hidroxilo en la posición uno de la glucosa, por otro lado, en soluciones acuosas, (α - y β -) existen en equilibrio con aproximadamente el 63% de la lactosa en la forma β - , a temperatura ambiente (Badui, 1999).

Desde el punto de vista tecnológico, se afirma que la presencia de la lactosa favorecerá resultados considerados beneficiosos en el sistema donde esté presente, además puede ser fácilmente separada de la leche o suero, en una forma mas o menos pura y utilizada como ingrediente en los alimentos para consumo humano y de animales, en preparaciones farmacéuticas, y como precursor de sustancias bioactivas lactosa-derivados, con aplicaciones en la industria (Schaafsma, 2008). Es considerado un disacárido único, obtenido exclusivamente de la leche de mamíferos; y debido a que el carbono anomérico de su glucosa se encuentra en estado libre, este disacárido presenta características de azúcar reductor (Badui, 1999).

Vega y Ross, (2006), señalan que la lactosa, presenta muchas características de un encapsulante ideal (no emulsificante), relativamente de suave sabor, solubilidad adecuada, del cual se pueden obtener soluciones de concentraciones de baja solubilidad, sin embargo es raramente usada sola como encapsulante, y siendo a menudo utilizada en combinación con proteínas lácteas.

De acuerdo con Bangs y Reineccius (1988), citados por Kagami *y col.*, (2003), los carbohidratos por sí solos no suelen ser utilizados como materiales tipo

“pared” o de recubrimiento con ausencia en el sistema de un constituyente de recubrimiento de superficie-activa, debido a que generalmente no poseen propiedades emulsificantes, sin embargo, la incorporación de carbohidratos en formaciones de sistemas tipo "pared" han mostrado favorecer las propiedades de secado de la matriz, esto probablemente por la formación de una corteza alrededor de las partículas (Sheu y Rosenberg, 1995; Kagami *y col.*, 2003). Tomándose en cuenta adicionalmente que las proteínas e hidrocoloides poseen propiedades intrínsecas que modifican su capacidad de interacción con el agua, pequeños iones, macromoléculas, presentes en la fase dispersa, y diversos factores pueden afectar la capacidad de una proteína para funcionar como microencapsulante conjuntamente con el carbohidrato presente, como son la concentración, proporción de la dispersión, solubilidad de las fases, condiciones del procesamiento con respecto al tipo de homogenizador y presión utilizado, propiedades del material que será encapsulado. Otros factores (Kim *y col.*, 1996) también son señalados, como el control de la capacidad para interactuar: enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, interacciones electrostáticas y dipolares, asociación hidrofóbica, formación de enlaces covalentes disulfuros que afectarán sus propiedades de emulsificación, además de temperatura, pH, composición iónica, fuerza iónica, proporciones de las fases dispersa y dispersante, identificándose que determinan la

capacidad de la proteína y del hidrocoloide para su funcionamiento como emulsificadores.

En las glicoproteínas o proteínas conjugadas con carbohidratos, la unión que imparte a éstas, características o funciones especiales, son de dos clases, *N*-ligando y *O*-ligando, refiriéndose esto al sitio de unión covalente de las estructuras del azúcar. Los azúcares unidos al *N* se unen al nitrógeno amida del grupo-R de la asparragina por ejem; los azúcares unidos al *O*- se unen a los grupos hidroxilo de serina o de treonina y ocasionalmente al grupo hidroxilo de un aminoácido modificado, hidroxilisina (Badui, 1999). Así, la conjugación de compuestos proteicos con moléculas pequeñas de carbohidratos, como glucosa y lactosa, a temperaturas que han sido controladas sin la presencia de humedad, muestran la capacidad de éstos de reaccionar con la mayoría de los residuos lisil expuestos, formando agregados insolubles debido a una reacción progresiva y colateral, encontrándose que los conjugados proteicos con mono- y oligosacáridos pueden mejorar la solubilidad en los primeros pasos de la reacción. Se ha observado, que las propiedades funcionales de las proteínas, mejoran con la conjugación, considerándose esto positivo con polisacáridos, pero no así con los oligosacáridos, aunque siendo igualmente deseables las conjugaciones entre éstos polímeros para aplicaciones industriales. La

contaminación de las mezclas con oligosacáridos, debe ser removida de las preparaciones con polisacáridos, de acuerdo con Kato (2002), igualmente, se ha señalado que algunos glicoconjugados, obtenidos en un medio "seco", tienen la ventaja potencial de presentar una mayor estabilidad, una tasa rápida de reacción por la concentración de los reactantes, facilidad en el manejo del almacenamiento al ser comparados con aquellos preparados con métodos en medio húmedos (Oliver *y col.*, 2006a).

Dickinson, (2009), del mismo modo, considera, que los complejos de proteínas y carbohidratos presentes en formulaciones alimenticias interaccionan de formas diferentes de acuerdo a las respectivas estructuras químicas, temperatura y al resto de la composición, éstas interacciones pueden ser atractivas o repulsivas, débiles o fuertes, y específicas o no específicas. La formación de complejos proteína-polisacárido estables frente a las diferentes condiciones del medio (pH, contenido en sales, azúcar, otros) requieren la formación de enlaces covalentes, normalmente luego de un tratamiento térmico controlado, y en condiciones de baja actividad de agua (Muñoz *y col.*, 2007). Estas interacciones han sido el interés de numerosos autores en diferentes sistemas y especialmente en la formación de emulsiones y coloides (Nasirpour *y col.*, 2006).

Muñoz *y col.*, (2007), discuten, que la existencia de las fuertes interacciones proteína-polisacárido sugieren la presencia de enlaces covalentes o de fuerzas electrostáticas atractivas, y ocurren entre proteínas cargadas positivamente (a $pH < pI$) y polisacáridos aniónicos, sobre todo con una fuerza iónica baja, pudiéndose provocar la formación de co-precipitados insolubles de ambos biopolímeros, además de indicar que las claves para la formación y obtención de complejos solubles no están suficientemente resueltas.

Por otro lado, Aiqian, (2008), afirma que diversas investigaciones han sido llevadas a cabo para la obtención y formación de complejos entre proteínas lácteas y polisacáridos, donde sus propiedades y aplicaciones podrían estar relacionadas al posible uso de estos en la industria de alimentos. Donde, la formación de los complejos entre estos materiales a través de interacciones electrostáticas dan lugar a complejos solubles en soluciones estables, pero igualmente a complejos insolubles, observándose una separación de fases, así señala, que la formación y la estabilidad de estos complejos se ven influenciados por el pH, fuerza iónica, la relación proteína-polisacárido, densidad de carga de las proteínas y polisacáridos, como de las condiciones del proceso entre estos, la temperatura y tiempo. Así, las propiedades funcionales de las proteínas de la leche, tales como solubilidad, actividad de

superficie, estabilidad conformacional, capacidad de formación de gel, propiedades emulsionantes y propiedades de la espuma, se ven favorecidas a través de la formación de estos complejos con polisacáridos, y los cambios en las propiedades funcionales en muchos casos favorecen la creación de nuevos ingredientes para la industria alimentaria. Las proteínas del suero lácteo se consideran las más ampliamente usadas comercialmente como emulsificadores y estabilizadores en la industria alimenticia, debido a la presencia de la más abundante proteína en el suero, la β -lactoglobulina (β -Lg) que le da sus características.

Funtenberger *y col.*, (1995), mencionan que la funcionalidad del aislado proteico de suero, se refleja por la presencia de la proteína globular y anfifílica, β -lactoglobulina (β -Lg), la cual presenta la habilidad de permanecer en las interfases agua-aceite y aire-agua, contribuyendo a la formación de una baja tensión interfacial, y a la formación y estabilización de la película. La proteína se desplegará parcialmente en la interfase, formando asociaciones intermoleculares, del tipo de interacciones hidrofóbicas o puentes de S-S. La α -Lactoalbúmina (α -La), la segunda proteína del suero proteico mas abundante, posee también propiedades emulsificantes y estabilizantes, participando

conjuntamente con la β -Lg en la formación de puentes de S-S y de la película en la interfase (Schokker *y col.*, 2000; Bouaouinaa *y col.*, 2006)

Se han evaluado el comportamiento de glicoconjugados obtenidos a partir de caseinatos, los mismos mostraron un aumento de la viscosidad en el sistema, resultando esto favorecido en primer lugar por la unión a la glucosa, luego con la fructosa y lactosa, siendo comparados los resultados con muestras de caseinatos no modificados. El tiempo de las reacciones de caseinato-glucosa y caseinato-ribosa, ocurrieron con una mayor rapidez que las de los caseinato-fructosa y caseinato-lactosa, deteniéndose la reacción luego de transcurrido 24h de experimentación, notándose que a diferencia de las proteínas globulares como la β -Lg, los caseinatos, poseen una conformación abierta con una pequeña estructura secundaria, lo que la hace reaccionar más rápidamente con los azúcares reductores (Oliver *y col.*, 2006a), además se ha encontrado que los carbohidratos como glucosa, ribosa, fructosa, lactosa, fructo-oligosacárido, una mezcla de inulina y fructosa, conjugados con caseinatos, a través de la reacción de Maillard mejoran las propiedades funcionales de la proteína, siendo utilizados como productos alimenticios, y observándose que la viscosidad del caseinato se vio fuertemente aumentada por la conjugación. En cuanto a las propiedades de emulsificación, los

glicoconjugados evaluados se comportaron de manera similar al caseinato control, presentando al inicio una baja estabilidad, la glicación no afectó las propiedades emulsificantes de la proteína, en este estudio (Oliver, *y col.*, (2006b).

Las proteínas que contienen enlaces disulfuros (SS), de acuerdo con Sun *y col.*, (2005), mantienen un alto orden estructural, mostrando una mayor sensibilidad a la digestión, el conocimiento de las modificaciones en la secuencia proteica es de importancia debido a que esto afectará las propiedades funcionales y nutricionales de la proteína (Sun *y col.*, 2005).

La evaluación de los diversos métodos para mejorar las propiedades funcionales y fisicoquímicas, así como la modificación de proteínas lácteas, ha mostrado que muchos de estos métodos, utilizan productos químicos tóxicos, los cuales se sugiere no deben ser usados en el procesamiento de alimentos (Chevalier *y col.*, 2001a). Se ha discutido ampliamente, el interés en explotar las ventajas de la combinación de proteínas e hidrocoloides como ingredientes funcionales, de acuerdo al desarrollo de diversos complejos, y su función como emulsificadores y estabilizadores (Dickinson y Galazka, 1991; Kovakova *y col.*, 2009), los componentes proteicos y polisacáridos pueden asociarse conjuntamente ya sea por enlaces covalentes o por interacciones

electrostáticas, como ya se ha discutido, y el tipo de enlace covalente que liga la proteína a un polisacárido puede ser obtenido por varios caminos, una química directa para obtener híbridos, como la gelatina–pectina unidos por enlaces amidos, e incubación de la mezcla altamente metoxilada bajo condiciones alcalinas (Diftis y Kiosseoglou., 2003). O la conjugación obtenida enzimáticamente, usando enzimas tipo peroxidasas para conjugar la β -caseína, o enzima transglutaminasa para conjugar el caseínato de sodio a la goma arábica. Sin embargo, probablemente el método de conjugación mas conveniente es simplemente el calor seco de una mezcla de proteína y polisacárido (Dickinson y Galazka, 1991; Oliver *y col.*, 2006). La temperatura seca, sin presencia de humedad, induce la conjugación y tiende a mejorar la solubilidad y estabilidad de la proteína en condiciones desfavorables, bajos pH y alta fuerza iónica, resultando esto beneficioso para las propiedades de emulsificación proteica (Oliver *y col.*, 2006a).

La evidencia de que las proteínas conjugadas con azúcares reductores en calor controlado, mejoran las propiedades funcionales de la proteína, han sido evaluadas, pero el conocimiento fundamental de la química y su optimización para producir estos productos deseables y especiales, ha hecho necesario promover su manufactura y utilización de los conjugados de Maillard así como

evaluar el valor adicional que como ingrediente alimenticio presenta (Oliver y *col.*, 2006b). La aceptación de estos conjugados tipo-Maillard como ingredientes funcionales y su aplicación en una variedad de alimentos ha sido amplia. Debido al enlace producido, el conjugado resultante se ha observado más activo de superficie que los polisacáridos por sí solos; el conjugado es capaz de lograr una saturación en la capa superficial aún a baja concentración. Debido al enlace covalente con el polisacárido, la proteína absorbida en la capa es protegida de una desestabilización bajo las condiciones ambientales que les sean desfavorables, como el calentamiento, pH bajo, altas concentraciones de electrolitos, entre otros. El mayor tamaño e hidrofiliidad del polisacárido genera en el medio una repulsión estérica entre las gotas de la emulsión en la superficie. Otros autores indican que la fuerte asociación de una amplia parte del polisacárido (>5–10 kDa) a una proteína absorbente, puede otorgar suficiente estabilización estérica adicional, para lograr una superficie de interacción atractiva bajo condiciones desfavorables de pH y/o fuerza iónica (Dickinson, 2009).

La modificación de algunas propiedades físicas (carga hidrofílica, viscosidad) pueden explicar los cambios funcionales que son observados en las proteínas glicadas. El mejoramiento en la solubilidad y la exposición de nuevas regiones hidrofóbicas en la superficie de las proteínas modificadas favorecen su

absorción en la interfase, por lo tanto su capacidad emulsificante, además, la estructura del carbohidrato puede orientarse en la fase acuosa, inhibiéndose la floculación de las gotas de aceite por repulsión electrostática (Moreno *y col.*, 2002). Autores como Dickinson y Galazka, (1991), concluyen que los compuestos proteína-polisacáridos que son usados para obtener una emulsificación no deben contener polisacáridos libres o débilmente acomplejados, debido a que esto puede disminuir o afectar los resultados del complejo proteína-polisacárido absorbidos en la superficie de las gotas, favoreciendo la coalescencia, por reducción de la estabilidad de la crema (separación del suero), o a través de la floculación o un posiblemente entrecruzamiento (Dickinson y Galazka, 1991).

II.I.III. Modificaciones de las proteínas

Las principales estrategias que han sido usadas para modificar las proteínas, son las modificaciones químicas, el tratamiento con calor, y la modificación enzimática. Las modificaciones químicas envuelven acetilación o succinilación de proteínas con ácidos anhidros, fosforilación, lipofilización, glicosilación (mencionada previamente), tiolación, alquilación reductiva y ataque covalente de amino ácidos. Muchas de estas modificaciones químicas ocurren al ser

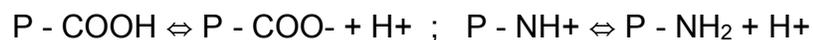
modificada la carga neta de la proteína por sustitución del grupo ϵ -amino, el cual influenciará la solubilidad proteica. Sin embargo, un cambio en la solubilidad no siempre resulta ser un cambio favorable para las otras propiedades funcionales. Por otro lado, las modificaciones químicas de las proteínas alteran su digestibilidad, efecto no deseado en la comercialización por el incremento de los costos, uso de químicos, necesidad de control de la reacción, como la espera de la aceptabilidad por consumidores y agencias regulatorias (Cheftel *y col.*, 1989).

Wang *y col.*, (2008), manifiestan que en las modificaciones proteicas que utilizan enzimas, los factores que afectan las hidrólisis proteicas son: la especificidad enzimática, extensión de la desnaturalización proteica, sustrato y concentración enzimática, pH, fuerza iónica, temperatura y, ausencia o presencia de sustancias inhibitorias. La especificidad de una enzima es un factor clave, se ve influenciada por el número y la posición de la unión del péptido que es hidrolizado. La proteólisis puede ocurrir en cualquier secuencia, liberando un péptido a la vez, o a través de la formación de intermediarios los cuales son completamente hidrolizados a péptidos mas pequeños, continuando el proceso proteolítico, el cual es denominado "mecanismo de cierre".

La extensión de la proteólisis se identifica y cuantifica como el grado de hidrólisis (GH), entendiéndose como el porcentaje de enlaces peptídicos hidrolizados. La hidrólisis puede ser limitada o controlada, aunque la razón de esto no ha sido claramente definida, debido a que está relacionada a la extensividad de la proteína. La aparición o desarrollo de cierto amargor, puede ocurrir debido a la acumulación de péptidos de bajo peso molecular que contienen amino ácidos hidrofóbicos, pudiéndose resolver, por selección o por adición de proteasas específicas capaces de “eliminar acidez” del hidrolizado. La hidrólisis de proteínas está acompañada de tres distintos efectos: 1. disminución del peso molecular, 2. aumento del número de grupos ionizables, y 3. exposición de grupos hidrofóbicos, se considera que el cambio en las propiedades funcionales de una proteína es el resultado directo de estos efectos. Las enzimas proteolíticas grado alimenticio, pueden ser de origen animal, bacterial, fúngico, o vegetal, tener diferentes pH y temperatura óptimas, e hidrolizarán una variedad de enlaces peptídicos, una amplia variedad de péptidos son generados dependiendo de la especificidad de la enzima, condiciones ambientales y extensión de la hidrólisis provocada. La proteína hidrolizada resultante contendrá péptidos de bajo peso molecular así como péptidos de alto peso molecular además de proteínas no hidrolizadas (Panyam y Kilara, 1996).

La hidrólisis enzimática de proteínas es un proceso que transcurre a través de un conjunto de etapas en serie: *proteínas* \Rightarrow *proteosas* \Rightarrow *peptonas* \Rightarrow *péptidos* \Rightarrow *aminoácidos*. Cada una de estas especies intermedias, se diferencian básicamente de las otras en su solubilidad, correspondiente tamaño molecular promedio, y relación nitrógeno amino / nitrógeno total, de acuerdo con Guadix y col., (2000). La proteasa (enzima) actuará sobre el enlace peptídico, rompiéndolo y liberando el grupo amino y el grupo carboxilo según la siguiente ecuación: $P - CO - NH - P + H_2O \Rightarrow P - COOH + P - NH_2$.

Los grupos amino y carboxilos formados tras la hidrólisis pueden estar parcialmente ionizados, dependiendo del pH en el proceso de hidrólisis, y según los siguientes equilibrios:



Por otro lado, se estiman que los valores de pK a 25 °C para los grupos -COOH y + H₃N- en los polipéptidos están comprendidos entre 3,1 - 3,6 y 7,5 - 7,8 respectivamente. Por lo que para pHs menores de 3,1 - 3,6, el grupo ácido estará parcialmente disociado y el grupo amino totalmente protonado, si no es controlado el pH en esta zona, aumenta rápidamente. Si se trabaja al pH > 7,5 - 7,8, el grupo carboxilo estará totalmente disociado y el amino parcialmente protonado, lo que conllevaría a una disminución continua del pH, señalándose que la hidrólisis proteolítica no es una sola reacción, sino que se trata de un

conjunto de reacciones simultáneas de ruptura de enlaces, con distintas especies cargadas en equilibrio, lo que dará una gran complejidad a estos procesos (Guadix *y col.*, 2000).

Otra modificación proteica, de interés en la industria alimenticia, de tipo no enzimática, es denominada reacción de Maillard o glicación, donde los azúcares reductores provocan la alteración de las proteínas mediante una glicosilación no enzimática. Los azúcares reductores reaccionarán no enzimáticamente con grupos amino de residuos Lys expuestos de la cadena proteica, esta adición (del azúcar reductor), provocará una extensa reacción de deshidratación y oxidación, conduciendo a especies altamente reactivas, las cuales explican las diferentes funcionalidades y reactividades exhibidas por este tipo de producto. La glicación proteica se inicia por la reacción de condensación entre el grupo terminal α -amino, o el grupo ϵ -amino de la lisina, de los residuos proteicos, y el grupo α -hidróxicarbonilo del azúcar reductor o sacárido.

II.I.IV. Reacción de Maillard

La reacción de Maillard, envuelve la formación de pigmentos marrones, y consiste en la condensación el grupo carbonilo de un azúcar reductor, (aldehídos o cetonas) y un grupo amino libre, de aminos ácidos, péptidos, proteínas o cualquier compuesto nitrogenado. Se considera una reacción complicada, la cual produce un amplio número de productos denominados “Productos de Reacción de Maillard (MRP)”, ocasionando compuestos aromáticos, intermediarios que absorben la luz ultra-violeta y compuestos de oscurecimientos identificados como melanoídnas (Wijewickreme y Kitts, 1997).

Se conoce es influenciada por diferentes factores relacionados con la formación de compuestos de color y aromas, entre estos: concentración de los reaccionantes, tipo de aminoácidos y azúcares, temperatura, presencia de oxígeno, tiempo, pH inicial, actividad de agua y otros componentes de importancia que pueden estar presente en los alimentos (Kim y Lee, 2009).

Badui (1999), señala como azúcares reductores, los que presentan un grupo carbonilo (grupo funcional) intacto, el cual puede reaccionar con otras especies. Los azúcares reductores que favorecen la reacción de Maillard son en primer término las pentosas, y en segundo lugar, las hexosas, además las aldosas

actuarán más fácilmente que las cetosas, y los monosacáridos son considerados más efectivos que los disacáridos en términos de ésta reacción.

La utilidad de los compuestos alimenticios provenientes de la glicación en la industria de alimentos, se cree presentan una menor seguridad al ser comparados con proteínas modificadas químicamente, en lo concerniente a los aspectos nutricionales, pérdida de lisina disponible, amino ácidos esenciales como triptófano, reducción de la digestibilidad proteica, y adicionalmente el presentar cierta duda de toxicidad, como la formación de ciertos productos finales en la glicación avanzada.

El primer paso, que se identifica para la obtención de los productos de Maillard es la reacción del azúcar reductor, tal como la glucosa, con un amino ácido, Fig.1, donde se observa la formación de los llamados compuestos de Amadori.

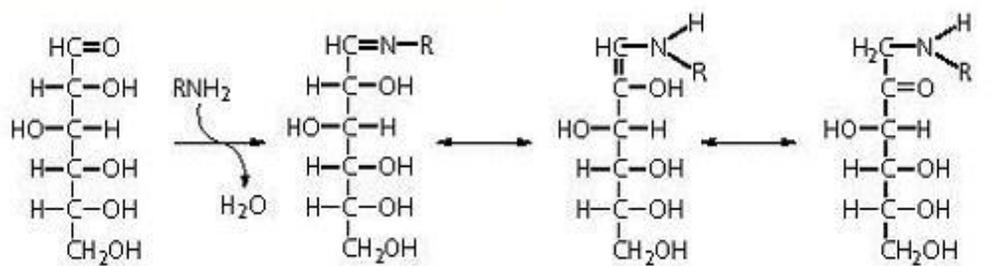


Fig. 1. Formación de compuestos de Amadori

Fuente: Meyer (1975).

Los compuestos de Amadori, identificados como grupos isoméricos de tres diferentes estructuras, reaccionan originando los pasos subsiguientes.

Generalmente se encuentran presentes en los alimentos, alrededor de 5 diferentes azúcares y 20 amino ácidos reactivos, y teóricamente podrían obtenerse alrededor de 100 diferentes productos de la reacción (Meyer, 1975).

El peso molecular del azúcar presente en la reacción influye en el tiempo en que ésta ocurre, lo cual hará que la reacción con el amino ácido se lleve a cabo lenta o rápidamente según sea el caso. El azúcar del tipo pentosa (5 átomos de carbono), como la ribosa, reaccionará más rápido que los azúcares hexosa (glucosa, fructosa) y disacáridos (sacarosa, lactosa). El amino ácido lisina, con dos grupos aminos, reaccionará con rapidez produciendo colores oscuros en la reacción, la cisteína con grupos sulfuros, causará olores específicos, y menos color en los productos (Badui, 1999). Por otro lado, los azúcares-alcoholes o polioles (sorbitol, xilitol) no participan en la reacción de Maillard, esto significa que los productos horneados endulzados con sorbitol no tendrán, o producirán poco cambio de color al hornearse. Los diversos pasos que suceden a continuación en la reacción, dependerán de los isómeros de los compuestos de Amadori. Cualquier amino ácido que se encuentre en el medio, podrá estar involucrado en la reacción, lo cuál originará compuestos, que son finalmente degradados a otros componentes. El re-arreglo de Amadori, que se

observa en la Fig.2, se considera el comienzo de las principales reacciones de oscurecimiento.

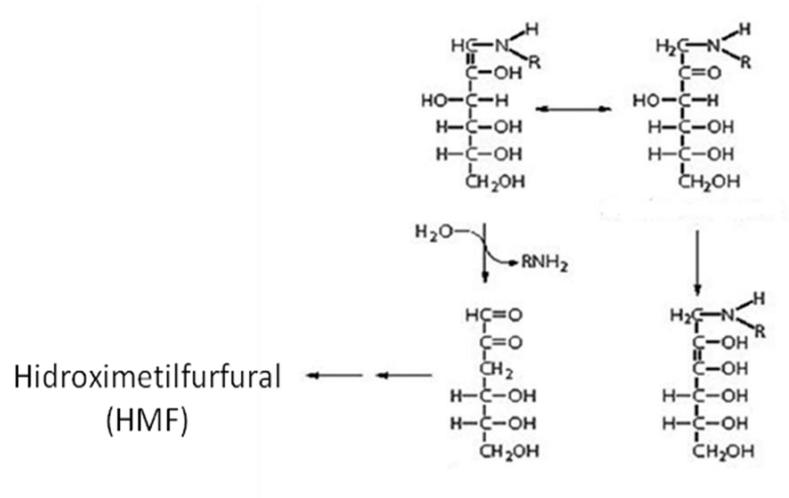


Fig. 2. Re-arreglo de Amadori

Fuente:<http://www.food-info.net>

De acuerdo con Yaylayan y Huyghues-Despointes (1994), el furfural y el 5-hidroximetilfurfural (HMF), son compuestos de olor y sabor característicos de la reacción de Maillard. El furfural es considerado el resultado de la reacción con un azúcar pentosa (tal como una ribosa), mientras que el HMF es el resultado de una reacción con una hexosa (glucosa, sacarosa).

Luego de la obtención del re-arreglo de Amadori, tres caminos diferentes se han identificados: 1-reacciones de deshidratación, 2-escisión de productos hidrolíticos de cadena corta, como ejemplo diácetilos y piruvaldehído, o 3-“degradaciones Strecker” con amino ácidos, o condensación a aldoles (Bender,

1973; Badui, 1999). Estos originarán una compleja mezcla, incluyendo compuestos de sabor y color, pigmentos de alto peso molecular denominados melanoíquinas, los cuales pueden estar presentes en muchos alimentos, como el café, pan, cervezas. El conocimiento y entendimiento de las propiedades estructurales, funcionales y fisiológicas del grupo de componentes de la reacción de Maillard presentes en los alimentos es limitado.

La reacción se estima favorece la formación de cientos de productos debido a reacciones consecutivas y paralelas incluyendo oxidaciones, reducciones y condensaciones aldólicas entre otras, la amplia variedad ha forzado a clasificarlos como productos en diferentes etapas: tempranas, avanzadas y finales (Yaylayan y Huyghues-Despointes, 1994).

La reacción de Maillard produce cambios físicos en soluciones acuosas, de glucosa/glicina, siendo posible detectarlos a través de análisis térmico y reológico, así como determinaciones más convencionales. El incremento en el contenido de agua, actividad de agua (A_w) y la entalpía del punto de congelación (ΔH_m) durante la reacción, influyen en la formación de nuevas moléculas de agua y especies de bajo peso molecular. La disposición de

estructuras moleculares más complejas se evidencia en los cambios de la solución a la temperatura de transición vítrea.

El aumento de la viscosidad debido a la polimerización es compensado por la formación de agua, esto ocurre en aquellas muestras cuyas viscosidades se miden a un mismo A_w , además se han observado cambios de absorbancia de 297nm a 420nm, en los primeros estados de la reacción, de los productos marrones desarrollados y variación en la concentración de los reactantes en función del tiempo de calentamiento, y variación de la actividad de agua de 0,92 a 0,95 después de 24h de calentamiento (Manzocco y Maltini, 1999).

Manzocco y Maltini (1999), discuten que los cambios físicos observados con la reacción de Maillard son bien correlacionados a la evolución química de la reacción, estos reflejan el incremento de la complejidad molecular resultante de la reacción en especies de bajo peso molecular, conjuntamente con un efecto de plasticidad de las moléculas de agua formadas. Algunas propiedades físicas asociadas con estos cambios estructurales (ejem. A_w , viscosidad) son fuertemente dependientes del contenido de agua. Los productos de reacción de Maillard, cambian el color y *flavor* de los alimentos, y muchos de éstos cambios en algún momento son apreciados por el consumidor (Bender, 1973),

las melanoídnas formadas adicionalmente, se conoce pueden tener algunos beneficios como antioxidantes (Turkmen *y col.*, 2006).

La presencia de pigmentos marrones, y un fuerte olor a caramelo, aparecen durante la formación de los derivados de ribosa y gliceraldehído, en función del tiempo de calentamiento. Este desarrollo es una de las principales características de la reacción de Maillard, atribuido a la formación de las melanoidinas, en el paso final de la reacción. Cuando no se reduce la base de Schiff, ocurre una reacción no enzimática de oscurecimiento, debido a la aplicación del calor, que incluye re-arreglos, eventuales escisiones, y formación de múltiples productos (Nacka *y col.*, 1998), encontrándose que el color variará de acuerdo a los amino ácidos involucrados en la reacción (Murakami *y col.*, 2002).

Los estados avanzados de la reacción según Moreno *y col.*, (2002) conducen a la polimerización proteica y oscurecimiento de manera que, puede debe ser desarrollada bajo condiciones controladas y así lograr prevenir el cambio de color o la pérdida de solubilidad. La modificación de las propiedades físicas, carga, condición hidrofílica, o viscosidad pueden explicarse como cambios funcionales observados de las proteínas glicadas. El mejoramiento en la

solubilidad proteica puede ocasionarse con un incremento en la carga neta negativa y una disminución en la superficie hidrofóbica causada por la adición de grupos hidrofílicos (Moreno *y col.*, 2002).

La reacción de Maillard señalan Murakami *y col.*, (2002) puede reducir el valor nutricional de un alimento, por las pérdidas o disminución de la cantidad amino ácidos y carbohidratos, ya que éstos pasan a contribuir con la formación de color, sabor-olor antioxidantes y productos mutagénicos (Murakami *y col.*, 2002). Además de los compuestos potencialmente tóxicos que pueden formarse por estas reacciones, también se ve disminuído el valor nutricional del alimento debido al bloqueo de la lisina y/o de otros aminos ácidos esenciales. Indistintamente de las consecuencias, diversos estudios han ilustrados el potencial de usar la glicación y manipular las propiedades de las proteínas (Oliver *y col.*, 2006b). Algunos productos finales de la reacción de Maillard que pueden ser tóxicos o carcinogénicos, la acrilamida es identificado como uno de estos productos, compuesto potencialmente tóxico el cuál es formado a temperaturas cercanas a 180°C, especialmente en productos horneados o fritos (*French fries*), cuando se fríe por debajo de los 180 °C, la acrilamida no es formada.

Los primeros estados de la reacción de Maillard, dan lugar a pequeñas moléculas formadas tales como glioxal, metilglioxal, algunas reductonas, y otros dicarbonilos, estos compuestos tienen un alto potencial oxidativo y actividad química, se ha indicado que los productos de Maillard formados en este estado tienden a ser pro-oxidativos (Shih-Chuan *y col.*, 2008). La alta actividad de estos compuestos entonces, conducirán los progresos de la reacción de Maillard a estados más tardíos formando productos con altos pesos moleculares y color marrón, a través de una serie de condensaciones y polimerizaciones (Turkmen *y col.*, 2006).

La leche sometida a un procesamiento con calentamiento, estará sujeta a la reacción de Maillard; la lactosa y los residuos de lisina de las proteínas lácteas (principalmente caseína) son los principales reactantes. Se conoce que ocurre en la leche todos los estados de la reacción, tempranos, avanzados y finales de Maillard. Las reacciones tempranas de Maillard, se limitan a los enlaces-proteínas formando los productos de Amadori, como la lactulosilisina. La escisión de los productos (Amadori) conduce a la formación de todo tipo de productos avanzados de la reacción, como lisilpirralina, pentosidina, iso- maltol, hidroximetilfurfural, furfurales y ácido fórmico. El contenido de estos compuestos, en la leche calentada, sin embargo, es muy bajo (con excepción

del ácido fórmico), no correspondiendo en su totalidad a sólo los productos de Amadori. El estado final, en el cual son formadas las melanoíginas (pigmentos marrones) y ocurre la polimerización proteica, es ampliamente desconocido, tanto desde el punto de vista químico, y mucho más desde el cuantitativo. Se ha llegado a la conclusión de que no todos los compuestos importantes han podido ser identificados aún. Algunos datos experimentales, para la leche que ha estado bajo un proceso de calentamiento, ilustran los diversos estados de la reacción de Maillard. En la leche el análisis de la cinética de la reacción de Maillard, ha sido difícil de determinar debido a los pasos paralelos y consecutivos de la reacción; estando sujeta la lactosa a otro tipo de reacción como reactantes, denominada isomerización seguida de una degradación. La dependencia a la temperatura en los primeros estados de la reacción es mínima, en comparación a la necesaria para las reacciones de isomerización, las cuales ocurren simultáneamente con la reacción de la lactosa (Van Boekel, 1998).

El control de la reacción de Maillard, se ha observado como difícil, sin embargo, puede ser prevenida cuando los alimentos están en proceso de calentamiento, con la remoción de azúcares o de amino ácidos, o con la elaboración de productos muy ácidos o muy alcalinos (Yaylayan y Huyghues-Despointes,

1994). Kato *y col.*, (1993) indican que son numerosos los estudios enfocados en evaluar la funcionalidad de los glicoconjugados de Maillard, tanto desde el punto de vista beneficioso como de resultados perjudiciales. Algunos de los efectos beneficiosos han sido asociados con los estados avanzados de la reacción de Maillard, los cuales producen compuestos con capacidad antioxidante (Murakami *y col.*, 2002; Rizzi, 2003), y comportamiento bactericida (Kato, 2002). Chen *y col.*, (2009), señalan que de acuerdo a la tendencia observada en la formación del compuesto hidroximetilfurfural (HMF) y al incremento de la actividad anti-oxidativa, se podría especular que el compuesto HMF podría contribuir a la actividad antioxidante presentada por los productos, como resultado al evaluar la presencia de esta actividad antioxidante en productos caramelizados, en sistemas modelos, donde adicionalmente se estudiaron los cambios del color en los productos, pH y de formación de HMF.

Un ejemplo del beneficio de la glicación, ocurre durante los estados iniciales de la reacción, donde se ha contemplado la capacidad de incrementar la emulsificación (Dickinson y Galazka, 1991; Kato *y col.*, 1993), mejoras de las propiedades espumantes, aumento de la solubilidad proteica y actividad antimicrobiana//bactericida (Chevalier *y col.*, 2001b). Igualmente, los efectos asociados a los estados avanzados de la reacción, se relacionan con la

formación de compuestos con capacidad antioxidantes (Chevalier *y col.*, 2001a), efectos anticarcinogénico, y propiedades antimutagénicas (Matzi *y col.*, 2007). Sin embargo, igualmente, la glicación ha sido asociada a la formación de compuestos mutagénicos (Miller, 1994; Brands *y col.*, 2000), formados en los diversos productos de degradación o intermediarios de la reacción de Maillard, combinados en la muestra alimenticia, en la cual pueden existir una gran diversidad de compuestos tipo dicarbonílos, heterocíclicos volátiles simples, aminas heterocíclicas aromáticas (Lee y Shibamoto, 2002). De aquí, que cualquier ingrediente alimenticio creado bajo la reacción de Maillard requieren de una evaluación a través de un test de seguridad para asegurar la ausencia de tales compuestos, observar la disminución del valor nutricional del alimento por el bloqueo de la lisina y de amino ácidos esenciales (Murakami *y col.*, 2002), el desarrollo de la formación de olores desagradables, proteínas de baja solubilidad (Moreno *y col.*, 2002), la disminución de la digestibilidad, producción de reacciones adversas o indeseables oscurecimientos (Bender, 1973), y disminución de la vida útil del producto. Indistintamente de las consecuencias, diversos estudios muestran el potencial de la reacción para usar la glicación y manipular las propiedades de las proteínas (Oliver *y col.*, 2006a).

Oliver *y col.*, (2006b) bajo condiciones de calentamiento y humedad controladas, evaluaron la formación de la reacción de Maillard provocando la interrelación proteica del caseinato-monosacarido, obteniendo el desarrollo de una fuerte viscosidad, y donde la interacción resultó mas rápida que aquellas preparaciones con mezclas de caseinato-oligosacáridos-monosacáridos. En presencia de humedades relativas mucho mayores, los oligosacáridos modificaron la reacción, haciéndose mas lenta la conformación de geles no hidratados, concluyendo estos autores que para obtener un glicoconjugado que produzca un incremento en la solubilidad y viscosidad del producto, puede requerirse una combinación de azúcares reductores, donde al menos uno posea la habilidad de conducir la producción de las reacciones avanzadas de Maillard, y lograr así un equilibrio en la extensión de la unión proteica y los residuos hidrofílicos del azúcar en el medio acuoso.

La beta-lactoglobulina (β -Lg), en presencia de glucosa, también ha sido evaluada bajo el desarrollo de una glicación no enzimática en suaves condiciones, caracterizándose luego los productos cromóforos formados durante el calentamiento a 60°C, obteniéndose que la variación de los espectros tomados de las proteínas modificadas fue debido principalmente a las reacciones de condensación de la glucosa en el sistema. El análisis de los

amino ácidos, mostró que al menos cuatro amino ácidos (lisina, arginina, histidina, y tirosina) fueron modificados durante la reacción. El análisis de SDS-PAGE realizado indicó que el predominio de una polimerización covalente de los monómeros de la β -Lg es independiente de la formación de los puentes disulfuros. Encontrándose además que la solubilidad de los conjugados de glucosa- β -lactoglobulina fue mayor al ser comparada con la proteína previamente calentada a un pH 5 (Chevalier *y col.*, 2001).

Asimismo, Jiménez-Castaño *y col.* (2005, 2007) evaluaron las características de solubilidad y estabilidad, de otro conjugado formado por la beta-lactoglobulina y un dextrano de alto peso molecular, bajo diferentes procesos de calentamiento, notando una glicación de complejos con altos pesos moleculares, viéndose favorecida la polimerización de la proteína por la formación de enlaces disulfuro, y la solubilidad afectada por el pH y la temperatura utilizada en la experimentación.

Sun *y col.*, (2005), determinaron que la actividad de atrapar radicales libres de la β -lactoglobulina glicosilada, no está relacionada a el grado y a la posición de un sitio específico en la glicación. Los resultados sugieren que las propiedades químicas observadas de los productos de Maillard, están relacionados más bien a el re-ordenamiento de los compuestos de Amadori (secuestradores de

cromo, fluorofóbicos), y no con la formación de los productos iniciales con propiedades secuestrantes de la denominada base Schiff. Se cree entonces, que la formación de los diversos productos de Maillard son obtenidos por las diferencias estructurales existentes entre los azúcares, y la formación de productos, los cuales además contribuyen a las propiedades funcionales del sistema (Sun *y col.*, 2005).

Algunos datos calorimétricos, muestran que la glicosilación moderada de la β -Lactoglobulina con carbohidratos como la glucosa galactosa, manosa y lactosa, no provoca una significativa modificación en la estructura terciaria de la proteína involucrada. Esto lleva a sugerir que solo los residuos lisil de la superficie de la β -Lactoglobulina son modificados. Al contrario, los derivados glicosilados de β -Lactoglobulina, luego de caracterizada la glicosilación se observa una alta sustitución, en este caso con ribosa y gliceraldehído, reveló una completa destrucción de la estructura terciaria, indicando que una cantidad significativa de residuos lisil localizados dentro de la molécula, fueron sustituidos. Así, la desnaturalización causada en proteínas altamente glicosiladas es la responsable de la baja solubilidad y emulsificación de estos derivados. La β -lactoglobulina y la α -lactoalbúmina modificados en suaves condiciones con azúcares reductores, resultó con un 20-30% de los grupos

aminos de la β -lactoglobulina sustituidos por aldohexosas y lactosa, mientras que el 70-90% de los grupos aminos de la β -lactoglobulina fueron modificados con ribosa y gliceraldehídos, la electroforesis en gel mostraron que la modificación resultó al azar, generándose una alta cantidad de proteínas glicadas. Las proteínas sustituidas con hexosas y lactosas exhibieron una alta solubilidad y una mejoría de la capacidad emulsificante, las sustituidas con ribosa y gliceraldehído mostraron un comportamiento contrario a éstas (Nacka *y col.*, 1998). Las diferencias en el grado de glicación, de acuerdo con los diversos resultados de Wijewickreme y Kitts (1997), entre aldo-hexosas y ceto-hexosas, se deben a la variedad estructural entre las dos especies de azúcares reductores. De una manera general, las aldosas (galactosa) son consideradas mas reactivas que las cetosas (como fructosa), concluyendo que esto es debido a la presencia de la cantidad grupos carbonilos electrofílicos.

Sun *y col.* (2005), llevaron a cabo un estudio sobre la glicación de la Lactoalbúmina, con cuatro 4 tipos diferentes de azúcares reductores, utilizando tiempos de 12, 24, 36, y 48 h de incubación. El índice de glicación, se observó en aumento durante las primeras 12 h de incubación, y ligeramente hasta las 24 h de incubación, pero al prolongarse el tiempo de incubación a 48h, no se observó un marcado efecto en el perfil de los espectros de masa (MS) en la

Lactoalbúmina glicosilada monomérica. Los resultados sugirieron, que la reacción de la Lactoalbúmina conjugada con los cuatro azúcares reductores, ocurre principalmente durante las primeras 24h de incubación. Los productos de Maillard que estuvieron envueltos en estas reacciones fueron, primero, la formación de una base de Schiff, luego de la reacción del azúcar reductor con el grupo amino de la proteína.

Brands *y col.*, (2000), señalan la formación de ciertos compuestos mutagénicos de los productos de la glicación con sistemas modelos azúcar-caseína a temperaturas de 120°C utilizando el *test Ames* para el estudio, con la cepa *Salmonella typhimurium* TA100. Diversos azúcares fueron evaluadas: glucosa, fructosa, galactosa, tagatosa, lactosa, y lactulosa comparando su grado de mutagenicidad, la cual pudo ser completamente relacionada a los productos de la reacción de Maillard, variando fuertemente con el tipo de azúcar utilizado. Los niveles de mutagenicidad en las muestras azúcar-caseína fueron causados por una diferencia en el índice de reacción, así como en el mecanismo de la misma. Azúcares con mecanismos de reacción comparables: glucosa y galactosa, mostraron una alta actividad mutagénica correspondiente con una alta reactividad de Maillard. Los disacáridos no mostraron actividad mutagénica (lactosa) o una baja actividad mutagénica (lactulosa) en

comparación con los monosacáridos correspondientes. Las cetosas: (fructosa y tagatosa, mostraron una marcada alta actividad mutagénica comparada con los isómeros de las aldosas (glucosa y galactosa), lo cual fue debido como se ha dicho, a la diferencia entre los mecanismos de reacción. Los resultados obtenidos muestran marcadas diferencias de mutagenicidad, debido a la reacción de Maillard, entre cetosas y aldosas, mono- y disacáridos, bajo condiciones que corresponden al de una esterilización industrial de alimentos, las diferencias encontradas ofrecen posibilidades para optimizar la calidad de un alimento (Brands *y col.*, 2000). De manera que la modificación de proteínas por la reacción de Maillard presenta una cantidad de posibilidades de estudio y evaluación para lograr mejorar o modificar el comportamiento de la misma en un producto alimenticio.

II.I.V. Actividad antioxidante de los productos de reacción de Maillard

La actividad antioxidante derivada de la reacción de Maillard, muestra cierta contradicción entre los científicos que la han estudiado. La literatura señala la actividad oxidativa de Maillard, como parte de los productos de la reacción (MRP), e indican que pueden actuar como antioxidante, mientras algunos autores sugieren que estos MRP son pro-oxidantes, otros reportan que

presentan ambas actividades (pro y oxidantes), sin embargo, se pueden encontrar diferencias debido a los estados o progresos de la reacción.

En los primeros estados de la reacción de Maillard, pequeñas moléculas son formadas glicoxal, metilglicoxal, algunas reductonas, dicarbonilos, compuestos con alto potencial oxidativo y actividad química, estos productos tienden a ser pro-oxidativos (Liu *y col.*, 2008). Su alta actividad conduce a estados posteriores, formándose productos con altos pesos moleculares y de color marrón a través de condensaciones y polimerizaciones. Los productos mas complejos de la reacción de Maillard, de estados mas tardíos, han probados ser antioxidantes y llamados colectivamente melanoídnas. La actividad antioxidante y la formación de pigmentos coloreados va aumentando con la temperatura y el tiempo de tratamiento, relacionándose a ambos (Turkmen *y col.*, 2006).

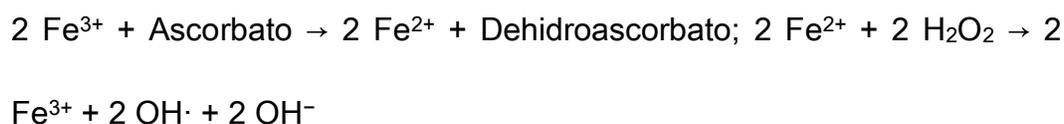
La actividad anti-radical ha sido relacionada con la intensidad de los pigmentos formados, observándose ésta en los primeros estados de la reacción, la actividad es producida en primer lugar por los productos pequeños de la reacción no-coloreados que por los pigmentos formados considerados mas brillantes, mientras que los pigmentos algo mas oscuros mostraron actividad en

el último estado. De acuerdo a esto, se vincula la mezcla de productos de reacción en los primeros estados, la cual contiene, pigmentos coloreados brillantes y productos anti-radicales no-coloreados, y la posible utilidad de ser usados como aditivos alimentarios en una amplia variedad de alimentos (Liu y *col.*, 2008).

Un antioxidante, se define como una molécula capaz de detener o prevenir la oxidación de otras moléculas. La oxidación es una reacción química que transfiere electrones de una sustancia a un agente oxidante, produciendo los denominados radicales libres, los cuales comienzan una cadena de reacción. Los antioxidantes terminan estas cadenas de reacción por remoción de radicales libres intermediarios, inhibiendo otras reacciones de oxidación por oxidación de si mismos. Como resultado, los antioxidantes a menudo son agentes reductores, como los tioles o polifenoles.

A menudo son clasificados en dos amplias divisiones, dependiendo de su solubilidad en agua (hidrofílico) o en lípidos (hidrofóbico), la capacidad de acción de un antioxidante, por otro lado, dependerá de la función de otros miembros del sistema antioxidante, la protección que aporta dependerá de su concentración, y de su reactividad en particular a especies oxígeno reactivas.

Estos agentes antioxidantes, pueden también actuar como pro-oxidante, un ejemplo de ello es la vit C, la cual posee actividad antioxidante cuando se reduce oxidando sustancias tales como el peróxido de hidrogeno, sin embargo, también reducirá iones metálicos que generan radicales libre a través de la reacción de *Fenton* :



Son pocos los datos disponibles de antioxidantes en la dieta (Knight, 1998), Osada y Shibamoto, (2006), encontraron la presencia de cierta actividad antioxidante de compuestos obtenidos con sistemas modelos para desarrollar y obtener compuestos de Maillard, con glucosa y amino ácidos, concluyendo que el efecto antioxidante, es un efecto combinado y de manera sinergista de muchos otros compuestos producidos en la misma reacción.

Se ha llevado a cabo la determinación de la actividad antioxidante por los autores Yilmaz y Toledo (2005), de los productos de la reacción de Maillard, solubles en agua, luego de la unión de la hístidina (His) con glucosa (Glu), el estudio se basó en el ensayo ORAC (PE) con ficoeritrina, el cual evalúa la capacidad de absorción de oxígeno radical. Estudiaron dos tipos de condición del material, encontrando que la mezcla His–Glu calentada a 100 °C por más

de 30 min no generó productos de reacción de Maillard con actividad antioxidante. Sin embargo, cuando la mezcla fue calentada a 120 °C por 10, 20, y 30 min, resultó una significativa formación de los productos con valores de ORAC_{PE} de 0,25, 0,43, y 0,44 μmol de Trolox como equivalente/mg. El calentamiento a 120 °C por 30 min disminuyó la capacidad de atrapar radicales peroxil por los productos de reacción, posiblemente debido a la degradación de los antioxidantes formados en los primeros estados de la reacción. Estos autores concluyen que los productos de Maillard obtenidos si poseen actividad anti-radical, los cuales pueden ser cuantificados por el ensayo de ORAC_{PE}.

En la industria de alimentos, el método ORAC; de capacidad absorbente del oxígeno radical, se usa como ensayo estándar para asegurar la fuerza antioxidante de alimentos completos, jugos y aditivos alimentarios. Otras metodologías o test, incluyen el reactivo de *Folin-Ciocalteu*, y el Trolox, estos determinan el equivalente a la capacidad antioxidativa.

Los antioxidantes, son encontrados en una amplia variedad de alimentos, como frutas, vegetales, cereales, nueces, algunos identificados como el licopeno y ac. ascórbico, pueden ser destruidos por largos almacenamiento y calentamientos prolongados, otros son mas estables, como los polifenólicos.

En general, los alimentos que han estado bajo algún tipo de procesamiento contienen menos antioxidantes que los frescos o crudos, suelen ser usados como aditivos alimentarios (antioxidantes) para evitar el deterioro de los alimentos. La exposición al oxígeno y a la luz son los principales factores en la oxidación del alimento, y las moléculas más comúnmente atacadas por la oxidación son las grasas insaturadas, dando origen a la aparición de la rancidez, la evaluación de conjugados (proteína-carbohidrato) formados en la reacción de Maillard con potencial como encapsulantes, han favorecidos la estabilidad de muestras de aceite de pescado en polvo, protegiéndolas de la aparición de la oxidación. El aceite de pescado en polvo, fue evaluado en la obtención de una emulsión con una mezcla acuosa con proteínas (caseinato de sodio, aislado proteico de suero lácteo, aislado proteico de soya, y leche descremada en polvo) y carbohidratos (glucosa, sirope en polvo de glucosa, oligosacáridos), monitoreándose la extensión de la reacción de Maillard en la mezcla y el efecto protector como antioxidante aportado por este material al producto evaluado (Agustín *y col.*, 2006).

El método de “captura” por el estable radical DPPH, es ampliamente usado para evaluar las actividades antioxidantes en un tiempo relativamente corto, comparado con otros métodos (Yanga *y col.*, 2008). Se basa en la reducción

de la solución etanólica DPPH⁻ en la presencia de un antioxidante donante de hidrogeno, destacándose la formación de un producto no-radical DPPH-H. El compuesto conjugado es capaz de reducir el radical estable DPPH⁻ al compuesto amarillo di-fenil picril hidracina. Esta correlación, entre la concentración del compuesto conjugado y su actividad antioxidante ha sido bastante documentada, relacionándola con su estructura química (Rao y Muralikrishna, 2006).

Chevalier *y col.*, (2001) reportan que las proteínas modificadas con azúcares ribosa y arabinosa, mostraron una fuerte actividad de captura de radicales, de acuerdo a estos resultados, se sugiere que las proteínas glicadas pueden ser usadas en formulaciones alimenticias como ingredientes funcionales, con esta actividad de captura, donde pueden ser capaces de retardar el deterioro debido a la oxidación, concluyendo que la naturaleza del azúcar utilizado es un factor que influencia ésta actividad.

II.II. Estabilidad física y química del d-limoneno encapsulado en emulsiones preparadas con proteína aislada de suero lácteo (WPI) modificada con azúcares

II.II.I. Emulsión Aceite: Agua

La emulsión es referida como dos líquidos inmiscibles entre sí, en la cual uno de ellos es dispersado dentro del otro en forma de pequeñas gotas esféricas (McClements, 2007a). En la industria de alimentos, usualmente estos líquidos son aceite y agua, sin embargo no siempre es así. El tamaño del diámetro de las gotas esféricas en el producto emulsificado alimenticio puede variar entre el rango 0,1 a 100 μm .

Se clasifican de acuerdo a la distribución espacial relativa de las fases involucradas. La emulsión de gotas de aceite dispersada en una fase acuosa, es una emulsión aceite-agua (O/W), ejemplo de ello, leche, cremas, helado, *dressings*, mayonesa, bebidas, sopas, *dips* y salsas. La emulsión que consiste de gotas de agua dispersas en una fase oleosa es denominada como agua-aceite (W/O), como la mantequilla, margarina, y algunos *spreads*. El material que conforma las gotas es usualmente denominado como la fase dispersa,

“fase discontinua”, o “fase interna”, mientras que el material que integra el líquido alrededor es referido como la fase dispersante, “fase continua” o “fase externa”. Es posible originar varios tipos de emulsiones múltiples, como aceite-agua-aceite (O/W/O), agua-aceite--agua (W/O/W), y/o aceite-agua-agua (O/W/W) (McClements, 2007; Weiss *y col.*, 2006). El proceso que consiste en convertir parte del aceite y parte del agua en una emulsión, o el de reducir el tamaño de las gotas en una emulsión existente, es conocido como “homogenización. En la industria de alimentos, la homogenización es usualmente obtenida por la aplicación de una agitación mecánica intensa a la mezcla líquida que formarán las fases, para esto debe utilizarse un dispositivo conocido como homogenizador, el cual puede ser un mezclador o cizallador, una homogenizadora con válvula de alta presión, un molino coloidal o molino de microesferas de cerámica, homogenizador tipo *microfluidizer* o un micro-emulsiones (Dickinson, 1992; McClements, 2007)

Las emulsiones tipo aceite en agua, son considerados vehículos importantes para la liberación posterior de compuestos bioactivos e hidrofóbicos en productos alimenticios. Las características de las emulsiones han sido ampliamente reportadas, considerándose de crítica importancia para la calidad y funcionalidad de un sistema de microencapsulación (Sheu y Rosenberg,

1998; Mongenont, *y col.*, 2000). El homogenizador a presión, es usado regularmente como equipo de emulsificación, debido a que produce emulsiones con características de finura y propiedades adecuadas de textura (cremas, helados), con alto grado de estabilidad, y en algunos casos produce cambios funcionales proteicos (Roach y Harte, 2008), la emulsión obtenida por medio de oscilaciones mecánicas en frecuencias ultrasónicas, igualmente se conocen poseen una serie de ventajas cualitativas y una gran estabilidad (Mongenont *y col.*, 2000).

En la homogenización de alta presión una porción inicial de la emulsión a ser producida, es colocada en un *blender* a alta velocidad, luego es forzada por presión a través de una pequeña válvula. La combinación del intenso cortado o cizallado (condiciones de movimiento y flujo turbulento en válvulas) puede conllevar a una alteración de las partículas. El efecto de la homogenización de alta presión en las emulsiones aceite-agua, provoca cambios en la conformación de la proteína que se encuentre presente, debido a la combinación de los efectos que intervienen; el tratamiento a altas presiones y aumento de la temperatura (no controlado), se conoce que éste cambio en la conformación de la proteína podría modificar las propiedades emulsificantes de las mismas. La evaluación de la relación entre la formulación de la emulsión y

el rango de presión usado en la homogenización, al estudiarse una emulsión de aceite de girasol-agua (con una concentración de aceite del 20%), estabilizada con proteínas de suero lácteo, con una presión de homogenización aplicada y determinada como óptima (100 MPa), de acuerdo a los resultados obtenidos medidos con un equipo de *light scattering* (dispersión de luz), dió como resultado a esta presión aplicada, la obtención de un valor mínimo de diámetro de la partícula (d_{32}) y una adecuada dispersión en el coeficiente del tamaño de la misma, concluyéndose como una emulsión estable a los parámetros evaluados (Desrumaux y Marcand, 2002).

De acuerdo con McClements, (2007), las emulsiones convencionales (macro) poseen un comportamiento intrínsecamente inestable debido al contacto entre la molécula de aceite y agua, lo cual es desfavorable provocando el rompimiento de la emulsión con el transcurrir del tiempo. La preparación de emulsiones con un comportamiento cinéticamente estable en un período de tiempo establecido, son de uso práctico en la industria de alimentos (ej., unos pocos días, semanas, meses o años) pudiendo requerirse la incorporación de sustancias conocidas como estabilizadores, los cuales pueden ser clasificados de acuerdo a su modo de operación como "emulsificadores" o "modificadores de la textura". Un emulsificador es la sustancia de superficie-activa que es

adsorbida en la superficie de las gotas de la emulsión para formar una capa protectora que previene la agregación de gotas con otras, como ciertas proteínas, polisacáridos, fosfolípidos, pequeñas moléculas surfactantes y partículas sólidas. Esta sustancia reduce la tensión interfacial y facilita la desorganización de las gotas de emulsión durante la homogenización, ayudando en la formación de la emulsión (Thanasukarn *y col.*, 2004).

Ciertos polisacáridos e ingredientes proteicos han sido usados como espesantes o agentes gelificantes en emulsiones alimenticias, entre estos el almidón, almidón modificado, celulosa, celulosa modificada, pectina, alginato, carragenato, gelatina, proteína del suero, caseinato, proteína de soja y proteína del huevo (Chanamai y McClements, 2002; McClements, 2007). La inestabilidad que ocurre en el producto emulsionado, entre las fases hidrofóbicas e hidrofílicas, dando lugar a la aparición de la agregación y separación en el sistema en la estructura de la emulsión, se ha relacionado puede ser estabilizada con el agregado de agentes de superficie activa, para superar la desagregación o asociación del aceite y agua. Algunos estudios señalan que las proteínas lácteas, proteínas de suero y soja, pueden retardar el rompimiento de la estructura de la emulsión aceite-agua (Kinsella, 1979; Kinsella y Morr, 1984). Así, polisacáridos, como gomas, pectinas y celulosas,

pueden generar una viscosidad deseable o formar una estructura de gel que estabilizarán las gotas de la emulsión, contra una disociación gravitacional (Dickinson, 2009). Complejos de polisacáridos funcionales, con ciertas cantidades de proteínas o cadenas laterales de carbohidratos de altos pesos moleculares en su estructura, pueden estabilizar hidrofílicamente e hidrofóticamente la interfase e interrumpir la floculación o agregación de las gotas de emulsión (Dickinson y Galazka, 1991). Proteínas modificadas con varios polisacáridos han demostrado provocar un efecto estabilizador en la interfase aceite-agua. De manera que, la adición de polisacáridos puede ayudar a la funcionalidad de la proteína en la interfase aceite-agua e incrementar la estabilidad de la emulsión al aportar una alta actividad de superficie y viscosidad entre las capas hidrofílicas e hidrofóbicas (Harnsilawa y *col.*, 2006).

Las emulsiones aceite-agua han sido utilizadas en la elaboración de una gran cantidad de productos alimenticios, carnes, bebidas funcionales, fórmulas infantiles, productos lácteos, y la inestabilidad que puede ocurrir en la superficie de estas emulsiones, entre las fases hidrofóbicas e hidrofílicas, debe ser estabilizada por los agentes de superficies activas, para lograr la interrupción o la asociación del aceite y el agua, por otro lado, se entiende que la formación

de complejos proteína-polisacáridos pueden ser logrados por reacciones de conjugación incluyendo reacciones controladas de Maillard (Chiu *y col.*, 2009). Los autores Syrbe *y col.*, (1998), mencionan que el tipo de enlaces entre proteínas y polisacáridos, es del tipo covalente, y el cual puede ser obtenido a través de agentes enlazantes químicos, en medio “seco” o baja humedad y bajo un procesamiento con calor, señalando como desventajas el tiempo que conlleva el que ocurra la reacción, pudiendo ser días a semanas dependiendo de las condiciones y compuestos de la mezcla evaluadas, concluyendo que los resultados, no siempre son los esperados, debido a que son difíciles de controlar (Dickinson y Galazka, 1991), igualmente, destacan que la presencia de hidrocoloides remanentes, los cuales pueden permanecer en el sistema o producto, sin reaccionar, pueden generar comportamientos antagonistas a la estabilidad del producto, debido a el efecto de desplegamiento que puedan desarrollar. Aunque se indica que entre las ventajas de estas emulsiones estabilizadas por proteínas e hidrocoloides conjugados, es la de soportar mejor el calor del procesamiento y cambios de pH que aquellas de proteínas, estabilizadas con homólogos, además de una estabilidad a largo plazo, evaluadas con el índice de crema y formación de coalescencia (Syrbe *y col.*, 1998).

La variedad de materiales para la formación de algunos tipos de productos encapsulados, para ser usados en sistemas alimenticios son relativamente limitados, se han evaluado gomas naturales, carbohidratos, lípidos, y algunas proteínas. El almidón y productos relacionados no poseen propiedades de emulsificación, sin embargo pueden ser usados como materiales de cobertura en ausencia de un constituyente de superficie-activa. Los esfuerzos para el desarrollo de nuevos materiales encapsulantes deben llevarse a cabo, evaluando e identificando la necesidad existente. Las proteínas de suero de leche manifiestan propiedades funcionales que son deseables como materiales de cobertura, y han sido previamente reportadas como muy efectivas como agente encapsulantes para grasa de leche anhidra (Young *y col*, 1993).

II.II.II. Estabilidad de las emulsiones

La estabilidad de las emulsiones requiere un buen entendimiento de las complejas interacciones de las macromoléculas presentes en los diferentes procesos tecnológicos, siendo dependientes de éstas comportamientos como el índice de crema, diámetro del glóbulo de grasa, viscosidad de la fase continua, y la diferencia de densidad entre las fases continuas y dispersas. Las partículas le dan la propiedad a la emulsión, y es relacionada a la distribución

del tamaño de la misma, lo cual determina el área total de las partículas dispersadas, las emulsiones en sí poseen una inestabilidad inherente a sí misma, debida a la energía asociada con la interfase, siendo proporcional al área total la cual es mínima cuando el agua y el aceite están en capas diferentes, de manera que las especies de superficie activas, controlan el proceso de separación de las fases, reducen la energía interfacial por unidad de área, además de ayudar a generar fuerzas repulsivas entre las partículas. La estructura de las partículas entonces tienen un efecto de consideración sobre las emulsiones, y el número e interacciones entre ellas determina la estabilidad física y las propiedades reológicas (Robins, 2000).

Las emulsiones estabilizadas por proteínas tan complejas como yemas de huevo, proteínas del suero y caseinatos han sido empleadas para evaluar las interacciones que ocurren entre ellas, además de su relación con otros componentes presentes en el medio. La presencia de monoglicéridos saturados o insaturados, tienen efectos diferentes sobre la estabilidad de las emulsiones, se conoce que el controlar el nivel de presencia del emulsificador insaturado en el sistema, dará lugar a emulsiones con propiedades y comportamiento estables. Se ha estudiado la relación del cambio ocurrido post-adsorción en la estructura secundaria de la proteína, así como las

características interfaciales y reológicas de la mezcla, y su efecto sobre la estabilidad de la emulsión. La cinética del comportamiento de la crema obtenida, puede ser descrita por la Ley de Stokes, la cual envuelve la dependencia de ésta del medio involucrado (Robins *y col.*, 2002).

La floculación la cual ha sido identificada, como una agregación con comportamiento reversible (Dalglish, 1996), puede estar presente en algunos tipos de mezcla, debido a que diversas gotas previamente asociadas pueden asociarse con otras, produciéndose un desbalance entre las fuerzas repulsivas y las atractivas. De acuerdo con Sánchez y Rodríguez (2005), la floculación y el cremado en la emulsión puede deberse a una interfase saturada con altas concentraciones proteicas, que provocan así la inestabilidad de la emulsión. Aunque, por otro lado, la presencia de polisacáridos en la emulsión en una gran parte de la fase, pueden promover la disminución de la floculación de las gotas de aceite, por inducción del gradiente de presión osmótica en la fase continua, lo cual ocurrirá alrededor de los glóbulos o partículas seguida de una agregación (Santiago *y col.*, 2004). El volumen de aceite presente en la fracción oleosa, o fase dispersa, puede influenciar además, la formación de la crema, dando lugar a la reducción, floculación o a la incompatibilidad termodinámica (Reiffers-Magnania *y col.*, 2000).

Kulmyrzaev *y col.*, (2000a), evaluaron a la sacarosa, y su influencia sobre la estabilidad térmica de las proteínas del suero, en productos como emulsiones y geles. La estabilidad del estado globular proteico en el sistema al ser calentado a altas temperaturas, el desplegamiento que ocurre en las mismas debido a éste, y la habilidad para aumentar la fuerza de las interacciones entre las proteína-proteína, fue observado. De manera, que al ocurrir el desdoblamiento de las proteínas se observó un aumento de la atracción entre las moléculas, resultando geles más fuertes, y una mayor cantidad de gotas o partículas en la floculación ocurrida en el sistema. La influencia de la sacarosa en el sistema, se percibió, fue dependiente del balance de los procesos evaluados, correlacionando su comportamiento a la evaluación de la temperatura sobre el sistema, el tiempo transcurrido y los efectos producidos. Reiffers-Magnani, *y col.*, (1999), señalan que la cantidad de proteínas en un sistema de emulsión, afectará la presencia de las mismas, su distribución en la interface O/W, e influenciara además el comportamiento de la emulsión. Por otro lado, igualmente discuten que los polisacáridos adicionados a la emulsión pueden desbalancear las fuerzas repulsivas y atractivas entre las fases agua y aceite por estimulación del gradiente osmótico en la interfase continua, dando lugar a la agregación de las gotas o partículas de aceite.

Diftis y Kiosseoglou (2003), observaron en su experimentación, el aumento de las propiedades de emulsificación de la mezcla conformada por un aislado proteico de soya y carboximetilcelulosa, reducción del tamaño de la partículas de aceite y estabilización de la emulsión, pero no así en la formación de crema. Estas características de la emulsión así como la estabilidad fueron relacionadas al peso molecular del polisacárido evaluado, a la proporción del peso molecular, tiempo de incubación, y la relación entre los productos presentes en la mezcla. Estudiaron además la formación del conjugado covalente proteína– polisacárido, el efecto del sobrecalentamiento de la mezcla sobre la adsorción en la interface O/W del conjugado, el aumento de fuerzas estéricas repulsivas entre las gotas de aceite como resultado de la cadena solapada de polisacáridos presentes y el efecto del pH sobre la formación del complejo de moléculas de proteína de soya con el carboximetil celulosa, la presencia de cargas opuestas, y el enlace de uno o más polisacáridos de peso molecular medio, los cuales podrían estabilizar sin favorecer la formación de la coalescencia durante los estados iniciales de la formación de las partículas.

II.II.III Encapsulación

La encapsulación y/o microencapsulación es una tecnología que permite envolver físicamente en una matriz protectora o material denominado “tipo pared”, a aquellos ingredientes considerados sensibles, como una manera de protegerlos o cubrirlos, de diversas reacciones adversas, pérdidas volátiles, deterioro nutricional (Hogan *y col.*, 2001), de la humedad, calor, o condiciones extremas, y así desarrollar o mejorar su estabilidad y mantener la viabilidad del producto (Gibbs *y col.*, 1999), la técnica posee un alto potencial para generar nuevos productos y procesos (Sanguansri y Agustín, 2006). En las aplicaciones para alimentos, son típicamente empleados para resolver problemas de formulación que puedan surgir de la estabilidad química o física limitada del ingrediente activo, una incompatibilidad entre el ingrediente activo y la matriz, control de liberación del compuesto, o biodisponibilidad de un nutriente (Ubbink y Krüger, 2006)

Desde el punto de vista tecnológico, la encapsulación es definida como el proceso de recubrimiento de productos, bajo la forma de moléculas, partículas sólidas o glóbulos líquidos, con materiales de distinta naturaleza, para dar lugar a partículas de tamaño micrométrico. El producto resultante de este proceso tecnológico recibe la denominación de “micropartículas”, “microcápsulas”, “microesferas”, sistemas que se diferencian en su morfología y estructura

interna, todos ellos presentan como característica común el tamaño de partícula, el cual es siempre inferior a 1 mm. Cuando las partículas poseen un tamaño inferior a 1 μm , el producto resultante del proceso de microencapsulación recibe la denominación de “nanoesferas”, “nanopartículas” o “nanocápsulas”.

Existen diversas razones por lo cual algunos compuestos deben ser encapsulados, como por ejemplo aromas o *flavor*, en estos casos, una de las más importantes es la retención en el producto alimenticio durante el tiempo de almacenamiento. Los *flavor* son volátiles, de manera que pueden ser rápidamente evaporados o perderse de la matriz alimenticia durante el almacenamiento. La segunda razón es el proteger a éste de interacciones indeseables en el alimento (Reineccius, 1991; Brazel, 1999), tercera razón es el minimizar las interacciones *flavor/flavor*. Si el *flavor* contiene constituyentes reactivos, ejemplo, aldehídos y aminas en su composición, los cuales pueden formar bases de Schiff, este *flavor* puede ser dividido en dos partes, uno que contenga al aldehído y el otro a la amina, cada uno de ellos podrá entonces ser encapsulado separadamente y ser mezclado dentro de un producto final seco, la cuarta razón es resguardarlo contra cualquier reacción a la luz u oxidación, y la quinta razón, consiste en utilizar la técnica de encapsulamiento, con la cual

se pueda controlar la liberación del *flavor* (Reineccius, 1991), durante la manufactura del producto final o en su consumo (Kim *y col.*, 1996).

Las nano-emulsiones consisten en un sistema de emulsión que mayoritariamente cubre el rango de tamaños que van de 50 a 200 nm (transparente, o por encima de los 500 nm la cual tiene una apariencia lechosa). Pueden ser preparadas por métodos de baja energía de emulsificación o emulsiones espontáneas, sin embargo, emulsiones de sub-micrones pueden ser preparadas usando altas energías como el ultrasonido o por homogenización de alta presión y la microfluidización. El encapsulamiento de líquidos aromáticos, consta primero de la emulsificación del material de *flavor* o aromático dentro de una dispersión acuosa del producto microencapsulante, la cual actuará como emulsificador y luego, del secado de la emulsión microencapsulada bajo condiciones que minimicen la pérdida del material encapsulado por volatilización y el mejoramiento de la estabilidad del material encapsulado (Kim *y col.*, 1996).

En la industria existen varios tipos de agentes encapsulantes que incluyen carbohidratos, naturales y modificados, gomas, lípidos, proteínas y polímeros sintéticos (Gibbs *y col.*, 1999).

Se ha evaluado sistemas tipo "cubiertas" o "pared", obtenidos a partir de aislados proteicos de trigo en combinación con maltodextrinas o sirope de

maíz, siendo efectivos para encapsular compuestos volátiles como el etil caprilato, utilizándose como técnica para la obtención del encapsulado el " *spray drying*" en el cual el producto es atomizado en aire caliente (Sheu y Rosenberg, 1995), el uso por ejemplo de goma arábica, es común, debido a sus características de solubilidad, viscosidad y capacidad de emulsificación (*Gibbs y col.*, 1999), la influencia de las propiedades fisicoquímicas tanto del material como del volátil a encapsular debe ser evaluada, la retención del compuesto dependerá del grupo funcional del compuesto aromático en algunos casos, mas aún del peso molecular, de la polaridad y la relativa volatilidad (*Goubet y col.*, 1998).

Suslick, (2001); Avivi y Gendaken (2007), estudiaron los procesos de recubrimiento de medicamentos, realizando microcápsulas en forma de partículas o glóbulos líquidos con materiales de diversa naturaleza de partículas de tamaño micrométrico, denominándolas: microcápsulas, microesferas, y micropartículas de tamaños $< 1\text{mm}$ o mayor de $1\ \mu\text{m}$; con aplicaciones farmacéuticas, además de lograr la estabilización de principios activos inestables, transformación de líquidos en sólidos, inclusión de principios incompatibles en una misma forma farmacéutica, aplicación biofarmacéuticas, enmascaramiento de olores y sabores, reducción de efectos irritantes sobre la

mucosa gástrica, control y liberación principio activo. Entre los materiales de que utilizaron se encontraron, grasas, cera carnauba, alcohol esteárico, proteínas (gelatina o albúmina), polisacáridos, alginatos, y técnicas de polimerización interfacial, recubrimiento en lecho, gelificación iónica para su desarrollo. Se llevó a cabo un amplio rango de aplicaciones biomédicas, con estas microcápsulas incluyendo agentes de contraste para sonografías, resonancias magnéticas de contraste y liberación de drogas y oxígeno.

Por otro lado además, se han desarrollado bebidas con partículas encapsuladas, utilizando para ello soluciones de goma y proteínas lácteas con ClCa_2 , suspendiendo las partículas formadas por agitación y emulsificación, con la presencia de un estabilizante, las partículas en este caso presentaron diversos colores y sabores (Kulmyrzaev *y col.*, 2000b), se ha señalado que la encapsulación puede poseer diferentes formas, una simple cubierta, pared o membrana de característica esférica o irregular, una estructura con multi-paredes, de una o variada composición, o numerosas cubiertas con la misma pared estructural (Gibbs *y col.*, 1999; Bownman *y col.*, 2011).

Entre las proteínas más comúnmente usadas para encapsulamiento de ingredientes alimenticios, se encuentra la gelatina. Su valor como material de

encubrimiento se relaciona a su valor comercial, sin toxicidad, y económico. Tiene una buena propiedad formadora de película así como características químicas y físico-químicas (Shahidi y Han, 1993; Pedroza, 2002). Mezclas de proteínas de suero lácteo con carbohidratos naturales o modificados también han sido evaluadas para la microencapsulación de grasa de leche anhidra y ésteres (Young *y col.*, 1993; Sheu y Rosenberg 1995). En tales sistemas, las proteínas del suero actúan como un emulsificante y agente formador de película, mientras que los carbohidratos como una matriz que conforma el material. Las mezclas de proteínas de suero y maltodextrinas, suelen proveer un buen perfil funcional para la microencapsulación de ciertos materiales volátiles, de acuerdo a Sheu y Rosenberg (1995). También se ha reportado que los aislados proteicos de suero son muy efectivos en producir una barrera contra la oxidación de aceites de naranja microencapsulados (Kim *y col.*, 1996).

Entre los agentes encapsulantes proteicos se tiene además, caseinatos, suero de leche, zeína, entre otros, biopolímeros muy complejos y de gran diversidad funcional debido a su naturaleza química. Su conformación espacial se ve fuertemente afectada por el pH del medio y la fuerza iónica, por ejemplo en procesos de encapsulación por coacervación (método químico de separación de fases), el tamaño de las micropartículas varía con cambios en el pH

modificando las densidades de carga (carga positiva, neutra o negativa) (Takenaka *y col.*, 1980, citado por Pedroza, 2002), dando lugar a moléculas expandidas o contraídas en función de las fuerzas de repulsión intramoleculares, lo cual afecta las propiedades como la solubilidad, siendo mínima en el punto isoelectrico (pI) de la proteína.

Existen diversas tecnologías para encapsulamiento como: Coacervación, técnica de microencapsulación basadas en la inducción de la desolvatación parcial del polímero que, a continuación, se deposita en forma de gotitas de coacervado alrededor de las partículas o gotitas de principio activo, se conoce como una etapa intermedia entre disolución y precipitado. Extracción-Evaporación: conjunto de procedimientos en los que se forma una emulsión O/A (O/W) o de tipo O/O (W/W) y se incorpora el compuesto tensoactivo en la fase externa y el material de recubrimiento se encuentra disuelto en la fase interna, de naturaleza lipófila. El principio activo puede estar disuelto o disperso en la fase interna. Polimerización interfacial, proceso que se produce en el seno de una emulsión A/O, en la interfase se desarrolla un proceso de polimerización que da lugar a la formación de microcápsulas. Los 2 tipos de monómeros que integran el polímero de recubrimiento se disuelven cada uno en una de las fases de la emulsión. Atomización, el principio activo se disuelve

o dispersa en una solución del polímero de recubrimiento en un disolvente adecuado. Dicha mezcla se pulveriza en una cámara en cuyo interior circula aire caliente (150-200°C), de esta manera el disolvente se evapora y se obtienen las microcápsulas. Atomización-congelación: en este caso el material de la cubierta se encuentra fundido, y la masa fundida se pulveriza en una cámara donde circula aire frío. Recubrimiento en lecho fluido, se utiliza para el recubrimiento de partículas sólidas de principio activo en un sistema de lecho fluido. En dicho dispositivo las partículas que se mantienen en suspensión gracias a la corriente de aire que penetra por la parte inferior a la vez que se pulveriza sobre las mismas la disolución del polímero de recubrimiento (Pedroza, 2002).

Suslick (1994), ha obtenido microesferas proteicas utilizando a la albúmina de suero de bovino con un 96% de pureza (no purificada), disuelta en agua destilada, utilizando la técnica de ultrasonido. Por observaciones de su comportamiento, resultó una técnica adecuada para la formación de las micropartículas. Por otro lado, la proteína resultó adecuada debido a la presencia en su composición de 583 residuos de aminoácidos, no presenta carbohidratos, y a pH de trabajo entre 5-7, contiene 17 puentes disulfuros y un grupo sulfhídrico, siendo esto favorecedor bajo las condiciones de trabajo, para

la obtención de microesferas y el control de la técnica de ultrasonido. Un sistema encapsulado debe poseer una buena solubilidad en agua, propiedades emulsificantes, propiedades deshidratantes y baja viscosidad en altas concentraciones de sólidos (Reineccius, 1991; Kim, *y col.*, 1996). Han sido desarrollados, mezclas de carbohidratos con proteínas y polisacáridos a diferentes concentraciones, resultando en matrices sencillas para encapsulación, cuyas características mejoran las propiedades de encapsulación (Kaushik y Roos, 2007).

De acuerdo con Sheu y Rosenberg (1998), la estructura de microcápsulas obtenidas por *spray-dried*, cuyas paredes consistían de sistemas de mezclas de aislado proteico de suero (WPI) y maltodextrinas o jarabe de maíz, se vieron apreciablemente afectadas por el tipo de carbohidrato utilizado y la relación entre el WPI y el carbohidrato. La extensión de una cavidad en la superficie de la estructura obtenida, fue inversa a la proporción de WPI en la pared del sistema, y la relación entre las moléculas afectaron la estructura de la pared del sistema, esto a una relación WPI-carbohidrato de 1:1, o a concentraciones mucho mayores. Las proteínas del suero presentes en la mezcla mejoraron la superficie, aportando suavidad y disminuyendo la depresión o cavidades en la superficie de las microcápsulas, con maltodextrinas. La relación entre los pesos

moleculares en el sistema de pared o superficie afectó la estructura, así las combinaciones de WPI con carbohidratos de alto peso molecular, fueron más efectivas que las combinaciones con aquellos de bajo peso molecular, resultando una menor formación de depresiones en la superficie. Además la estructura de las paredes de las microcápsulas elaboradas con la técnica denominada *spray-dried*, se vio afectada por la relación WPI/carbohidrato, por el perfil y peso molecular del carbohidrato. La incorporación de proteínas del suero en el material de la pared pudo provocar significativamente el limitar o minimizar la formación de orificios en la superficie de paredes con sistemas que consistían solo de maltodextrinas. Las maltodextrinas con altos pesos o jarabe de maíz en polvo pueden ser de utilidad para limitar la formación de grietas en la superficie. La ausencia de grietas es muy importante para el funcionamiento de la pared, limitando el deterioro central y / o pérdidas durante el almacenamiento.

El estudio comparativo de muestras de goma arábica, aislado proteico de soya, aislado proteico de suero lácteo y caseinato de sodio, para encapsular un *flavor* de naranja, dio como resultado que el caseinato de sodio fue el mas efectivo, y el menos la goma arábica en lograr la encapsulación del compuesto, y producir un tamaño de partículas mas pequeñas en las emulsiones que fueron

obtenidas con la técnica de homogenización de alta presión (Young y col.,1996).

Kaushik y Roos (2007), evaluaron la encapsulación del compuesto limoneno, con la técnica "*freeze-drying*" en diversas matrices incluyendo goma arábica, sacarosa y gelatina. Fue observada la retención del compuesto con un espectrofotómetro a una absorbancia de 252 nm, donde la relación de peso evaluada para la cantidad de sólidos totales (ST) presentes y el limoneno fue de 9:1 and 8.5:1,5. La mayor cantidad retenida de limoneno ($75,3\pm 0.3\%$ de la cantidad inicial adicionada) en la emulsión homogenizada-*freeze-drying*, fue la obtenida con la matriz de goma arábica, de relación 9:1 (pxp). La mezcla que consistió de gelatina-sacarosa-goma arábica con una relación de 0,66:0,17:0,17 (pxp) retuvo mayor cantidad ($71,8\pm 0.1\%$ de la cantidad inicial) de limoneno que la que presentaba una relación (pxp) de 8.5:1,5 (TS: limoneno), concluyendo que la técnica fue adecuada para la encapsulación del compuesto.

Igualmente una matriz consistente de goma arábica-sacarosa-gelatina (1:1:1 pxpxp) con adición del compuesto limoneno a la relación de 9:1(pxp), fue usada para estudiar los efectos de la técnica de homogenización de ultra alta-presión (50-250 MPa) versus la encapsulación del limoneno por *freeze-drying*. Se

observaron altas cantidades de retención del limoneno (84% del total adicionado) en las emulsiones homogenizadas (presión de 100 MPa), presentando las partículas una estable estructura observadas por micrografía electrónica, concluyéndose que la mezcla evaluada resultó ser eficiente para la encapsulación de limoneno por *freeze-drying* (Kaushik y Roos, 2007).

Se determinó igualmente la eficiencia del encapsulamiento del aceite de pescado, el cual fue previamente emulsificado, y las mezclas para preparar las muestras fueron llevadas a un tratamiento con calentamiento para la obtención de productos con la reacción de Maillard, en este sistema las proteínas involucradas fueron : caseinato de sodio, aislado proteico de suero, aislado proteico de soya y leche en polvo descremada y los carbohidratos: glucosa, sirope de glucosa en polvo, oligosacáridos, Agustín *y col.*, (2006), concluyeron, que la capacidad de la mezcla de carbohidratos y proteínas para encapsular el aceite de pescado se incrementó con la prolongación en la obtención de la reacción de Maillard, y este le confiere estabilidad al encapsulado. Además los productos pueden ser usados para prevenir la oxidación del compuesto encapsulado, o de compuestos sensibles a la oxidación en las emulsiones preparadas.

II.II.IV. Estabilidad de un encapsulado

La atracción y repulsión son las dos principales tipos de interacción que se producen entre las proteínas y los polisacáridos (macromoléculas anfifílicas o biopolímeros) en solución, dando lugar a la formación de complejos o a la inmiscibilidad de los dos biopolímeros (incompatibilidad termodinámica). Debido a las interacciones en la solución, éstas y sus consecuencias en la mezcla dependerán en gran medida del pH, fuerza iónica, conformación, densidad de carga y concentración de los biopolímeros (Benichou *y col.*, 2002). En muchos casos el fenómeno de la separación puede ser observado, y es dependiente de la afinidad existente entre los diferentes polímeros presentes y el solvente (Doublier *y col.*, 2000)

Dos tipos de separación de fases pueden ser observadas cuando estos dos biopolímeros son mezclados en medio acuoso, una si las interacciones entre proteína-proteína o polisacárido-polisacárido son lo suficientemente fuertes, en comparación con las interacciones polímero-disolvente, es notada la separación y segregación de las fases, conduciendo esto a una fase superior rica de polisacáridos y una fase inferior rica en proteínas, lo cual ocurre principalmente si la interacción de polisacárido-proteína es positiva

(denominada interacción *Flory-Huggins*), y otra que igualmente se ha señalado como una repulsión neta entre los biopolímeros, cuya posibilidad puede ocurrir si están en la presencia de un pH más alto que el punto isoeléctrico (IEP) de la proteína, y donde tanto la proteína como el polisacárido poseen la misma carga (en el caso de un polisacárido con carga negativa). Al ser reducido el pH de la mezcla por debajo del punto isoeléctrico de la proteína, las interacciones entre los dos biopolímeros cargados opuestamente se ven favorecidas, ocurriendo la formación del complejo, éste último así formado de proteína-polisacárido, puede ser soluble o llevar a una separación de las fases y de agregación.

Teóricamente existen límites a las interacciones proteína-polisacárido en un medio acuoso (si la proteína presenta características poliméricas), la formación de complejos entre los dos biopolímeros cargados suele ser un proceso reversible en función del pH y fuerza iónica, disociándose a valores altos de fuerza iónica (0,2-0,3), o de pH por encima del punto isoeléctrico de la proteína. Sin embargo, las interacciones electrostáticas entre polisacáridos aniónicos y las proteínas con carga positiva pueden ocurrir a pH por encima del punto isoeléctrico. La incompatibilidad termodinámica de las mezclas de proteínas y polisacáridos toma lugar con fuerzas iónicas altas y/o pH por encima del punto isoeléctrico de la proteína (Benichou *y col.*, 2002). En cuanto a la velocidad a la

cual se produce la separación gravitacional de las partículas, está disminuírá con el aumento de su concentración, debido a que el movimiento de una gota o partícula se ve obstaculizada por la presencia de las gotas de los alrededores, entonces a altas concentraciones la separación gravitacional puede ser retrasada o disminuida (McClements, *y col.*, 2007b).

La inestabilidad de una emulsión, puede ser debida a una variedad de diferentes mecanismos fisicoquímicos, y varios de éstos son a menudo interrelacionados, un incremento en el tamaño de la partícula debido a la floculación, coalescencia o modelo Ostwald, donde este último indica la dinámica del cambio de radio de las gotas o partículas debido a las presiones interfaciales de *Laplace*, señalando que las burbujas grandes crecerán a costa de la desaparición de las burbujas más pequeñas, así el crecimiento de las burbujas grandes será debido a la difusión del aceite a través de la pared de la partícula con lo que está caracterizado o identificado por un crecimiento lineal del radio como función del tiempo, llevando usualmente a incrementar la inestabilidad de las partículas para un separación gravitacional (McClements, 2007a).

La separación gravitacional es el proceso donde las partículas se mueven hacia la superficie del sistema (crema) debido a que ellas tienen una densidad

mas baja que el liquido a su alrededor. Normalmente, la densidad de las partículas en una emulsión es diferente de el liquido que las contiene, y así una fuerza gravitacional neta actuará sobre ellos (McClements, 2007b). Si las partículas tienen una baja densidad en comparación con el liquido a su alrededor, entonces existirá la tendencia de moverse hacia arriba, lo cual es referido como crema, contrariamente, si ellos tienen una densidad mayor que el líquido, entonces ellas se moverán hacia abajo, lo cual es denominado como *sedimentación*.

II.III. Metodología basada en ultrasonido para la encapsulación de compuestos

II.III.I. Ultrasonido

La sonoquímica es la aplicación del ultrasonido a las reacciones y procesos químicos, ha sido considerada como un nuevo campo en la investigación (Mason *y col.*, 1996) durante la pasada década hasta el presente.

El ultrasonido es parte del espectro sónico cuyos rangos están cercanos de los 20 kHz a los 10 MHz, de manera general es subdividido en tres regiones principales: a- baja frecuencia y alto poder ultrasónico, de 20 a 100 kHz; b- alta frecuencia y poder medio ultrasónico, de 100 kHz a 1 MHz, y c- alta frecuencia y bajo poder ultrasónico, de 1 a 10 MHz.

El rango de alrededor 20 kHz a 1 MHz se ha usado en la sonoquímica, mientras que frecuencias mayores, de 1 MHz y más, son usadas en medicina y ultrasonido de diagnóstico.

El de alta intensidad, se conoce como una tecnología emergente de procesamiento utilizada cada vez más en la síntesis química, preparación y procesamiento de productos alimenticios y farmacéuticos (Gülseren *y col.*, 2007), en terapias de enfermedades y daños orgánicos (Mason, 2011).

El efecto producido por el ultrasonido en líquidos, se ha denominado o conocido como “cavidad” (oquedad o burbuja) acústica. La energía acústica no es absorbida por las moléculas, es transmitida a través del medio, vía ondas de presión, por inducción o producción de un movimiento vibracional de las moléculas, las cuales alternativamente se comprimen y alargan la estructura molecular debido a los cambios de la presión para un tiempo dado (o evaluado). La distancia entre las moléculas varía, así como el oscilamiento alrededor de su posición inicial (principal), de manera que si la intensidad del ultrasonido en el líquido es aumentada, se alcanzará un punto en el cual la fuerza intramolecular no es capaz de retener la estructura molecular intacta, ocurriendo seguidamente un rompimiento y formación de la cavidad. La pequeña cámara formada la cual se denomina burbuja o cavidad, corresponde al campo que ocupa el sonido en el líquido, por expansión y contracción, excitada a una presión en un tiempo definido, conociéndose entonces dos formas de cavidad: la estable y la transitoria. En la cavidad estable, las burbujas oscilarán alrededor de una posición en equilibrio a causa de varios ciclos de refracción/compresión; mientras que en la cavidad transitoria, las burbujas se producirán alrededor de un ciclo acústico (algunas veces dos o tres), alcanzando el doble de su tamaño inicial, colapsando violentamente, las burbujas así formadas, crecen hasta que finalmente “implosionan” generándose

una alta presión y temperatura, durante el estado final del colapso. La alta presión debida al choque de la onda, en la zona de la burbuja, como se ha observado, es capaz de causar un efecto mecánico, o daño, sobre el ambiente del material o medio, o a células y/o macromoléculas que se encuentren presentes. Además, en la “cavidad estable”, existe una amplia y rápida oscilación del tamaño de la burbuja, causando un flujo violento del fluido en el medio ambiente de la burbuja, proceso éste conocido como microflujo, las burbujas oscilarán en un movimiento regular debido a la cantidad de ciclos acústicos. Las bajas velocidades del microflujo producirán una mezcla en el medio, mientras que altas velocidades producen una fuerza ligera (sin mezcla), considerada suficientemente alta para causar cierto daño a las macromoléculas y células (Sinisterra y Barrios, 1990).

Estas “cavidades” o “burbujas” formadas en el medio sonificado han alcanzado diámetros de pocos micrómetros, el proceso entonces dependerá de la extensión o la prolongación de la amplitud de la presión acústica, y si estas son grandes favorecerán el colapso de la burbuja. Ambos procesos de cavitación pueden ocurrir simultáneamente en el medio durante el transcurso de la sonicación. Conociéndose, que el tamaño, tiempo de vida y destino de una burbuja dependerá de varios parámetros como la frecuencia aplicada,

intensidad acústica o presión acústica, solvente, gas burbujeante, y de parámetros externos como temperatura, presión ambiental, donde la relación entre estos factores no es de muy simple control. El efecto químico del ultrasonido en soluciones acuosas ha sido estudiado por muchos años, indicándose que la "termólisis cavitacional" puede producir radicales hidroxilos y átomos de hidrógeno, que pueden favorecer la formación de peróxido de hidrógeno, y en ausencia de oxígeno, radicales de hidroperóxidos (Portenlänger y Heusinger, 1994).

De acuerdo con Romdhane y Gourdon, (2002), otros factores adicionales, intervienen en la acción del ultrasonido, como son muestreo, preservación / almacenamiento, intensidad del ultrasonido en la mezcla, rendimiento y cinética de extracción, donde la influencia de estos factores son difícil de predecir debido a la interacción que ocurre entre ellos, adicionalmente el sistema (sólido/líquido/soluto), el reactor ultrasónico, y la presencia de la fase dispersa en el medio, contribuyen a la atenuación de la onda, siendo éste lugar la zona más activada por el ultrasonido debido a la cercanía del emisor del ultrasonido.

Los efectos de la sonoquímica , que se han estudiado en reacciones químicas y procesos, son identificados como beneficiosos debido a la disminución del

tiempo de reacción, bajas temperaturas de reacción, posible interrupción en corto tiempo de la reacción, desgasificación de la reacción con productos gaseosos, uso de reactivos puros o técnicos, activación de metales y sólidos, disminución de cualquier periodo de inducción, aumento de la reactividad de reactivos o catálisis, y generación de especies reactivas de utilidad (Shahidi y Han, 1993; Vilkuh y col., 2008). Las condiciones como bajas temperaturas y presión utilizadas, son consideradas favorables para el rendimiento y la cinética de extracción de productos, y en algunos casos la mejora de la calidad, como ocurre en la extracción de proteínas, donde debe tenerse en cuenta el tiempo total de sonicación, ya que un exceso de aplicación podría dañar la calidad del producto, de acuerdo con Romdhane y Gourdon, (2002).

La sonoquímica aplicada en líquidos, será influenciada por el efecto físico, un rápido calentamiento y luego enfriamiento, causado por la “implosión” de la cavidad. En la irradiación del agua con ultrasonido, el calor producido por la “implosión” de la cavidad en el medio (H₂O), logra la descomposición en átomos de hidrógeno extremadamente reactivos (H⁺) y radicales hidroxilos (OH⁻).



Y durante la rápida fase de enfriamiento, los átomos de hidrógeno y radicales hidroxilos son combinados nuevamente para dar lugar a peróxidos de hidrógeno (H_2O_2) e hidrógeno molecular (H_2), si otros compuestos son adicionados al agua irradiada con ultrasonido, pueden ocurrir un amplio rango de otras reacciones secundarias (Suslick, 1989). A consecuencia del ultrasonido, los compuestos de estructura tipo alcanos, presentes en una gran cantidad en aceites crudos, pueden ser convertidos a compuestos más pequeños y fragmentados (Suslick, 1989).

En la sonoquímica de líquidos de inmiscibles (como aceite y agua), Suslick (1989), demostró la habilidad del ultrasonido para la producción de la emulsificación de un líquido, donde las gotas o partículas microscópicas de uno resultan suspendidas en el otro líquido, de manera que el ultrasonido obliga a las superficies del líquido a la compresión y expansión. La emulsificación que ha sido provocada por el ultrasonido puede acelerar las reacciones químicas entre los líquidos inmiscibles, debido a un aumento de la superficie de contacto, conocido esto como uno de los primeros usos de esta aplicación en el procesamiento (emulsificación), la burbuja colapsará cerca del límite entre las fases de los dos líquidos inmiscible, provocando un shock en el proceso y dando como resultado una eficiente mezcla de las interfases, de

acuerdo con Gendaken, (2008), luego de la emulsificación, puede dar lugar a una desnaturalización térmica y hidrofóbica, llevando a la molécula a un estado más condensado por disminución de sus contactos desfavorables. Se han obtenido, emulsiones estables generadas con el ultrasonido las cuales han sido usadas en textiles, cosméticos, industrias farmacéuticas y de alimentos, al no ser una técnica invasiva incluso se ha utilizado en procesos de liberación de drogas, ya que las microburbujas producidas por el ultrasonido son de un tamaño más reducido que las células rojas del organismo (Hitesh *y col.*, 2011). Tales emulsiones son a menudo más estables y requieren poco o ningún, agente tensoactivo, además de lograrse tamaños de gotas o partículas con una distribución de tamaño más pequeñas, cuando ha sido comparado con otros métodos (Mason *y col.*, 1996).

Barteri *y col.*, (1996), concluyen que el efecto del ultrasonido, observado en aquellas modificaciones químicas y conformacionales de proteínas, enzimas y ácidos nucleicos, deben ser asociados al estrés mecánico causado por la cavitación o burbuja. El ultrasonido podría causar el rompimiento de los enlaces de hidrógeno e interacciones van der Waals en las cadenas polipeptídicas, ocurriendo luego la modificación de la estructura secundaria y terciaria, y la oxidación de los grupos sh-. Los autores señalan la posible correlación entre el

posible daño molecular causado con la longitud de la α -hélice de la cadena polipeptídica y la rigidez presente de la molécula proteica, lo cual favorecen el aumento del estrés mecánico que es producido por la cavitación, indicándose entonces que estructuras de moléculas como el citocromo oxidasa resultan más flexibles, capaces posiblemente de atenuar los efectos mecánicos, probablemente debido a modificaciones reversibles de su estructura considerada mucho mas desordenada, participando en el proceso.

El efecto producido por el ultrasonido sobre metales (Zn), ha sido evaluado por Doktycz y Suslick (1990), observando fuertes cambios en la morfología de las partículas, aglomeración del producto en polvo, y la significativa reducción de la superficie o cubierta óxido. El choque de las ondas generadas es capaz de causar que pequeñas partículas choquen dentro de la otra con gran fuerza, produciéndose una fusión inter-particular de Zn en polvo con un diámetro de 5 μm de promedio. Dos partículas de Zn, originalmente esferas separadas, se observaron fusionadas después del impacto. Las partículas de Sn (diámetro promedio $< 44 \mu\text{m}$, punto de fusión $232 \text{ }^\circ\text{C}$) y Fe (diámetro promedio $5 \mu\text{m}$, mp $1535 \text{ }^\circ\text{C}$) fueron igualmente irradiadas por 30 min en una solución de decano, con ultrasonido, resultando una fusión de partículas metálicas diferentes.

Los mecanismos responsables para la formación de microesferas proteicas en la sonoquímica, son una combinación de dos fenómenos acústicos: emulsificación y cavitación. La emulsificación ultrasónica creará una dispersión microscópica de la solución proteica necesaria para formar la microesfera proteica, donde la larga vida de estas microesferas es el resultado del entrecruzamiento de la pared proteica (Suslick, 2001). Sin embargo, se ha estudiado que la emulsificación que se produce en el medio, no es suficiente o capaz de provocar una larga vida útil de las microesferas en estudio, sugiriéndose que la reacción química requiere de oxígeno, lo cual se considera crítico en la formación de las mismas, de manera que la sonólisis provocada en el agua dará lugar a átomos de hidrógeno que reaccionarán con el oxígeno produciéndose el súperoxido. Suslick y Grinstaff (1990), demostraron que las microesferas proteicas que se producen en la sonólisis se mantienen unidas por los enlaces disulfuro entre los residuos de cisteína de la proteína presente y el súperoxido actúa en la formación como el agente de entrecruzamiento.

Por otro lado, los autores, Avivi y Gedanken, (2007), al evaluar las microesferas obtenidas en la experimentación, observaron que la formación de estas pudo deberse a él entrecruzamiento de los residuos de cisteína, provocado por el HO_2 , posicionado alrededor de alguna microburbuja gaseosa, señalando, que

el mecanismo propuesto por otros autores, no es consistente con la formación de microesferas con el compuesto evaluados por ellos, estreptavidin, debido a que éste no posee cisteína en su estructura. El estreptavidin, el cual es un compuesto no-glicosilado, no presenta residuo sulfúrico, las microesferas formadas con éste además, muestran una estabilidad de horas a temperatura ambiente y al menos un mes a la temperatura de 4°C, bajo las condiciones de los métodos sonoquímicos, así indican la existencia de un posible mecanismo diferente para la formación de los enlaces S-S, de acuerdo a los resultados obtenidos, conjuntamente señalan una desnaturalización térmica o condición hidrofóbica de la proteína, lograda después de una emulsificación inicial obtenida con el proceso de ultrasonido, lo cual favorecería concluir la formación de las microesferas.

En condiciones específicas, ha sido demostrado que la sonicación es capaz de provocar con algunas proteínas la formación de microesferas, diferentes drogas han resultado atrapadas dentro de éstas microesferas durante un proceso de sonoquímica, señalándose que la técnica es un método rápido y eficiente para la encapsulación de sustratos (Suslick y Grinstaff, 1990).

De acuerdo a Lin y Brasseur (1995), el efecto causado por un ambiente hidrofóbico provocará en las moléculas, unión y formación de una estructura más condensada, al disminuir las uniones que son consideradas desfavorables, esto puede ocurrir a partir de los residuos hidrofóbicos y moléculas de agua. Adicionalmente un bajo pH del medio contribuye a la neutralización de aquellos restos de la molécula con comportamiento básicos (COO-enlaces), resultando entonces un ambiente hidrofóbico mas favorable. Los autores comprobaron un medio favorable con la proteína denominada ácido poli-glutámico (5% p/v) con ultrasonido, la cual posee grupos carboxilos en su cadena, obteniendo como resultado microesferas de ácido poli-glutámico, a pH de 4,5 y observaron la formación de interacciones hidrofóbicas, en mayor proporción por el medio ácido, concluyendo que éstas (interacciones hidrofóbicas) son las responsables de la producción de las microesferas del ácido poli-glutámico, así como del compuesto estreptavidin, además de ser lo suficientemente fuertes tanto para la obtención de las microesferas como para mantenerlas estables al menos por un mes.

Otros autores Mongenot, *y col.*, (2000), han señalado la efectividad del ultrasonido en el caso de la obtención de emulsiones y cápsulas estables utilizando para ello el compuesto maltodextrina, la cual presenta previamente

una deficiente propiedad de emulsificación. Encontrando que, las cápsulas obtenidas con el compuesto bajo la técnica de *spray-dried* fueron efectivas en la retención de aromas de productos lácteos como el queso, utilizaron el ultrasonido (12,7 g/100 g material seco) como técnica para obtener la emulsificación y un equipo Ultra-Turrax (10,7 g/100 g de material seco). En términos de eficiencia de encapsulación, mencionan que el mejor sistema de encapsulación para el aroma de queso, fue el que utilizó el paso de la emulsificación con ultrasonido, y almidón modificado (94,3%) como sistema soporte, la microcápsula obtenida resulto de menor tamaño y con una alta retención del aroma, en comparación con el obtenido por el Ultra-Turrax (83,3%). Concluyen que los estudios de los perfiles de aroma mostraron cambios después de la encapsulación, pero dependientes de la naturaleza del soporte y del método de emulsificación además de las interacciones que podrían haber entre el compuesto aromático y la matriz, en términos de calidad del aroma, el mejor sistema de encapsulación de aroma de quesos igualmente es el obtenido con ultrasonido y maltodextrina como soporte.

Para la obtención de una eficaz emulsificación con ultrasonido, debe ser aplicada a los sistemas una energía óptima de ultrasonido, un exceso de ésta conducirá a un incremento del tamaño de la gota. Se ha señalado el mismo

comportamiento en relación al tamaño de las partículas de la emulsión y el cizallamiento aplicado, siendo esto advertido en emulsiones hechas con proteínas y/o almidones modificados (Desrumaux y Marcand, 2002).

Jambrak *y col.*, (2008), de acuerdo a los resultados obtenidos, citan que un ultrasonido de alto poder (20 kHz), produce un mayor efecto en la modificación de las propiedades funcionales de las proteínas del suero lácteo, como solubilidad y formación de espuma, debido a que favorece la modificación del medio circundante de las proteínas, la temperatura y la conductividad, así, el ultrasonido de frecuencia de 40 kHz produjo un menor efecto sobre la proteína del suero que el 20 kHz. La frecuencia de 40 kHz por un tiempo de 15 min. disminuyó la conductividad en la muestra proteica, aumento la solubilidad y formación de espuma. El ultrasonido de frecuencia de 500 kHz no tuvo impacto sobre las propiedades funcionales de las proteínas del suero, así como sobre la capacidad de espumado, pero si afectó la solubilidad y conductividad. Concluyen estos autores, indicando que el uso del ultrasonido en el procesamiento de alimentos resulta en ventajas como el incremento de la solubilidad de la proteína y la capacidad de espumado, pero que debe investigarse el adecuado poder de aplicación de ultrasonido para el tiempo de

tratamiento, debido al efecto destructivo como la desnaturalización de la proteína.

Con respecto a la homogenización en el sistema, se ha discutido, que la técnica de ultrasonido, posee esta capacidad, además de reducir el tamaño de las partículas en un medio líquido, aportando uniformidad y estabilidad. Las partículas (fase dispersa) presentes pueden ser tanto sólidos como líquidos, pudiendo lograrse al reducir el diámetro de las partículas incrementar el número de partículas individuales, reducción del promedio entre distancias de las partículas e incrementar la partícula por superficie de área. De acuerdo a esto, se ha examinado, que la superficie de área y el promedio de la distancia entre las partículas puede influenciar la reología del líquido, existiendo una correlación entre el diámetro de partícula individual y el área total de superficie. Así, la estabilidad de la dispersión, puede ser influenciada, por la diferencia de gravedad específica entre las partículas y el líquido, conjuntamente con la homogeneidad de la muestra. Si el tamaño de la partícula en observación, es similar a la mayoría de las partículas presentes, la tendencia a la formación de la aglomeración durante el ascenso o asentamiento se ve reducido, debido a que partículas similares, tienen velocidades similares (Mason, 1996).

Para lograr la homogenización convencional, se utilizan altas presiones, donde el líquido es presionado a través de la válvula del homogenizador, éste es forzado a pasar a través de ella, en ciclos cortos de alta y baja presión (aprox. 50 μ seg), éste mecanismo funcionará adecuadamente para aquellas partículas consideradas en promedio pequeñas y suaves, como ejemplo glóbulos de grasa de leche, pero el uso es limitado para dispersiones de materiales más fuertes y abrasivos, tales como pigmentos, óxidos de metales, fibras y materiales fibrosos. Así, la alta velocidad del líquido (por encima de 120m/seg) y pequeños orificios en las válvulas utilizadas, podría causar disminución de la eficiencia y tiempo de vida de la bomba y de la válvula, al ser comparado este sistema con el ultrasonido, las homogenizaciones producida por este último, resultan eficientes para la reducción de partículas suaves y/o duras, basada en la formación de la "cavidad" (Azuola y Vargas 2007). Usar el ultrasonido para emulsificación de polisacáridos y/o almidón modificado con agregado de aromas, parece incrementar la calidad de la emulsión y su estabilidad, sin embargo, se han obtenido resultados desbalanceados de los aromas presente (Mongenot *y col.*, 2000). Han sido obtenidas emulsiones estables con ultrasonido, sin la adición de surfactantes, con un promedio de tamaño de la gota en las suspensiones más pequeño, y una distribución de menor tamaño comparada con los obtenidos por otros métodos. Debido a estas dos

características, las emulsiones generadas por el ultrasonido pueden encontrar una potencial aplicación en áreas donde la uniformidad y un pequeño tamaño de partículas son necesarios.

Para los autores, Jafari *y col.*, (2006), el incremento de la presión y el número de ciclos, en la homogenización con la técnica tipo microfluidización no modifica o amplía la extensión o formación de la emulsión, mientras que el ultrasonido si la modifica, haciéndose ésto mucho mayor con el tiempo de aplicación de la energía. Además, la homogenización con microfluidización produce una distribución de gotas o partículas con tamaños mayores que las obtenidas con la técnica de ultrasonido. De manera que se ha observado la necesidad de desarrollar técnicas sonoquímicas para la síntesis de microesferas o cubiertas para líquidos, líquidos no- acuoso, o aire, donde las proteínas han ofrecido excelentes propiedades funcionales, siendo consideradas buenos materiales para encapsular diversos ingredientes utilizando el ultrasonido. Sin embargo, el efecto obtenido al incrementarse la presión y números de ciclos, puede ser descrito como “sobre-procesamiento” lo cual causa el aumento de la coalescencia de las gotas o partículas en una emulsión (Kentish *y col.*, 2008).

En relación, a los factores que controlan el uso del ultrasonido, algunos resultados han mostrado que la amplitud alcanzada por el ultrasonido, debe ser ajustada y mantenida en las mismas condiciones operacionales, para la obtención de procesos controlables y repetibles, para una calidad del material y aumentar los resultados proporcionalmente. La cavitación genera, un fenómeno de cizallamiento lo cual producirá la rotura de los aglomerados, formando así partículas dispersas. La obtención de dispersión y no aglomeración de sólidos en un líquido, se menciona como una aplicación importante de la técnica, las partículas individuales generalmente son mantenidas unidas por fuerzas de atracción, químicas o físicas, y por la tensión superficial del líquido, este efecto es mayor cuando la viscosidad es alta, la aplicación de la tensión mecánica romperá los aglomerados de las partículas. Cuando el ultrasonido es aplicado al líquido, y las ondas sonoras son propagadas en ciclos de alta presión y de baja presión, se producirá la tensión mecánica, en la atracción de las fuerzas electrostáticas (eje. van der Walls) y esta presión separa las partículas unas de otras (Vilkhu *y col.*, 2008). Para lograr la estabilización de las gotas de la emulsión, en la fase dispersa, y evitar la coalescencia, le son agregados al sistema algún tipo de emulsionantes (sustancias de superficie activas y tensoactivos) y estabilizantes, de manera que la ruptura, desorden o formación de la misma por las gotas o partículas no

ocurra, este influirá en la distribución y tamaño de la partícula final, el emulsionante aportara la estabilidad, manteniendo la distribución del tamaño de la partícula final en un mismo nivel, demostrándose la relación entre la densidad de energía y el tamaño de las gotas (por ejemplo, el diámetro de Sauter), resultando con lo cual el uso de un nivel adecuado de energía de ultrasonido podrá ser obtenido un tamaño promedio de partículas o gotas, menor de 1 micrón (microemulsiones). la producción de emulsiones alimenticias de alta calidad, por lo tanto, dependerá del conocimiento de la contribución de los componentes, individualmente y su combinación, sobre las propiedades del producto final (Taherian *y col.*, 2008)

III. Objetivos

III.I. General

Evaluar los parámetros de encapsulación de ingredientes activos, utilizando el aislado proteico de suero lácteo modificado con carbohidratos (lactosa y galactosa), empleando las técnicas de homogenización a alta presión y ultrasonido.

III.II. Específicos

1. Elaborar los productos proteicos-carbohidratos utilizando las condiciones de la reacción de Maillard, para ser empleados en la encapsulación
2. Determinar algunas propiedades funcionales de los productos obtenidos bajo la reacción de Maillard
3. Evaluar el desarrollo de coloración de los productos
4. Evaluar la capacidad anti-radical de los productos
5. Preparar las emulsiones como vehículos de los productos agregando el compuesto d-limoneno, utilizando las técnicas de homogenización de alta presión y ultrasonido.

6. Evaluar la estabilidad de las emulsiones de los productos
8. Evaluar estabilidad física y química relativa de los productos en la retención del compuestos d-limoneno
10. Evaluar los parámetros para optimizar las condiciones de trabajo con ultrasonido para la obtención de microcápsulas proteicas utilizando albumina de bovino, y su capacidad de atrapar de diversos compuestos.

IV. Materiales y Métodos

IV.I. Material

El material de trabajo consistió de aislado proteico de suero lácteo (WPI, nativo) grado A (proporcionado por BioPro, Davisco Food International Inc. USA) con una composición de: proteína (94%), cenizas (40%), grasa (1,0%), lactosa (1,0%). La composición química proteica se muestra en la Tabla 1, la mayor cantidad de proteína se encuentra representada por la β -lactoglobulina con un 68,5%, posee una colección de proteínas globulares que incluye la anteriormente nombrada, así como a la α -Lactoalbúmina (15,4%), albúmina BSA (3,6%). Los carbohidratos utilizados: Lactosa D-(+) – (Lactose Monohydrate, Fluka-BioChemika), Galactosa D-(+) (Galactose Sigma-Aldrich, Germany). Los reactivos químicos fueron del más alto grado de pureza comercial disponible.

IV.I.I. Productos de reacción de Maillard

Tabla 1. Composición química proteica del Aislado Proteico de Suero Lácteo (WPI)

	%	Mol. Mas (kDa)	# Lisina
Albumina de bovino	3,6	66,3	60
α -Lactalbumina	15,4	14,2	12
B-Lactoglobulina	68,5	18,4	15
Lactoferrina	1,5	76,5	46
IgG	2,7	80-900	
Otros	8,3		

Para la obtención de los productos de reacción de Maillard, el WPI (120 g) fue disuelto en agua destilada a la concentración proteica de 8% (p/v), a una relación molar de épsilon aminoácidos:carbonilo, de 1:1,5, se le agregó Lactosa (46,8g) o Galactosa (23,4 g), obteniéndose varios productos, de acuerdo a las condiciones aplicadas (Tabla 2).

Se ajustó el pH a 7,5 (pH-meter 240 Corning) con HCl / NaOH diluidos. Para la preparación de las muestras denominadas Aislado Proteico de Suero Lácteo Térmico- Lactosa (WPI-T+L) y Aislado Proteico de Suero Lácteo Térmico- Galactosa (WPI-T+G), la solución fue calentada a 80 °C x 20 min al pH mencionado, y enfriada a 21 °C antes de la adición del azúcar correspondiente. Para las muestras de Aislado Proteico de Suero Térmico- Enzima-Lactosa (WPI-TE+L) y Aislado Proteico de Suero Térmico-Enzima- Galactosa (WPI-TE+G), el Aislado Proteico de Suero (WPI) fue calentado a 80 °C x 20 min, enfriado a 37,5 °C, al mismo pH previo al agregado de la enzima tripsina en una concentración de 0,25% ppx de proteína (Type IX-S, Sigma T0303), por un período de 120 min. Después de la hidrólisis, la solución fue ajustada a una temperatura de 21°C, antes de la adición del carbohidrato.

Las soluciones Aislado Proteico de Suero Lácteo Lactosa (WPI+L) y Aislado Proteico de Suero Lácteo Galactosa (WPI+G), no sufrieron tratamiento de

Tabla 2. Identificación de los productos iniciales procesados bajo la Reacción de Maillard, tratamiento previo y carbohidrato adicionado

Identificación	Tratamiento	Carbohidratos
WPI	Ninguno	Ninguno(control)
WPIL	Ninguno	Lactosa
WPIG	Ninguno	Galactosa
WPITL	Térmico	Lactosa
WPITG	Térmico	Galactosa
WPITEL	Térmico + Enzima	Lactosa
WPITEG	Térmico + Enzima	Galactosa

Identificación:

WPI: aislado proteico de suero lácteo (control)

WPIL: aislado proteico de suero lácteo mas lactosa

WPIG: aislado proteico de suero lácteo mas galactosa

WPITL: aislado proteico de suero lácteo con tratamiento térmico mas lactosa

WPITG:aislado proteico de suero lácteo con tratamiento térmico mas galactosa

WPITEL: aislado proteico de suero lácteo con tratamiento térmico y enzimático mas lactosa

WPITEG: aislado proteico de suero lácteo con tratamiento térmico y enzimático mas galactosa

calentamiento o enzimático. Las muestras finalmente obtenidas fueron liofilizadas, para luego ser colocadas en platos de aluminio (aprox. 15 g c/u), llevadas a 50 °C en desecadores sellados, separados y mantenidos a una humedad relativa de 65% (Greenespan, 1977) con una solución saturada acuosa de ioduro de potasio (KI), e incubadas (Reach-in incubator Forma Scientific Model 3940) por un tiempo de 0, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 h (Fig. 3, acondicionamiento del material). Luego de finalizado el tiempo de la incubación, se retiraron y se almacenaron a -20°C hasta los análisis. La muestra control Aislado Proteico de Suero Lácteo (WPI) fue tratada bajo las mismas condiciones (Kato, 2002).

IV.II. Determinación de la hidrólisis de las proteínas tratadas con enzima

tripsina

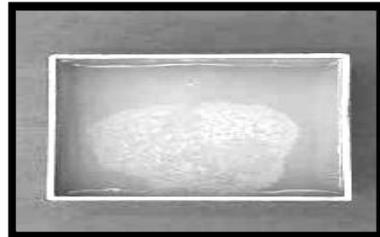
Se determinó el grado de hidrólisis (GH), realizado por la enzima tripsina a las muestras denominadas WPI-T+E-L y WPI-T+E-G sometidas a calentamiento y al tratamiento enzimático en su preparación, se utilizó el método modificado del oftaldialdehído (OPA) (Aldrich Chemical Co, Milwaukee, Wi, USA) (Lookhart, Jones, Cooper Hall 1982).



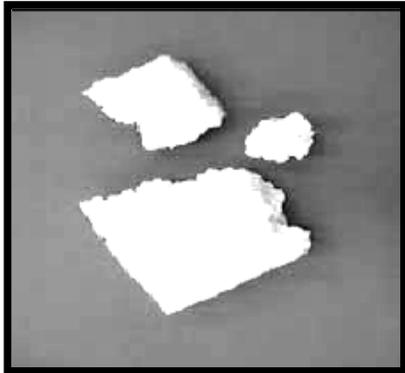
Producto seco



Solución



Material Congelado



Material Liofilizado



Material final

Figura 3. Acondicionamiento del material de trabajo

El reactivo OPA se preparó diariamente, mezclando 40 mg de OPA (disuelto en 1 mL de metanol), 25 mL 100mM buffer tetraborato de sodio, 100 μ L de β -mercaptoetanol, y 2,5 mL de 20% (pvp) Sodio Dodecil Sulfato en agua. A 150 μ L de la muestra conjugada de Maillard (concentración de proteína 0,2%) se le adicionó 3 mL de la solución OPA.

La absorbancia fue leída a 340 nm a los 2 min. exactamente (Spectrophotometer Beekman, Model DU 65). Una curva de calibración fue realizada usando ácido glutámico (Sigma Aldrich, Germany) como estándar (Church *y col.*, 1983).

IV.III.Determinación del grado de glicación: método de fluorescamina.

Se utilizó una modificación del método de fluorescamina (Yaylayan *y col.*, 1992) para determinar los ϵ -amino libre no reactivos de las muestras. Aproximadamente 25 +/- 5 mg de la muestra conjugada fue suspendida en 10 mL agua, colocada en un vortex, y mezclada por 30 min continuos. La solución resultante se filtró a través de una jeringa-filtro de 0,45 μ m (Milipore, USA), luego 200 μ l de la solución filtrada fue pipeteada en un tubo de centrifuga (10 mL) conteniendo 4 mL de buffer borato (0,02 M tetraborato de potasio, pH 8,5). Finalmente una alícuota (1 mL) del reactivo de fluorescamina (15

mg/100 mL acetona) (Sigma F-9015) se adicionó rápidamente durante el mezclado-vortex. El buffer borato, el cual no contiene proteína fue usado como blanco. La fluorescencia fue medida después de 5 min en un Detector Varian 474 Scanning Fluorescence, a longitudes de excitación y emisión, de 390 y 475 nm, respectivamente. Las lecturas de la fluorescencia fueron normalizadas usando el contenido de proteína soluble de las respectivas soluciones, determinadas simultáneamente por el método Bradford (desarrollo de un color azul intenso, debido a la interacción relativamente inespecífica entre el colorante hidrofóbico y las proteínas, se mide la absorbancia a 595 nm) (Bradford, 1976), se uso una curva de calibración con WPI.

IV.IV. Evaluación del color de los productos de Maillard.

La evolución del color de las muestras glicadas y no-glicadas fue analizado por medición de los valores L^* , a^* , b^* utilizando un espectrofotómetro Labscan tricromático VI-A30, (Hunter Associates Lab., Inc., Reston, VA, Fig. 4). La diferencias de color L , a , b se expresan como el promedio de la diferencia de color $DE = (L^2 + a^2 + b^2)^{1/2}$ o como diferencia del croma $DC = (a^2 + b^2)^{1/2}$, en el cual la escala es simulada. L (luminosidad) corresponde a un valor máximo de 100, siendo el mínimo 0 (en blanco), el 100 es de color blanco. Para a^* y b^* .



Figura 4. Espectrofotómetro Labscan tricromático VI-A30

no hay límites numéricos específicos, a^* (colores rojo-verde) donde si el valor es positivo (+) el color es rojo y negativo (-) el color verde (amarillo-azul), en b^* el valor es positivo (+) es amarillo, y el negativo (-) es azul. Se usaron los cálculos de $DE = (L^2 + a^2 + b^2)^{1/2}$ o $DC = (a^2 + b^2)^{1/2}$, asociándose las escalas del color obtenido, el valor resultante indica cuanto difiere la muestra del estándar.

IV.V. Solubilidad proteica a pH 6,8

Se determinó la solubilidad de las proteínas por el método de Betschart, (1974) con algunas modificaciones. La muestra conjugada (25 +/-5 mg) se dispersó en 10 mL de agua deionizada, ajustándose el pH a 6,8 con HCl (1N) o NaOH (1N). La dispersión fue mezclada por 30 min continuos y centrifugada a 2056 x g x 10 min (Beckman Coulter, Model Allegra 6R centrifuge, rotor GH-3.8^a). La cantidad de proteína en el sobrenadante fue determinada por el método de Bradford (Bradford, 1976), expresándose la solubilidad como el porcentaje de proteína en el sobrenadante, del total en la muestra inicial.

IV.VI. Determinación de la actividad anti-radical

La capacidad anti-radical de los productos de Maillard expuestos a 65% de humedad relativa, a 50 °C, en tiempos diferentes, fue estimada de acuerdo al procedimiento de Cämmerer y Kroh (1996), ligeramente modificado. Las muestras fueron disueltas en agua destilada, para una concentración de 0,8% pxp, mezcladas vigorosamente (Junior Orbit shaker, Lab-Line instruments, Model 3520, Melrose Park ILL) por 30 min. y finalmente centrifugadas a 3.213x g x 10min (Beckman Coulter, Model Allegra 6R centrifuge, rotor GH-3.8A). A una alícuota de 200 uL del sobrenadante le fue adicionada 1 mL de solución diariamente preparada 74 mg/L DPPH en etanol (2, 2-Diphenyl -1- picryl-hydrazyl, Sigma D9132; absorción final de ± 1.8 AU), luego colocada en la oscuridad x 1 h, mezclada, tomando la lectura a una longitud de 520 nm, usando etanol como blanco. La concentración de DPPH \cdot en el medio de reacción fue calculada a partir de una curva de calibración, determinada por la regresión lineal; $[DPPH\cdot]_t = 0,0252 (A_{520\text{ nm}}) - 0,0419$ ($r^2 = 0,99$), donde la concentración de $[DPPH\cdot]_t$ se expresa en mg/100 mL. La actividad anti-radical de la muestra se determinó como el porcentaje de desaparición DPPH \cdot ; a mayor porcentaje de desaparición del color purpura inicial, mayor actividad anti-radical. El porcentaje remanente de DPPH \cdot (%DPPH \cdot rem) fue calculado como sigue;

$$\%DPPH\cdot_{\text{rem}} = ([DPPH\cdot]_t/[DPPH\cdot]_o) \times 100,$$

donde $[DPPH\cdot]_0$ es la concentración a tiempo cero (Morales y Jiménez - Pérez, 2001).

IV.VII. Actividad antioxidante de polifenoles usando el sistema β -caroteno/ácido linoleico

Dos mililitros de la solución de β -caroteno en cloroformo (0,2 mg/ml) fue pipeteada en un frasco conteniendo 40 mg ácido linoleico y 400 mg Tween 20. El cloroformo fue removido en un evaporador rotatorio (Büchi 461.Büchi Labortechnik AG. Flawil 1/Switzerland) a 40°C por 5 min, al residuo le fue adicionado 100 ml de agua destilada (previamente aireada) lentamente con vigorosa agitación para la formación de una emulsión. Una alícuota de 5 ml de la emulsión fue adicionada a tubo de test, conteniendo 0,2 ml de muestra, mezclada y colocada en un baño de agua a 50 °C por 2 h. La absorbancia de las muestras fue medida cada 5 min por 30min (o 60 min) a 470 nm., la solución del blanco fue preparada conteniendo la misma concentración de la muestra sin β -caroteno. La actividad antioxidante fue calculada basada en la siguiente ecuación:

$$AA = \left[1 - \frac{A_0 - A_t}{A_0^o - A_t^o} \right] \times 100,$$

Donde AA es la actividad antioxidante, A_0 and A_0^o son los valores de absorbancia, medidos al tiempo inicial a de la incubación de la muestra y control, respectivamente, mientras que A_t and A_t^o son los valores de absorbancia medidos en las muestra o estándar y control a $t = 120$ min. (Amin, *y col.*, 2006).

IV.VIII. Determinación de proteínas

La estimación de la proteína cruda de los 7 productos fue llevada a cabo usando el método automatizado LECO nitrógeno/proteína (el cual se basa en el método de combustión directa de Dumas; Determinador PF- 42 LECO Instruments Ltd., Mississauga, ON, Canadá, Fig. 5), el contenido de nitrógeno fue multiplicado por 6,38.

IV.IX. Determinación de la capacidad de emulsificación

La capacidad de emulsificación y su estabilidad fue analizada utilizando el método de Pearce y Kinsella (1978). 1,5 mL de aceite de maíz le fue agregado a 22,5 mg del producto de Maillard disuelto en 4,5 mL de buffer fosfato 0,01 M, pH 7. La mezcla fue homogenizada a 20.000 r.p.m a temperatura ambiente



Figura 5. Determinador de Proteínas LECO Instruments

por 1 min con un Homogenizador Polytron PT 2100 (Kinematica AG, Littau-Luzern, Switzerland); 800 µL de la emulsión preparada fue inmediatamente llevada a homogenización (t=0 min.) y luego transferida a platos de aluminio para la determinación de la capacidad de emulsificación (EAI). La absorbancia de la emulsión diluida fue determinada a 500 nm con un espectrofotómetro Cary 300 Bio, UV-Visible Spectrophotometer (Varian Canadá, Inc., St- Laurent, QC, Canadá). Para la evaluación de la estabilidad, 250 µL de la emulsión fue tomada en diferentes tiempos, diluida con 50 mL de una solución de 0,1% sodio dodecil sulfato, midiendo la absorbancia de la emulsión a 500 nm.

IV.X. Desarrollo de la emulsión utilizando un homogenizador de alta presión.

Las emulsiones aceite-agua fueron preparadas mezclando, 10% de aceite que consistía de : d-limoneno 2 %(pxp), n-dodecano 1,4 %(pxp) y tri-decano 0,4 %(pxp) disueltos en n-hexadecano, y la fase acuosa, una solución de 10 mM de buffer citrato de sodio (pH 3,0) adicionándosele los productos en estudio: WPI, WPI-L, WPI-G, WPIT+E-L, y WPIT+E-G , y GA (Goma arábica, control). La solución final de la emulsión consistió de una relación de 1:10 (1,0 % pxp de proteína en 10 % pxp de aceite) para los productos del aislado

proteico de suero lácteo y 1:2 para la que contenía GA, fueron agitadas durante toda la noche hasta completa disolución. Antes de la homogenización, el pH fue reajustado con 1,0 M y/o 12,0 M HCl, 1,0 M y/o 5,0 M NaOH. El compuesto hidroperóxido de cumeno (CH, 100 mmol/kg aceite) fue disuelto en la fase oleosa y agitado por 15 min. Una pre-emulsión, fue preparada por homogenización de las fases usando un Homogenizador Polytron PT 2100 (Kinematica AG, Littau-Luzern, Switzerland, Fig. 6) a 8.000 r.p.m por 1 min a temperatura ambiente, luego fue pasada a través del Homogenizador (Emulsiflex-C5, Wilmington, MA, Fig. 7) a 3.000 psi, 4 veces cada muestra. Le fue adicionado sulfato ferroso (FeSO_4), a la emulsión homogenizada a una concentración final de 0,25 mM, y agitada por 15 min (favorece la oxidación del d-limoneno conjuntamente con el hidróxido de cumeno). Todas las emulsiones fueron almacenadas a 55 °C en la oscuridad.

IV.XI. Desarrollo de la emulsión utilizando ultrasonido

Las emulsiones aceite-agua fueron preparadas mezclando 10% de aceite que consistía de: d- limoneno 2 %(pxp), dodecano 1,4 %(pxp) y tridecano 0,4 % (pxp) disueltos en *n*-hexadecano y la fase acuosa, una solución de 10 mM de buffer citrato de sodio (pH 3,0) adicionándosele los productos en estudio: WPI,



Fig. 6. Homogenizador Polytron



Fig. 7. Homogenizador de alta presión Emulsiflex-C5

WPI-L, WPI-G, WPIT+E-L, y WPIT+E-G a una relación final emulsificador-aceite de 1:10 (ejem., 1,0 % ppx proteína para 10 % ppx aceite). Fueron disueltos en la fase acuosa mezclando a temperatura ambiente hasta asegurar una completa dispersión. Antes del paso del ultrasonido, el valor de pH fue reajustado con 1,0 M y/o 12,0 M HCl, 1,0 M y/o 5,0 M NaOH. Se agregó hidroperóxido de cumeno y sulfato ferroso (FeSO_4) en las mismas condiciones que la emulsión anterior. Se preparó una pre-emulsión usando un Homogenizador Polytron PT 2100 (Kinematica AG, Littau-Luzern, Switzerland) llevándola a 8.000 r.p.m x 1 min a temperatura ambiente, luego fue colocada en un Procesador Ultrasónico (Model DMC750, Sonics, Newtown, USA) con una punta de acero inoxidable (diámetro $\frac{1}{2}$ pulgada) para sónicas 50 mL de la solución. El frasco de reacción es sumergido en un baño de hielo, y la punta del aplicador es colocada cerca de 1,5 mm en la fase acuosa. Las soluciones fueron tratadas bajo emisiones de ultrasonido pulsadas, al poder seleccionado, con el siguiente programa: 5min encendido (on) 1min. apagado (off) / 5min encendido (on) 1min apagado (off) / 5min on-off (Fig. 8). El tratamiento de ultrasonido fue llevado a una frecuencia de 20 kHz y un poder de 750 Watts, la intensidad generada a este poder fue de 20 W/cm^2 . La temperatura fue monitoreada durante el desarrollo del experimento. Todas las emulsiones



Fig.8. Muestras Homogenizadas por ultrasonido

fueron almacenadas en la oscuridad a 50 °C por el tiempo total del experimento.

IV.XII. Determinación de la degradación del d-limoneno en la emulsión aceite-agua

Se estudió la degradación del compuesto d-limoneno midiendo su concentración y la formación de sub-productos, tales como carvon y terpinol, además del compuesto hexanal como indicador de la oxidación del aceite (dodecano, tridecano y n-hexadecano). Un gramo (1g.) de la emulsión fue diluido en 3 mL de metanol, colocado en el vortex por 15 seg. y centrifugado (Beckman Coulter, Model Allegra 6R centrifuge, rotor GH-3.8A 3750 rpm) a 3.213 gx 10 min., luego se tomó una alícuota de 40 µL del sobrenadante, se diluyó en 1 mL de agua Milli-Q (saturada con NaCl), y colocada en un vial ámbar sellado de 10 mL de capacidad.

El análisis de los compuestos fue llevado a cabo en un cromatógrafo de gases acoplado con un espectrómetro de masas (GC-MS), equipado con un sistema de micro-extracción en fase-sólida (SPME). La fibra SPME (fiber 85µm Carboxen/PDMS, Supelco, Oakville, ON, Canadá), fue insertada dentro del espacio de cabeza del vial por 45 min a la temperatura de 45°C. La operación

de la SPME se llevó en modo automático usando un inyector (MPS2, Gerstel Inc., Baltimore, MD). Los compuestos volátiles fueron desabsorbidos durante 6 min. por inserción de la fibra dentro del puerto de inyección del Cromatografo de Gas Varian CP-3800 (Palo Alto, CA) en modo *splitless* (Glass insert SPME, 0.8 ID; Varian, Mississauga, ON, Canadá) por 3 min a la temperatura de 300°C. La misma fibra fue utilizada para todos los análisis (alrededor de 100 inyecciones). El sistema de GC-MS usado en este estudio, consistió de un espectrómetro de masa de captura iónica, equipado con una fuente de ionización de impacto electrónico (EI), controlado con un detector espectrométrico de masa Saturn 2000 (Varian Inc., Palo Alto, CA). Una columna capilar 0,25 mm; 25µm espesor de película (Varian VF-5MS FS, 5% phenyl/95% dimethylpolysiloxane) fue usada con gas helio a una velocidad de flujo de 1,0 mL/min. La columna en el horno fue inicialmente colocada a una temperatura inicial de 35°C por 3 min, calentada a 80°C a una tasa de 6°C/min, incrementándose a 280°C, a una tasa de 20°C/min, siendo mantenida a 280°C por 2 min. El tiempo total de análisis fue de 22,5 min. El espectrómetro de masa fue operado en una rango de 40 a 200 a una tasa de scan de 1,00 s/scan. La cuantificación fue realizada por un total de iones (TIC). La detección se llevo a cabo por captura electrónica a 70 eV y la cuantificación se realizó tomando en consideración la corriente gastada por el numero total de iones

referidos a una curva de calibración tomando como patrón de referencia al estándar de d-limoneno (Aldrich 183164), y carvon (Aldrich 12.493-1), a una concentración en un rango de 0.5 - 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de emulsión, diluyendo 10 μL de las concentraciones seleccionadas en 1 mL de una solución de agua saturada con NaCl. El coeficiente de correlación fue 0,934 and 0,997, el tiempo de retención, fue alrededor de 12,06 y 14,59 min para limoneno y carvon, respectivamente. El limite de detección (señal/ruido) fueron alrededor de 25,9, 7,2, 3,9 y 4,7 $\mu\text{g}/1\text{ L}$ de emulsión para hexanal, limoneno, terpineol y carvon, respectivamente. Una solución (99,9%) de 2-pentanone- d_5 , fue usada diariamente como estándar de referencia, y diferentes viales usados como blancos, así como otro conteniendo la misma concentración del estándar de referencia colocándose entre viales de muestra, e inyectados antes y después de cada 5 inyecciones de muestra por día. El área del estándar es usada para evaluar la repetibilidad y reproducibilidad del método así como la sensibilidad del equipo (Sabik, 2011).

IV.XIII. Índice de estabilidad de crema

Cincuenta mililitros (50 mL) de la emulsión homogenizada, fue transferida a un tubo test (diámetro interno 35 mm, altura 200 mm), y almacenada para evaluar

su estabilidad por 37 días en total, a temperatura ambiente. Se evaluó la susceptibilidad de las emulsiones a la formación de una crema localizada en la interface, entre la capa opaca en el tope y la transparente o turbia capa en el fondo del tubo de test. El total de la altura de las emulsiones (H_E) y la altura de la capa de suero (H_S) fueron medidas. La extensión de la crema fue evaluada como el Índice de Cremado (CI) = $100 \times (\text{altura de la interface}) / (\text{altura total de la emulsión})$ (Fig.9) (Demetriades y McClements, 2000).

IV.XIV. Determinación de estabilidad de la emulsión (Quick Scan)

Todas las emulsiones inmediatamente después de la homogenización, fueron ópticamente caracterizadas usando un Vertical Scan Analyzer (QuickScan, Coulter Beckman AD 09004, Hialech, Florida USA) (Pan *y col.*, 2002). Los gráficos de “back scattering” (BS %) fueron obtenidos con intervalos de 5 min/1 h, y luego 24h después, para un total de 37 días, como una función de la altura de la muestra (en mm). El “back scattering” (BS), considerado cinética de la crema fueron registrados trazando los valores promedios del mismo como una función del tiempo, en una zona 0–10 mm.



$$\text{Índice de Cremado (CI)} = \frac{100 \times (\text{altura de la interface})}{(\text{altura total de la emulsión})}$$

Figura 9. Cálculo del índice de crema de las muestras

Se utilizó un lector compuesto de una fuente de luz infrarroja pulsada ($\lambda = 850 \text{ nm}$) y dos detectores de longitud sincronizados (alrededor de 60 mm), obteniéndose los datos de “transmisión” (T) y el “back-scattering” (BS, Fig. 10) cada 40 μm , siendo expresados en porcentajes relativo a estándares externos, como función de la altura de la muestra en mm. Los resultados fueron comparados con el perfil de referencia (tiempo = 0 min), obteniéndose los perfiles correspondientes de Δ transmisión (ΔT) y Δ back-scattering (ΔBS).

IV.XV. Tamaño de Partícula

La distribución del tamaño de las partículas de las emulsiones, fueron medidas usando un instrumento “laser light scattering” (instrumento de dispersión de luz laser) Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Southborough, MA). El índice refractivo 1,59 fue usado para los cálculos del tamaño de partícula. Las emulsiones (dilución 1/200mL o 1/300mL) fueron colocadas directamente dentro de la celda de medida del instrumento (Fig.11) y agitada lentamente durante la medida. El promedio del diámetro inicial de las gotas y la distribución del tamaño de partícula de las emulsiones fueron medidos en función del tiempo de almacenamiento. El instrumento “*laser light catering*” mide la intensidad de la dispersión de la luz en la emulsión.

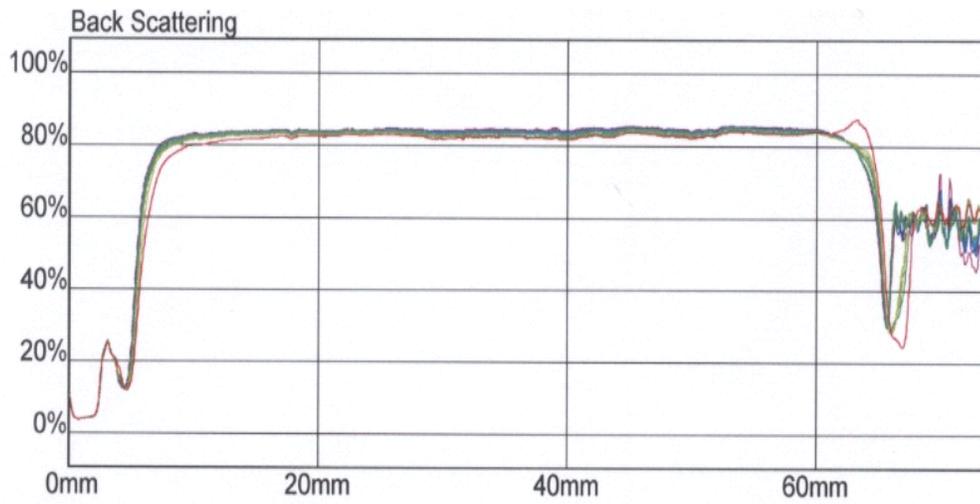


Figura 10. Reporte (Back Scattering) de una emulsión

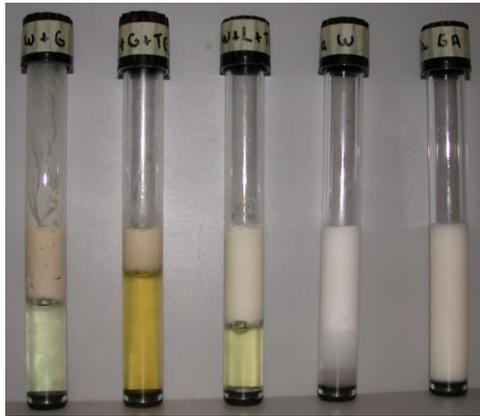


Figura 11. Tubos del equipo Quick Scan con muestras de experimentación

IV.XVI. Encapsulamiento utilizando una proteína modelo (BSA) y una metodología basada en ultrasonido

IV.XVI.I. Material

Se utilizó la albúmina de suero de bovino (BSA), muestra comercial proteica, adquirida en Sigma Chemicals (Sigma A2153-100G, 96%), sin previa purificación. Su composición de acuerdo al fabricante, fue de 583 residuos de amino ácidos, sin presencia de carbohidratos. Las soluciones del BSA fueron preparadas a una concentración de trabajo de 5% (pxv) en agua destilada, a temperatura ambiente por 30 minutos antes de su uso, agitadas fuertemente para asegurar una completa hidratación. Los compuestos a adicionar para determinar la eficacia de la encapsulación de las microesferas de proteína fueron: vainillina, benzaldehído, catequina, verde de bromocresol, y dicloroindofenol, se muestran sólo los resultados con benzaldehído. Soluciones de decano y aceite de canola, además de interfase de aire (vacío), fueron usados como la fase de inmisible en la aplicación del ultrasonido.

IV.XVI.II. Acondicionamiento de la muestra de BSA

La muestra proteica fue disuelta en agua (20 o 25 ml) y colocada en un matraz de tres bocas, de fondo redondo de 100 ml de capacidad. Los compuestos para encapsular, fueron disueltos en decano (13 o 20 ml) o aceite de canola (20 ml) y añadidos a la solución de proteína, luego se llevó a sonicación por un tiempo total de tres minutos.

IV.XVI.III. Metodología de encapsulamiento con ultrasonido

La sonicación de las soluciones de proteína (25, 38 o 40 ml) se llevaron a cabo en un procesador de ultrasonido (Model DMC750, Sonics, Newtown, USA) (Fig. 12,13), con una punta (diámetro 1,27 cm) de acero inoxidable, la cual fue sumergida a aproximadamente 1,5 mm de profundidad en la fase acuosa. El matraz de reacción con las muestras en estudio fue sumergido en un baño de hielo para el control de la temperatura. Las soluciones fueron tratadas con ultrasonido pulsado o continuo al poder seleccionado por un tiempo total de 3 min., la secuencia de irradiación sobre las muestras controlada a través de los pulsos fue: 20 seg on (encendido) y 40 seg off (apagado), o 15 seg on y 50 seg off, o aplicación ininterrumpida, a una frecuencia de 20 kHz y una potencia de 750 watts.



Figura 12. Cámara y equipo de ultrasonido

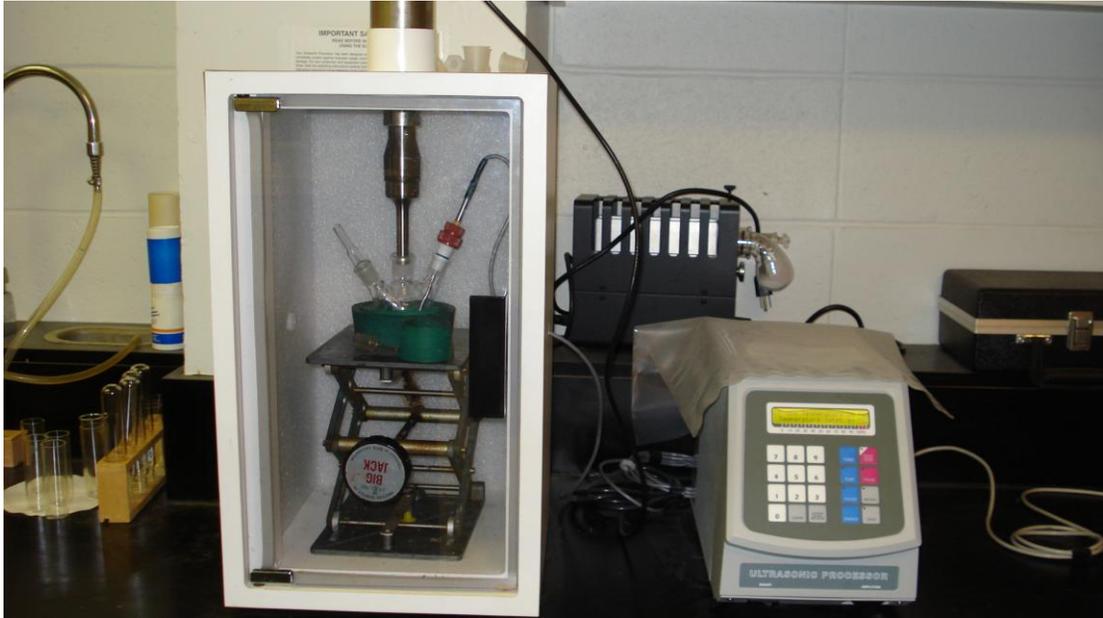


Figura 13. Equipo de ultrasonido, Model DMC750, Sonics.

La intensidad de ultrasonido generada la potencia fue de 20 watts / centímetros⁻² y la temperatura fue monitoreada durante todo el experimento.

Después de la aplicación del ultrasonido las muestras fueron filtradas en un filtro Whatman de 0,45 µm (Millipore, C.A.), y lavada varias veces para remover el exceso proteínas. Las muestras posteriormente fueron secadas a temperatura ambiente antes de ser almacenadas en viales a 10°C, previo a los análisis. Las microesferas fueron analizadas por microscopia óptica (Digilab UMA 600, Varian) y la microscopia electrónica de barrido (Hitachi S - 4300 FE-VP- SEM) para analizar los productos obtenidos, y determinar la presencia y dimensiones de las microesferas de proteína, así como la variación en la formación de estos componentes en relación a los diversos tratamientos aplicados (Alfaro *y col.*, 2006).

IV.XV. Estadística

Todos los experimentos fueron llevados a cabo por triplicado. Los datos fueron analizados por el Método Análisis de Varianza No Paramétrico (Kruskal Wallis) para determinar diferencia entre los tratamientos, a un nivel de significancia de $p < 0,05$ (Kruskal y Wallis, 1952)

V. Discusión de los resultados

V.I. Productos del aislado proteico de suero lácteo

A partir del material aislado proteico de suero lácteo (WPI, por sus siglas en inglés) grado A se elaboraron los diferentes productos de trabajo, identificados en la Tabla 2 (ver pág. 106). A la muestra de WPI se le adicionaron dos tipos de carbohidratos: galactosa (monosacárido) y lactosa (disacárido), colocándose luego bajo las condiciones para el desarrollo de la reacción de Maillard (RM). Se tomó como referencia control la muestra de WPI.

En la preparación de las muestras identificadas como WPI-T-L, WPI-T-G, y WPI-T+E-L, WPI-T+E-G, se consideró la aplicación previa de tratamientos térmico y enzimático a la proteína, antes del agregado de los azúcares (galactosa, lactosa) con el fin de lograr la modificación de la estructura de la proteína (WPI) y favorecer la reacción posterior, sin embargo se observó una baja obtención de los productos conjugados de Maillard en la experimentación, de acuerdo a los resultados del estudio de la determinación del grado de glicación con el método de fluorescamina, probablemente debido a la pérdida de solubilidad de la proteína investigada por la aplicación de calor (80 ° Cx20 min), éste comportamiento concuerda a lo discutido por Morgan *y col.*, (1999),

donde se señala, que la proteína puede sufrir una desnaturalización y/o polimerización de sus enlaces de puentes disulfuros, pudiendo ser provocado por el calentamiento aplicado y favorecer así la insolubilización de la β -Lg.

La β -lactoglobulina (β -Lg), se reconoce como la principal responsable del comportamiento, propiedades y funcionalidad que presenta éste producto (WPI), siendo que las características de este material se ven determinadas por sus características estructurales, tamaño molecular, conformación, composición/secuencia de aminoácidos, carga neta, distribución de carga, hidrofobicidad/hidrofilicidad, estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria, flexibilidad molecular y rigidez. Es del tipo globular, y al igual que el resto de las proteínas presentes en el aislado proteico de suero lácteo, son compactas y altamente estructuradas (Nacka *y col.*, 1988), las cuales participan en la estabilización de su estructura terciaria en medio acuoso, con interacciones como puentes de hidrógeno, hidrofóbicas y electrostáticas, indicándose esta estructura como difícil para ser modificada en su totalidad.

La distribución de sus residuos hidrofóbicos e hidrofílicos a lo largo de la cadena polipeptídica de la β -Lg, se consideran aleatorios, observándose después de algún desplegamiento de la molécula que la mayoría de los residuos apolares presentes se encuentran ocultos en el interior de la proteína y los polares en la superficie, en contacto con el solvente, así, a pesar de su

estructura es considerada la más hidrofóbica de las proteínas del lactosuero, la β -Lg presenta una elevada solubilidad en agua (Kinsella, 1984), pero como se observó en la experimentación, su estructura puede limitar las diversas asociaciones o interacciones con otras moléculas (Cheftel, *y col.*, 1989), como con los carbohidratos en estudio, así que el posible desplegamiento causado por el tratamiento pudo haber favorecido un comportamiento insoluble, polimerización de la proteína en algunas muestras expuestas, formación de complejos entre estas, o haciéndolas además resistentes a las enzimas (Morgan *y col.*, 1999).

Por otro lado, en la obtención de los conjugados de Maillard, el azúcar que participa en la reacción debe disponer de un grupo carbonilo libre, el cual reaccionará con los grupos primarios de las proteínas, y donde la reactividad del carbohidrato (lactosa y galactosa) viene dado por la disponibilidad de su grupo carbonilo y la forma que presente, abierta y/o cíclica, la primera no se considera muy estable, pudiéndose observar en soluciones acuosas un equilibrio entre la forma abierta y por lo menos dos cerradas (anómeros cíclicos, donde el grupo carbonilo ha desaparecido), no favoreciendo éstas últimas la interacción. La otra consideración a ser tomada en cuenta por los resultados, los azúcares reductores, en calentamiento controlados para formar los glicoconjugados vía reacción de Maillard, se ven favorecidos si el azúcar agregado o presente es una

aldosa (D-galactosa) (Yeboah *y col.*, 1999) las cuales tiene su grupo carbonilo al final de la cadena de carbonos, dando lugar al correspondiente compuesto de Heyns (2-amino-2-desoxi-aldosa), el cuál es el primer producto estable de la reacción, durante esa primera etapa la proteínas no muestran una importante alteración estructural, tampoco es observada mayor producción de color, como resultó en las primeras horas y el primer día de desarrollo de los productos. Adicionalmente con respecto al tipo de carbohidrato utilizado (PM Lactosa= 360,32 g/mol, PM Galactosa=260,14 g.mol), también se ha descrito que la reactividad de los azúcares reductores disminuye con el peso molecular (Nacka *y col.*, 1998), pero que esta dependerá de varios factores (Yaylayan y Huyghues-Despointes., 1994), que incluyen proporción de azúcar existente en forma acíclica o abierta (forma reactiva) en disolución acuosa, presencia de grupos cargados en la molécula de azúcar (por ejemplo, grupos fosfato) y electrofilicidad del grupo carbonilo, como se ha señalado previamente.

La actividad de agua (A_w), para la obtención de los productos de Maillard se mantuvo a 65%, con una solución saturada de ioduro de potasio, debido a que se conoce ésta influye en la velocidad de la reacción, en la conformación y asociación de la proteína glicosilada, favoreciéndose las modificaciones estructurales; medios con A_w más bajos conducen a la formación de agregados

no covalentes, de elevados pesos moleculares, de manera que el nivel elegido para la reacción, no parece afectó mayormente los resultados, sin embargo, al igual que la temperatura (50°C), son considerados factores determinantes para el desarrollo de la misma (Quintas *y col.*, 2007), no se llevó a cabo la modificación y evaluación de estos factores sobre los resultados.

Respecto al incremento en el tiempo de almacenamiento de las muestras este favoreció de forma exponencial el pardeamiento no enzimático (Tosun, 2004), lo cual se pudo observar al tiempo total del desarrollo de la reacción (7días) además , igualmente da lugar a la disminución en la solubilidad de las proteínas por la desnaturalización, entrecruzamiento y agregación de las mismas, ocasionando grandes complejos insolubles de naturaleza covalente (Yeboah *y col.*, 1999; Chevalier *y col.*, 2001b; Katayama *y col.*, 2002), en cuanto a la concentración de los reactantes, la relación utilizada en la experimentación fue de 1:1,5 (a.a:grupo carbonilo) varios estudios han mostrado que la reacción se ve favorecida por el exceso de azúcares en el medio, así como al aumentar la relación molar azúcar reductor : aminoácido (Warmbier *y col.*, 1976), no se tomó en consideración la variación de esta relación sin embargo, de acuerdo a los resultados parece que la reacción fue más influenciada por los otros factores considerados.

De manera que las condiciones de la reacción de Maillard para la obtención de las muestras, y los factores involucrados condujeron el comportamiento posterior de cada una de ellas, interrelacionándose sus resultados, como se discutirá en cada uno de los análisis posteriores

V.II. Determinación del grado de hidrólisis de la proteína.

Se evaluó el grado de la hidrólisis (GH), a la muestra del aislado proteico de suero lácteo, que fueron sometidas al proceso de tratamiento térmico (80° C x 20 min) y digestión enzimática (tripsina) a 35° C, previamente, utilizando el método OPA (o-ftaldialdehído), con una curva de ác. glutámico (Fig. 14) (Church *y col.*, 1983). El grado de hidrólisis (GH) de la proteína, tal como muestra la Tabla 3, fue incrementándose durante el período total de evaluación, los valores observados fueron 10,32%, 10,74%, 12,61% a los tiempos de 30, 60 y 120 min., respectivamente, y el número de aminoácidos libres aumentó 17,53 a 21,44 en 2 horas de tiempo de incubación. La hidrólisis se llevo a cabo mas rápidamente, en los primeros estados de la digestión, esto se relaciona con lo observado por Mohamed *y col.*, (1992), quienes encontraron que la hidrólisis enzimática de una proteína ocurre muy rápidamente en las etapas iniciales

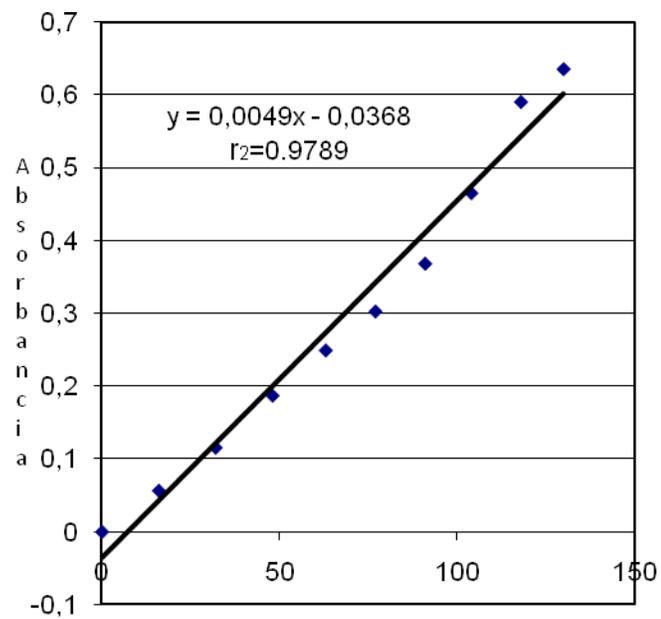


Fig. 14. Curva estándar de ácido glutámico. Método OPA

Tabla 3. Grado de Hidrólisis (GH) y grupos amino libres de proteínas (AN) (tripsina 0,25% conc. proteína)

Tiempo (min)	GH (%)	AN
30	10,32	17,53
60	10,74	18,25
120	12,61	21,44

de la hidrólisis, demostrando un ligero incremento del nitrógeno α -amino, y disminuyendo luego gradualmente. Los resultados indican además que el tratamiento previo con calor (80 °C) realizado a la muestra, pudo haber debilitado los enlaces que mantienen la estructura secundaria y terciaria, los cuales si la temperatura es conducida a altas temperaturas podrían ser destruidos (Mangino, 1984), esto no favoreció la tasa de reacción de la hidrólisis durante la digestión, tal como se esperaba, en algunos casos la desnaturalización proteica se considera beneficiosa para llevar a cabo una posterior hidrólisis proteica con enzimas tipo proteasas. La posibilidad de una agregación proteica debida a la modificación de la estructura provocada por el calentamiento en el sistema, pudo inhibir la hidrólisis enzimática, por el enmascaramiento de los sitios catalíticos provocados por la misma agregación (Shou-Wei *y col.*, 2008). Se ha evaluado, que la β -Lactoglobulina y α -Lactoalbúmina, proteínas presentes en el material de WPI, se desnaturalizan irreversiblemente a las condiciones de pH 7,0 / 70°C, y pH 6,7 / 65°C de trabajo, respectivamente. En el proceso de una agregación proteica, las proteínas, además de interacciones hidrofóbicas, pueden resultar estabilizadas por enlaces intra- e intermoleculares, debido a enlaces tipo tiol-disulfuro, siendo catalizadas por grupos tioles libres, e interacciones hidrofóbicas y/o electrostáticas, los cambios conformacionales causados por el tratamiento

térmico, pueden entorpecer entonces la accesibilidad del carbohidrato, por ejemplo de la lactosa a los grupos amino libres (Rada-Mendoza *y col.*, 2006).

Por otro lado, el aislado proteico de suero lácteo WPI, posee grupos amino potencialmente reactivos, los cuales incluyen 0,0072 moles de lisina/10g, siendo éste el amino ácido más sensible al daño provocado por la reacción de Maillard, aumentando esta reacción con el incremento en la temperatura y la humedad, este tipo de proteínas que contienen enlaces tipo SS mantienen un alto orden estructural, y muestran diferente sensibilidad a la digestión, y a las modificaciones en la secuencia de la proteína, las cuales son de importancia debido a que afecta las propiedades funcionales así como las nutricionales (Sun *y col.*, 2005). Al modificar enzimáticamente a las proteínas de trabajo con la enzima tripsina, para lograr el fraccionamiento del péptido en sitios específicos, se esperaba favorecer el grado de glicosilación y su tasa de reacción, lo cual no resultó positivamente, además las diferencias obtenidas pueden estar también relacionadas por un efecto combinado, de impedimento estérico causado por el tamaño de los azúcares y la diferencia de su reactividad (Nacka *y col.*, 1998), los péptidos obtenidos tuvieron un tamaño molecular más pequeño que la proteína original y sus propiedades funcionales fueron diferentes por ejemplo: aumento de la solubilidad por encima del rango de pH, cambios significativos

en la formación de espuma, propiedades de emulsificación y estabilidad, como veremos en discusiones posteriores de los resultados. Las propiedades funcionales de las proteínas hidrolizadas son gobernadas por la dimensión de su tamaño molecular (Adler-Nissen 1986 citado por Turgeon, *y col.*, 1992; Benítez *y col.*, 2008) de manera que el grado de hidrólisis tuvo un efecto sobre la solubilidad.

V.III. Determinación del grado de glicación de los productos. Método fluorescamina

Los resultados obtenidos con éste método, fundamentado en el hecho de la reacción de la proteína con la fluorescamina indica el número de grupos amino libres de la misma, de manera que, las proteínas glicadas tendrán menos grupos amino libres, y por lo tanto menos fluorescencia, muestran que sólo la muestra en experimentación WPI-Galactosa reaccionó inmediatamente, para demostrar un grado de glicación con un valor de 11,5% aumentando hasta 39,30 %, en una incubación total de 144 h, la misma no tuvo tratamiento de calentamiento ni enzimático previo. El resto de los conjugados no mostraron una glicación apreciable con este método. Yaylayan, *y col.*, (1992) señalan que las reacciones alcanzadas en los estados iniciales son reversibles, la glicación no observada

en las otras muestras puede deberse en principio al tipo de proteína utilizada y las características estructurales presentadas. De acuerdo con Aminlari *y col.*, (2005) el grado de glicación de una proteína como la caseína ocurre en función del tiempo de incubación y la relación de peso entre la proteína y el polisacárido, utilizados en la mezcla de reacción, el incremento del peso del polisacárido en una relación con la proteína de 5 a 7,5, aumento el número de moles ligados del dextrano de 0,1 a 0,13 luego de 48 h, y de 0,066 a 0,098 después de 72 h. Los resultados mostraron la relación con el tiempo de incubación (144h), el proceso de glicación aumentó en función de éste, de acuerdo con Achouri *y col.*, (2005), la producción de un rápido incremento de la glicación ocurre en los estados iniciales de la reacción (0-6 h) y luego un aumento más gradual, sin embargo períodos muy largos, provocan que las proteínas sean menos extendidas, o ocurra la separación de residuos glicosil de algunas moléculas de proteínas, estos fenómenos además podrían estar relacionados con la descomposición de los compuestos de Amadori, formados durante el curso de la reacción de Maillard.

Del mismo modo en cuanto a la relación utilizada (1:1,5 a.a:grupo carbonilo) los estudios indican que la reacción se ve favorecida por un exceso de azúcares en el medio, así como al aumentar la relación molar azúcar reductor : aminoácido (Warmbier *y col.*, 1976). El hecho de que el número de moles sea algo mayor a

1, se esperaba que las moléculas de la proteína reaccionarían con una o más moléculas de carbohidrato, lo cual no fue el resultado, indicando que otros factores son también importantes. La experimentación se llevó a cabo utilizando una curva estándar de WPI (Fig. 15). Como se ha observado con los resultados, la tasa de reacción para la formación de los conjugados parece depender de la conformación de las proteínas de trabajo, de acuerdo a estudios previos, se ha observado que una proteína desplegada como la α -caseína forma fácilmente conjugados polisacáridos, debido probablemente a que sus cuatro residuos lisil reaccionan fácilmente con los polisacáridos en las primeras 24 h, y el proceso de glicación se realiza rápidamente durante los primeros estados de la reacción debido a la gran mayoría de grupos aminos de la lisina los cuales se encuentran accesibles para interactuar, lo cual no parece observarse en la experimentación. Por otro lado, algunos autores señalan (Kato *y col.*, 1993; Kato, 2002) un efecto del incremento del tiempo de incubación (144h), donde la glicación podría alcanzar un punto de saturación y debido a esto, ocurrir la disminución de la flexibilidad de la proteína evaluada y no accesibilidad de los grupos amino como resultado del entrecruzamiento inter-molecular e intra-molecular, o la no disponibilidad de los residuos de lisina.

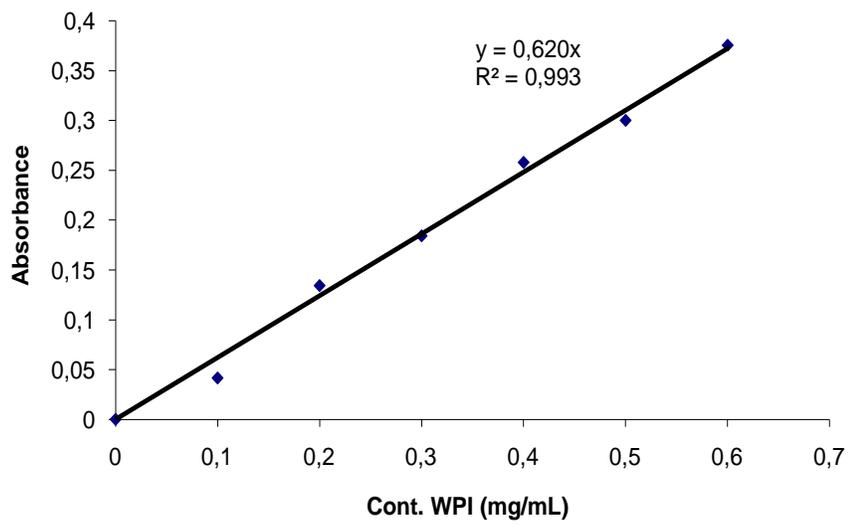


Fig.15. Curva estándar WPI. Método fluorescamina

V.IV. Formación de pigmentos marrones de los productos de reacción de Maillard.

El desarrollo del oscurecimiento en función del tiempo de calentamiento, se muestra en la Fig.16, en esta fotografía del control y productos de la reacción se observa la dependencia del tipo de azúcar utilizado, encontrándose ser mas significativo la formación de pigmentos marrones en la muestra con la presencia de Galactosa (monosacáridos) al día uno de la determinación, mostrando ser mas reactiva al ser comparada con la lactosa. De una manera general, se observó un incremento del color amarillo±naranja, en los primeros días de calentamiento hasta alcanzar un máximo, luego el cambio de coloración pasa a naranja±marrón, las muestras muestran un color más oscuro al final de los 6 días de experimentación.

El típico color marrón formado es debido a la formación de productos llamados cromóforos, los cuales han sido ampliamente evaluados en diferentes sistemas modelos (Monti *y col.*, 2000), estos son compuestos de bajo peso molecular y otros como las melanoíquinas, de alto peso molecular (Lee y Shibamoto, 2002), esto ocurre durante el proceso de la reacción de Maillard, donde reaccionan un azúcar y un amino ácido por polimerización de intermediarios de bajo peso molecular.



Fig.16. Pigmentación de los productos conjugados de Maillard
En orden descendiente: WPI-Lactosa, WPI-Galactosa, WPI
+T-Lactosa, WPI+T-Galactosa, WPI+TE-Lactosa, WPI+TE-
Galactosa.
Días en evaluación = 1, 2,4, 6

Se observó que bajo las mismas condiciones, el oscurecimiento que ocurre en las muestras evaluadas aumenta casi linealmente con el tiempo de calentamiento al cual son sometidas, algunos autores señalan que el desarrollo o la presencia de alguna la actividad o capacidad anti-radical tiene un comportamiento opuesto (Morales y Jiménez-Pérez, 2001), sin embargo en la experimentación el oscurecimiento no fue relacionado a la actividad de captación de radicales libres de los conjugados de Maillard.

La muestra control, WPI (no se muestra en la fotografía), no mostró algún oscurecimiento, confirmándose entonces que ocurre en las mezclas de azúcar/aminoácido, y relacionando el oscurecimiento completamente a los productos conjugados de Maillard, la formación de pigmentos marrones han sido usados como indicadores de esta reacción en los alimentos (Matiacevich *y col.*, 2005).

Los valores DE (medidos con una escala de color/oponente, en Unidades NBS, de Diferencial de Color), es la diferencia entre la cromaticidad de la muestra y del estándar, medidos con el espectrofotómetro Labscan tricromático VI-A30. El valor más utilizado para la determinación o indicar el color (aprobación o rechazo) es el DE*, pudiendo obtenerse un numero referencial y establecerse la tolerancia, al ser la misma una determinación matemática.

La Fig.17, muestran gráficamente la diferencia de los valores (DE) encontrados en los productos, estas representan el promedio de la diferencia máxima que es aceptada para una serie dada o un grupo.

Como es observado, en la figuras presentada, con el tiempo se unifican los valores, debido a la formación de una mayor cantidad de los pigmentos marrones, en función del tiempo y aplicación de calor, las muestras control no desarrollan pigmentos marrones, lo cual identifica a productos de la reacción de Maillard. La evaluación del pardeamiento a través de la lecturas L, a, b y aplicando las definiciones de los parámetros diferencia total de color (DE), son resultados son concordantes con la observación de los productos visualmente, pudiéndose por ende utilizar los valores DE para evaluar el cambio de color, provocado por el grado de pardeamiento determinándolo a través de las lecturas.

V.V. Determinación de la actividad anti-radical. Método 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).

El método se basa en la reducción etanólica del 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH⁻) en presencia de un antioxidante donante de hidrógeno, desarrollándose de acuerdo a la siguiente fórmula: la forma no-radical DPPH⁻ (coloreada) + producto de reacción de Maillard (en estudio) → DPPH⁻H (no

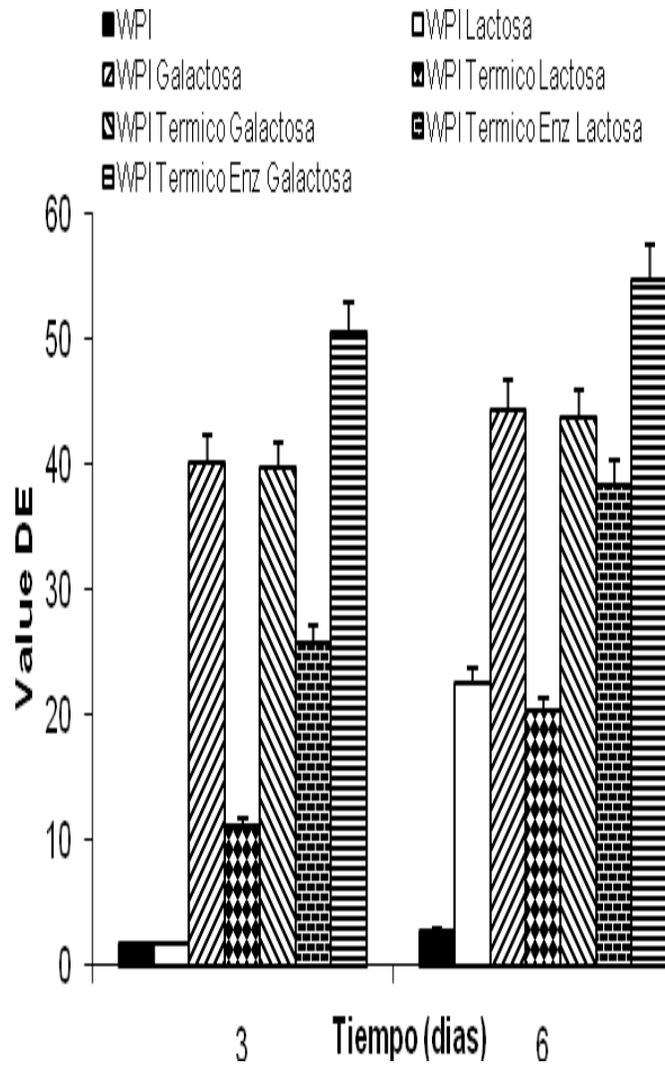


Fig. 17. Valores de diferencia de cromaticidad (DE), de las muestras para el tiempo total de análisis.

En orden: WPI, WPI-L, WPI-G, WPI-T-L, WPI-T-G, WPI-T+E-L, WPI-T+G

coloreado) + producto de reacción de Maillard.

El rango de concentración de la curva estándar de DPPH utilizada fue de 0,0 a 75mg/mL (Fig.18), los valores DPPH Rem% para cada muestra se observan en la Tabla 4, calculados como $\%DPPH_{rem} = ([DPPH]_t / [DPPH_0]) \times 100$. De acuerdo a la técnica, las especies que se comportan como oxidantes reaccionan inmediatamente con el DPPH dando origen a un cromógeno purpura. La actividad antioxidante de los conjugados de Maillard, corresponden a la capacidad que presenten para inhibir las especies oxidantes y limitar así la oxidación del DPPH. Los valores de absorbancia son proporcionales al grado de oxidación del DPPH por el radical libre, de manera que la propiedad de captar radicales libres por los conjugados de Maillard, fueron cuantificados.

A mayor porcentaje de desaparición del color purpura inicial, mayor fue la capacidad o actividad anti- radical, encontrándose en la experimentación, como puede observarse de los valores obtenidos, la capacidad antioxidativa aumentó suavemente en el tiempo.

Las muestras identificadas WPI-Térmico+Enzima y WPI, ambas con carbohidrato galactosa mostraron la mayor actividad anti-radical con el método DPPH, el incremento se mostró rápidamente desde el primer día de la determinación , alcanzando luego una estabilidad de los valores.

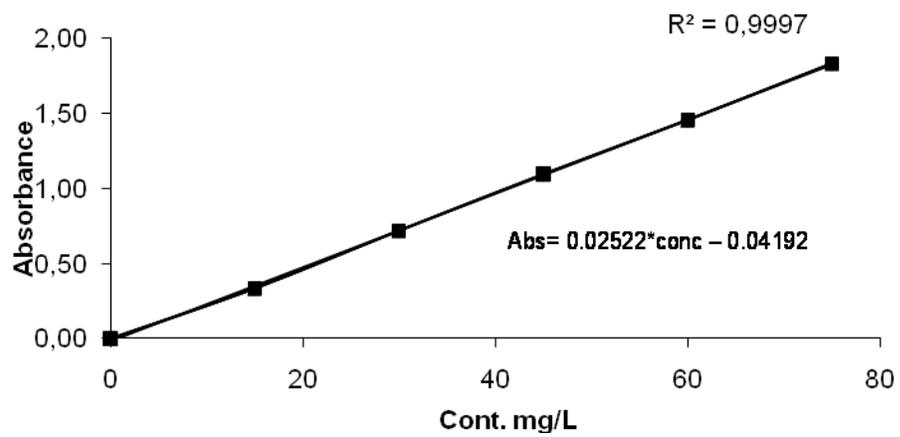


Fig. 18. Curva estándar de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

Tabla 4. Valores Remanentes de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH %)

Muestra (Días)	WPI	σ	WPIL	σ	WPIG	σ	WPITL	σ	WPITG	σ	WPITEL	σ	WPITEG	σ
T=0	100	0,14	100	1,13	100	0,42	100	0,14	100	0,85	100	0,57	100	0,14
T=1	100	0,49	100	0,57	52,64	3,32	100	0,63	100	0,14	99,56	0,71	24,40	1,48
T=2	100	0,07	97,79	1,70	39,71	2,12	100	0,35	97,78	1,34	88,12	1,98	20,39	1,76
T=3	100	0,21	91,35	2,19	31,42	1,34	100	0,35	93,13	0,27	61,71	0,40	22,79	2,05
T=4	100	0,28	82,57	2,40	47,07	2,97	100	0,07	91,50	0,98	53,76	0,19	22,62	1,06
T=5	100	0,57	81,52	3,46	57,57	1,41	100	0,07	89,86	1,06	49,83	0,33	22,84	2,43
T=6	100	0,41	86,36	1,63	50,32	0,46	99,34	0,42	76,81	1,63	38,86	0,97	19,77	2,05

n=3

No se encontró diferencias significativas del comportamiento entre la muestra control (WPI) y la muestra de WPI con tratamiento Térmico y carbohidrato Lactosa, es decir ésta última no presentó actividad antioxidante relativa, y entre las muestras WPI-Lactosa y la WPI-Térmico+Galactosa la actividad fue similar. De nuevo la naturaleza del azúcar parece ser un factor que influencia la actividad anti-radical de las proteínas glicadas, existiendo una relación positiva entre los factores concentración y la capacidad antioxidante la cual ha sido bien documentada, siendo la actividad antioxidante de los conjugados altamente relacionada a la estructura química (Rao y Muralikrishna, 2006).

La diferencia estructural y/o química entre diferentes azúcares (lactosa y galactosa), condujo a la obtención de diferentes conjugados de Maillard, identificándose de manera general que básicamente tres parámetros pueden influenciar la actividad anti-radical: el grado de glicación presentado, la naturaleza del azúcar, y el grado de la hidrólisis proteica.

La disminución en la absorbancia causada por el radical DPPH y el antioxidante es debido al atrapamiento o captación del radical por donación de hidrogeno (Rao y Muralikrishna, 2006). Los datos obtenidos pueden ser relacionados con el trabajo de Turkmen *y col.*, (2006), quienes muestran que los cambios en la capacidad antioxidativa así como la formación de pigmentos marrones, en muestras de miel previamente tratadas con un temperatura entre 50 – 70 °C, en

función del tiempo, aumentó continuamente desde el primer día hasta los 12 días de evaluación, a las temperaturas de 50, 60 °C, y en 10 días a la temperatura de 70 °C. Con un aumento de la temperatura de trabajo, ambas, tanto la capacidad como la formación de pigmentos marrones, se vieron incrementadas. Ciertos compuestos reaccionan rápidamente con el radical DPPH, reduciéndose el número de moléculas del radical DPPH correspondientes al número disponible de grupos hidroxilos, en la mayoría de los compuestos evaluados, el mecanismo es considerado altamente complejo (Brand-Williams *y col.*, 1995).

V.VI. Determinación de la capacidad antioxidante. Método de polifenoles, sistema caroteno/ ácido linoleíco

En este trabajo se estudió la actividad antioxidante de los conjugados de Maillard mediante el ensayo de atrapamiento de radicales DPPH' previamente discutido y el sistema β -Caroteno-acido linoleíco, con resultados satisfactorios.

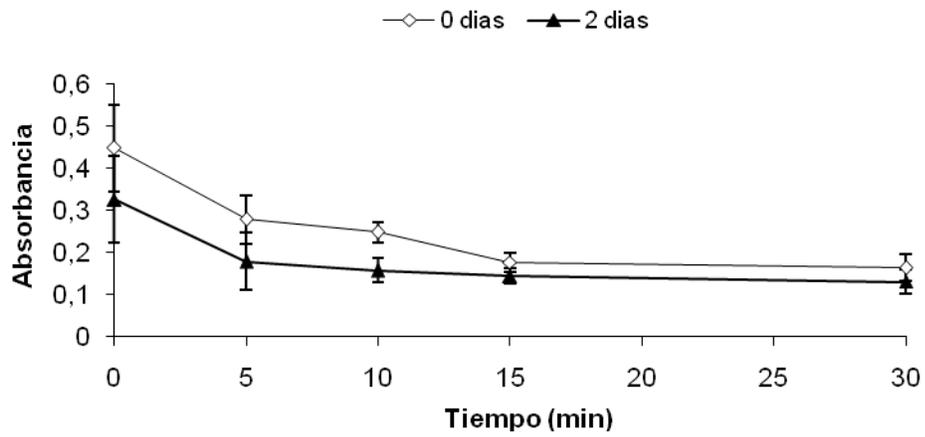
La actividad antioxidante de las muestras se evaluó basándose en la determinación de la decoloración del β -caroteno mediante hidroperóxidos, y por tanto la presencia de antioxidantes evitan este proceso.

La evaluación por separado de antioxidantes individuales, permite conocer con certeza la capacidad antioxidante total de un producto, esto debido a los posibles efectos sinérgicos que puedan establecerse entre los antioxidantes presentes (Zapata *y col.*, 2007).

La actividad antioxidante de la muestra añadida inhibe la generación de los radicales. En los productos estudiados se observó una disminución de la absorbancia durante la oxidación de los compuestos β -caroteno/acido linoleico, la decoloración señala la actividad antioxidante que presentaron, esta comienza con el ataque a los radicales libres. Se encontró que los productos WPI-G, WPI-T+E-L y WPI-T+E+G presentaron una actividad antiradical similar entre ellos, observándose un máximo en las muestras con dos días de incubación, la muestra WPI-L presentó la menor actividad. Tuvieron un comportamiento similar sobre los radicales generados en relación con el contenido de antioxidantes coincidiendo esto con el método anterior de evaluación, observándose además en todos los resultados que los productos son más efectivos en los inicios del tratamiento en lograr el atrapamiento de radicales (Fig. 19,20).

V.VII. Capacidad emulsificante de los productos de la reacción de Maillard

Sistema B-caroteno/acido Linoleico. WPIL



Sistema B-caroteno/ac. linoleico. Muestra WPIG

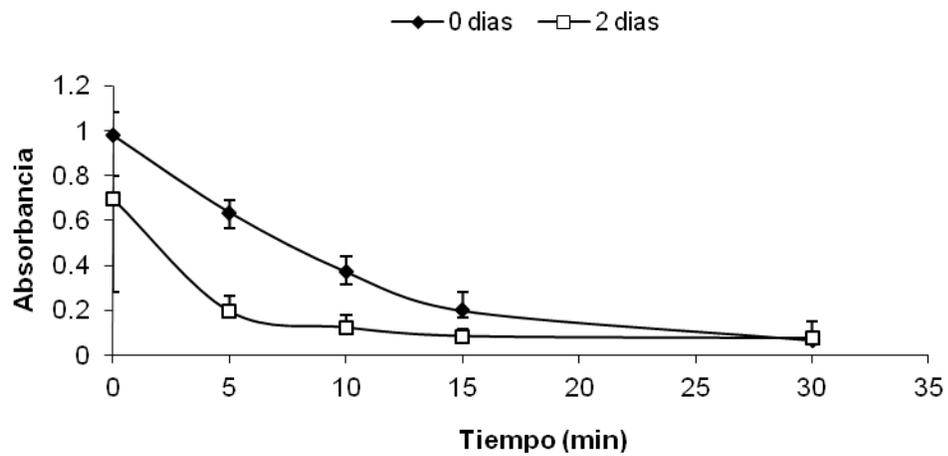
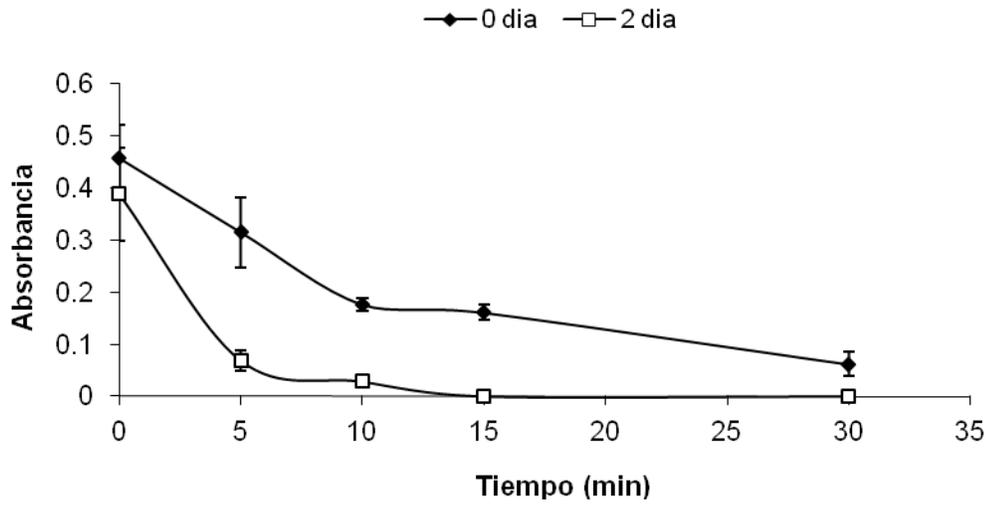


Fig. 19. Gráficos del sistema betacaroteno/ linoleico. Evaluados en día 0 y 2

Sistema B-caroteno/ac. linoleico. Muestra WPITEL



Sistema B-caroteno/ac. linoleico.Muestra WPIEG

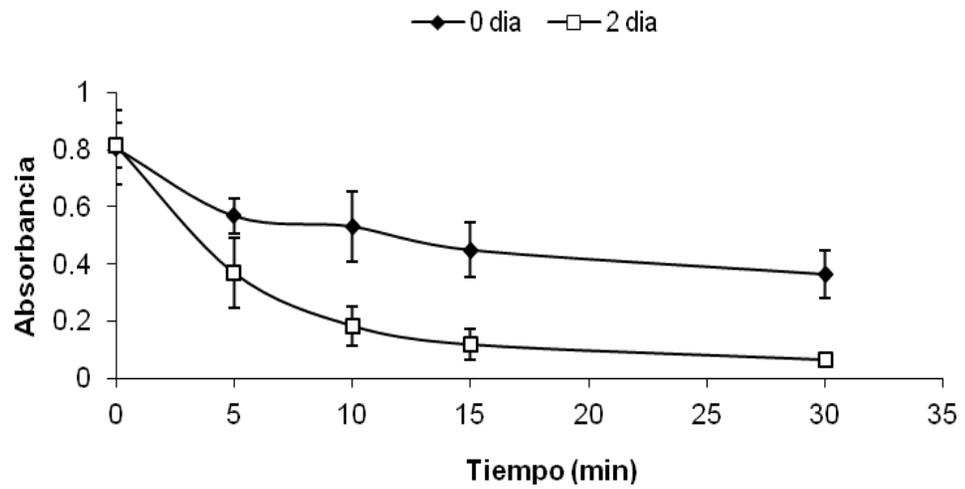


Fig. 20. Gráficos del sistema betacaroteno/linoleico. Evaluados en día 0 y 2

Ha sido discutido que el rol de los polisacáridos en la estabilidad de una emulsión de un conjugado proteína-polisacárido, se relaciona probablemente con la fijación de los residuos hidrofóbicos de la molécula de proteína, a una partícula de aceite presente, y la orientación de la fracción de los polisacáridos en la capa acuosa, durante la preparación de la misma, favoreciéndose la formación de una capa estérica que dará estabilidad a la emulsión, e inhibiéndose la formación de la coalescencia de las gotas de aceite (Aminlari y *col.*, 2005).

Todas las muestras evaluadas (Tabla 6) mostraron diferentes capacidad emulsificante EAI (índice de la actividad emulsificante) a un pH de 7,0, disminuyendo esta actividad lentamente hasta los seis días de experimentación.

El tiempo total de la experimentación no tuvo efecto sobre la capacidad de emulsificar de las muestras, pero la capacidad de emulsión de las muestras si fue diferente, esto debido a la diferencia de tratamientos y carbohidratos presente, al ser comparadas con la WPI, todas denotan diferencia en su comportamiento. Es conocido que el tratamiento térmico aumenta ligeramente la actividad, relacionándose con el hecho de que, los tratamientos térmicos dan lugar a la exposición de grupos hidrofóbicos inicialmente atrapados en el interior de las moléculas proteica, las proteínas con una hidrofobicidad alta presentan

Tabla 5. Índice de actividad emulsificante ($m^2.g^{-1}$)

Tiempo (días)	WPI	σ	WPIL	σ	WPIG	σ	WPITL	σ	WPITG	σ	WPITEL	σ	WPITEG	σ
0	17,67	0,61	18,02	0,30	16,91	0,69	15,75	0,76	14,84	0,56	13,61	0,88	13,97	1,34
1	16,92	0,31	18,42	0,27	14,67	1,44	14,37	0,21	14,99	0,21	13,14	1,83	15,73	0,99
2	18,10	0,74	18,58	0,01	14,31	0,26	14,90	0,47	11,90	0,20	17,27	0,19	17,71	3,84
3	17,05	1,87	15,07	0,39	13,41	0,18	14,64	0,06	12,16	0,25	18,81	0,85	18,44	0,02
4	14,63	0,43	17,09	0,63	12,33	0,77	14,99	1,09	12,98	0,11	13,64	1,04	21,51	0,02
5	16,33	0,43	8,85	0,50	11,52	0,49	15,08	0,09	11,53	0,48	11,24	0,33	20,26	0,19
6	13,94	0,52	8,96	0,37	10,41	0,73	12,96	1,21	12,26	0,24	10,60	0,27	16,14	1,07

n=3

valores mayores de EAI, en comparación con las de una hidrofobicidad baja. Sin embargo, en casos de una extensa modificación enzimática, esto podría causar la modificación de las propiedades funcionales de las proteínas de los alimentos, de manera que el grado de hidrólisis (GH), ha de ser controlado para obtener una distribución de tamaño de reproducible y un óptimo péptido, cuando la hidrólisis enzimática son aplicadas para obtener modificaciones de propiedades funcionales y diferentes comportamientos (Shou-Wei *y col.*, 2008). El comportamiento en cuanto a la estabilidad (Tabla 6) de nuevo no se encontró diferencias significativas para el tiempo de evaluación, pero si entre las muestras en estudio, relacionándose esta diferencia de nuevo con los diversos los tratamientos y carbohidratos presentes, sin embargo el comportamiento de la muestra WPI-L fue relativamente similar a la del WPI.

V.VIII. Solubilidad de la proteína a pH 6,8

La solubilidad es una de las propiedades funcionales más importantes de las proteínas, debido a que afecta a las otras propiedades, como las de superficie-activa, reológicas o hidrodinámicas.

La determinación de la solubilidad proteica a pH 6,8 se realizó a la muestra control WPI y a los diversos productos (Fig. 21). Observándose de acuerdo a

Tabla 6. Estabilidad de la emulsión

Tiempo (días)	WPI	σ	WPIL	σ	WPIG	σ	WPITL	σ	WPITG	σ	WPITEL	σ	WPITEG	σ
0	18,70	0,62	15,91	0,42	16,42	0,19	17,17	0,22	17,38	0,21	18,44	0,45	17,97	0,43
1	16,24	0,28	17,09	0,97	17,97	0,26	16,81	0,49	17,75	0,38	17,60	0,23	21,33	0,45
2	16,31	0,27	16,13	0,40	16,99	0,39	16,63	0,26	18,24	0,30	16,50	0,27	18,24	0,23
3	18,07	0,09	16,60	0,32	17,18	0,28	17,59	0,30	17,99	0,24	16,65	0,29	21,72	0,28
4	16,99	0,27	16,24	0,34	17,28	0,32	17,58	0,34	18,00	0,35	16,91	0,31	17,95	0,29
5	15,52	0,33	17,69	0,35	18,48	0,38	16,36	0,23	18,35	0,37	17,60	0,29	18,86	0,38
6	17,69	0,29	16,96	0,05	18,28	0,03	18,29	0,45	17,58	0,32	17,72	0,35	20,25	0,27

n=3

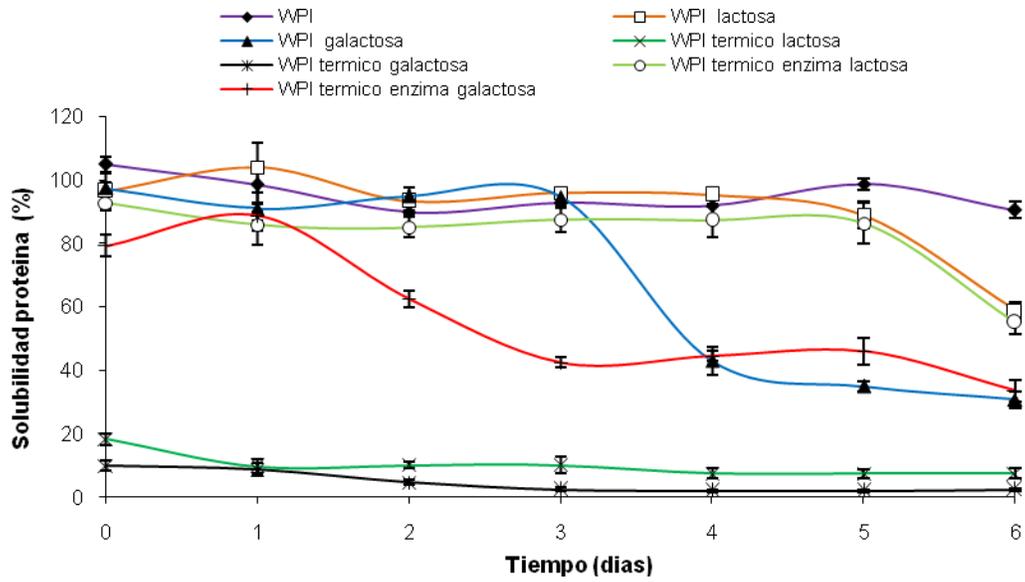


Fig.21. Solubilidad proteica de las muestras a pH 6,8, en un tiempo total de seis días

los resultados obtenidos una disminución de la solubilidad en aquellas muestras a las cuales se les aplicó un tratamiento con calor, estas son las identificadas como WPI-T-L y WPI-T-G, y por otro lado, en las muestras con tratamiento de hidrólisis enzimática, WPI-T+E-L y WPI-T+E-G, se vio favorecida la solubilidad, lo cual en primer lugar la aplicación de temperatura puede haber modificado la estructura proteica, favoreciendo la agregación e insolubilidad, y en el segundo caso, la posible liberación de péptidos solubles de los agregados, y/o el incremento del número y exposición de grupos ionizables, como los aminos y carboxilos (Panyam y Kilara, 1996), de manera que la hidrólisis enzimática limitada o controlada, puede ser usada como una efectiva técnica para mejorar la solubilidad proteica (Shou-Wei *y col.*, 2008). Estos resultados pueden ser relacionados a lo discutido por Nacka *y col.*, (1998), en el caso de proteínas modificadas con carbohidratos (galactosa, glucosa, lactosa o ramnosa), el cual señala se ha observado un aumento del 75% de su solubilidad a pH 4,5 mostrándose un efecto favorecedor debido a la acción de la glicación producida con estos azúcares, y la disminución de la solubilidad debida a procesos de calentamiento.

Las proteínas sustituidas con carbohidratos como hexosas y lactosa muestran una alta solubilidad y mejoramiento de su actividad emulsificante, al ser comparadas con aquellas proteínas no glicadas, evaluadas en un completo

rango de pHs. Así que, la glicación puede favorecer la modificación del perfil de solubilidad, produciendo un cambio de mínima solubilidad hacia pHs más ácidos, por otro lado la naturaleza o tipo de azúcar involucrado, es un factor esencial para mejorar las propiedades funcionales de las proteínas glicadas por procesos relacionados a la reacción de Maillard, de acuerdo a esto, como se ha observado, existe una mejoría de las propiedades funcionales a través de Maillard, relacionándose con la naturaleza del azúcar (Chevalier *y col.*, 2001). El contenido de proteína para las muestras en experimentación fueron: WPI 93,04 %, WPI-L 69,21 %, WPI-G 80,02 %, WPIT-L 62,33 %, WPIT-G 79,49 %, WPIT+E-L 69,41 %, y WPIT+E-G 79,48 %, respectivamente (Tabla 7), La determinación de la solubilidad a pH 6,8, sugiere como el material proteico se comportará cuando es incorporado a un producto alimenticio (Inyang y Iduh, 1996) e indica como es influenciada la solubilidad por, el origen del material, condiciones de procesamiento, pH, y otros parámetros corroboran este comportamiento. Un producto soluble, es más fácil de incorporar, que uno insoluble; así, las proteínas con baja solubilidad tendrán un uso restringido en la elaboración de productos alimenticios (Kinsella, 1979).

V.IX. Emulsiones de los productos en experimentación.

Tabla 7. Contenido de proteínas (6,38)

Muestra (b.s.)	Proteína (%)	σ
WPI	93,04	0,022
WPI-L	69,21	0,121
WPI-G	80,02	0,126
WPI-T-L	62,33	0,049
WPI-T-G	79,49	0,099
WPI-T+E-L	69,41	0,018
WPI-T+E-G	79,48	0,162

Las emulsiones tipo aceite-agua, son considerados vehículos de importancia para la liberación de compuestos bioactivos hidrofóbicos, para un amplio rango de productos alimenticios, se escogió evaluar al d-limoneno, como sustancia natural y conocido monoterpeneo, extraído de materiales cítricos, de olor característico a naranjas y limones; con dos isómeros ópticos: el D- y el L-Limoneno, como compuesto para determinar la capacidad de atrapamiento de los materiales y la estabilidad. Como lo refieren algunos autores, las características que presentan las emulsiones son de importancia crítica para la calidad y funcionalidad de los sistemas encapsulados, viéndose afectadas por el tipo de carbohidrato, y por la relación WPI (proteína) -carbohidrato (Sheu y Rosenberg, 1998), por otro lado, es conocido que las proteínas son excelentes agentes emulsificantes, debido a su hidrofobicidad y flexibilidad molecular, esto le permite una rápida absorción y reordenamiento en la interfase aceite-agua, al ocurrir esto sobre la partícula de aceite da lugar a una capa macromolecular de protección, la WPI posee regiones hidrofílicas e hidrofóbicas, lo cual le aporta cierta estabilidad a la emulsión a través de interacciones estéricas y electrostáticas. Contrariamente, los polisacáridos de alto peso molecular, tendrán un comportamiento hidrofílicos en la estabilización de emulsiones de aceite en el agua, y generalmente, se muestran como espesantes y gelificantes

y resultando en la formación de la emulsión como una barrera de macromoleculares en el lado acuoso de la emulsión, probablemente entre las gotas dispersas (Dickinson y Galazka, 1991), algunos autores (Dickinson, 2009) señalan su influencia en las propiedades de los distintos sistemas a través de sus propiedades interfaciales, estabilizadores de la emulsión por su adsorción en capas de protección en las interfaces (aceite-agua), interacción con gotas o partículas de la emulsión afectando su reología y estabilidad con respecto a la agregación y la separación del suero.

Se observan algunas de las emulsiones obtenidas de los productos en experimentación, Fig. 22 y 23, se evaluó su formación, y su estabilidad en el tiempo conjuntamente con la degradación del limoneno. Adicionalmente se preparó una emulsión de goma arábiga (GA) como control, y se muestra como emulsión individual o agregada a cada uno de los productos evaluándose su efecto sobre la estabilidad de los productos de Maillard, encontrándose que su presencia en las emulsiones modificó la viscosidad del medio e inhibió la tasa de coalescencia, de acuerdo con Reiffers-Magnania *y col.*, (2000), en los sistemas de emulsiones la cantidad de proteínas presentes afecta su distribución en la interfase y en el desarrollo de la emulsión, pero el agregado de polisacáridos adicionales pueden desbalancear las fuerzas repulsivas y atractivas entre las fases de aceite y agua, al estimular el gradiente de presión



Fig. 22. Emulsiones. I. Goma arábica; II. WPI; III. WPI-T+E-L; IV. WPI-T+E-G y V. WPI+G



Fig. 23. Tubos de quick scan, emulsiones de las muestras

En orden: I. Goma arábica (1%) (GA); II. WPI; III. WPI+GA (1%); IV. WPI-T+E-Lactosa; V. WPI-T+E-Lactosa+ GA (1%); VI. WPI-T+E-GA; VII. WPI-T+E-Galactosa+ GA (1%)

osmótica en la fracción o fase continua, y resultando luego una posterior agregación de las partículas de aceite, sin embargo el tiempo total del estudio aprox. 37 días, la emulsión de goma arábica, y las muestras de productos de Maillard con el agregado de GA (1%), presentaron una adecuada estabilidad, sin mostrar separación de fases o agregación. Por otro lado, la bibliografía indica que la presencia de aproximadamente un 2% de proteínas enlazadas covalentemente en la muestras tipo de goma arábica comercial, es considerada la responsable de aportar a este hidrocoloide polisacárido una propiedad emulsificante, siendo identificado como un híbrido natural proteína-polisacárido (Dickinson y Galazka 1991; Gaonkar, 1991). Así, que hidrocoloides o gomas, polímeros de cadenas largas y de altos pesos moleculares, se dispersan o disuelven en agua, aportando un considerable incremento de la viscosidad de la solución, y/o induciendo la gelificación aun a bajas concentraciones. En la Fig. 24 se muestra la goma arábica y algunas emulsiones de los productos de Maillard en con la presencia de la GA, donde se puede ver la estabilidad relativa. En las emulsión la presencia de un agente emulsionante, y un estabilizador, el primero activa la formación de la misma, como especie química, y la estabilización a corto tiempo por acción interfacial, y el segundo, le confiere la estabilidad a largo tiempo, posiblemente debido a un mecanismo de adsorción, normalmente este lo representa las proteínas o polisacáridos.

V.X. Emulsión obtenida con un equipo homogenizador de alta presión

El equipo de emulsificación, u homogenizador a alta presión, produce emulsiones con finuras adecuadas, propiedades de textura (cremas, helados) y altos grados de estabilidad, de acuerdo a Desrumaux y Marcand, 2002. La alta presión en la homogenización, produce inicialmente una emulsión suave, luego le es aplicada una agitación a alta velocidad, siendo luego forzada la emulsión bajo presión a través de una válvula angosta. La combinación de ese intenso corte, y las condiciones de un flujo turbulento en las válvulas del equipo conduce a la rotura de los glóbulos de grasa de las muestras. Los efectos de la homogenización de alta presión en las emulsiones aceite en agua, son considerados complicados, y se considera producen cambios en la conformación de la proteína utilizada, probablemente debido a efectos combinados del tratamiento de la alta presión y a un posible aumento de la temperatura del sistema, así que este probable cambio que ocurre en la conformación de la proteína, probablemente modifica las propiedades de emulsificación de las proteínas del aislado proteico de suero lácteo (WPI).

Además, existe una fuerte correlación entre la formulación de la emulsión, el rango de presión usado en la homogenización la cual fue 1000 psi x 1 tiempo y

3000 psi x 4 veces en la experimentación, y su estabilidad, ya que se ha observado en emulsiones formadas de aceite de girasol en agua (20% aceite), estabilizadas con proteínas de suero lácteo, donde la presión máxima óptima del sistema de acuerdo a los resultados mejoro la estabilidad y los sólidos en suspensión, provocando una mejor distribución en el tamaño de la partícula, un diámetro (d_{32}) y un tamaño del coeficiente de dispersión de la partícula mínimo evaluando los resultados con un equipo del *light scattering* (Desrumaux y Marcand 2002), adicionalmente el número de ciclos utilizados en los procesos también determinan el tamaño de la partícula.

V.XI. Emulsiones obtenidas con ultrasonido

Una emulsión obtenida con ultrasonido, es observada en la Fig. 24, no se muestran la totalidad de las muestras. Las condiciones aplicadas de poder, tiempo, y energía para la obtención de las emulsiones con la técnica de ultrasonido se encuentran en la Tabla 8, se indica una amplitud completa del equipo (100%), la temperaturas iniciales de las muestras fueron de 12°C, y las finales se encontraron entre 32 y 42°C, para evitar la modificación o desnaturalización de las muestras en estudio. En la cantidad de energía liberada no se observa una gran variación entre las muestras evaluadas,



Fig.24. Emulsión obtenida con ultrasonido

Tabla 8. Condiciones de trabajo del ultrasonido

Interfase	Pulso	Amplitud	Vol	Temp. Inicial	Temp. Final	Energía	Poder
		(%)	(mL)	(°C)	(°C)	(J)	(W)
WPI	5min ON/ 1min OFF/5min ON/ 1min OFF/5min ON	100	50	12	32	68685	79.5
WPIL	5min ON/ 1min OFF/5min ON/ 1min OFF/5min ON	100	50	12	36.5	77865	87.5
WPIG	5min ON/ 1min OFF/5min ON/ 1min OFF/5min ON	100	50	12	38	82210	88
WPITEL	5min ON/ 1min OFF/5min ON/ 1min OFF/5min ON	100	50	12	42.5	88028	94
WPITEG	5min ON/ 1min OFF/5min ON/ 1min OFF/5min ON	100	50	12	40.2	75474	84

debido a que esta dependerá del tipo de muestra, y la diferencia de viscosidad que se presente entre las muestras expuestas. El tiempo de sonicación aplicado, fue de 5 min ON/ 1min OFF/5min ON/ 1min OFF/5min ON, encontrándose adecuado para la formación de la emulsión al poder utilizado, algunos autores señalan (Mongenont *y col.*, 2000), que al realizar un cambio en el tiempo de aplicación de la sonicación, a un poder constante (140-150 W), el tamaño de las partículas puede verse afectado, además un tiempo de sonicación menor de 10 min. producirá partículas grandes con amplia distribución, mientras que un tiempo de sonicación mayor de 10 min dará lugar a la formación de la coalescencia. Igualmente discuten que la eficiencia de la emulsificación es ampliamente determinada por el sistema y el emulsificador, indistintamente del tipo de método emulsificante utilizado, sin embargo el ultrasonido incrementara la calidad de la emulsión cuando el soporte ha presentado bajas propiedades emulsificantes y/o una viscosidad baja o débil (Mongenont *y col.*, 2000).

Generalmente las emulsiones obtenidas por oscilaciones mecánicas a las frecuencias del ultrasonido poseen calidad y estabilidad, pero no existe una teoría única que explique la estabilidad de una emulsión, el factor de mayor influencia sobre la estabilización se encuentra en las propiedades físicas de la película interfacial. Cuando una fase se dispersa en el seno de la otra, como

ocurre en la emulsificación, debe ser suministrada cierta cantidad de energía al sistema, de manera de incrementar el área superficial de las partículas dispersas, y los glóbulos adquieran una cantidad de energía libre de superficie. La cantidad de energía que se consume (Tabla 8), para la obtención de la emulsión es dependiente del proceso y de la temperatura del sistema, cuando el proceso se realiza en caliente puede ocasionar pérdidas desde el punto de vista energético y en la eficiencia de la misma. La formación de la emulsión, requiere de esta energía, y de una aplicación directa, existe una agitación que ocurre para lograr la misma, convirtiendo la mayor parte de la energía en calor a causa de la fricción ya que ésta presente cierta viscosidad en el sistema, entonces, las propiedades o características de la temperatura, composición, y método utilizado, es decir diversos factores controlan el proceso e influirán probablemente en su estabilidad.

El ultrasonido utiliza la formación súbita y consecuente colapso de burbujas de aire en el sistema, y ésta alcanza a destruir las gotas o partículas, la reproducibilidad de esta técnica puede ser difícil de lograr debido a la dificultad de controlar los núcleos formados de cavitación, donde la presión del líquido resulta menor que la presión del vapor, y el tamaño promedio de la gota o partícula dependerá de la energía aplicada por unidad de volumen.

En el experimento se observa que el ultrasonido de alta intensidad suministra la energía necesaria para dispersar a una fase líquida (fase dispersa) en pequeñas gotas en una segunda fase (fase continua), formándose la emulsión, la cavitación causa ondas de choque intensivo en el líquido ocurriendo el movimiento del mismo a alta velocidad, la temperatura inicial del sistema se mantuvo igual para todas las muestras, y la temperatura final no tuvo mayor diferencia, lográndose mantener a un nivel adecuado usando una camisa de hielo en el equipo. Los hidrocoloides presentes actúan como agentes emulsificadores (la superficie de las sustancias activas, de superficie) y estabilizadores.

V.XII. Índice de formación de crema de las emulsiones

Se muestran fotografías del índice de formación de crema de algunas muestras (Fig. 25 a 29), obtenidas tanto por las técnicas de homogenización a alta presión como la de ultrasonido. Como se mencionó previamente, la emulsión de goma arábica, presenta el mejor índice de crema, no mostró separación de fases en el tiempo total de evaluación (37 días), las propiedades de emulsificación de la mezcla y la estabilidad de ésta, se conocen y ven favorecidas cuando se logra la reducción en el tamaño de la partícula, esta

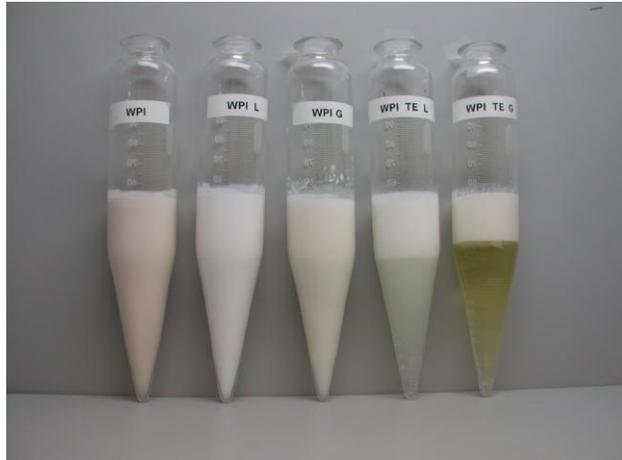


Fig. 25. Índice de Crema- Emulsión Homogenizador de alta presión.
En orden: I. WPI, II. WPI+L, III. WPI+G, IV. WPI-TE+L, V. WPI-TE+G



Fig. 26. Índice de Crema- Emulsión Homogenizador de alta presión (21°C / 60días). En orden: I. AG, II. WPI, III. WPI-TE+L, IV. WPI-TE+G, V. WPI+G



Fig. 27. Índice de Crema- Emulsión Ultrasonido, WPI (21°C/1 días)



Fig. 28. Índice de Crema- Emulsión Ultrasonido, WPI-TE+L (21°C/1 días)



Fig.29. Índice de Crema- Emulsión Ultrasonido, WPI-TE+G, WPI+G (21°C/ 1 días)

emulsión presentó los valores más bajos en el tamaño del diámetro de partículas, siendo que la formación e índice de crema, son dependientes del tamaño y además del peso molecular del polisacárido, no se observó modificación por el tiempo total de incubación de esta muestra.

Asimismo algunas modificaciones que ocurren en los otros sistemas emulsificados de las muestras en experimentación pueden probablemente ser atribuidos a la aplicación o presencia de cierto calentamiento al producto covalente proteína-polisacárido, el cual pudo ser asimilado por la fracción proteica en la interfase aceite-agua, produciendo un aumento de las fuerzas repulsivas y estéricas entre las partículas, dando lugar al solapamiento de la cadena del polisacárido. Se esperaría que las moléculas de proteínas al acomplejarse, y como resultado de algunas cargas opuestas, que podrían sobrellevar o contener uno o más restos de los polisacáridos, las estabilizaría y evitaría de esta manera las coalescencia (Diftis y Kiosseoglou, 2003), sin embargo en los sistemas evaluados, la observación es contraria.

Los efectos del tratamiento con alta presión sobre algunas propiedades funcionales y físicas de un aislado proteico de soya han sido previamente investigados, observándose en estos en una lenta pero gradual declinación de la solubilidad en los sistemas, un aumento de la superficie de hidrofobicidad y disminución del índice de estabilidad de la emulsión evaluada. De manera que

se ha encontrado cierta influencia de los tratamientos a alta presión sobre estas propiedades, además de ser dependientes de la concentración proteica. Los resultados sugieren que los tratamientos con altas presiones pueden ser usados para modificar las propiedades de las proteínas con una selección apropiada del nivel de presión y concentración proteica. La conformación de la proteína, es un factor a considerar y discutir sobre la estabilidad o la pérdida de ésta en las emulsiones, como se observó. Bouaouina, *y col.*, (2006), mencionan que obviamente, el tamaño del agregado proteico tiene un gran impacto sobre las propiedades viscoelásticas, pero el equilibrio de la tensión interfasial, el cual debe ser considerado, es independiente del tamaño de los agregados proteicos, presentando tamaño variables de partículas, y cierta inestabilidad en el tiempo de evaluación.

V.XIII. Estabilidad de la crema de las emulsiones

Los resultados de evaluación de la estabilidad de la crema (Tabla 9) muestran que las emulsiones fueron ligeramente inestables, luego de transcurridos los primeros cinco días, encontrándose que el mejor resultado de estabilidad en orden decreciente fue el sig.: AG > WPI > WPT+E-G > WPI-G > WPIT+E-L. La

Tabla 9. Valores del Índice de Crema Emulsión alta presión/Ultrasonido (mL)

Días	AG	WPI		WPI-L		WPI-G		WPIT+E-L		WPIT+E-G	
		Hom ¹ .	Ultras ² .								
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	67	94	37	70	76	100
5	100	100	100	100	100	70	90	38	50	76	52
9	100	40	46	70	71	71	73	36	71	80	53
16	100	50	50	67	71	71	46	38	71	76	49
23	100	56	54	62	67	75	47	42	67	77	48
37	100	55	54	55	67	74	32	42	67	71	39

¹ Emulsión Homogenización a alta presión

² Emulsión Ultrasonido

visible deformación de la crema observada en las muestras pudo deberse al hecho de que la mayoría de las partículas en las emulsiones se modifican a diámetros mayores en el tiempo, siendo esto más claro al ser comparados los resultados con una emulsión de GA.

La inestabilidad presentada por las emulsiones (Tabla 10) puede ser relacionada a una variedad de diferentes mecanismos fisicoquímicos los cuales a menudo se interrelacionan entre sí, como el incremento en el tamaño promedio de partícula debido a la coalescencia, que por lo general conduce entonces al aumento en la inestabilidad de las partículas y a la separación gravitacional (McClements, 2007), ésta última es observada en las emulsiones. Todas las emulsiones resultaron con formaciones de crema de diferentes comportamiento entre sí, este proceso es identificado mediante el cual las partículas ascienden ("descremado") en el sistema debido a que presentan menor densidad del líquido que las rodea. Si la densidad de las partículas de una emulsión es diferente a la del líquido que los rodea, la fuerza gravitacional neta actuará sobre ellas, al presentar entonces las partículas una densidad menor que el líquido que las rodea, desplegarán movimiento hacia el tope, lo que se conoce como formación de la crema, lo contrario, con una densidad mayor que el líquido que las rodea, se moverán hacia abajo, conociéndose esto como sedimentación.

Por otro lado, cuando el pH es considerado suficientemente bajo ($\text{pH} < 4$) o más alto ($\text{pH} > 6$) del punto isoeléctrico (pI), la fuerza de repulsión electrostática será lo suficientemente grande para superar las interacciones atractivas (Kulmyrzaev, *y col.*, 2000c), el pH de la emulsión de trabajo fue de 3,0 para favorecer la estabilidad del compuesto agregado (d-limoneno), y el pI de las proteínas del suero lácteo es de aproximadamente entre 4,1 y 5,2, por debajo de éste presentan una carga positiva, probablemente esto favoreció algunas de las interacciones proteínas-proteínas y la formación de agregados.

Se observó el desarrollo de una coalescencia en las emulsiones en el tiempo de estudio, la cual dependerá entonces del tamaño de la partícula (ver Tablas 11,12), de la viscosidad presente y la relación fase-volumen (1:10), de la naturaleza de las fases, del cremado, y de la probable diferencia de densidades (fase acuosa/aceite).

Las partículas en una emulsión polidispersa tienden al cremado a diferentes velocidades como se ha evaluado, formándose la crema más rápidamente con la presencia de gotas o partículas grandes más que con tamaños más pequeños, de manera que cuando esta difusión molecular ocurre, el proceso se observa lento y dependiente de la solubilidad de las fases, y el crecimiento de las partículas de más grandes a expensas de las más pequeñas, se ve acelerado por el tiempo. Las emulsiones tratadas con ambas técnicas,

presentaron propiedades de estabilización de emulsión comparables, debido probablemente a la modificación en la superficie de hidrofobicidad, y atribuido al aumento de la exposición de sitios hidrofóbicos (Wang *y col.*, 2008), pero solo en los primeros días del ensayo.

V.XIV. Determinación del tamaño de partícula

El tamaño de las partículas en las emulsiones, tiene un fuerte impacto sobre la estabilidad de la misma (ejem. separación gravitacional, floculación y coalescencia), sus propiedades ópticas (ejem. luminosidad y color), su reología (ejem. viscosidad o aspecto), y sus atributos sensoriales (ejem. cremosidad) (McClements, 2007).

Las emulsiones polidispersas suelen ser caracterizadas como “monomodal,” “bimodal” o “multimodal” dependiendo si hay uno, dos o mas picos en la distribución del tamaño de partícula (McClements 2007), la distribución del tamaño de las partícula de las emulsiones se evaluó utilizando un analizador de partículas tipo Malvern Mastersizer 2S, (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido), observándose características monomodales en las muestras al inicio de la experimentación, luego ocurrió una modificación, aumento el tamaño de las mismas, con características bimodales. Las distribuciones de los tamaños de

las partículas son la expresión del volumen diferencial del rango de diámetros de estas, y este suele ir, en algunos casos, de 0,03 a 300 μm . El promedio del diámetro de la partícula (de Sauter, d_{32}), es conocido como la medida del área creada durante los procesos (homogenización, ultrasonido) y es obtenido por su distribución en el volumen evaluado (Márquez *y col.*, 2005). El tamaño disperso de las partículas en estudio, es de importancia para determinar la formación y estabilidad de la emulsión, el radio promedio de las gotas dispersas y la velocidad con que ocurre la formación de crema, son considerados directamente proporcionales, en la mayoría de los casos el uso de equipos como el homogenizador a alta presión logra reducir la fase dispersa a un estado uniforme, disminuyéndose así, la velocidad de la formación de la crema. El análisis del tamaño de partículas, estabilidad o inestabilidad, el aumento o no de los diámetros de las partículas debe ser relacionado, con la evaluación de la estabilidad de las emulsiones (punto siguiente), movimiento y modificación del “promedio del Back Scattering”, debido a que están interrelacionados, al observarse una disminución de los valores iniciales del % BS (BackScattering datos gráficos observados con el equipo) existe una relación con el proceso de migración de las partículas o separación gravitacional, y aumento del tamaño de partícula, denominada coalescencia. Las muestras WPI, WPI-G, WPI-L, WPIT+E-L, WPIT+E-G, en las emulsión evaluadas, muestran un aumento del

tamaño de las partículas con migración de las mismas en función del tiempo (Tablas 10,11), siendo significativo este cambio a través del transcurso del tiempo de experimentación, dependiente del tiempo, en ambas técnicas (homogenización y ultrasonido). Las muestras con tratamiento térmico y térmico-enzimático (WPI-T+E-G y WPI-T+E-L) resultaron con un comportamiento similar en el método de homogenización, mas no en el de ultrasonido. A partir de perfiles del % BS obtenidos en la experimentación (punto siguiente), se observa en la mayoría de las emulsiones estudiadas el incremento en el diámetro de la partícula, éste aumento influyó negativamente sobre la estabilidad, probablemente además determinada por la viscosidad del sistema. En el estudio donde se adicionó goma arábica (GA) como control, se observó una estabilización del sistema frente a la separación gravitacional de las emulsiones, utilizando al hidrocoloide como estabilizante. El diámetro resultante de las partículas de la emulsión GA (345-559 nm) fue significativamente menor que el de las emulsiones obtenidas con homogenización y ultrasonido, y donde no se encontró diferencia en el tamaño relacionado con el tiempo de experimentación.

Tabla 10. Tamaño de partículas en muestras con tratamiento de homogenización

Tiempo (días)	WPI		WPIL		WPIG		WPITEL		WPITEG	
	(d.nm)	σ								
0	481,7	113,01	344,6	15,7	406,8	62,0	885,5	42,5	5261,5	143,5
1	841,2	139,4	403,0	22,2	493,8	23,0	881,9	38,5	5305,0	173,0
3	1206,5	247,5	539,1	77,5	815,8	77,8	1331,5	108,5	5898,5	531,5
7	1617,5	79,5	654,1	73,7	3092,0	369,0	2021,0	136,0	8887,5	73,5
10	1340,5	40,5	795,4	108,2	5850,0	586,0	3913,3	376,3	4300,5	36,5
17	1693,1	80,0	1075,5	59,5	7760,5	776,5	9110,0	13,0	6833,3	3497,3
21	2210,5	93,5	1276,0	199,0	7275,0	85,0	12345,0	685,0	8460,5	110,5
35	2981,1	175,0	2503,0	128,5	9343,0	618,0	13409,0	433,0	8463,5	520,2
60	4034,3	391,6	9297,5	525,5	9489,5	23,5	13545,0	265,0	8291,0	85,0

Tabla 11. Tamaño de partículas en muestras con tratamiento de ultrasonido

Tiempo (días)	WPI		WPIL		WPIG		WPITEL		WPITEG	
	(d.nm)	σ								
0	654,7	24,7	973,2	106,8	794,8	15,5	1116,2	222,8	1711,3	335,8
1	655,7	19,5	1058,6	89,5	826,3	45,1	1160,0	64,9	2389,3	363,1
3	814,3	75,4	1381,8	69,0	1614,0	125,1	1189,7	154,6	3482,3	123,7
7	1094,8	248,4	1605,5	343,4	2699,0	517,2	1445,3	289,6	3564,3	34,0
10	1339,4	309,0	2013,3	448,7	2631,7	890,6	1658,3	133,7	4072,0	28,0
17	1473,0	441,5	2544,7	192,3	3710,5	584,5	2829,3	405,7	7139,7	516,5
21	1118,0	44,9	1993,5	228,5	4306,5	209,5	5487,0	597,6	6243,5	643,5
35	1706,3	467,2	3144,3	233,3	4851,5	2289,5	6288,5	421,5	6206,7	445,8
60	1724,4	462,6	4942,5	458,5	4988,7	479,2	7954,5	385,5	6457,5	1768,5

V.XV. Estabilidad de las emulsiones en experimentación.

Los cambios en el movimiento de las partículas y viscosidad del sistema se llevo a cabo con la técnica del QuickScan (Beckman Coulter, Fullerton, USA), diferenciándose los cambios ocurridos de una floculación o coalescencia, distinguiéndose la formación de una red, se conoce que la existencia en el sistema de un emulsificador o polímero surfactante debería lograr estabilizarlas, debido a las interacciones atractivas que afectan las propiedades de formación de crema y reológicas (Robins *y col.*, 2002), sin embargo, en casi la totalidad de las emulsiones evaluadas, los resultados señalan la formación de una coalescencia.

Las medidas realizadas de la dispersión de luz con el analizador óptico vertical QuickScan, indican la estabilidad global o inestabilidad de las diferentes emulsiones evaluadas (Fig. 30, 31), la cual es llevada a cabo con un barrido de la emulsión a lo largo del tubo de análisis, obteniéndose las medidas y una serie de perfiles del denominado “porcentaje de BackScattering (% BS)” en función del tiempo. La zona que es evaluada corresponde desde la parte inferior del tubo que contiene la muestra, hasta una altura señalada por el operador, entonces el promedio de los valores de % BS estará en una zona de 10-60 mm.

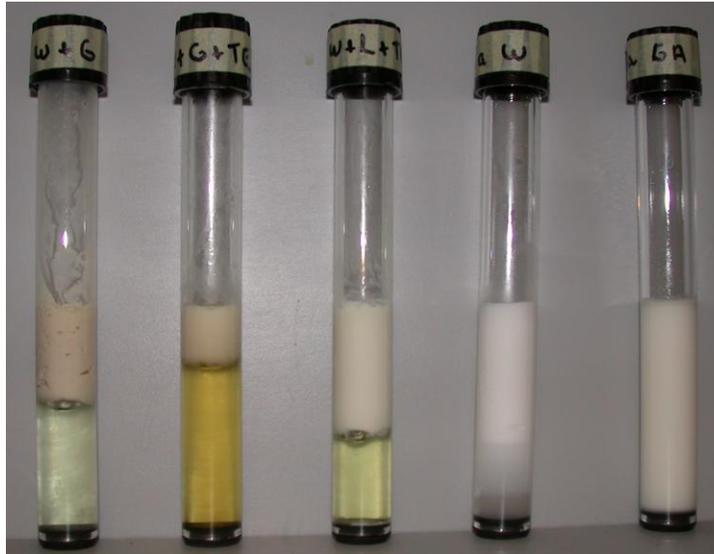


Fig.30.Tubos de quick scan. En orden: I.WPI-G, II.WPIT+E-G, III.WPIT+E-L, IV. WPI, V. Goma Arábica

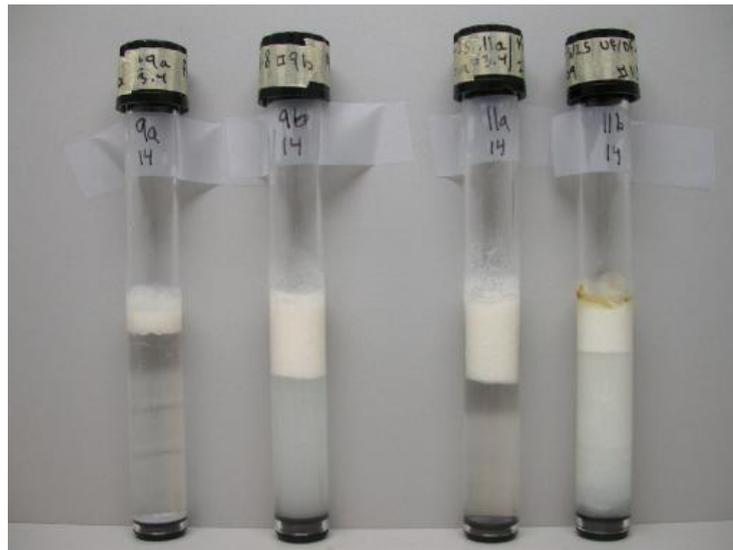
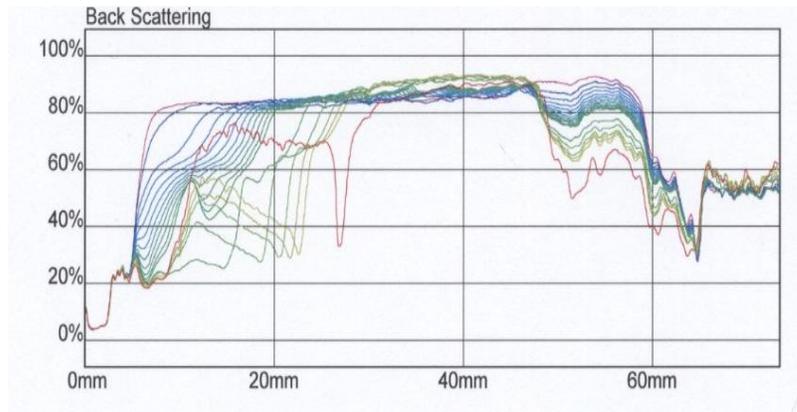


Fig. 31. Tubos de quick scan. En orden: I.WPI-G, II.WPIT+E-G, III.WPIT+E-L, IV. WPI con ultrasonido

La experimentación, de las muestras estudiadas, revelan la disminución de los valores iniciales del % BS (Fig. 32-33, indican ejemplos de %BS, no se muestran la totalidad de los resultados), los gráficos denotan pérdida de la linealidad a través del tiempo de evaluación. Debido al proceso de migración de partículas, separación gravitacional, y al aumento del tamaño de la partícula, observado, se concluye que ocurre una coalescencia en los sistemas evaluados. El movimiento del perfil de izquierda a derecha a medida que transcurre el tiempo, señala que las partículas de la emulsión migran de la parte inferior del tubo a la parte superior. Como muestra control se observa el perfil de % BS de una emulsión de GA (Fig. 34), la cual se mantuvo estable, sin formación de una separación gravitacional y coalescencia, no presentó una modificación apreciable durante el tiempo total de la evaluación (35-60 días).

Se ha discutido que los polisacáridos al interactuar con las moléculas de proteínas, actuaran como estabilizadores, y debido a que no son de superficie activa, puede dar lugar a una adsorción cooperativa, considerándose que este tipo de interacción entre grupos con carga opuesta, como las proteínas y polisacáridos, que se encuentran en todas las muestras evaluadas deberían conducir y generar a una mayor estabilidad de la emulsión, evitando la coalescencia, sin embargo, como se ha observado algunas mezclas de polisacáridos-proteínas pueden presentar incompatibilidad termodinámica

Whey Protein Isolate Emulsion



5min x 1 hour
Reading each h x 5 hour
24 hour after

Fig. 32. Perfil de % BS de la emulsión de WPI

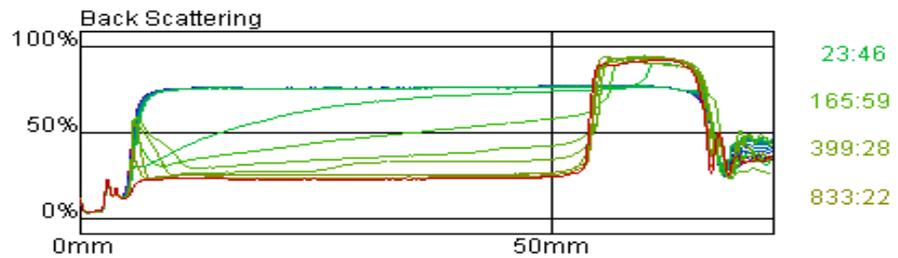


Fig. 33. Perfil de % BS de la emulsión de ultrasonido WPI

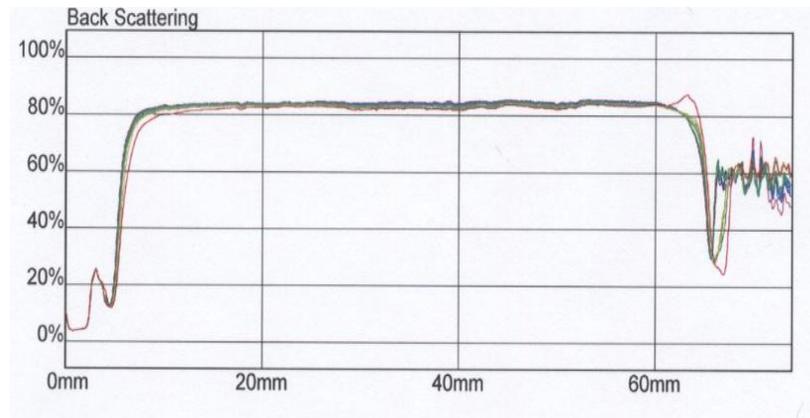


Fig. 34. Perfil de % BS de la emulsión de Goma arábica (1%)

(Dickinson y McClements, 1995; citado por Thanasukarn 2004), pudiendo además presentar una entalpía desfavorable en la mezcla. Por otro lado, los azúcares en solución pueden aumentar el orden estructural en el agua, favoreciéndose los puentes de hidrógeno, la cooperación, e incrementar la tendencia a la agregación de las proteínas hidrofóbicas, y un posible aumento de la proteína en la superficie de la interfase aceite-agua en sistemas que contienen el azúcar (Euston *y col.*, 2000).

En la experimentación, la adición de goma arábica a algunas emulsiones, le otorgan una mayor estabilidad en el tiempo de evaluación, en la Fig. 35 se observa diferentes emulsiones con y sin la presencia de GA obtenidas con la técnica de homogenización y la Fig. 36, el resultado del gráfico %BS para la muestra WPI+GA (1%), al ser comparado, éste gráfico con el de la Fig.33, puede relacionarse la estabilidad que presentó la muestra WPI con el agregado de la goma arábica, y el aumento de la viscosidad del medio aportado por esta.

La evaluación de los resultados señala que la estabildades de las emulsiones evaluadas están en el siguiente orden: $WPI-T-E+G > WPI-T+E+L > WPI > WPI+G > WPI+L$ para las obtenidas con la técnica de homogenización de alta presión, y $WPI-T+E-G > WPI-T+E-L > WPI$, $WPI-G > WPI-L$ con la técnica de

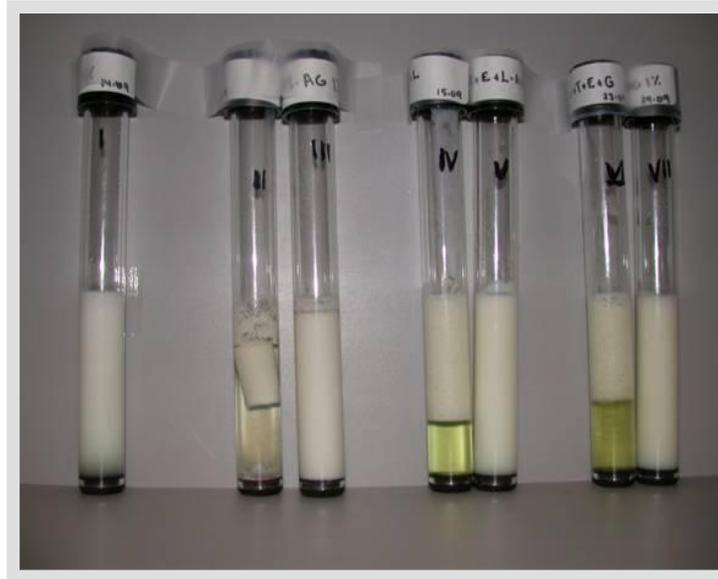
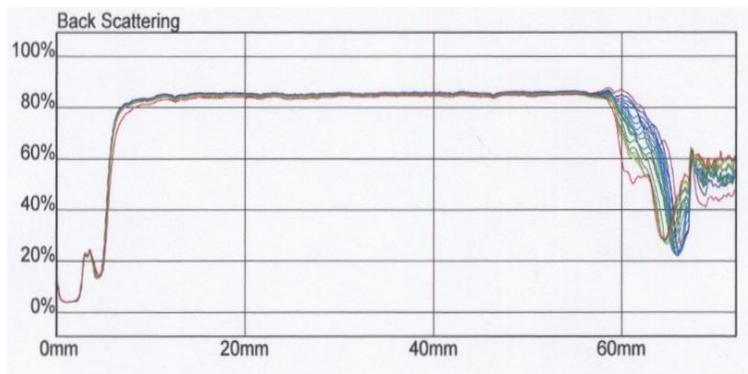


Fig. 35. Emulsiones obtenidas con homogenización a alta presión. En orden: I. AG (1%), II. WPI, III. WPI +AG (1%), IV. WPIT+E-L, V. WPIT+E-L + AG (1%), VI. WPIT+E-G, VII. WPIT+E-G + AG (1%)

Whey Protein Isolate + Arabic Gum 1% Emulsion



5min x 1 hour
Reading each h x 5 hour
24 hour after

Fig. 36. Perfil de % BS de la emulsión de WPI+GA (1%)

ultrasonido, siendo similares los resultados entre ambas técnicas, y donde la estabilidad se vio afectada por el efecto de la temperatura y enzima. En relación al tiempo de estabilidad de los sistemas, las emulsiones resultaron ser más estable la técnica de homogenización a alta presión, disminuyendo luego de los 5 días de experimentación, contrario a la técnica de ultrasonido.

V. XVI. Determinación de la capacidad de retención del compuesto d-limoneno

Los resultados obtenidos en la experimentación muestran bajos niveles de d-limoneno, el cual es evaluado como producto para ser encapsulado/atrapado por los productos de la reacción de Maillard en estudio, en las emulsiones de WPI-d-limoneno / hexadecano en agua. El hidroperóxido de cumeno (CH) y sulfato ferroso (Fe), fueron añadidos para acelerar la degradación del mismo. Estos últimos fueron escogidos, debido a que la degradación de los hidroperóxidos en lípidos es acelerada por la presencia del hierro, a través de un mecanismo de reacción de oxidación en emulsiones de aceite en agua, el limoneno es altamente susceptible a la degradación, o estrés oxidativo. Para evaluarse la estabilidad del compuesto (limoneno) en la emulsión, se determinó su desaparición o pérdida durante el almacenamiento a la temp. de 50°C,

adicionalmente debido a su característica de insaturado, el d-limoneno puede desarrollar sub-productos de degradación, como carvon y terpineol (Djordjevic y col., 2008) cuya formación también fue monitoreada. Los productos de degradación carvon y α -terpineol, fueron identificados por sus tiempos de retención y estándares (mg compuesto/ g aceite, Fig. 37). Se evidenció que la matriz identificada como WPI-T-E+L conjuntamente con la muestra WPI+L fueron las que presentaron mayor capacidad de atrapamiento del d-limoneno, cercano al 100% de retención, en las emulsiones preparadas con la homogenización a alta presión y el ultrasonido, en este último se observó una suave disminución de ésta retención al final del tiempo de experimentación. La capacidad de atrapamiento de estas matrices puede estar relacionada con la estabilidad y firmeza de la misma, conjuntamente con la capacidad antioxidante (DPPH) que presentan estos tipo de productos obtenidos por la reacción de Maillard, la muestra WPI-L tuvo un buen comportamiento en el primer sistema mas no en el segundo (Fig. 38,39).

Las muestras WPI y las que no tuvieron tratamiento con calor y enzimático, fueron las que mostraron la mas baja capacidad de atrapamiento del d-limoneno, detectándose la mayor cantidad de compuestos volátiles en comparación con las otras, con una recuperación de hasta un 40% del d-limoneno en el *headspace*. Las otras muestras tuvieron una capacidad similar

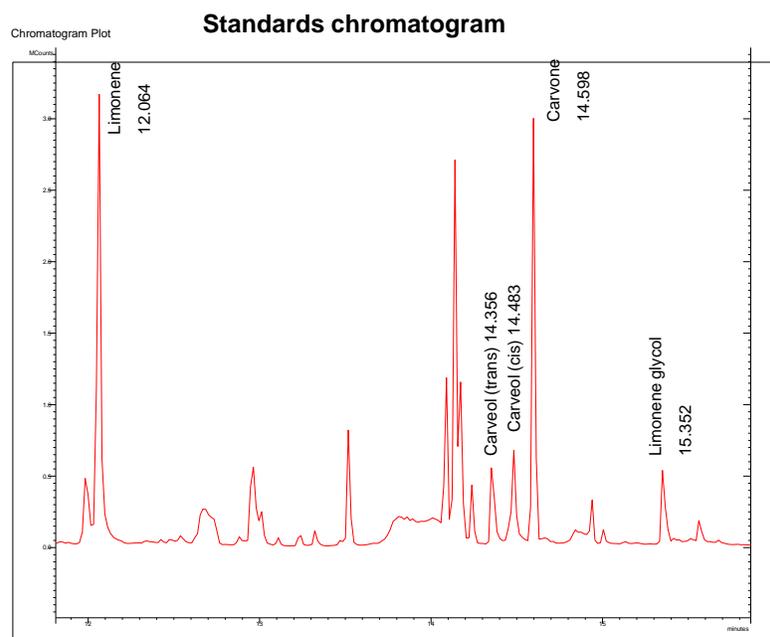


Fig. 37. Cromatograma de los estándares de los compuestos en estudio (CG/MS)

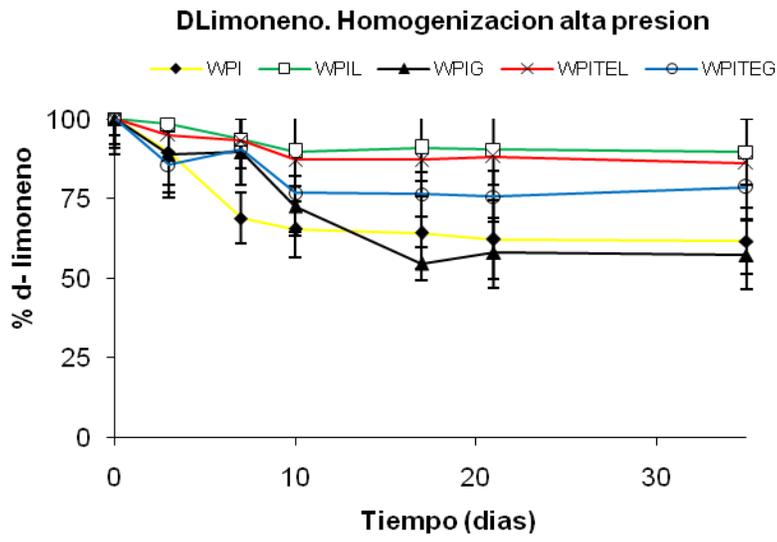


Fig.38. Degradación del Limoneno. Homogenización a alta presión

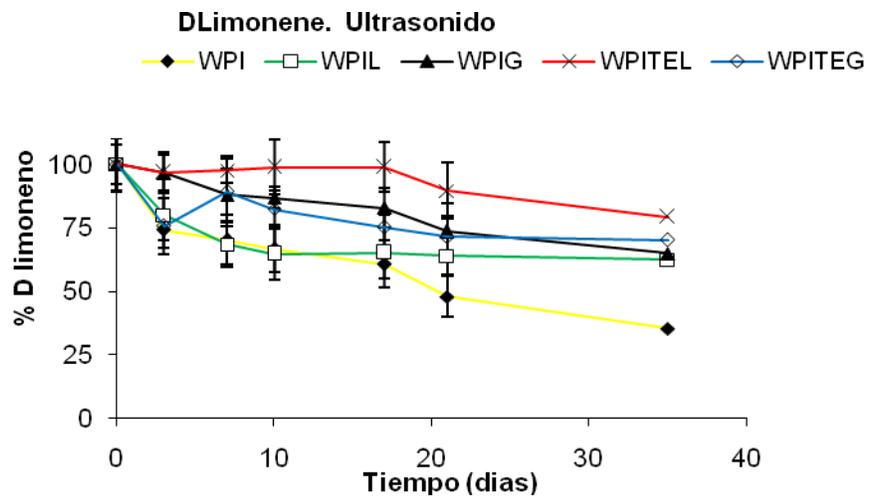


Fig.39. Degradación del Limoneno. Ultrasonido

relativa, donde la degradación se produjo de una manera general por debajo del 50% para el tiempo total de experimentación.

En cuanto a la formación de los compuestos de degradación, identificados como carvone y terpineol, la formación se mantuvo ligeramente constante en los días de experimentación, en ambos sistemas de emulsiones de homogenización por alta presión y ultrasonido, observándose que la emulsión WPI-L presentó mayor formación de carvone, indicando esto que el limoneno se encontraba posiblemente mayormente atrapado en la superficie de los productos, y no en su interior (Fig. 40,41). Los compuestos generados en el proceso son muy volátiles y altamente solubles, lo cual es un inconveniente para el objetivo de lograr una alta selectividad, una buena reproducibilidad.

El grado de protección como antioxidantes de los productos de Maillard evaluados en ambos sistemas, pudo observarse y relacionarse, con la generación del producto hexanal, donde se obtuvo una menor formación de este compuesto (no se presentan los gráficos) con las muestras que presentaron una mayor actividad mayor anti-radical, estas son WPI-T+E-L, WPI-T+E-G, WPI-G.

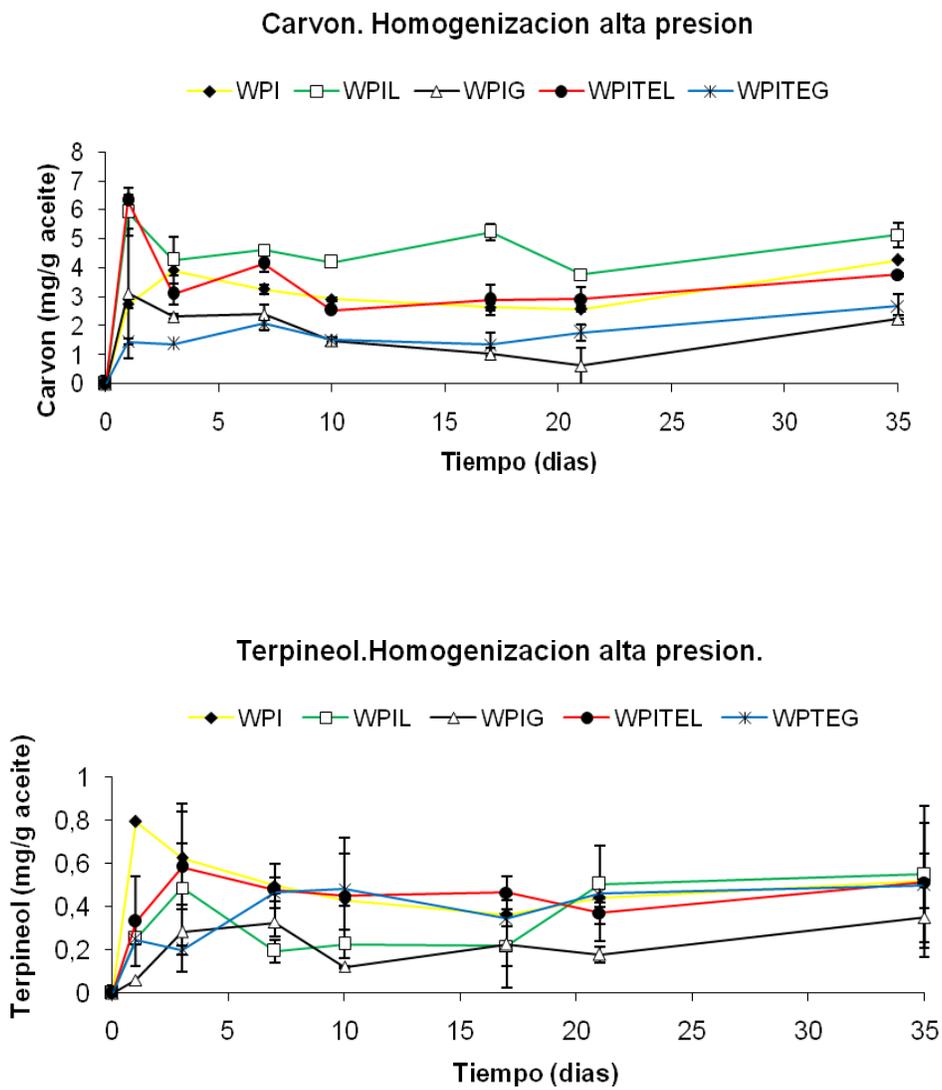


Fig. 40. Productos de degradación del d- limoneno (carvon y terpineol), en la emulsión de homogenización a alta presión

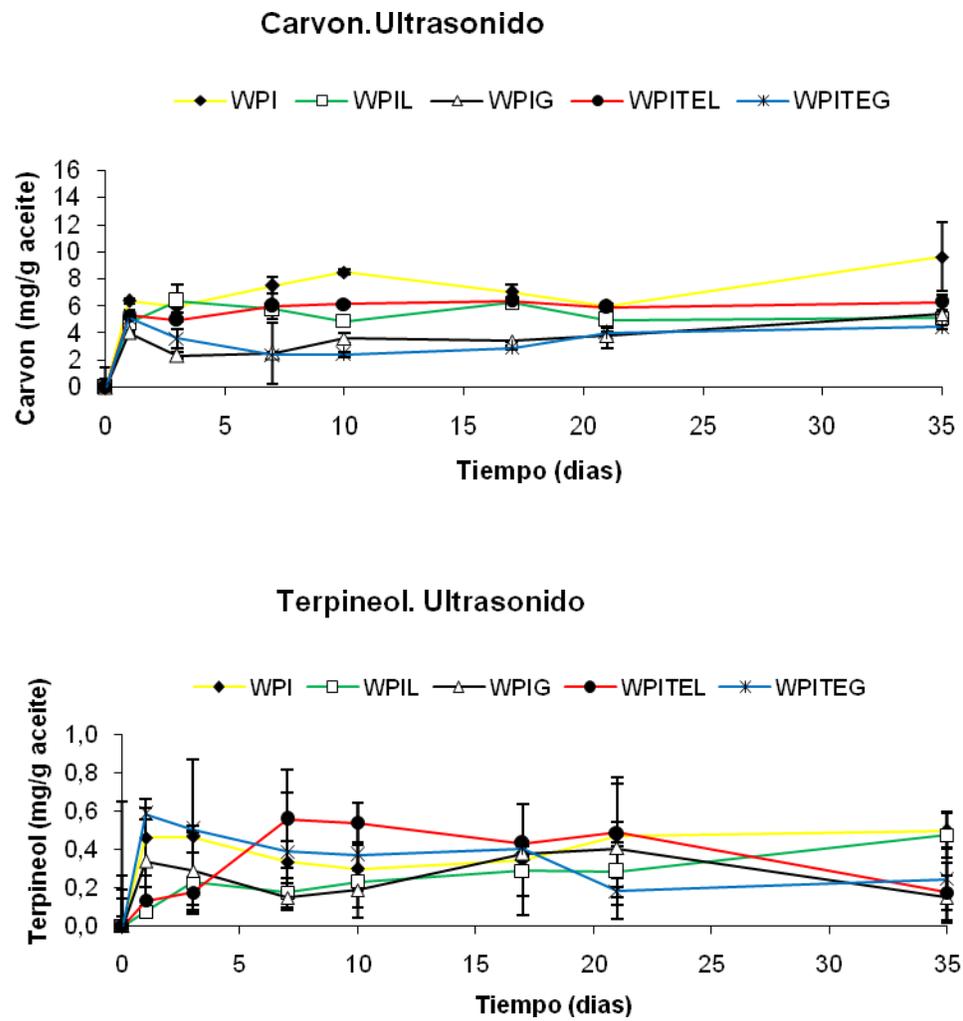


Fig. 41. Productos de degradación del d-limoneno (carvon y terpineol), en la emulsión de ultrasonido

V.XVII. Obtención de microcápsulas de albúmina de suero de bovino (BSA)

La albúmina de suero de bovino (BSA) fue seleccionada como proteína modelo para el estudio de la formación de microesferas, basándose en su composición y disponibilidad. Esta proteína presenta en rangos de pH 5 y 7, 17 puentes disulfuros y un grupo sulfhídrico, encontrándose favorable para la obtención de microesferas, y evaluar el potencial del ultrasonido, y el tipo de sustrato a encapsular (Suslick, 1994). La microscopía óptica (Digilab UMA 600, Varian) y la microscopía electrónica de barrido (Hitachi S - 4300 FE-VP- SEM) fueron utilizadas para analizar y determinar la presencia y dimensión de las microesferas, así como la variación presentada en la formación de estas y la relación con los diversos tratamientos aplicados.

La duración de aplicación del ultrasonido a las muestras se mantuvo constante a un tiempo total de tres minutos, y la secuencia de la irradiación de ultrasonido sobre las muestras fue controlada a través de los pulsos, 20 seg ON (prendido) y 40 seg OFF (apagado), o 15 seg ON y 50 seg OFF, o aplicación ininterrumpida, en esta última aplicación de ultrasonido no fue observada la formación de microesferas. Los mejores resultados se obtuvieron utilizando la secuencia de pulsos: 15 seg ON y 50 seg OFF de aplicación, para la formación

de microesferas de BSA, con decano. Henglein (1995) sugiere que la aplicación de pulsos al trabajar con ultrasonido, son mas eficientes, si el intervalo que ocurre entre cada pulso es breve. Por otro lado, para realizar comparaciones de cambios químicos obtenidos en experimentos con aplicación de ultrasonido ininterrumpido y ultrasonido pulsado, es necesario utilizar tiempos relativamente largos de irradiación y aplicar cantidades de energía acústica similar entre ellos, al sistema que esta en evaluación, e igualmente mantener una exposición total, para la obtención de una constante, en la aplicación del ultrasonido entre los experimentos ininterrumpidos y pulsados (Gedanken, 2008). La Tabla 13 muestra las interfases evaluadas, los valores de energía, y poder aplicados a las soluciones de BSA, para la formación de microesferas de proteína y la capacidad encapsular, utilizándose decano o aire como interfase en el proceso. No se observó formación de microesferas con la interfase aire en las condiciones experimentales de trabajo, esto debido probablemente a la posible desnaturalización de la proteína en el sistema (Tian *et al.*, 2004).

La Figura 42, muestra una solución de BSA/decano como interfase, con y sin aplicación tratamiento, observa en la primera micrografía óptica donde no hay formación de microesferas, contraria a la segunda. Las microesferas observadas en esta última fueron generadas utilizando temperaturas iniciales

Tabla 13. Condiciones de ultrasonido de la muestra BSA con interfases aire y decano

Interfase	Pulso	Vol. (mL)	Inicial (°C)	Final (°C)	Energia (J)	Poder (W)
BSA/Aire1	No aplicación	25	20	33	3911	44,5
	15s ON/50s OFF	25	6	7	4159	46
	15s ON/50s OFF	25	20,5	21,5	5325	52,75
	20s ON/40s OFF	25	21	22	4588	45,5
	20s ON/40s OFF	25	21	40	3389	44,5
BSA/Decano2	No aplicación	38	21	45	6097	59,5
	15s ON/50s OFF	38	9	14	4030	50,5
	15s ON/50s OFF	38	8	21,5	6261	75,75
	15s ON/50s OFF	38	7	13	6051	58,5
	20s ON/40s OFF	38	22	23	6666	62,5
	20s ON/40s OFF	38	21,5	40,5	5692	68,5
BSA/Decano3	No aplicación	40	21	72	7473	96,5
	No aplicación	40	22	40	11371	81,5
	15s ON/50s OFF	40	8	21	12506	111
	20s ON/40s OFF	40	23	42	8509	67,5
	15s ON/50s OFF	50	9	24	12134	108

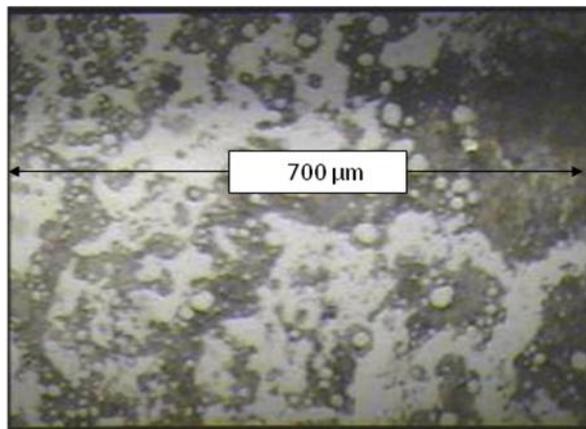
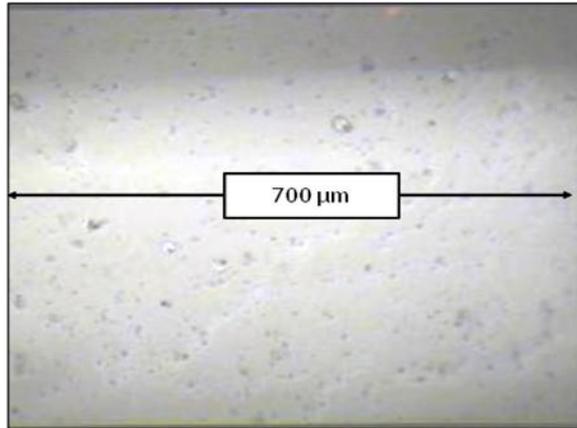


Figura 42. Micrografías ópticas, arriba: muestra control, abajo: BSA/solució con decano como interfase, se observan microesferas (amplitud = 700μm).

bajas y pulsos en condiciones de irradiación controladas, indicando que estas condiciones son las más favorables para la formar las microesferas.

Los resultados asimismo adicionalmente señalan, que la variación del poder acústico no produce un efecto importante, esta observación está en concordancia con la literatura la cual señala que para la obtención de resultados óptimos, es necesario conducir los experimentos de ultrasonido/sonoquímica a las más bajas temperaturas posibles (Mason y Lorimer, 2002).

En la experimentación desarrollada, el control de la temperatura del sistema durante la experimentación, fue de difícil control, utilizándose para ello, una camisa de hielo. El efecto térmico que provoca el ultrasonido, causa el calentamiento del sistema, dando como resultado la desnaturalización de la proteína, además la temperatura del sistema, como se observó aumenta rápidamente con el incremento del tiempo de aplicación del ultrasonido (Tian *y col.*, 2004). Por otro lado, en los sistemas evaluados, se observó que la variación de los volúmenes de muestra y la composición, mostraron diferentes niveles de resistencia para el movimiento, o paso del ultrasonido en ellos, indicando la dependencia del nivel de poder de ultrasonido ha ser aplicado por el equipo a la muestra, sugiriendo que el poder aplicado dependerá entonces del volumen de la muestra, de la viscosidad presente, además del tamaño de la

punta del sonicador y, en algunos casos, la presión ambiental (Doktycs y Suslick, 1990). En la Tabla 14, se observan los resultados del tratamiento del sistema BSA / decano con benzaldehído en diferentes concentraciones, el cual es el compuesto a encapsular por este sistema. De acuerdo a lo obtenido temperaturas iniciales bajas, entre 8 y 21 °C, irradiaciones pulsadas de ultrasonido, y una baja concentración (% de 0,1 - 0,5) de benzaldehído, fueron las mejores condiciones para la formación de microesferas, en este caso el poder acústico no tuvo ningún efecto observado adicional, la Figura 43 corresponde a la micrografía óptica de las microesferas obtenidas después de aplicar el ultrasonido a la solución BSA / decano / benzaldehído.

La siguiente Figura 44, una micrografía electrónica la cual muestra las mismas microestructuras pero detallando el tamaño homogéneo y la morfología estructural de las partículas. Sugiriendo esto, que el ultrasonido favorece la formación de altas cantidades de microesferas de proteína con unas amplias distribuciones de tamaño. Algunos autores señalan (Avivi y Gedanken ,2007) señalan que en el proceso sonoquímico, el tamaño de los microesferas son dependientes de la concentración de la solución usada, además que la sonicación puede ser capaz de romper los puentes de hidrógeno y los interacciones de van der Waals de las cadenas de polipéptidos resultando una

Tabla 14. Condiciones de ultrasonido, muestra BSA/decano y benzaldehído

Interfase/compts	Pulso	Vol	Temp. Inicial	Temp. Final	Energia	Poder
		(mL)	(oC)	(oC)	(J)	(W)
Decano/benzaldehido 0,1%	15s ON/50s OFF	38	9	16	9851	72,5
Decano/benzaldehido 0,1%	15s ON/50s OFF	38	20	23	9436	73
Decano/benzaldehido 0,1%	20s ON/40s OFF	38	21	38	8809	63,5
Decano/benzaldehido 0,1%	15s ON/50s OFF	40	8	34	16237	126
Decano/benzaldehido 0,1%	20s ON/40s OFF	40	20	47	14659	119,5
Decano/benzaldehido 0,5%	15s ON/50s OFF	38	9	14	8366	68,5
Decano/benzaldehido 0,5%	15s ON/50s OFF	38	20	23	10139	75,5
Decano/benzaldehido 0,5%	20s ON/40s OFF	38	21	34	70 8	88,5
Decano/benzaldehido 0,5%	15s ON/50s OFF	40	8	31	18178	122,5
Decano/benzaldehido 0,5%	20s ON/40s OFF	40	20	45	17347	121,5
Decano/benzaldehido 1%	15s ON/50s OFF	38	8	13	9064	82
Decano/benzaldehido 1%	15s ON/50s OFF	38	21	24	7165	58
Decano/benzaldehido 1%	20s ON/40s OFF	38	22	36	7874	63,5
Decano/benzaldehido 1%	20s ON/40s OFF	38	20	42	9517	107,5
Decano/benzaldehido 1%	20s ON/40s OFF	40	20	34	13490	91,5
Decano/benzaldehido 5%	20s ON/40s OFF	38	23	41	10736	84

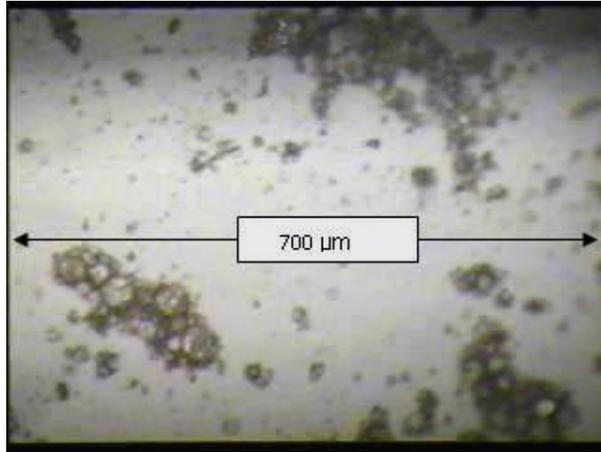


Figura 43. Micrografía óptica, se observan las microsferas de muestra BSA/decano con agregado de benzaldehído.



Figura 44. Micrografía electrónica (30kV X 5000), muestra BSA/decano con agregado de benzaldehído

modificación de la estructura secundaria y terciaria de la proteína, y la oxidación de los grupos de SH (Tian *y col.*, 2004; Gendaken, 2008).

Las puntas del equipo de ultrasonido intensifican e irradian la energía ultrasónica en la muestra, aquellas puntas que posean diámetros más pequeños en su extremidad producirán mayor intensidad de cavitación, pero la energía que es liberada se ve restringida por su diámetro, y un campo más concentrado se encontrará justo debajo de la punta. Inversamente, las puntas con diámetros más grandes en su extremidad producirán una intensidad mas reducida, pero la energía liberada alcanza una mayor área. De manera que, más grande el diámetro de la extremidad de la punta, más grande será entonces el volumen que puede ser procesado, pero la intensidad será reducida.

La experimentación fue realizada a una completa amplitud del equipo de ultrasonido (100%), La amplitud controla el número de las vibraciones de la punta del sonicador, sin embargo, la cantidad de potencia (Watts) requerida por la muestra no puede ser determinada, de aquí que usando el 100% de amplitud, un máximo poder será liberado ajustándose la potencia automáticamente para mantener la amplitud al nivel preseleccionado.

En las amplitudes crecientes, el colapso de la burbuja de cavitación es más violento, ya que el tamaño de burbuja es proporcional a la amplitud de la onda

ultrasónica (Suslick *y col.*, 1999). La alta intensidad del ultrasonido (750W) colocado en la interfase de la solución proteica y el compuesto, sonicados en las diferentes condiciones por 3 min., generó un poder acústico en el rango de 47 a 130 W/cm². De acuerdo a, Enterazi y Kruus (1996), un alto poder no resulta en un incremento de la velocidad de reacción en el sistema. El poder aplicado, observado en todas las tablas presentadas, medido en vatios, es la cantidad de energía transferida por unidad de tiempo en la muestra. Es medido por el equipo de ultrasonido por un tiempo total de tres minutos. Este poder puede ser medido en cualquier momento y la energía liberada en la muestra, como se dijo previamente, es determinada por el volumen de muestra usado, la viscosidad, el tamaño de la punta del sonicador y, en algunos casos, la presión ambiental.

VI. Conclusiones

1. El grado de hidrólisis (GH) de la proteína, se incrementó durante el período de la digestión, hasta un max. de 12,61% en 120 min de incubación.
2. La muestra conjugada identificada como WPI-galactosa presentó un grado de glicación de 39,30%, en un periodo total de 144 h de incubación. La aplicación de tratamientos térmico y enzimático a la proteína del aislado proteico de suero lácteo (WPI), probablemente modificó la estructura de la misma, causando la pérdida de solubilidad de la proteína.
3. La capacidad antioxidativa con el sistema DPPH, identificó de acuerdo a la actividad presentada los siguientes resultados: WPIT-L, WPIT-G, WPI-L (de baja actividad), WPIT+E-L (mediana), WPI-G y WPIT+E-G (de alta actividad) y con el sistema β -Caroteno-acido linoleico, se encontró que el conjugado WPI-T+E-L presentó la mejor actividad, seguido de WPI-G y WPITEG. Siendo más efectivos en los inicios del tratamiento.
4. Se observó la formación de pigmentos marrones de los productos de reacción de Maillard y la dependencia con el tiempo de almacenamiento y temperatura, además del tipo de azúcar utilizado, encontrándose ser más significativo con la galactosa. El tratamiento previo con temperatura y enzimas aceleró la aparición del oscurecimiento en las muestras.

5. Todas las muestras evaluadas mostraron diferentes EAI (índice de la actividad emulsificante) a un pH de 7,0 disminuyendo esta actividad lentamente hasta los seis días de experimentación, esto debido a la diferencia de tratamientos y carbohidratos presente. La estabilidad de las emulsiones no presentaron diferencias significativas para el tiempo de evaluación.
6. El tratamiento con calor afectó la solubilidad proteica a pH 6,8 de las muestras en experimentación.
7. Se obtuvieron dos tipos de emulsiones, por homogenización a alta presión y por ultrasonido, con resultados comparables
8. Los resultados de la evaluación de la estabilidad de la crema indicó que las emulsiones fueron ligeramente inestables, luego de transcurridos los primeros cinco días. Se observó un proceso de migración de las partículas (separación gravitacional), y un aumento del tamaño de las mismas (coalescencia). La separación de las partículas aumentó con el tiempo, en ambos tratamientos (homogenización a alta presión y ultrasonido).
9. Las estabilidades presentadas por las emulsiones mostraron similitud en los resultados para ambas técnicas, siendo afectadas la temperatura y enzima.

10. La matriz del WPI-T+EL presentó la que mayor capacidad de atrapamiento del d-limoneno, un poco menos del 100% de retención, para ambos sistemas evaluados. La formación de los compuestos de degradación, identificados como carvon y terpineol, se mantuvo ligeramente constante en los días de experimentación, en ambos sistemas de emulsiones de homogenización por alta presión y ultrasonido, indicando que el limoneno se encontraba posiblemente mayormente atrapado en la superficie de los productos, y no en su interior.
11. Se obtuvieron microesferas proteicas utilizando la albúmina de suero de bovino (BSA). Los parámetros como la potencia aplicada y el pulso de ultrasonido no fueron consistentes en la formación de las microesferas.
12. Los resultados obtenidos para las muestras en estudio, bajo las dos técnicas (homogenización y ultrasonido) son consistentes y comparables, deben hacerse mas estudios estableciendo los diferentes mecanismos y parámetros de control para determinar la eficiencia y mejorar la estabilidad.

VII. Anexos

Los resultados obtenidos en la presente investigación, forman parte de las siguientes publicaciones:

1. THE ROLE OF GALACTOSE AND LACTOSE IN THE MODIFICATION OF FUNCTIONAL PROPERTIES OF INTAC, DENATURED OR HYDROLYZED MILK-DERIVED PROTEINS.

Autores: Patrick Fustier^a, María de Jesús Alfaro^b, Varoujan Yaylayan^b

^a Agriculture and Agric-Food Canada, Food Research and Development Centre, 3600 Casavant Blvd. West, St. Hyacinthe, Quebec, Canada J2S 8E31 y

^b McGill University, Dept. of Food Science and Agricultural Chemistry, 21.111 Lakeshore, Ste-Anne- de Bellevue, Quebec, Canada. H9X 3V9. En revisión para ser enviada a la Revista *Food Chemistry*

2. PHYSICAL AND CHEMICAL STABILITY OF SUGAR MODIFIED MILK PROTEINS

Autores: Patrick Fustier^{a,*}, Maria de Jesús Alfaro^b, Hassan Sabik^a, Varoujan Yaylayan^b, Ali Taherian^a

^a Agriculture and Agric-Food Canada, Food Research and Development Centre, 3600 Casavant Blvd. West, St. Hyacinthe, Quebec, Canada J2S 8E31 y ^b McGill

University, Dept. of Food Science and Agricultural Chemistry, 21.111 Lakeshore, Ste-Anne- de Bellevue, Quebec, Canada. H9X 3V9. En revisión para ser enviada a la Revista *Food Chemistry*

3. PRELIMINARY STUDY OF SONICATION PARAMETERS FOR THE GENERATION OF PROTEIN MICROSPHERES FOR THE ENCAPSULATION OF VARIOUS SUBSTRATES

Autores: María de J. Alfaro¹, Varoujan A. Yaylayan², Jacqueline M. R. Bélanger, y J. R. Jocelyn Paré (2006) *Revista Facultad de Farmacia, UCV* 69(1-2).

¹ Instituto de Investigaciones Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Ciudad Universitaria, Los Chaguaramos UCV

² McGill University, Dept. of Food Science and Agricultural Chemistry, 21.111 Lakeshore, Ste-Anne- de Bellevue, Quebec, Canadá. H9X 3V9.

4. MODIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR MÉTODOS FÍSICOS NO CONVENCIONALES

Autor: María de Jesús Alfaro (2007). *Memorias del SPDC ASME USB*

¹ Instituto de Investigaciones Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Ciudad Universitaria, Los Chaguaramos UCV

VIII. Referencias Bibliográficas

- Achouri, A., Boye, J. I., Yaylayan, V. A., y Yeboah, F. K. (2005). Functional Properties of Glycated Soy 11S Glycinin, *Journal of Food Science* 70: C269-C274
- Agustin, M.A., Sanguansri, L. y Ortwin, B. (2006). Maillard Reaction Products as Encapsulants for Fish Oil Powders *Journal of Food Science* 71(2): E25–E32
- Aiqian, Y. (2008). Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: principles and applications – A review. *International Journal of Food Science and Technology*, 43: 406-415.
- Alfaro, M. de J., Yaylayan, V., Bélanger, J. M. R, y Paré, J. R. J. (2006) Preliminary study of sonication parameters for the generation of protein microspheres for the encapsulation of various substrates *Revista Facultad de Farmacia, UCV* 69(1-2):34-42
- Amin, I., Norazaidah, Y., y Hainida, K.I. Emmy. (2006). Antioxidant activity and phenolic content of raw and blanched Amaranthus species. *Food Chemistry* 94 (1):47-52.
- Aminlari, M., Ramezani, R., y Jadidi, F. (2005). Effect of Maillard-based conjugation with dextran on the functional properties of lysozyme and casein. *Journal Science Food Agricultural* 85:2617–2624

- Avivi, S. (Levi) y Gedanken, A. (2007). Are sonochemically prepared α -amylase protein microspheres biologically active?. *Ultrasonics Sonochemistry* 14: 1-5.
- Azuola, R. y Vargas, P. (2007). Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (eua). *Tecnología en Marcha*. 20(4): 30-40
- Badui, S. (1999) Química de los Alimentos. 3ed. 5reimpresión Editorial Alambra Mexicana. México
- Barteri, M. Fioroni, M., y Gaudiano, M.C. (1996). Oxidation of Fe (II) horse heart cytochrome c by ultrasound waves. *Biochimica et Biophysica Acta* 1296:35-40
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254
- Brands C., M. J., Gerrit, M. A., y Martinus, A. (2000). Mutagenicity of Heated Sugar-Casein Systems: Effect of the Maillard Reaction *Journal Agricultural Food Chemistry* 48: 2271-2275
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., E. y Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel- Wissenschaft-und-Technologie* . 28: 25-30.
- Bender, A.E. (1973). Nutrición y Alimentos Dietéticos. 2da. Ed. Editorial Acribia, Zaragoza, España. Cap. 19, p.320-324

- Benichou, A., Aserin, A. y Garti, N. (2002) Protein-Polysaccharide Interactions for Stabilization of Food Emulsions *Journal Dispersion Science and Technology* 23(1-3): 93-123
- Benítez, R., Ibarz, A., y Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones Protein hydrolysates: processes and applications *Acta bioquímica clínica latinoamericana* 42(2):227-236
- Betschart, A.A (1974). Nitrogen solubility of alfalfa protein concentrate as influenced by various factors. *Journal of Food Science*. 39:1110-1115
- Bohinski, R. C. (1978). Bioquímica. Fondo educativo interamericano, S.A., E.U.A. 2da. edit. cap.8, pag.234
- Bouaouinaa, H., Desrumauxa, A., Loisela, C. y Legrand, J. (2006) Functional properties of whey proteins as affected by dynamic high-pressure treatment *International Dairy Journal* 16 : 275-284
- Bownman, R.G., Rueb, C.J., y Finney, J.M. (2011) Encapsulation of oxidatively unstable compounds. Patent Publication number: US 2011/0020519 A1
- Brazel, C.S. 1999. Microencapsulation: offering solutions for the Food Industry. *Cereal Foods World*. 44(6):388-393
- Cämmerer, B., y Kroh, L. W. (1996). Investigation of the contribution of radicals to the mechanism of the early stage of the Maillard reaction. *Food Chemistry* 57:217-221

- Chanamai, R. y McClements, D.J. (2002). Comparison of Gum Arabic, Modified Starch, and Whey Protein Isolate as Emulsifiers: Influence of pH, CaCl₂ and Temperature *Journal of Food Science* 67(1): 120–125
- Cheftel, J.C., Cuq, J.L y Lorient, D. (1989). Proteínas Alimentarias. Bioquímica. Propiedades funcionales. Valor nutritivo. Modificaciones químicas. Edit. Acribia, S.A. Zaragoza. España. Cap. 6
- Chen, S-L., Yang D-J., Chen H-Y., y Liu S-C. (2009). Effect of hot acidic fructose solution on caramelisation intermediates including colour, hydroxymethylfurfural and antioxidative activity changes. *Food Chemistry* 114: 582–588
- Chevalier, F., Chobert, J-M., Dalgalarrrondo, M. y Haertlé, T., (2001a). Characterization of the Maillard reaction products of β -lactoglobulin Glucosylated in mild conditions. *Journal of Food Biochemistry* 25(1): 33–55
- Chevalier, F., Chobert, J., Genot, C., y Haertlé, T. (2001b). Scavenging of Free Radicals, Antimicrobial, and Cytotoxic Activities of the Maillard Reaction Products of β -Lactoglobulin Glycated with Several Sugars. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 49:5031 -5038
- Chiu, T-h, Chen M-l, y Chang H-Ch. (2009) Comparisons of emulsifying properties of Maillard reaction products conjugated by green, red seaweeds and various commercial proteins *Food Hydrocolloids* 23 :2270–2277

- Chung, S. L., y Ferrier, L. K. (1995). Heat denaturation and emulsifying properties of egg yolk phosphovitin. *Journal Food Science* 60:906–908,916
- Church, F.C., Swaisgood, H. E., Porter, D. H., y Catignani, G. L. (1983). Spectrophotometric assay using o-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal Dairy Science* 66 (6): 1219- 1227
- Dalgleish, D.G. (1996). Conformation and structures of milk proteins absorbed to oil water interfaces. *Food Research International* 29 (5-6):541-547
- Demetriades, K. y McClements, D.J. (2000). Influence of sodium dodecyl sulfate on the physicochemical properties of whey protein stabilized emulsions. *Colloids and Surfaces A*. 161: 391-400
- Desrumaux, A. y Marcand, J. (2002). Formation of sunflower oil emulsions stabilized by whey proteins with high-pressure homogenization (up to 350 MPa): effect of pressure on emulsion characteristics *International Journal of Food Science & Technology* 37(3): 263-269.
- Dickinson, E. (2009). Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocolloids* 23: 1473–1482
- Dickinson, E. y Galazka, Y. B. (1991). Emulsion stabilization by ionic and covalent complexes of B-lactoglobulin with polysaccharides. *Food Hydrocolloids* 5 (3): 281-296

- Diftis, N. y Kiosseoglou, V. (2003). Improvement of emulsifying properties of soybean protein isolate by conjugating with carboxymethyle cellulose. *Food Chemistry*, 81(1): 1-6
- Djordjevic , D., Cercaci, L., Alamed, J., McClements, D., J. y Decker E. A. (2008). Stability of citral in protein- and gum arabic-stabilized oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*.106 (15): 698-705
- Doane, W. M., Shasha, B. S.,y Russell, C. R. (1977) Encapsulation of Pesticides within a Starch Matrix. *ACS Symposium series*. 53:74-84
- Doktycz, S. J. y Suslick, K. S. (1990). Interparticle Collisions Driven by Ultrasound. *Science* 247: 1067-1069.
- Doublier, J.-L., Garnier C., Renard D., y Sanchez C. (2000). Protein-polysaccharide interactions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 5 :202-214
- Euston, S.R., Finnigan, S.R., y Hirst, R.L. (2000). Aggregation kinetics of heated whey protein-stabilized emulsions *Food Hydrocolloids* 14:155–161
- Funtenberger, S., Dumay, E. y Cheftel, J. C. (1995). Pressure-induced Aggregation of [3-Lactoglobulin in pH 7.0 Buffers. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 28: 410-418
- Gaonkar, A. G. (1991) Surface and interfacial activities and emulsion characteristics of some food hydrocolloids *Food Hydrocolloids* 5(4): 329-337

- Gendaken, A. (2008). Preparation and properties of proteinaceous microspheres made sonochemically. *Chemistry a European Journal* . 4:3840-3853
- Gibbs, B. F., Kermasha, S., Alli, I., y Mulligan, C. N. (1999). Encapsulation in the food industry: a review *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50(3): 213-224
- Greenespan, L. (1977). Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *Journal Research Natural Burn Standard* 81(A): 89-96
- Goubet, I., Le Quere, J.-L., y Voilley, A. J. (1998). Retention of Aroma Compounds by Carbohydrates: Influence of Their Physicochemical Characteristics and of Their Physical State. A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46 (5):1981–1990
- Guadix, A., Guadix, E.M., Páez-Dueñas, M.P., González-Tello, P. y Camacho, F. (2000). Technological processes and methods of control in the hydrolysis of proteins. *Ars Pharmaceutica*, 41(1): 79-89
- Gülseren, İ., Güzey, D., Bruce, B. D., y Weiss, J. (2007). Structural and functional changes in ultrasonicated bovine serum albumin solutions. *Ultrasonics Sonochemistry*. 14(2): 173-183
- Harnsilawa, T., Pongsawatmanit, R., y McClements, D.J. (2006). Characterization of b-lactoglobulin–sodium alginate interactions in aqueous

- solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study *Food Hydrocolloids* 20:577-585
- Hayta, M., Alpaslan, M., y Baysa, A. (2002). Effect of Drying Methods on Functional Properties of Tarhana: A Wheat Flour-Yogurt Mixture *Journal of Food Science* 67(2): 740–744
- Henglein, A. (1995). Chemical effects of continuous and pulsed ultrasound in aqueous solutions *Ultrasonics Sonochemistry* 2 (2): s115-s121.
- Henle, T. (2005) Protein-bound advanced glycation endproducts (AGEs) as bioactive amino acid derivatives in foods *Amino Acids* 29 (4): 313-322
- Hitesh, J., Parth, P., Suraj, F., Prachi, P., y Shikha, Y. (2011). Microbubbles - a potential ultrasound tool in drug delivery *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 4(2): 2011 6-11
- Hogan, S.A., McNamee, B.F., O’Riordan, E.D., y O’ Sullivan, M. (2001). Microencapsulating properties of whey protein concentrate. *Journal Food Science* 66(59): 675-680
- Inyang, U.E. y Iduh, A.O. (1996). Influence of pH and salt concentration on protein solubility, emulsifying and foaming properties of sesame protein concentrate. *Journal American Oil Chemistry Science* 73 : 1663-1667.

- Jafari, S. M., Heb, Y., y Bhandari, B. (2006) Nano-emulsion production by sonication and microfluidization—A comparison. *International Journal of Food Properties* 9: 475–485
- Jambrak, A. R., Mason, T. J., Lelas, V., Herceg, Z., y Herceg, I. L. (2008). Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions *Journal of Food Engineering* 86 : 281–287
- Jiménez-Castaño, L., López-Fandiño, R., Olano, A., y Villamielos, M. (2005). Study on β -lactoglobulin glycosylation with dextran: effect on solubility and heat stability *Food Chemistry* 93(4):689-695
- Jiménez-Castaño, L., Villamiel, M., y López-Fandinho, R. (2007). Glycosylation of individual whey protein by Maillard reaction using dextran of different molecular mass. *Food Hydrocolloids* 21:433-443
- Kagami, Y., Sugimura, S., Fujishima, N., Matsuda, K., Kometani, T. y Matsumura, Y. (2003). Oxidative Stability, Structure, and Physical Characteristics of Microcapsules Formed by Spray Drying of Fish Oil with Protein and Dextrin Wall Materials *Journal of Food Science* 68(7): 2248–2255
- Katayama, S., Shima, J., y Saeki, H. (2002) Solubility Improvement of Shellfish Muscle Proteins by Reaction with Glucose and Its Soluble State in Low-Ionic-Strength Medium *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (15):4327–4332

- Kato, A. (2002). Industrial Applications of Maillard-Type Protein-Polysaccharide Conjugates. *Food Science Technology Research*, 8 (3): 193–199
- Kato, A., Shimokawa, K., y Kobayashi, K. (1993). Improvement of emulsifying properties of egg white proteins by the attachment of polysaccharide through Maillard reaction in a dry state. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 41,540-3
- Kaushik, V., y Roos, Y. H. (2007). Limonene encapsulation in freeze-drying of gum Arabic–sucrose–gelatin systems. *LWT Food Science and Technology* 40:1381–1391
- Kentish, S., Wooster, T. J., Ashokkumar, M., Balachandran, S., Mawson, R. y Simons, L. (2008). The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9: 170–175.
- Kim, Y.D., Morr, C.V., y Schenz,T.W. (1996). Microencapsulation properties of gum Arabic. And several food proteins: liquid orange oil emulsion particles. *Journal Agricultural Food Chemistry* 44:1308-1313
- Kim, Ji-S., y Lee, Y-S (2009) Antioxidant activity of Maillard reaction products derived from aqueous glucose/glycine, diglycine, and triglycine model systems as a function of heating time *Food Chemistry*, 116(1) : 227-232
- Kinsella, J.E. (1979). Functional Properties of Soy Proteins. *Journal American Oil Chemistry Society*. 56:242-258

- Kinsella, J. E. y Morr, Ch. V. (1984). Milk proteins: Physicochemical and functional properties *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 21(3):197-262
- Kinsella, J.E. y Whitehead, D.M., (1989). Proteins in whey: chemical, physical, and functional properties. *Advances Food Nutrition Res.* 33:343-438.
- Knight, J.A. (1998). Free radicals: their history and current status in aging and disease. *Annals of Clinical & Laboratory Science* 28(6):331-46.
- Kováčová, R., Synytsya, A. y Stetina, J. (2009). Characterisation of Whey Proteins–Pectin Interaction in Relation to Emulsifying Properties of Whey Proteins *Czech Journal Food Science.* 27:s4-s8
- Kruskal, W.H. y Wallis, W.A. (1952). Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association* 47(260):583-621
- Kulmyrzaev, A., Bryant, C., y McClements, D. J. (2000a). Influence of Sucrose on the Thermal Denaturation, Gelation, and Emulsion Stabilization of Whey Proteins *Journal Agricultural Food Chemistry* 48, 1593-1597
- Kulmyrzaev, A., Sivestre, M. P. C. y McClements, D. J. (2000b). Rheology and stability of whey protein stabilized emulsions with high CaCl₂ concentrations *Food Research International* 33(1): 21-25.

- Kulmyrzaev, A., Bryant, C. y McClements, D. J. (2000c). Thermal Denaturation, Gelation, and Emulsion Stabilization of Whey Proteins. *Journal Agricultural Food Chemistry* 48:1593-1597
- Lee, K-G., y Shibamoto, T. (2002). Toxicology and antioxidant activities of non-enzymatic browning reaction products: Review. *Food Reviews International*, 18: 151-175
- Lin, L. y Brasseur, R. (1995). The hydrophobic effect in protein folding. *The FASEB Journal* 9 (7): 535-540
- Liu, S-Ch., Yang, D-J., Jin, Sh-Y., Hsu, Ch-H., y Chen, S-L., (2008). Kinetics of color development, pH decreasing, and anti-oxidative activity reduction of Maillard reaction in galactose/glycine model systems. *Food Chemistry* 108 (2): 533-541
- Madene, A. , Jacquot, M, Scher, J., y Desobry, S . (2006). Flavour encapsulation and controlled release- a review. *International Journal of Food Science & Technology* 41:1-21
- Maillard, L.C. (1912). Condensation des acides aminés sur les sucres; formation de melanoidines par voie méthodique. *CR Acad Sci Paris* 154: 66-8
- Mangino, M. (1984). Physicochemical Aspects of Whey Protein Functionality. *Journal Dairy Science* 67:2711—2722

- Manzocco, L. y Maltini, E. (1999). Physical changes induced by the Maillard reaction in a glucose–glycine solution *Food Research International* 32(4): 299-304
- Márquez, A. L., Palazolo, G. G. y Wagner, J. R. (2005). Emulsiones tipo crema preparadas a base de leche de soja 1: Estudios de estabilidad y determinación de las formulaciones. *Grasas y Aceites* 56 (1): 59-66
- Mason, T.J. y Lorimer, J.P. (2002). Use of power ultrasound in chemistry and processing. *Applied Sonochemistry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 56-60.
- Mason, T.J., Paniwnyk, L., y Lorimer, J.P. (1996). The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry* 3: S253-S260.
- Mason, T.J. (2011). Therapeutic ultrasound an overview. *Ultrasonic Sonochemistry*. 18(4):847-52.
- Matiacevich, S., Santagapita, P., y Buera M. P. (2005). Fluorescence from the Maillard Reaction and its Potential Applications in Food Science .*Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45:483–495
- Matzi, M. K., Herwig, V. M.A., Greilberger, R. J., Kunert, J. H. y Wintersteiger, O. R. (2007) Hydroxymethylfurfural: an enemy or a friendly xenobiotic? A bioanalytical approach. *Analytical Bioanalysis Chemistry*. 387:2801-14

- Meyer, L. H. (1975). Food Chemistry Editorial The Avi Publishing Company. Connecticut, USA. Cap. 3, p. 108-112
- McClements, D. J. (1995). Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing *Trends in Food Science & Technology* 6(9): 293-299
- McClements, D. J. (2007a) Critical Review of Techniques and Methodologies for Characterization of Emulsion Stability *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 47(7): 611 – 649.
- McClements, D.J., Decker, E.A., y Weiss, J. (2007b). Emulsion-Based Delivery Systems for Lipophilic Bioactive Components *Journal of Food Science* 72(8): R109–R124
- McWatters y Cherry, J.P. (1977). Emulsification, foaming and protein solubility properties of defatted soybean, peanut, field pea and pecan flours. *Journal of Food Science* 42:144-147
- Meng, G. y Ching-Yung, M. (2002). Characterization of globulin from *Phaseolus angularis* (red bean). *International Journal of Food Science & Technology*. 37(6): 687–695
- Miller, J. A. (1994). Recent Studies on the Metabolic Activation of Chemical Carcinogens. *Cancer Research* 54:1879s-1881s.

- Mohamed, I., Mahmoud, Malone, W., y Cordle , C. (1992). Enzymatic Hydrolysis of Casein: Effect of Degree of Hydrolysis on Antigenicity and Physical Properties. *Journal of Food Science*, 57: 1223-1228
- Mongenont, N., Charrier, S. y Chalier, P. (2000).Effect of ultrasounds emulsification on cheese aroma encapsulation by carbohydrates. *Journal Agricultural Chemistry* 48:861-867
- Monti, S., M., Borrelli, R., C., Ritieni, A., y Fogliano, V. (2000). A Comparison of Color Formation and Maillard Reaction Products of a Lactose-Lysine and Lactose-Nr-Acetyllysine Model System. *Journal Agricultural Food Chemistry* 48: 1041-1046
- Morales, F.J., y Jiménez - Pérez, S. (2001). Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Food Chemistry*. 72: 119-125
- Moreno, J., Pez-Fandiño, R. L., y Olano, A. (2002).The C-terminal fragment of casein (residues 106-169) Characterization and Functional Properties of Lactosyl Caseinomacropetide Conjugates F. *Journal Agricultural Food Chemistry*., 50: 5179-5184
- Morgan, F., Léonil, J, Mollé, D. y Bouhallab, S. (1999) Modification of bovine β -lactoglobulin by glycation in a powdered state or in an aqueous solution:

immunochemical characterization *Journal Agricultural Food Chemistry* 47:83-

91

- Mulsow, B. B., Jacob, M. y Henle, T., (2009). Studies on the impact of glycation on the denaturation of whey proteins. *Europe Food Research Technology* 228:643–649
- Muñoz, J., Alfaro, M. del C., y Zapata, I. (2007). Avances en la formulación de emulsiones. *Grasas y Aceites* 58 (1): 64-73
- Murakami, M., A. Shigeeda, K. Danjo, T. Yamaguchi, H. Takamura y Matoba, T. (2002). Radical-Scavenging Activity and Brightly Colored Pigments in the Early Stage of the Maillard Reaction . *Journal of Food Science*. 67:93–96
- Nacka F., Chobert, J-M, Burova T., Leonil, J., E. y Haertle ,T. (1998). Induction of New Physicochemical and Functional Properties by the Glycosylation of Whey Proteins. *Journal of Protein Chemistry*, 17(5):495-503
- Nasirpour, A., Scher J. y Desobry, S. (2006). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 46 (8):665 – 681.
- Oliver, CH. M., Melton, L. D., y Stanley, R. A. (2006a). Creating Proteins with Novel Functionality via the Maillard Reaction: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 46:337–350

- Oliver, C. M., Melton L. D. y Stanley, R. A (2006b). Functional properties of caseinate glycoconjugates prepared by controlled heating in the 'dry' state *Journal of the Science of Food and Agriculture* . 86(5):732-740
- Osada, Y., y Shibamoto, T., (2006). Antioxidative activity of volatile extracts from Maillard model systems *Food Chemistry* 98(3): 522-528
- Panyam, D. y Kilara, A. (1996). Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification . *Trends in Food Science Technology* 71:120-125
- Pearce, K.N y Kinsella, J. E. (1978). Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 23:716-723
- Pedroza, R. (2002). Alimentos microencapsulados: particularidades de los procesos para la microencapsulación de alimentos para larvas de especies acuícolas. *Avances en Nutrición Acuícola VI*. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Cancún, México.
- Portenlänger y Heusinger (1994). Polymer formation from aqueous solutions of α -D-glucose by ultrasound and λ -rays. *Ultrasonics Sonochemistry* 1(2): S125-S129
- Pour-EI, A. (1981). Protein functionality: Clasification, definition and methodology. In Protein Functionality in Foods. E.J.P. Cherry, ACS

- Symposium Series 147, p.1. *Journal American Chemistry Society*.
Washington, D.C.
- Quintas, M.A.C., Brandao, T.R.S., y Silva C. L.M. (2007). Modelling colour changes during the caramelisation reaction *Journal of Food Engineering* 83:483-491
- Rada-Mendoza, M., Villamiel, M., Molina E. y Olano, A. (2006). Effects of heat treatment and high pressure on the subsequent lactosylation of β -lactoglobulin. *Food Chemistry* 4: 651-655
- Rao, R. y Muralikrishna, G. (2006). Water soluble feruloyl arabinoxylans from rice and ragi: Changes upon malting and their consequence on antioxidant activity *Phytochemistry* 67: 91-99
- Reiffers-Magnani, C.K., Cuq, J.L., y Watzke, H.J. (2000) Depletion flocculation and thermodynamic incompatibility in whey protein stabilised O/W emulsions *Food Hydrocolloids* 14:521-530
- Reiffers-Magnani, C.K., Cuq J.L., y Watzke H.J. (1999). Composite structure formation in whey protein stabilized O/W emulsions. I. Influence of the dispersed phase on viscoelastic properties *Food Hydrocolloids* 13(4): 303-316
- Reineccius, G.A. (1991). Carbohydrates for flavor encapsulation. *Food Technology*. March: 144-146,149

- Roach, A. y Harte, F. (2008) Disruption and sedimentation of casein micelles and casein micelle isolates under high-pressure homogenization *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 9(1): 1-8
- Robins, M. M. (2000) Lipid emulsions *Grasas y Aceites* 51(1-2): 26-34
- Robins, M. M., Watson, A. D., y Wilde, P. J. (2002) Emulsions creaming and rheology *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 7(Ž) 419-425
- Romdhane, M. y Gourdon, C. (2002). Investigation in solid-liquid extraction: influence of ultrasound. *Chemical Engineering Journal*. 87: 11-19
- Rizzi, G. (2003). Free radicals in the maillard reaction. *Food Reviews International*. 19: 375-395
- Sabik, H., Alfaro, M. J., Pelletier, M., Belanger, D., Britten, M., y Fustier, P. (2011). Chemical stability of sodium caseinate-lactose glycoconjugates-stabilized oil-in-water emulsions containing lemon oil by HS-SPME-GC/MS. In preense
- Sánchez, C.C., y Rodríguez, J.M. P. (2005). Interfacial, foaming and emulsifying characteristics of sodium caseinate as influenced by protein concentration in solution. *Food Hydrocolloids* 19: 407–416
- Sanguansri, P. y Augustin, M.A. (2006). Nanoscale materials development- a food industry perspective. *Trends in Food Science & Technology* 17:547-556

- Santiago, L. G., Bonaldo, A. G. y González, R. J. (2004) Influence of Salt Level and pH on the Stability of Oil-In-Water Emulsions Containing Untreated, Heat and Reduced Treated Soy Protein Isolate as Emulsifier. *Brazil Journal Food Technology* 7(2):179-186
- Schaafsma, G. (2008) Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition *International Dairy Journal* 18: 458–465.
- Schokker, E.P., Singh, H. y Creamer, L.K., (2000). Heat induced aggregation of β -lactoglobulin A and B with α -lactalbumin. *International Dairy Journal*, 12: 843-853
- Shahidi y Han (1993). Encapsulation of food ingredients. *Critical Review Food Science Nutrition*. 33(6):501-547
- Sheu, T-Y. y Rosenberg, M. (1995). Microencapsulation by Spray Drying Ethyl Caprylate in Whey Protein and Carbohydrate Wall Systems. *Journal of Food Science* 60(1):98-103
- Sheu, T-Y. y Rosenberg, M. (1998). Microstructure of Microcapsules Consisting of Whey Proteins and Carbohydrates *Journal of Food Science* 63(3):491-494
- Shih-Chuan, L., Deng-Jye, Y., Shu-Yi J., Chia-Hung H., y Su-Lin, Ch. (2008). Kinetics of color development, pH decreasing, and anti-oxidative activity reduction of Maillard reaction in galactose/glycine model systems. *Food Chemistry* 533-541

- Shou-Wei, Y., Chuan-He T., Jin-Song C., Er-Kun H., Qi-Biao W., y Xiao-Quan Y. (2008). Effects of limited enzymatic hydrolysis with trypsin on the functional properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate *Food Chemistry* 106: 1004-1013
- Sinisterra, J. V. y Barrios J. 1990. Proceedings of ultrasonics internacional 1989 Butterworths, London 1232-1237
- Sun, Y., Hayakawa, S., Ogawa, M. y Izumori, K. J. (2005). Evaluation of the Site Specific Protein Glycation and Antioxidant Capacity of Rare Sugar-Protein/Peptide Conjugates. *Agricultural Food Chemistry*. 53:10205-10212
- Suslick, K. S. (1989). The Chemical effects of Ultrasound. *Scientific American*. February : 80-89
- Suslick, K. S. (1994) .The Chemistry of Ultrasound. *The yearbook of science and the future* . Encyclopedia Britannica: Chicago. pp. 138-155.
- Suslick, K. S. y Grinstaff, M. W. (1990). Protein microencapsulation of nonaqueous liquids" *Journal American Chemistry. Society*. 112 : 7807-7809
- Suslick, K.S. 2001. Sonoluminescence and sonochemistry. Encyclopedia of physical science and technology, 3rd. Ed. Academic Press, Inc. San Diego, USA

- Syrbe, A., Baue, W.J. y Klostermeyer, H. (1998). Polymer science concepts in dairy system-an overview of milk protein and food hydrocolloid interaction. *International Dairy Journal* 8: 179-193
- Taherian, A. R., Fustier, P. y Ramaswamy, H. S. (2008). Steady and dynamic shear rheological properties, and stability of non-flocculated and flocculated beverage cloud emulsions *International Journal of Food Properties* 11: 24-43
- Thanasukarn, Pa., Pongsawatmanit, R., y McClements, D.J.(2004) _Influence of emulsifier type on freeze-thaw stability of hydrogenated palm oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids* 18 (6): 1033-1043
- Tian, Z.M., Wan, M.X., Wong, S.P. y Kang, J.Q. (2004). Effects of ultrasound and additives on the function and structure of trypsin. *Ultrasonics Sonochemistry* 11: 399-404.
- Tosun, I. (2004). Color changes and 5-hydroxymethyl furfural formation in zile pekmezi during storage *Grasas y Aceites* 55(3):259-263
- Turgeon, S., L., Gauthier, S.,F., y Paquin P. (1992). Emulsifying Property of Whey Peptide Fractions as a Function of pH and Ionic Strength. *Journal of Food Science* 57: 601-604, 634
- Turkmen, N.I, Sari, F., Poyrazoglu, E. S., y Velioglu, Y. S. (2006). Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey *Food Chemistry* 95:653-657

- Ubbink, J. y Krüger, J. (2006). Physical approaches for the delivery of active ingredients in foods. *Trends in Food Science & Technology* 17:244-254
- Van Boekel, M. A. J. S. (1998). Effect of heating on Maillard reactions in milk *Food Chemistry* 62:403-414
- Vega, C. y Roos H. (2006). *Invited Review: Spray-Dried Dairy and Dairy-Like Emulsions—Compositional Considerations. Journal of Dairy Science* 89(2):383-401
- Venkatesh, A. y Prakash, V. (1993). Functional properties of the total proteins of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed-effect of physical and chemical treatments. *Journal Agricultural Food Chemistry* 41:18-23
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., y Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry-a review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9:161-169
- Warmbier, H. C., Schnickels, R. A., y Labuza, T. P. (1976). Nonenzymatic Browning Kinetics in an Intermediate Moisture Model System: Effect of Glucose to Lysine Ratio. *Journal of Food Science* 41(5): 981–983
- Wang, X-S., Tang, Ch.-H., Li B-Sh., Yang, X-Q., Li, L. y Ma, Ch-Y. (2008). Effects of high-pressure treatment on some physicochemical and functional properties of soy protein isolates. *Food Hydrocolloids* 22 (4): 560-567

- Weiss, J., Takhistov, P., y McClements, J. (2006). Functional Materials in Food Nanotechnology *Journal of Food Science* 71(9): r107-116
- Wijewickreme, A. N. y Kitts, D. (1997). Influence of Reaction Conditions on the Oxidative Behavior of Model Maillard Reaction Products *Journal Agricultural Food Chemistry* 45: 4571-4576.
- Yanga, B., Zhaob, M., Shic, J., Yangb, N., y Jiang, Y. (2008). Effect of ultrasonic treatment on the recovery and DPPH radical scavenging activity of polysaccharides from longan fruit pericarp *Food Chemistry* 106 (2): 685-690
- Yaylayan, V. A. y Huyghues-Despointes, A. (1994). Chemistry of Amadori Rearrangement Products: Analysis , Synthesis, Kinetics, Reactions, and Spectroscopic Properties. *Critical Reviews in Food and Nutrition*. 34:321-369
- Yaylayan, V.,A., Despointes, A.,H., y Polydorides, A. (1992). A fluorescamine-based assay for the degree of glycation in bovine serum albumin. *Food Research International*. 25: 269-275
- Yeboah, F. K., Alli, I., y Yaylayan, V. A. (1999). Reactivities of d-glucose and d-fructose during Glycation of Bovine Serum Albumin *Journal Agricultural and Food Chemistry* 47 (8): 3164–3172
- Yilmaz, Y. y Toledo, R. (2005). Antioxidant activity of water-soluble Maillard reaction products. *Food Chemistry* 93(2):273-278

- Young, S. L., Sarda, X. y Rosenberg, M. (1993). Microencapsulating Properties of Whey Proteins.2. Combination of Whey Proteins with Carbohydrates *Journal Dairy Science* 76(10):2878-2877
- Young, D. K., Morr, Ch. V. y Schenz, T.W. (1996). Microencapsulation Properties of Gum Arabic and Several Food Proteins: Liquid Orange Oil Emulsion Particles *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 (5):1308–1313
- Zapata, L. M.; Gerard, L.; Davies, C. y Schva, M. del C. (2007). Estudio de los componentes antioxidantes y actividad antioxidante en tomates. *Natural and Exact Sciences - Engineering and Techonology* 35:173-193
- Zayas, J.F. (1997). Funcionalidad de proteínas en food. Charter 2 p. 76, Charter 4 p. 228. Berlin, Germany.