

Tesis Doctoral

Modificación molecular y funcional de proteínas de clara de huevo mediante ultrasonidos de alta intensidad: aplicación de esta tecnología al diseño de nanovehículos para ácido fólico

Arzeni, Carolina

2014

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Arzeni, Carolina. (2014). Modificación molecular y funcional de proteínas de clara de huevo mediante ultrasonidos de alta intensidad: aplicación de esta tecnología al diseño de nanovehículos para ácido fólico. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Arzeni, Carolina. "Modificación molecular y funcional de proteínas de clara de huevo mediante ultrasonidos de alta intensidad: aplicación de esta tecnología al diseño de nanovehículos para ácido fólico". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Industrias

Modificación molecular y funcional de proteínas de clara de huevo mediante ultrasonidos de alta intensidad: aplicación de esta tecnología al diseño de nanovehículos para ácido fólico

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Industrial

Lic. Carolina Arzeni

Director de tesis: Dra. Ana M. R. Pilosof

Director Asistente: Dr. Oscar E. Pérez

Consejero de Estudios: Dra. Ana M. R. Pilosof

Lugar de trabajo: Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Buenos Aires, 2014.

Modificación molecular y funcional de proteínas de clara de huevo mediante ultrasonidos de alta intensidad: aplicación de esta tecnología al diseño de nanovehículos para ácido fólico

Resumen

El objetivo de este trabajo fue caracterizar el efecto de la aplicación de ultrasonidos de alta intensidad (USAI) en las propiedades moleculares y funcionales de un aislado de proteínas de albúmina de huevo comercial (EW) y desarrollar nanopartículas por agregación controlada mediante USAI, sólo o en combinación con altas temperaturas (termosonicación), con la finalidad de emplearlas como nanovehículos (*nanocarriers*) para ácido fólico (AF). Luego de la aplicación de USAI, la hidrofobicidad superficial aumentó, mientras que se produjo un leve descenso del contenido de grupos SH totales. La viscosidad aparente disminuyó con el tratamiento con USAI, lo que pudo ejercer una influencia negativa en la capacidad de espumado y la estabilidad de las espumas. Sin embargo, la estabilidad al colapso no se vio afectada. Las emulsiones preparadas a partir de soluciones sonicadas resultaron ser más estables al cremado y a la floculación. No hubo diferencias significativas en los parámetros reológicos de los geles estudiados. La velocidad de formación de agregados por efecto del calentamiento fue mayor para las soluciones sonicadas, lo cual puede atribuirse al aumento en la hidrofobicidad de la proteína luego de la sonicación. Luego, se realizaron tratamientos con USAI y termosonicación a pH 7 y 3, para determinar las condiciones óptimas para la formación de las nanopartículas. Se seleccionaron dos tipos de nanopartículas, ambas a pH 3: las obtenidas por USAI, que presentaron una población monomodal de 220,2 nm de diámetro y las obtenidas por termosonicación, porque contenían partículas de 37,8 nm en su mayoría. Luego de la unión con AF, el tamaño de partícula permaneció igual. El porcentaje de AF unido fue de alrededor de 80% para ambos nanovehículos. Luego de la liofilización, se observó una leve agregación de las nanopartículas reconstituidas. Finalmente, se determinó que, luego de la digestión gastrointestinal *in vitro* de los complejos, la biodisponibilidad del AF para *Lactobacillus rhamnosus* fue mayor en comparación con la de la vitamina libre.

Palabras clave: clara de huevo, ácido fólico, nanopartículas, biodisponibilidad

Molecular and functional modification of egg white proteins by high intensity ultrasound: application of this technology for the design of folic acid nanocarriers

Abstract

The objective of this work was to characterize the effect of the application of high intensity ultrasound (USAI) on the molecular and functional properties of a commercial egg white protein isolate (EW) and to develop nanoparticles by means of controlled aggregation using USAI, alone or combined with high temperatures (thermosonication), with the aim of using them as nanocarriers for folic acid (AF). After the application of USAI, the surface hydrophobicity increased; while a slight decrease in the total SH groups content was observed. The apparent viscosity was lowered by USAI treatment, which could exert a negative influence on the foaming capacity and foam stability. However, the stability to collapse remained unaffected. The emulsions prepared from sonicated solutions turned out to be more stable to creaming and flocculation processes. There were no significant differences among the studied rheological parameters of the gels. The rate of aggregates formation by heating was higher for sonicated solutions, which can be attributed to the increase in surface hydrophobicity of the protein after USAI treatment. Then, USAI and thermosonication treatments were applied at pH 3 and 7 to determine the optimal conditions for the formation of nanoparticles. Two types of nanoparticles were selected, both at pH 3: one obtained by USAI, which presented a monomodal population of 220.2 nm of diameter and another produced by thermosonication, because it contained particles of 37.8 nm mostly. When binding the AF to the nanoparticles, the particle size was unaffected. The percentage of bound AF was approximately 80% for both nanocarriers. After freeze-drying the samples, a slight aggregation of the rehydrated nanoparticles was observed. Finally, it was determined that, after *in vitro* gastrointestinal digestion of the complexes, the bioavailability of AF for *Lactobacillus rhamnosus* was higher in comparison with the free vitamin.

Keywords: egg white, folic acid, nanoparticles, bioavailability

Agradecimientos

A la Dra. Ana Pilosof, por permitirme realizar mi tesis doctoral en su laboratorio, por orientar mi trabajo experimental y ayudarme en el análisis de los resultados, por su lectura crítica y sus valiosos aportes en el proceso de escritura.

Al Dr. Oscar Pérez, por su apoyo en la realización de este trabajo, por su buena predisposición y sus contribuciones en la escritura de la tesis y por alentarme a seguir adelante en esta última etapa.

A mis padres, Alicia y Carlos, a mi hermana Cecilia y a Juan, por su inmenso cariño, por ser mi soporte emocional y por darme confianza para alcanzar mis objetivos. A mi sobrino Fede, por su ternura y la alegría que me transmite.

A Martín, en especial, por ser mi compañero en la vida, por su cariño y su paciencia inigualable, por su contención en todo momento y por la ayuda que me brindó con la revisión y edición de mi tesis.

A mis compañeros del laboratorio, porque de una u otra manera contribuyeron en la realización de mi trabajo de tesis. A Julia, por su gran ayuda y por compartir desinteresadamente su conocimiento. A Paula, por los experimentos que realizamos juntas, por su amistad y su sensibilidad para aconsejarme. A Fernando, Rocío, Víctor, Karina, Edith, Nerina, Silvio, Federico y Mariana, por el día a día que compartimos y los momentos divertidos que nunca faltan.

Al Dr. Jean Guy LeBlanc, por realizar los experimentos microbiológicos que fueron de gran importancia para concluir mi trabajo experimental.

A la Universidad de Buenos Aires, por la formación que me brindó; a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por las becas otorgadas. A todas estas instituciones por los subsidios proporcionados.

A todos los integrantes del Departamento de Industrias, de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, con quienes compartí estos años de trabajo.

Índice

Introducción	1
1. El huevo en la alimentación	2
2. Estructura y composición química del huevo	3
3. Composición de la albúmina de huevo	4
3.1. Ovoalbúmina	5
3.2. Conalbúmina.....	7
3.3. Ovomucoide	8
3.4. Lisozima	9
4. Propiedades funcionales	10
4.1. Propiedades de gelificación.....	10
4.2. Propiedades de espumado.....	11
4.3. Propiedades de emulsificación.....	11
4.4. Otras propiedades funcionales.....	12
5. La industria del huevo en Argentina	12
5.1. Estadísticas actuales	12
5.2. Ovoproductos	13
5.3. Deshidratación de la clara de huevo	14
6. Procesamiento con ultrasonidos de alta intensidad (USAI).....	16
6.1. Fundamento	16
6.2. Variables que influyen en el tratamiento.....	19
6.3. Tipos de sonicadores	20
6.4. Modificaciones en los biopolímeros.....	22
7. Nanopartículas para el suministro de compuestos bioactivos en alimentos funcionales	23

7.1. Métodos para fabricar nanopartículas.....	24
7.2. Características de las nanopartículas	25
7.3. Mejora de la biodisponibilidad mediada por nanopartículas	27
7.4. Empleo de proteínas para el diseño de nanopartículas.....	29
8. Ácido fólico.....	30
8.1 Estructura y nomenclatura	30
8.2. Propiedades químicas.....	31
8.3. Funciones bioquímicas y actividad biológica	31
8.4. Fuentes de la vitamina	33
9. Referencias.....	37
Objetivos	47
Objetivo general.....	48
Objetivos Específicos.....	48
Materiales y métodos	49
1. Materiales	50
1.1. Clara de huevo.....	50
1.2. Ácido fólico	50
2. Métodos	50
2.1. Tratamiento con ultrasonidos de alta intensidad	50
2.2. Determinación de la energía acústica	51
2.3. Medición de conductividad	52
2.4. Determinación de grupos sulfhidrilos libres	52
2.5. Calorimetría diferencial de barrido	53
2.6. Determinación de hidrofobicidad superficial.....	53
2.7. Distribución de tamaño y potencial zeta de las partículas.....	54
2.8. Determinación de la solubilidad.....	58

2.9. Medición de la viscosidad.....	59
2.10. Propiedades espumantes	59
2.11. Propiedades de emulsificación.....	60
2.12. Dinámica de gelificación.....	63
2.13. Cinética de agregación térmica	64
2.14. Generación de nanocarriers de AF	65
2.15. Microscopía óptica	65
2.16. Evaluación del grado de unión de AF	65
2.17. Microscopía láser confocal.....	66
2.18. Microscopía de fuerza atómica (AFM)	66
2.19. Mediciones de fluorescencia.....	66
2.20. Deshidratación de los nanocarriers.....	67
2.21. Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	67
2.22. Ensayo microbiológico.....	67
2.23. Análisis estadístico.....	68
3. Referencias.....	69
Resultados.....	71
Capítulo I - Efectos de los ultrasonidos de alta intensidad en las propiedades moleculares, estructurales y funcionales de la clara de huevo	72
I.1. Determinación de la energía acústica.....	73
I.2. Efecto de los USAI en las propiedades moleculares y estructurales de la EW	75
I.2.1. Conductividad eléctrica	75
I.2.2. Grupos sulfhidrilo libres	76
I.2.3. Propiedades térmicas	78
I.2.4. Hidrofobicidad superficial	80
I.2.5. Determinación del tamaño de partícula	83

I.3. Efecto de los USAI en las propiedades funcionales de la EW	89
I.3.1. Solubilidad	89
I.3.2. Propiedades de flujo.....	89
I.3.3. Espumas: formación y estabilidad.....	91
I.3.4. Emulsiones: formación y estabilidad.....	95
I.3.5. Geles: dinámica de gelificación y características reológicas	103
I.3.6. Agregación térmica: Cinética y microestructura.....	110
I.4. Conclusiones	115
I.5. Referencias.....	116
Capítulo II - Empleo de los ultrasonidos de alta intensidad como estrategia para el diseño de nanopartículas de clara de huevo	123
II.1. Justificación de la estrategia empleada	124
II.2. Caracterización del tamaño de partícula de EW	124
II.3. Influencia de los USAI (sin calentamiento) en el tamaño de partícula.....	127
II.4. Influencia de la TS en el tamaño de partícula	131
II.5. Evolución del tamaño promedio de las partículas.....	142
II.6. Carga superficial de las partículas: estabilidad coloidal	144
II.7. Conclusiones	148
II.8. Referencias.....	149
Capítulo III - Construcción de nanocarriers de clara de huevo para ácido fólico.....	152
III.1. Formación de nanocarriers de ácido fólico.....	153
III.2. Secado y estabilidad de los nanocarriers.....	160
III.3. Caracterización estructural de los nanocarriers	165
III.4. Evaluación de las propiedades funcionales de los nanocarriers	171
III.4.1. Propiedades de espumado.....	171
III.4.2. Propiedades de emulsificación.....	173

III.4.3. Propiedades de gelificación.....	178
III.5. Conclusiones	181
III.6. Referencias.....	182
Capítulo IV - Evaluación de la actividad biológica del ácido fólico en nanocarriers	
<i>luego de la digestión in-vitro</i>	184
IV.1. Ensayos de biodisponibilidad <i>in vitro</i>	185
IV.2. Estabilidad de los nanocarriers de AF al cambio de pH.....	186
IV.3. Evaluación de la actividad biológica de nanocarriers de AF en un modelo microbiano	190
IV.4. Conclusiones	193
IV.5. Referencias.....	194
Conclusiones generales	196
1. Conclusiones generales	197
2. Referencias.....	198

Introducción

1. El huevo en la alimentación

El huevo contiene todos los nutrientes esenciales para el desarrollo de un embrión en un ambiente externo. Es por eso que posee una protección física, la cáscara, pero además cuenta con un sistema complejo de defensas químicas que asegura la supervivencia del embrión en un ambiente que puede ser hostil. La diversidad de los componentes del huevo y su perfecto balance para asegurar el crecimiento del animal explican la calidad nutricional excepcional del huevo para los humanos (Nys y Guyot, 2011). La FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) afirma que los huevos son uno de los alimentos de mayor valor nutricional de la naturaleza debido a la calidad de sus proteínas y a la gran cantidad de vitaminas, minerales y sustancias esenciales que aporta. Las proteínas son esenciales para el desarrollo y mantenimiento de nuestro cuerpo, ya que los músculos, los órganos, la piel, el pelo, los anticuerpos, las enzimas y las hormonas están formados por proteínas. El huevo contiene los nueve aminoácidos esenciales y por ello se considera un alimento de "proteína completa". La proteína del huevo es considerada como patrón de referencia para comparar nutricionalmente a las demás proteínas de los diferentes alimentos, por cada 100 gramos de huevo, el aporte proteico es de 12 a 14 gramos (Ordoñez Pereda y de La Hoz Perales, 1999). En la Tabla 1 se detalla la composición centesimal de los nutrientes de la clara y la yema de huevo.

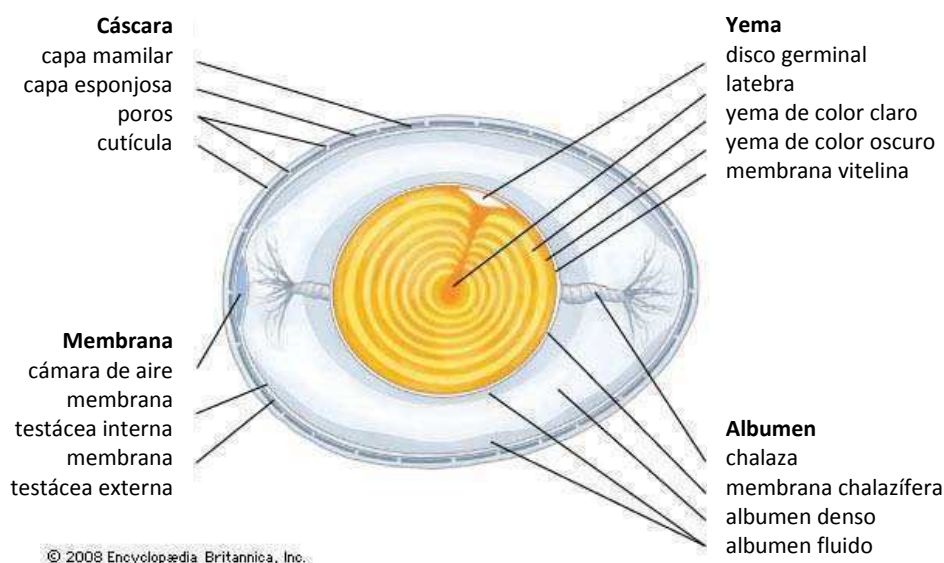


Figura 1: Componentes estructurales del huevo.

Fuente: Encyclopædia Britannica Inc. (2008).

2. Estructura y composición química del huevo

Las partes principales del huevo son la cáscara (8,5-10,5%), la yema (25-33%) y la albúmina (57-65%). En la Figura 1 se muestra el detalle de los componentes estructurales del huevo. La cáscara, que está compuesta de carbonato de calcio, es la cubierta más externa del huevo. La yema constituye alrededor de un tercio del huevo y contiene tres cuartos de las calorías, la mayoría de las vitaminas y los minerales y el total de los lípidos. La yema también contiene lecitina, el compuesto responsable de la emulsificación en productos como la mayonesa. La albúmina o clara de huevo (EW, sus siglas en inglés) constituye cerca de dos tercios del huevo y contiene más de la mitad de la proteína y la riboflavina (Rupa y Mine, 2005). La cáscara, la clara y la yema contienen 3, 11 y 17,5% de proteínas respectivamente (Doi y Kitabatake, 1997). Muchas de estas proteínas han sido usadas como sistemas modelo para el estudio de conceptos básicos en el campo de la química de proteínas y de las relaciones estructura–función de las mismas (Powrie y Nakai, 1986).

Tabla 1: Composición centesimal de nutrientes del huevo.

Nutriente	Unidad	Yema	Clara
Agua	g	52,31 ± 0,204	87,57 ± 0,124
Energía	kcal	322	52
Proteínas	g	15,86 ± 0,087	10,90 ± 0,137
Lípidos	g	26,54 ± 0,240	0,17 ± 0,018
Cenizas	g	1,71 ± 0,028	0,63 ± 0,029
Carbohidratos, por diferencia	g	3,59	0,73
Azúcares	g	0,56	0,71
<i>Minerales</i>			
Calcio, Ca	mg	129 ± 2,670	7 ± 0,320
Hierro, Fe	mg	2,73 ± 0,144	0,08 ± 0,004
Magnesio, Mg	mg	5,00 ± 0,225	11 ± 0,178
Fósforo, P	mg	390 ± 9,897	15 ± 0,409
Potasio, K	mg	109 ± 3,859	163 ± 1,848
Sodio, Na	mg	48 ± 1,657	166 ± 1,842
Zinc, Zn	mg	2,30 ± 0,085	0,03 ± 0,004
Selenio, Se	µg	56,0 ± 8,030	20,0 ± 5,364
<i>Vitaminas</i>			
Ácido pantoténico	mg	2,990	0,190
Folato, Eq. dietarios de folato	µg	146	4
Colina	mg	820,2	1,1 ± 0,129
Vitamina B12	µg	1,95 ± 0,316	0,09 ± 0,000

Nutriente	Unidad	Yema	Clara
Vitamina A	IU	1442	0
Luteína + zeoxantina	µg	1094	0
Vitamina E	mg	2,58	0,00
Vitamina D	IU	218	0
<i>Lípidos</i>			
Ácidos grasos saturados	g	9,551	0,000
Ácidos grasos monoinsaturados	g	11,738	0,000
Colesterol	mg	1085	0
<i>Aminoácidos</i>			
Triptofano	g	0,177	0,125
Treonina	g	0,687	0,449
Isoleucina	g	0,866	0,661
Leucina	g	1,399	1,016
Lisina	g	1,217	0,806
Metionina	g	0,378	0,399
Cistina	g	0,264	0,287
Fenilalanina	g	0,681	0,686
Tirosina	g	0,678	0,457
Valina	g	0,949	0,809
Arginina	g	1,099	0,648
Histidina	g	0,416	0,290
Alanina	g	0,836	0,704
Ácido aspártico	g	1,550	1,220
Ácido glutámico	g	1,970	1,550
Glicina	g	0,488	0,413
Prolina	g	0,646	0,435
Serina	g	1,326	0,798

Fuente: (USDA, 2013a, 2013b).

3. Composición de la albúmina de huevo

Existen aproximadamente 40 proteínas diferentes en la clara de huevo, que juegan un rol importante en el proceso de desarrollo y durante el deterioro del huevo. La EW constituye la segunda línea de defensa contra bacterias invasoras, junto con la cáscara y las membranas de la cáscara (Rupa y col, 2005). En la Tabla 2 se lista el contenido, los puntos isoeléctricos y los pesos moleculares informados para algunas proteínas presentes en la EW. Li-Chan y Nakai (1989) han compilado la composición aminoacídica de algunas de estas proteínas. Las variaciones entre los pesos moleculares y puntos isoeléctricos teóricos y los medidos experimentalmente se deben

al polimorfismo observado para muchas de estas proteínas (Guérin-Dubiard y col, 2005). Además, las isoformas glicosiladas y las no glicosiladas pueden diferir significativamente en el peso molecular (Raikos, Hansen, Campbell, y Euston, 2006). Cuando la EW es calentada, las proteínas sufren desnaturalización y gelificación, esta propiedad es aprovechada tecnológicamente, es así que la clara aislada es usada como un ingrediente alimenticio debido a la fuerza de sus geles, su capacidad espumante y de retención de agua (Doi & Kitabatake, 1997).

Tabla 2: Contenido, punto isoeléctrico y peso molecular de algunas proteínas encontradas en la clara de huevo.

Proteína	Porcentaje en la albúmina	Punto Isoeléctrico	Peso Molecular, kDa
Ovoalbúmina	54	4,5 (5,1–5,3)	45 (42,4)
Ovoalbúmina Y		(5,3–5,5)	(53,4–54,3)
Ovotransferrina	12	6,1 (6,2–6,7)	76 (85–75)
Ovomucoide	11	4,1 (5,0–5,3)	28 (37,2–43,1)
Ovomucina	3,5	4,5–5,0	5500–8300
Lisozima	3,4	10,7	14,3 (15)
Ovoglobulina		(6,1–5,3)	
Globulina G2	4,0	5,5	30–45
Globulina G3	4,0	4,8	N/D ^a
Ovoinhibidor	1,5	5,1 (6,2–6,4)	49 (69,5–63,6)
Glicoproteína	1,0	3,9 (5,0–5,4)	24,4 (37,2–43,1)
Flavoproteína	0,8	4 (5,0–5,2)	32 (37,4–40)
Macroglobulina	0,5	4,5	769
Cistatina	0,05	5,1 (6,1)	12,7 (17)
Avidina	0,05	10	68,3

^aNo determinado.

Fuente: los datos fueron compilados de Li-Chan, Powrie, y Nakai (1995), excepto por aquellos presentados entre paréntesis, que corresponden a Guérin-Dubiard y col (2005).

3.1. Ovoalbúmina

La proteína más abundante en la EW, 50% aproximadamente, es la ovoalbúmina (Cheftel, Cuq, y Lorient, 1989). Esta es una fosfoglicoproteína que consta de 385 residuos de aminoácidos (McReynolds y col, 1978; Woo y col, 1981). Tiene un oligosacárido heterogéneo unido covalentemente (Nisbet, Saundry, Moir, Fothergill, y Fothergill, 1981). La estructura terciaria de la proteína queda estabilizada por la presencia de dos puentes disulfuro (Figura 2).

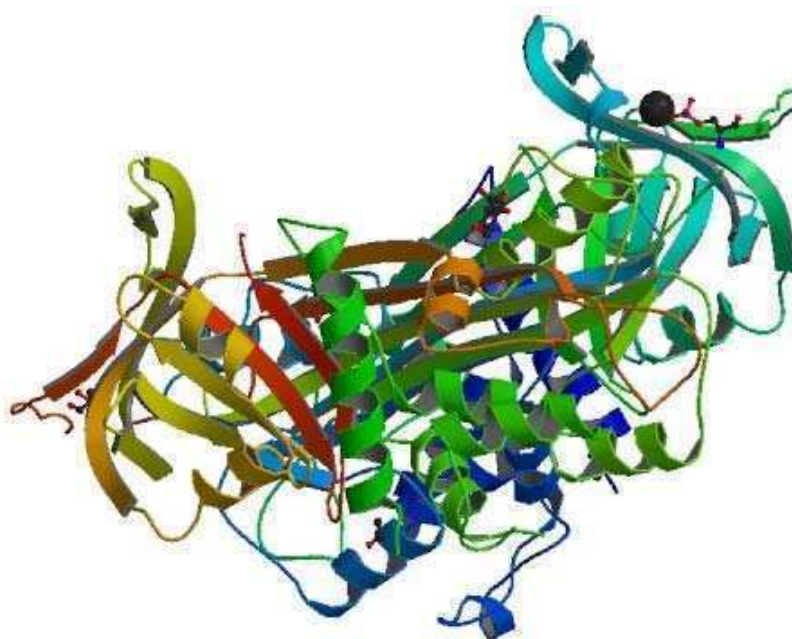


Figura 2: Estructura tridimensional de la ovoalbúmina
(Stein, Leslie, Finch, y Carrell, 1991).

Existe una variante de esta proteína que se denomina S-ovoalbúmina, forma abreviada de *stable-ovalbumin*, que presenta mayor termoestabilidad. La S-ovoalbúmina se produce durante el almacenamiento debido a una transición estructural de la ovoalbúmina generando una especie más compacta (Kint y Tomimatsu, 1979; Nakamura, Hirai, y Takemori, 1980).

La ovoalbúmina tiene dos sitios potenciales para la fosforilación en las serinas 68 y 344 (Nisbet y col, 1981). Las fracciones de ovoalbúmina A1, A2 y A3 que contienen dos, uno y cero grupos fosfato por molécula de ovoalbúmina, respectivamente, están presentes en la albúmina en una relación aproximada de 81–84%, 14–16% y 2–4% (Cann, 1949; Longworth, Cannan, y MacInnes, 1940; Perlmann, 1952). La ovoalbúmina puede organizarse en una estructura cuaternaria, según se demostró por difracción de rayos-X (Matsumoto y Chiba, 1990; Matsumoto, Chiba, y Inoue, 1992). Esta asociación molecular es dependiente de la concentración, estando monomérica en concentraciones menores al 0,1%, en forma dimérica para concentraciones entre 0,5 y 1%, y en forma tri o tetramérica para concentraciones entre 4 y 17%. La tasa de asociación también aumentaría con el descenso del pH: 2,1 moléculas a pH 7,0 contra 2,88 moléculas a pH 4,01, para una concentración del 0,5%. La ovoalbúmina en

solución puede desnaturalizarse y agregarse por tratamientos térmicos o por exposición en interfases aire-agua (Chang, Powrie, y Fennema, 1970; Kato, Matsuda, Matsudomi, y Kobayashi, 1985; Kato y Takagi, 1988; Kitabatake y Doi, 1987; Koseki, Kitabatake, y Doi, 1989; Lechevalier y col, 2003; Matsuda, Watanabe, y Sato, 1981; Mine, Noutomi, y Haga, 1990; Renault, Pezennec, Gauthier, Vié, y Desbat, 2002). Las soluciones de ovoalbúmina durante el calentamiento gelifican formando geles turbios o transparentes dependiendo de condiciones tales como el pH, la fuerza iónica y la concentración de proteína (Kitabatake & Kinekawa, 1995). La ovoalbúmina imparte también a la EW su capacidad de formar espumas.

3.2. Conalbúmina

La segunda proteína más importante de la EW es la conalbúmina u ovotransferrina, la cual consta de una cadena de 686 residuos de aminoácidos con una masa molecular de 78 kDa (Doi y col, 1997). Constituye alrededor del 11% de las proteínas de la clara (Cheftel y col, 1989). Esta proteína es una transferrina que tiene la capacidad de ligar Fe^{3+} y $(\text{CO}_3)^{2-}$ (Kitabatake et al, 1982). Su estructura terciaria consta de dos lóbulos, cada uno subdividido en dos dominios, entre los que se ubica el Fe^{3+} . Por lo tanto, una molécula de ovotransferrina tiene la capacidad de unir dos átomos de Fe^{3+} . Cuando se une este átomo, se produce un cambio conformacional de los dominios, que pasan de una posición más abierta a una más cerrada (Hirose, 2000). En la Figura 3 se puede apreciar la estructura terciaria de la proteína unida a Fe^{3+} y $(\text{CO}_2)^{3-}$. La ovotransferrina ejerce una actividad antimicrobiana *in vitro* contra diferentes bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Se ha informado que las especies más sensibles son *Pseudomonas spp.*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans*, y las más resistentes son *Proteus spp.*, y *Klebsiella spp.* (Valenti y col, 1983). Su capacidad antimicrobiana depende principalmente de su capacidad para secuestrar Fe^{3+} , esencial para el desarrollo bacteriano (Bullen, Rogers, y Griffiths, 1978).

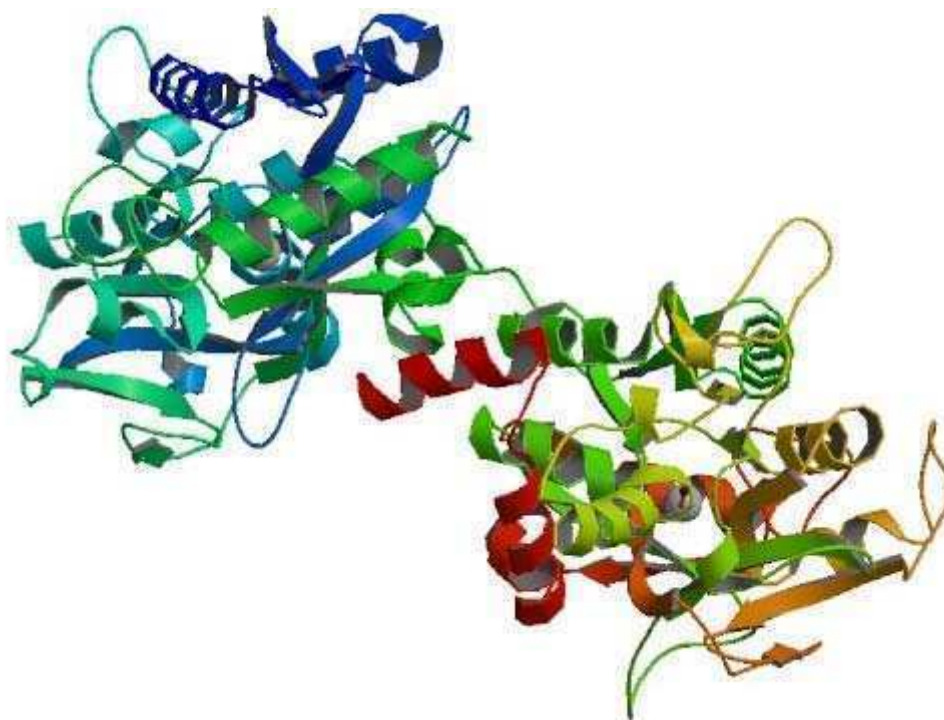


Figura 3: Estructura tridimensional de la conalbúmina (Kurokawa, Dewan, Mikami, Sacchetti, y Hirose, 1999).

La conalbúmina es la proteína más termolábil de la EW ya que su temperatura de desnaturalización está alrededor de los 58 °C (Donovan, Mapes, Davis, y Garibaldi, 1975), por ende las propiedades funcionales de EW están condicionadas por la desnaturalización térmica de esta proteína.

3.3. Ovomucoide

Esta proteína, que constituye cerca del 11% de las proteínas de la EW, es una glicoproteína térmicamente estable. La molécula de ovomucoide está compuesta de tres dominios distintos entrecruzados sólo por uniones disulfuro intradominio. En la Figura 4 se presenta la estructura terciaria de esta proteína. En el ovomucoide de huevo de gallina, el dominio II contiene un sitio activo para actividad de inhibidor de tripsina (Li-Chan y col, 1989). Se cree que el potencial como alérgeno del ovomucoide de la EW de gallina podría estar relacionado con su estabilidad al tratamiento térmico y a la digestión, lo que hace necesario el desarrollo de métodos de detección incluso luego de su desnaturalización (Hirose, Kitabatake, Kimura, y Narita, 2004; Hirose, Murakami-Yamaguchi, Ikeda, Kitabatake, y Narita, 2005).

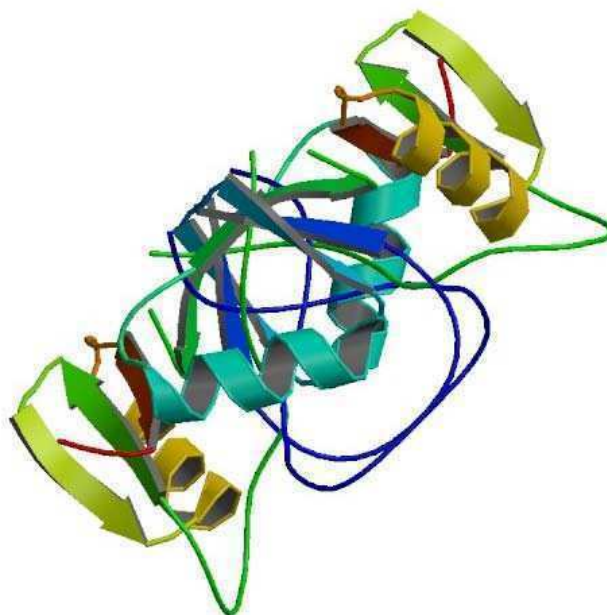


Figura 4: Estructura tridimensional del ovomucoide (Papamokos y col, 1982).

3.4. Lisozima

La lisozima, también presente en la EW, es una proteína relativamente pequeña de 14,5 kDa con un punto isoeléctrico de 10,7 (Li-Chan y col, 1995). Representa el 3,5% de las proteínas de la EW (Cheftel y col, 1989). Contiene 129 aminoácidos, presenta en su molécula cuatro puentes disulfuro y ningún grupo tiol libre, lo que la hace inusualmente compacta y muy estable (Stuart y col, 1986). Su estructura terciaria se presenta en la Figura 5. Para mantener su actividad enzimática deben mantenerse intactas al menos dos uniones disulfuro. Dos de las cuatro uniones disulfuro también son responsables de su estabilidad térmica; su actividad se conserva incluso luego de 1–2 minutos a 100 °C. Para generar geles de esta proteína al menos dos de sus puentes disulfuro deben ser reducidos (Hayakawa y Nakamura, 1986). De manera similar, también se ha visto que tiene una alta estabilidad en soluciones ácidas (pH 3,0–4,0). Sin embargo, los compuestos con tioles la inactivan rápidamente, y por eso no tiene actividad enzimática en la EW cuando ésta se calienta a 60 °C, debido a la presencia de grupos sulfhidrilo de la ovoalbúmina a esa temperatura (Tomizawa, Yamada, y Imoto, 1994). Debido a su elevado punto isoeléctrico, la lisozima puede interactuar con la ovomucina de la EW (pI 4,5–5,0) y con los residuos de ácido siálico de la glicoproteína cargados negativamente, como así también con la ovotransferrina (pI 6,0) y la ovoalbúmina (pI 4,5); todas estas proteínas están glicosiladas (Lesnierowski y Kijowski,

2007). El monómero de lisozima presenta un gran potencial como antibacteriano, principalmente frente a bacterias Gram-positivas. Este fenómeno se ha traducido en aplicaciones prácticas en las industrias de alimentos y farmacéuticas, como también en medicina (Akashi, 1972; Kijowski y Lesnierowski, 1995; Proctor y Cunningham, 1988). Esta enzima hidroliza un número de sustratos estructuralmente similares, pero los más conocidos son los copolímeros de polisacáridos, es decir, la N-acetilglucosamina y el ácido N-acetil murámico, que representan las unidades estructurales de las paredes celulares de diversas bacterias (Lesnierowski y col, 2007).

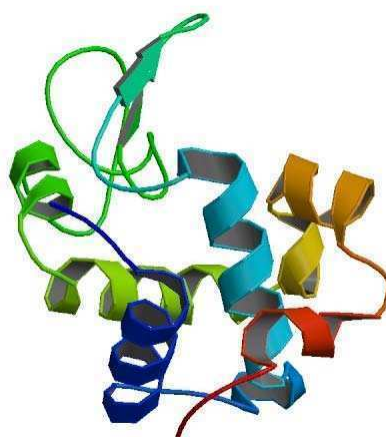


Figura 5: Estructura tridimensional de la lisozima (Pechkova y col).

4. Propiedades funcionales

Los huevos y ovoproductos son usados en la industria de alimentos debido a su elevado valor nutricional, pero además por sus propiedades funcionales que los convierten en indispensables para numerosos procesos de manufactura.

4.1. Propiedades de gelificación

Las proteínas de la EW son las responsables de la coagulación que ocurre como resultado de la acción de agentes físicos o químicos. La coagulación térmica tiene lugar a partir de los 62 °C y las principales proteínas de la EW (ovoalbúmina y conalbúmina) tienen muy buenas propiedades gelificantes. El ovomucoide no coagula por sí sólo. La sal y la sacarosa protegen contra la desnaturalización térmica y permiten elevar la temperatura de pasteurización por 6 y 3 °C, respectivamente. Sin embargo, esto también incrementa la resistencia de los microorganismos. Este efecto protector puede explicarse por la reducción en la cantidad de agua libre disponible. Al modificar

la estructura del agua unida a la proteína mejora la estabilidad térmica de la mezcla y retrasa la desnaturalización (Linden y Lorient, 1999).

4.2. Propiedades de espumado

La EW es un excelente agente espumante en alimentos y las propiedades de espumado únicas que tiene son el resultado de la interacción entre las diversas proteínas que la constituyen. Además, la coagulación térmica de las espumas de EW da como resultado productos con propiedades de textura estables (Mine, 1995). Las proteínas con funcionalidad espumante de la EW son, en orden de importancia, las globulinas, la ovoalbúmina, la ovotransferrina, la lisozima, el ovomucoide y la ovomucina (Johnson y Zabik, 1981). Las proteínas de la EW muestran su máximo desempeño como espumantes tanto en su pH "nativo" (8–9) como en la región de su pH isoelectrico (4–5). El cloruro de sodio incrementa el volumen y reduce la estabilidad de la espuma. Esto probablemente es el resultado de una disminución en la viscosidad de la solución. Los iones Ca^{2+} pueden mejorar la estabilidad al formar puentes entre los grupos carboxílicos de la proteína. Los carbohidratos disminuyen la expansión de la espuma pero mejoran su estabilidad. Por ende, cuando se producen merengues y otros productos que necesitan expandirse es preferible agregar el azúcar hacia el final de la operación cuando la espuma ya se encuentra formada. Como es bien sabido, una baja concentración de lípidos contaminantes (menos del 1%) dañan seriamente las propiedades de espumado de las proteínas, ya que aquellos se adsorben competitivamente en la interfase aire/agua, e impiden la formación de películas de proteína. La EW es particularmente sensible al batido excesivo; más de 6–8 min de batido causan una agregación-coagulación parcial de las proteínas en la interfase aire/agua. Estas proteínas, que no pueden disolverse, no se adsorben en la interfase de manera apropiada y no forman una película interfacial cohesiva, por lo tanto, la viscosidad de la lamela de líquido no es suficiente como para conferir una estabilidad adecuada a la espuma (Linden y col, 1999).

4.3. Propiedades de emulsificación

Las principales proteínas de la EW, como la ovoalbúmina, la ovotransferrina, el ovomucoide y la lisozima, son de naturaleza globular, debido a la presencia tanto de

uniones disulfuro intramoleculares como de interacciones hidrofóbicas entre grupos de aminoácidos no polares que se encuentran escondidos dentro de la estructura molecular. Cuando se calientan a temperaturas de 70-85 °C o al adsorberse en interfases aire-agua, las moléculas de proteína se desnaturalizan e interactúan, lo que conduce, respectivamente, al desarrollo de estructuras gelificadas o membranas interfaciales en las superficies de las burbujas de aire que estabilizan los sistemas espumados frente a la coalescencia y/o desproporción de las burbujas (Damodaran, 1997; Doi y col, 1997; Woodward, 1990). Aunque la EW es altamente apreciada por sus propiedades de gelificación y espumado, su potencial como emulsionante generalmente se considera bastante pobre en comparación con el de la yema. Las apoliproteínas altamente flexibles y penetrantes en las superficies de ésta se adsorben a una velocidad mayor y desplazan competitivamente a las proteínas globulares de la EW u otras moléculas proteicas de las superficies de las gotas de aceite de la emulsión (Aluko, Keeratiurai, y Mine, 1998; Shenton, 1979). Sin embargo, la EW puede encontrarse en productos de tipo *salad dressing* libres de colesterol, actuando efectivamente como emulsionante, bajo ciertas condiciones especiales de pH bajo, alta fuerza iónica y el agregado de agentes viscosantes (Drakos y Kiosseoglou, 2006b).

4.4. Otras propiedades funcionales

La EW posee una excelente capacidad para ligar, lo que involucra la retención de agua, de lípidos y propiedades de adhesión. Además, la EW tiene capacidad de anti-cristalización; por ejemplo, retrasa la cristalización de la sacarosa en una solución saturada y mejora la homogeneidad y la textura de productos de repostería.

5. La industria del huevo en Argentina

5.1. Estadísticas actuales

Con un mercado interno activo y demandante, el huevo es un producto de alto valor nutricional (que contiene la proteína de mejor calidad), económico, versátil y accesible, lo que conlleva al crecimiento de su consumo, desagregada la exportación, lo que se ha acompañado significativamente desde la producción. En 2003, el consumo per cápita era de 139 huevos, hoy es de 230 y se proyectan 274 para el año 2017, confirmando que Argentina es el segundo país consumidor de huevos per cápita de

Latinoamérica, detrás de México que es el primer consumidor a nivel mundial. La producción de huevos con destino a la Industrialización ha alcanzado en 2012 los 772.459 miles de huevo, con una leve caída en lo que va de 2013. Respecto a las exportaciones de huevos y ovoproductos, el balance es altamente positivo: pasaron de unos U\$S 3.000.000 en 2003, a casi U\$S 40.000.000 en 2012, proyectando para el año 2017 U\$S 76.000.000, con destino a países de América, Europa, Asia y África, arrojando el increíble crecimiento de más del 2500%.

El sector avícola transforma proteína vegetal en proteína animal, dándole valor agregado en origen al maíz y la soja, y creando trabajo. Hoy Argentina exporta huevos fértiles, huevos de consumo en cáscara y en polvo (Prida, 2013). Según las estadísticas de la Oficina de Comercio Exterior del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA, 2013), se registraron en 2012 exportaciones de 4.722 toneladas de ovoproductos por 11300 millones de dólares. El huevo industrial fue el producto de mayor volumen exportado: representó el 59,1% del total; en segundo lugar se posicionó la clara con el 21,3 y la yema con el 19,6%. La presentación en polvo es la más utilizada en la exportación dado que brinda mayor vida útil del producto, que puede alcanzar los 12 meses, y no necesita refrigeración. La demanda interna/externa de ovoproductos fomentó un aumento en la cantidad de Plantas de Industrialización de Huevo en las provincias productoras principales, Buenos Aires, Santa Fe y Entre Ríos. Los principales importadores de ovoproductos argentinos fueron Rusia, Japón, Alemania, y Austria, que en conjunto concentraron el 59% de las exportaciones en 2013 (Maggi, 2008).

5.2. Ovoproductos

Con el término ovoproducto se denomina a los diferentes productos de huevo obtenidos a partir de la rotura y procesamiento del huevo en cáscara. Ellos son esencialmente: la clara o albúmina, la yema y el huevo (obtenido a partir de la mezcla, en distintas proporciones, de la yema y de la clara). Al mismo tiempo, los ovoproductos pueden presentarse en estado líquido o deshidratado y con agregado de aditivos y/o ingredientes tales como sal o azúcar. La evolución tecnológica de esta industria ha permitido obtener productos deshidratados (en polvo) que poseen las mismas características funcionales que los productos líquidos y congelados. Los ovoproductos

son utilizados nuevamente en la industria como insumo intermedio para la elaboración de distintos alimentos, entre ellos, mayonesa, pastas secas, flanes, budines y tortas (Maggi, 2008).

5.3. Deshidratación de la clara de huevo

La deshidratación de huevos ha sido descrita en profundidad por (Bergquist, 1995). En general, los huevos son secados por aspersion (secado *spray*). La atomización se logra por aspersion con boquillas de alta presión (500–6000 psi) dentro de una corriente de aire caliente que evapora el agua instantáneamente. El polvo se separa de la cámara de secado, y el aire es removido mediante un extractor. En la Figura 6 se detalla el diagrama de flujo del proceso de deshidratación de la EW, con sus puntos críticos de control (PCC) respectivos, provisto por el fabricante del producto empleado en el presente trabajo.

Los ovoproductos aportan a la industria alimentaria no sólo las propiedades nutricionales características de los huevos, sino también una gran cantidad de propiedades funcionales necesarias para los procesos de fabricación de muchos alimentos. Entre ellos se encuentran la elaboración de mayonesa, merengues, baños de repostería, cremas, helados, pastas secas y frescas, premezclas alimentarias, galletitas, tortas y bizcochuelos, productos de la panificación, etc. Para la industria alimentaria los ovoproductos presentan las siguientes ventajas frente al huevo en cáscara: por un lado, una mayor seguridad bacteriológica (por someterse a un proceso de pasteurización); por otro lado, son de fácil empleo y dosificación; su manipulación es más sencilla, y se ahorra tiempo y mano de obra y se facilita su distribución y comercio internacional.

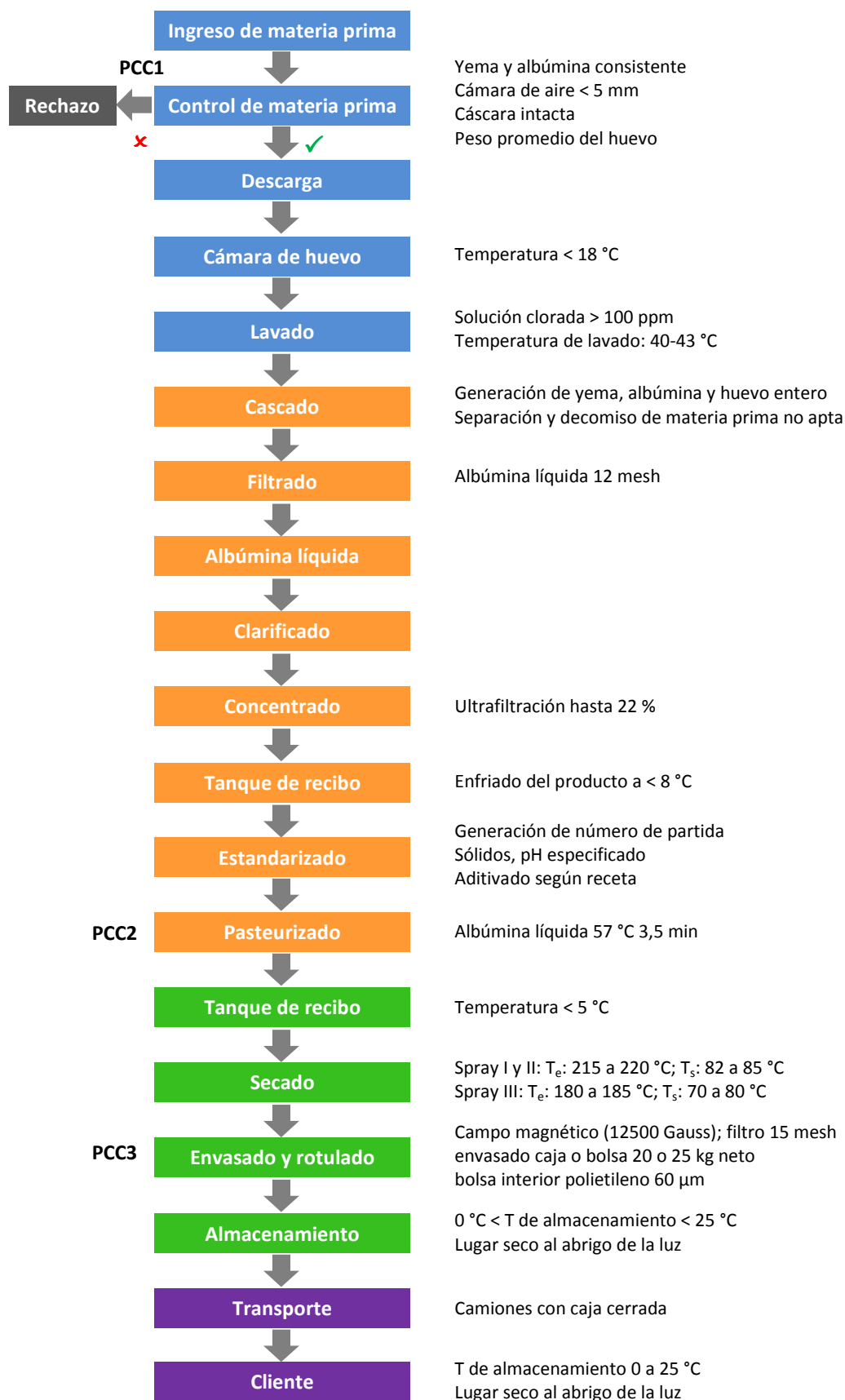


Figura 6: Diagrama de flujo de la deshidratación de clara de huevo.

Fuente: Gentileza de Ovoprot International S.A.

6. Procesamiento con ultrasonidos de alta intensidad (USAI)

Los ultrasonidos han sido utilizados, a intensidades bajas y frecuencias altas, para analizar la estructura y composición de los alimentos y, a intensidades altas y frecuencias bajas, para modificar ingredientes (Weiss, Kristbergsson, y Kjartansson, 2011). En la industria de alimentos, los ultrasonidos de alta intensidad (USAI) han demostrado ser una tecnología efectiva para el procesamiento y la preservación de los alimentos. Su empleo, con o sin calor en simultáneo, puede ser aplicado para desnaturalizar enzimas, facilitar la extracción de compuestos valiosos de plantas y semillas, ablandar carne y homogeneizar o dispersar sistemas bifásicos tales como emulsiones o suspensiones (Mason y Cordemans, 1996).

6.1. Fundamento

Al igual que cualquier onda sonora, el ultrasonido se propaga a través de una serie de ondas de compresión y expansión inducidas en el medio que atraviesa. Por encima de un umbral de intensidad, el ciclo de expansión puede romper la cohesión de un líquido y crear microcavidades, efecto que se conoce como cavitación (Lepoint y Lepoint-Mullie, 1998). Durante la fase de expansión, pequeñas cantidades de vapor (o gas) del medio entran en las cavidades y no son completamente expelidas durante la compresión. Las burbujas de gas atrapadas en el líquido o sobre las superficies de sólidos crecen desde un tamaño inicial submicrónico hasta unas décimas de micrones y se vuelven inestables. El colapso ocurre en un lapso muy corto de tiempo (estimado en 1/5 de ciclo). En el rango de 20-50 kHz, usado en muchas aplicaciones, este tiempo corresponde a alrededor de 10^{-6} s, suficiente para conducir a un intenso calentamiento en la burbuja residual, es decir, un punto caliente (Figura 7).

Se ha calculado que dichos puntos pueden llegar a temperaturas de al menos 5000 K y presiones de hasta 1200 bar (Bernstein, Zakin, Flint, y Suslick, 1996; Henglein, 1987; Lepoint-Mullie, De Pauw, Lepoint, Supiot, y Avni, 1996; Neppiras, 1984; Suslick, 1990). En consecuencia, bajo estas condiciones extremas, una cantidad suficiente de moléculas volátiles vaporizadas en la fase gaseosa son termolisadas a radicales libres, seguido de un muy rápido enfriamiento.

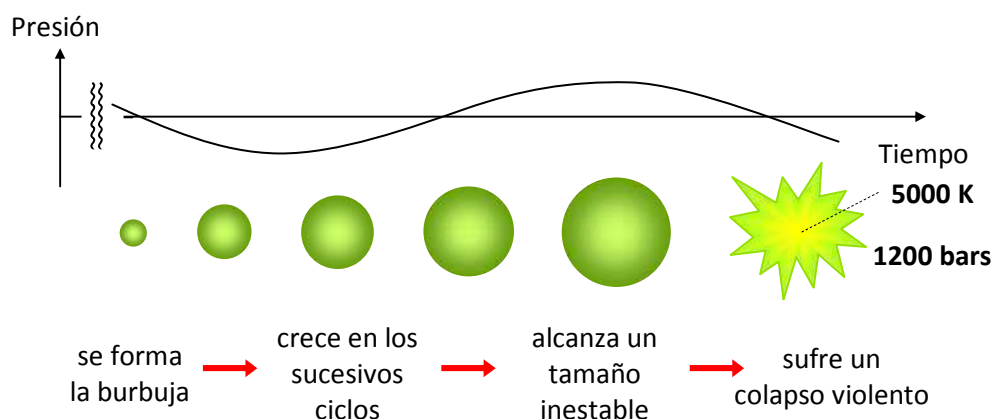


Figura 7: Generación de una burbuja por ultrasonido.

Una reacción muy estudiada es la de la sonólisis del agua, que produce radicales hidroxilo y átomos de hidrógeno (Henglein, 1993; Riesz, 1991). Esta reacción inicial puede continuar con la formación de peróxido de hidrógeno y, en presencia de oxígeno, radicales hidroperoxilo (Figura 8). Estas especies son las responsables de las propiedades oxidativas de soluciones acuosas sonicadas. La eficiencia de esta ruptura homolítica mejora aumentando la frecuencia desde 100 kHz hasta 1.7 MHz.

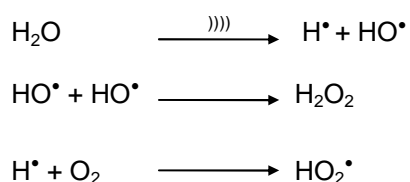


Figura 8: Formación de radicales por sonólisis del agua.

El colapso de las burbujas tiene una variedad de efectos dentro del medio líquido dependiendo del tipo de sistema en el que es generado. En sistemas homogéneos el colapso rápido de la burbuja genera fuerzas de corte en el líquido que la rodea, lo que puede producir efectos mecánicos. Cualquier especie que se introduzca en la burbuja durante su formación estará sujeta a condiciones extremas de temperatura y presión en el momento del colapso, provocando efectos químicos. En combinación con la propagación de ondas, estos picos de presión producen un intenso mezclado y algo de calentamiento (Figura 9).

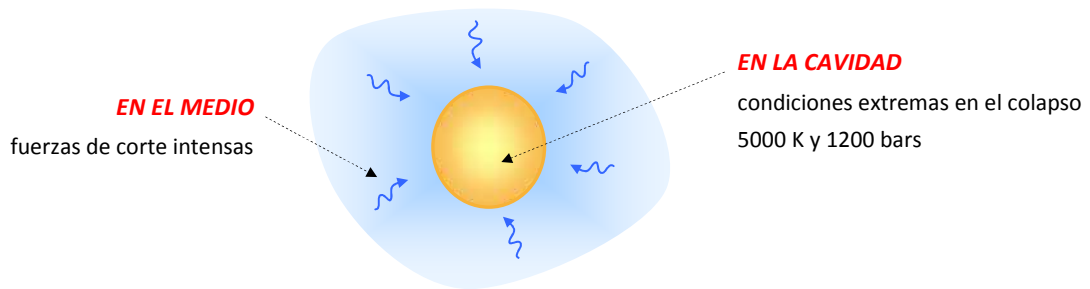


Figura 9: Cavitación acústica en un líquido homogéneo.

Cuando la cavitación se produce en un medio heterogéneo, es decir, próxima a una interfase, las burbujas se deforman considerablemente. Un chorro o *jet* de líquido se propaga a través de la burbuja hacia la interfase a una velocidad estimada en cientos de metros por segundo (Figura 10) (Mason y Lorimer, 2003a).

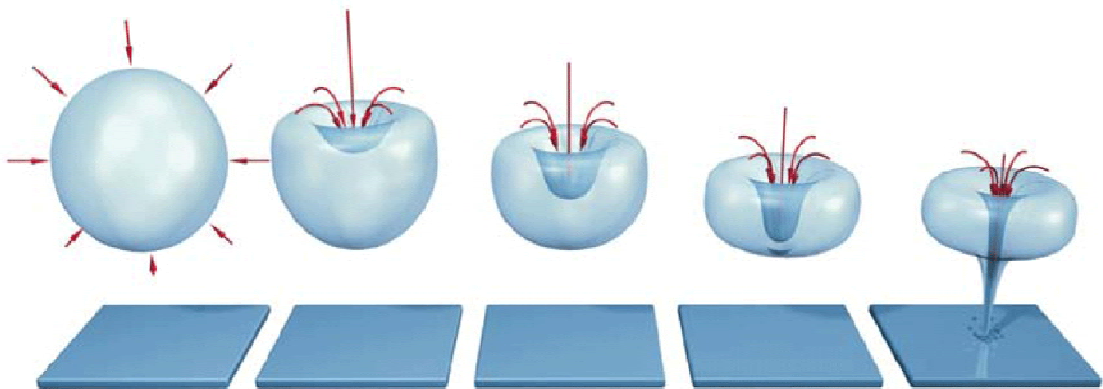


Figura 10: Cavitación de una burbuja sobre una superficie.

En una interfase líquido-líquido, el movimiento intenso produce la inyección mutua de gotas de un líquido dentro del otro, es decir, se forma una emulsión. En una interfase sólido-líquido, el choque de los *jets* sobre las superficies produce erosión en el sitio de impacto y en los alrededores. Las partículas que pueden ser eyectadas de la superficie por esta acción reaccionan más eficientemente que el sólido entero debido a una mayor área superficial. Los impactos mecánicos son capaces de quitar electrones de alta energía de los sólidos. Como resultado de este proceso, pueden producirse reacciones químicas, por ejemplo, la formación o clivaje de polímeros o la generación

de radicales a partir de moléculas pequeñas (Boldyrev, 1986; Kashiwagi, Enomoto, y Inoue, 1989; Luche, 1993).

6.2. Variables que influyen en el tratamiento

Energía

Debido a que la irradiación ultrasónica de un líquido produce calor, se puede registrar la temperatura en función del tiempo y estimar la potencia acústica mediante la siguiente ecuación (Mason, Lorimer, Bates, y Zhao, 1994; Raso, Mañas, Pagán, y Sala, 1999):

$$P = m C_p \frac{dT}{dt} \quad (1)$$

donde m (en g) es la masa de líquido sonicado, C_p es el calor específico a presión constante (J/g.°C) y dT/dt es la pendiente inicial de la curva determinada por calorimetría (T vs t). El valor calculado es siempre menor que el consumo eléctrico y se expresa en W. Cuando la potencia se refiere al área de emisión, las unidades son W/cm^2 o al volumen de solución sonicada, W/cm^3 . Para una dada energía, se puede obtener una distribución más homogénea incrementando la superficie de emisión.

Temperatura

Cuando la presión de vapor del solvente aumenta, éste penetra en grandes cantidades dentro de la burbuja y reduce la energía de colapso, por un efecto amortiguador. Es decir, que se debe entregar al sistema una energía mayor para lograr el mismo efecto que a una temperatura menor. Este fenómeno tiene una consecuencia paradójica: se puede acelerar las reacciones sonoquímicas disminuyendo la temperatura (Lorimer, Mason, Cuthbert, y Brookfield, 1995). Pero se debe tener en cuenta que existe un límite cuando la agitación se vuelve menos eficaz debido al aumento de la viscosidad, y que la temperatura óptima depende de cada sistema químico en particular.

Frecuencia

Se distinguen dos dominios, el de bajo rango a 20–100 kHz y el de alto rango, por encima de los 100 kHz. Como una regla empírica, los efectos mecánicos son mucho mayores en el bajo rango, lo cual sería preferible para reacciones bifásicas. En cambio,

se ha registrado que la producción de radicales es mayor en altas frecuencias (Figura 11) (Kardos y Luche, 2001).

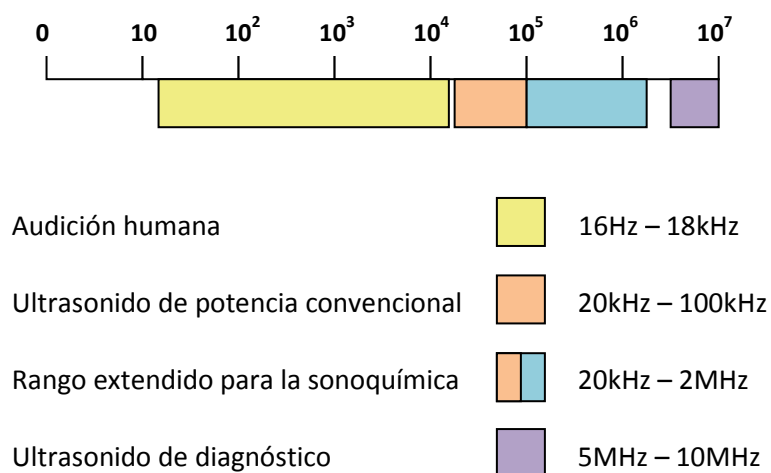


Figura 11: Rangos de frecuencias de sonido.

6.3. Tipos de sonicadores

Baño ultrasónico

Inicialmente se han realizado numerosos estudios de sonoquímica empleando baños ultrasónicos de limpieza, dado que son accesibles y de bajo costo. Sin embargo, este equipamiento traía aparejado ciertos inconvenientes que luego fueron resueltos mediante el desarrollo de baños ultrasónicos específicos para su uso en sonoquímica. Estos baños ultrasónicos están diseñados con un transductor de área grande en la base y un sistema externo de termostatación.

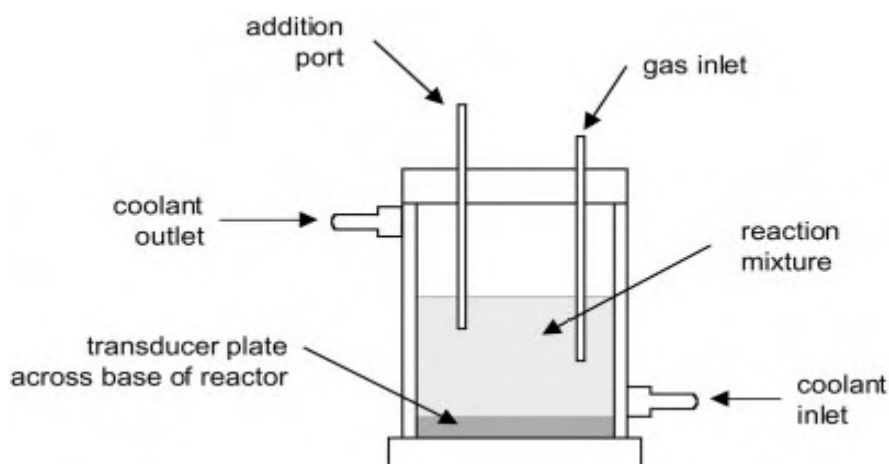


Figura 12: Baño ultrasónico.

La reacción se realiza directamente dentro del baño y, por lo tanto, está sujeta a sonicación directa. El campo acústico es más uniforme a lo largo del sistema, ya que se emplea una superficie de emisión plana. El baño ultrasónico es cerrado y puede estar equipado con purga de gas, embudos de adición, etc. (Figura 12). Las frecuencias empleadas son más altas que las utilizadas en las sondas ultrasónicas (Mason y Lorimer, 2003b).

Homogeneizador ultrasónico o silbato sónico

Este tipo de homogeneizador genera el efecto de cavitación mediante el movimiento de un líquido. El material a procesar es forzado a alta velocidad por la bomba del homogeneizador a través de un orificio especial por el que emerge como un chorro que impacta sobre una hoja de acero. Hay dos formas por medio de las cuales ocurre la cavitación en este sistema. Primero mediante el efecto Venturi, el líquido rápidamente se expande hacia un volumen mayor al salir del orificio y, segundo, a través de la hoja de metal que vibra por acción del material que fluye sobre ella. El flujo se ajusta para obtener frecuencias ultrasónicas (Figura 13).

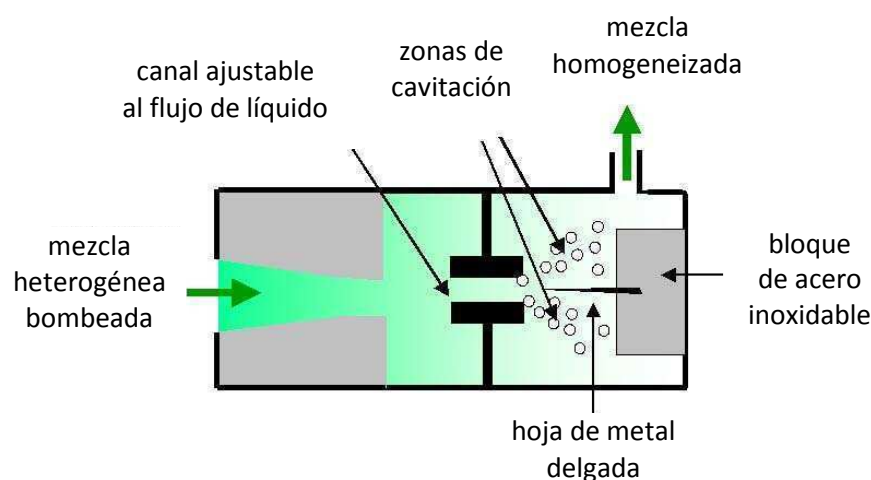


Figura 13: Homogeneizador ultrasónico.

Transductor piezoeléctrico ultrasónico

Un transductor piezoeléctrico es un dispositivo capaz de transformar energía eléctrica en energía mecánica. A través de un campo eléctrico se produce una deformación mecánica en el material piezoeléctrico y, si el campo eléctrico varía rápidamente, se

producen ondas de frecuencia ultrasónica, que se transmiten al medio utilizando una sonda sumergida en el mismo (Figura 14).



Figura 14: Transductor piezoeléctrico ultrasónico.

Fuente: Sonics & Materials Inc. (2013).

6.4. Modificaciones en los biopolímeros

Como es sabido, el tratamiento con USAI puede inducir modificaciones estructurales en los biopolímeros. Las proteínas son polímeros lineales pero están plegados en estructuras complejas que involucran una o más cadenas poliméricas estabilizadas por uniones covalentes, iónicas, hidrofóbicas y de puente de hidrógeno. Los aminoácidos con residuos sulfhidrilo y fenólicos pueden ser modificados por los radicales hidroxilo generados por las burbujas de cavitación y formar nuevas uniones covalentes entre las cadenas poliméricas de proteína. Los radicales formados por la ruptura de los biopolímeros también tienen el potencial para recombinarse en nuevas estructuras poliméricas (Vilkhu, Manasseh, Mawson, y Ashokkumar, 2011). Numerosos autores han estudiado los efectos de la aplicación de USAI en propiedades fisicoquímicas, moleculares y estructurales como la conductividad, el pH, la carga superficial, el contenido de grupos SH, la hidrofobicidad superficial, el grado de desnaturalización, la estructura secundaria, el estado de agregación/desagregación; en las propiedades funcionales, como la solubilidad, la turbidez, la viscosidad, las propiedades de espumado, emulsificación, gelificación e interfaciales; en características sensoriales,

entre otros, de proteínas y polisacáridos de uso habitual o con potencial para ser empleados en la industria de alimentos (Ashokkumar y col, 2009; Baxter, Zivanovic, y Weiss, 2005; Camino, Pérez, y Pilosof, 2009; Chandrapala, Zisu, Palmer, Kentish, y Ashokkumar, 2011; Chen, Chang, y Shyur, 1997; Furukawa y Ohta, 1983; Gordon y Pilosof, 2010; Gülseren, Güzey, Bruce, y Weiss, 2007; Güzey, 2002; Güzey, Gülseren, Bruce, y Weiss, 2006; Iida, Tuziuti, Yasui, Towata, y Kozuka, 2008; Jambrak, Lelas, Mason, Krešić, y Badanjak, 2009; Jambrak, Mason, Lelas, Herceg, y Herceg, 2008; Jambrak, Mason, Lelas, y Kresic, 2010; Kardos y col, 2001; Karki y col, 2009; Krešić, Lelas, Jambrak, Herceg, y Brnčić, 2008; Lei, Majumder, Shen, y Wu, 2011; Lorimer y col, 1995; Martini, Potter, y Walsh, 2010; Riener, Noci, Cronin, Morgan, y Lyng, 2009; Tang, Wang, Yang, y Li, 2009; Villamiel y de Jong, 2000; Zisu, Bhaskaracharya, Kentish, y Ashokkumar, 2010). De la misma manera, resulta de interés estudiar el efecto del tratamiento ultrasónico en las propiedades fisicoquímicas, moleculares y funcionales de proteínas de EW de manera de generar un nuevo ingrediente con una funcionalidad mejorada.

7. Nanopartículas para el suministro de compuestos bioactivos en alimentos funcionales

En los últimos años, la industria de alimentos comenzó a adicionar compuestos bioactivos en los productos. En general, estos compuestos son altamente susceptibles a las condiciones del entorno, de procesamiento y/o gastrointestinales y, por lo tanto, en muchos casos la encapsulación se ha impuesto como una estrategia para la protección efectiva de aquellos. Los ingredientes funcionales se emplean para controlar propiedades de *flavour*, color, textura o preservación y, en el caso de los compuestos bioactivos, se usan por sus potenciales beneficios en la salud. Conocidos como nutracéuticos, esta categoría de compuestos recientemente ha recibido una gran atención por parte de la comunidad científica, los consumidores, y los elaboradores (Chen, Remondetto, y Subirade, 2006). La lista de compuestos nutracéuticos (vitaminas, probióticos, péptidos bioactivos, antioxidantes, etc.) es interminable y la evidencia científica que respalda el concepto de ingredientes alimentarios promotores de la salud está creciendo de manera sostenida (Wildman, 2006). La efectividad de estos compuestos en la prevención de enfermedades depende

de la preservación de la biodisponibilidad de los ingredientes activos. Esto representa un desafío formidable, dado que sólo una pequeña proporción de moléculas permanecen disponibles luego de la administración oral, debido a un tiempo de residencia gástrico insuficiente, baja permeabilidad y/o solubilidad dentro del intestino, como así también por condiciones de inestabilidad encontradas en el procesamiento de alimentos (temperatura, oxígeno, luz) o en el tracto gastrointestinal (pH, enzimas, presencia de otros nutrientes), que limitan la actividad y los potenciales efectos benéficos para la salud de estos compuestos (Bell, 2000). Por lo tanto, el suministro de estas moléculas requiere que los formuladores y elaboradores de alimentos provean mecanismos de protección que mantengan su forma molecular activa hasta el momento del consumo y que suministren esta forma en el sitio fisiológico adecuado dentro del organismo (Chen y col, 2006). La encapsulación de compuestos bioactivos intenta preservar su estabilidad durante el procesamiento y el almacenamiento e impedir interacciones no deseables con la matriz. Por lo tanto, se verían beneficiados por un procedimiento de encapsulación, ya que se enlentecerían los procesos de degradación, como la oxidación o la hidrólisis, o se prevendría la degradación hasta que el producto sea liberado en el sitio deseado. Además, la encapsulación puede ser aplicada para modificar características físicas del material original para manipularlo más fácilmente, para ayudar a separar los componentes de una mezcla que, de otra forma, podrían reaccionar con otros, para proveer una adecuada concentración y una dispersión uniforme del agente activo. Una de las estrategias para lograr estas funcionalidades es el uso de nanopartículas. La nanotecnología se centra en la caracterización, fabricación y manipulación de estructuras biológicas y no biológicas menores a 100 nm. Las estructuras que se encuentran en esta escala han mostrado tener propiedades funcionales únicas y novedosas (Weiss, Takhistov, y McClements, 2006).

7.1. Métodos para fabricar nanopartículas

Se pueden emplear distintos métodos para fabricar nanopartículas, dependiendo de la naturaleza de los compuestos de partida y del desempeño funcional deseado. En general, estos métodos de producción pueden ser agrupados en tres categorías:

- Métodos “de arriba hacia abajo” (o *top-down*, en inglés): las partículas se forman por la ruptura de un material macroscópico en unidades de menor tamaño.
- Métodos “de abajo hacia arriba” (o *bottom-up*, en inglés): las partículas se forman por el ensamblaje de moléculas o partículas coloidales en estructuras específicas.
- Métodos combinados: en estos métodos, las partículas se forman mediante una combinación de métodos *top-down* y *bottom-up* (Lesmes y McClements, 2009).

En general, el método de producción empleado demandará un conocimiento específico para su implementación correcta. Los métodos *bottom-up* requieren una comprensión exhaustiva de la química y las interacciones de los componentes individuales de los alimentos, mientras que los métodos *top-down* requieren un profundo conocimiento del diseño y de los principios de operación de los equipamientos empleados para el procesamiento de alimentos (Augustin y Hemar, 2009; Velikov y Pelan, 2008).

7.2. Características de las nanopartículas

Composición

La composición de las nanopartículas determina cómo responde el sistema de suministro a condiciones ambientales específicas (por ejemplo, pH, temperatura, actividad de enzimas) e interactúa con otros componentes que se encuentran dentro del producto alimenticio (por ejemplo, interacciones por depleción o por puente salino). La comprensión de estas propiedades es esencial para el diseño de un sistema de suministro para una aplicación particular. Por ejemplo, la composición de la partícula puede ser diseñada de manera que se disocie o erosione en un sitio particular del tracto gastrointestinal, donde se libera un compuesto activo, por ejemplo, una proteína será digerida enzimáticamente en el estómago o en el intestino delgado, mientras que la fibra dietaria debería resistir la degradación hasta llegar al colon.

Estructura

La estructura de las nanopartículas varía ampliamente dependiendo de los ingredientes y los métodos empleados para fabricarlas. En general, la estructura de estas partículas se divide frecuentemente en cuatro categorías diferentes:

- Matriz simple: estas partículas consisten de una sola fase (formada por uno o más tipos de material) a través de la que se dispersa el bioactivo.
- Núcleo-coraza (o *core-shell*, en inglés): estas partículas consisten de un núcleo interno de una fase rodeado por una coraza externa de otra fase. La coraza puede constar de una capa simple o un número concéntrico de capas.
- Dispersión: estas partículas consisten de una fase dispersada como partículas pequeñas dentro de otra fase (la matriz).
- Combinación: estas partículas son alguna de las combinaciones de las categorías antes mencionadas, por ejemplo, una dispersión incluida dentro de una *core-shell* (Lesmes y McClements, 2009).

Dimensiones

Las dimensiones de las nanopartículas delimitan sus efectos en la apariencia, reología, estabilidad, sensación en la boca (o *mouthfeel*, en inglés) y las tasas de liberación. La distribución de tamaño de partícula representa la fracción de partículas presentes en diferentes clases de tamaños y puede ser controlada mediante la selección apropiada de los ingredientes y las condiciones de fabricación (McClements, D. Julian, 2005). La caracterización de la distribución de tamaño de partícula de los sistemas coloidales puede lograrse a través de diferentes medios instrumentales, lo que incluye a los métodos microscópicos (ópticos, electrónicos, o de fuerza atómica), los métodos de dispersión (de luz, neutrones, rayos X, ultrasónica) y los métodos de conteo (conteo por pulsos eléctricos u ópticos). La medición más precisa de las dimensiones de las nanopartículas, por ejemplo, el espesor laminar, ha sido lograda por métodos como la dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS) y la microscopía de fuerza atómica (AFM) (Lesmes, Cohen, Shener, y Shimoni, 2009; Zabar, Lesmes, Katz, Shimoni, y Bianco-Peled, 2009).

Carga

El conocimiento de la carga eléctrica de una partícula dentro de un sistema de suministro es importante debido a que impacta en diversas propiedades funcionales, tales como la estabilidad de la partícula a la agregación, la unión a superficies biológicas, o la interacción con especies moleculares dentro de la matriz alimentaria (por ejemplo, iones y polielectrolitos). Las propiedades eléctricas de una nanopartícula

se caracterizan usualmente en términos de su potencial eléctrico superficial (ψ_0), su densidad de carga superficial (σ) y/o su potencial zeta (ζ) (Hunter y Ekdawi, 1986).

Características de liberación

Las nanopartículas son diseñadas frecuentemente para liberar un componente activo en un sitio particular, que puede ser la boca, el estómago, el intestino delgado o el colon. El desarrollo de un modelo mecánico para tales procesos requiere el entendimiento de los mecanismos que conducen a la liberación del compuesto. Se han descrito cuatro mecanismos principales, que principalmente difieren en el rol que juega el vehículo en controlar la liberación:

- **Difusión:** el compuesto activo simplemente difunde hacia el medio que lo rodea a través de la matriz, que permanece intacta.
- **Erosión:** el compuesto activo es liberado en el medio debido a la erosión de la capa externa de la matriz. La erosión de la superficie de la partícula puede deberse a una degradación física, química o enzimática, por ejemplo, la disolución o hidrólisis enzimática de la matriz del vehículo.
- **Fragmentación:** el compuesto activo es liberado en el medio debido a la alteración física del vehículo, que se fragmenta o fractura, por ejemplo, por aplicación de fuerzas de corte. El bioactivo puede difundir fuera de las partículas, pero la principal fracción de este será liberada debido al aumento en el área superficial y a la disminución del trayecto de difusión.
- **Hinchamiento:** la liberación del núcleo puede ser inducida por la incorporación de solvente por las partículas, que provoca su hinchamiento. Por ejemplo, un compuesto activo puede estar encapsulado dentro de una partícula sólida o dentro de una partícula biopolimérica con un tamaño de poro suficientemente pequeño como para impedir que el compuesto se filtre. Cuando la partícula absorbe moléculas de solvente, se hincha y el compuesto activo entonces puede difundir hacia el exterior (Lesmes y McClements, 2009).

7.3. Mejora de la biodisponibilidad mediada por nanopartículas

Para diseñar nanopartículas como sistema de suministro efectivo para nutrientes, nutracéuticos e ingredientes activos relacionados es necesario comprender los

procesos biológicos que regulan su absorción y biodisponibilidad. Luego de que el alimento es parcialmente digerido en la cavidad oral (principalmente por masticación), pasa por un proceso de disolución en el estómago en condiciones ácidas (pH ~ 1 a 2) durante un período de tiempo que oscila entre 1 y 3 h. Se liberan en el estómago diversas enzimas (pepsina y otras) para hidrolizar algunas proteínas y carbohidratos. La disolución de la nanopartícula en el estómago puede o no ser deseable dependiendo de la estabilidad del compuesto activo al pH ácido. A medida que el alimento digerido abandona el estómago (ahora en la forma de una suspensión) y entra al duodeno, se mezcla con las sales biliares (tales como glicocolato y taurocolato de sodio y lecitina), liberadas por la vesícula biliar. Estas sales biliares emulsifican las grasas y otros compuestos hidrofóbicos presentes en la suspensión. Además de la secreción de estas sales, también se libera en el duodeno una solución de bicarbonato que contiene un cóctel de enzimas (tripsina entre otras), lo que eleva el pH de la solución a 6-7. Luego, la suspensión ingresa a la parte más larga del intestino delgado (4-7 m), en donde reside por alrededor de 3 a 5 h antes de pasar al intestino grueso. La superficie interna del intestino delgado está cubierta con pequeñas protuberancias con forma de dedos llamadas vellosidades. Cada célula epitelial está recubierta con protuberancias aún más pequeñas llamadas microvellosidades, que ayudan incrementar el área disponible para la absorción de nutrientes. La superficie de las microvellosidades está cubierta por una capa mucosa de una glicoproteína aniónica (mucina) y representa un factor clave en la absorción de nanopartículas. La absorción de nutrientes a través del intestino delgado ocurre mediante dos mecanismos principales: el transporte activo y pasivo. El transporte activo involucra la absorción del compuesto activo a través de canales específicos que se encuentran en la superficie de las células epiteliales. Las células usan su propia energía para capturar y absorber los nutrientes incluso cuando la concentración del nutriente dentro de la célula es mayor que la concentración fuera de ella. El transporte activo es el mecanismo principal mediante el cual las células captan y absorben minerales altamente solubles como el calcio y el hierro. Esta absorción activa es controlada por hormonas que regulan la concentración de minerales y otros nutrientes en el cuerpo. El transporte pasivo ocurre mediante la difusión simple a través del tejido epitelial. En este caso, la velocidad y el grado de absorción es una función de la diferencia en la actividad del mineral o nutriente a

través del tejido epitelial. La mayoría de los compuestos hidrofóbicos son altamente permeables a través del intestino y se transportan empleando difusión pasiva y activa, sin embargo, las sustancias altamente hidrofílicas tienden a presentar una permeabilidad baja y se absorben mediante el transporte activo (Acosta, 2009). Existe un acuerdo en que la formulación de sistemas de suministro nanoestructurados produce un aumento en la absorción de los compuestos bioactivos, sin embargo, aún no se comprenden adecuadamente los mecanismos por los cuales ocurre. Estos mecanismos podrían involucrar el aumento en la solubilidad aparente del compuesto bioactivo, el aumento de la velocidad de transferencia de masa, el aumento del tiempo de retención o el aumento en la absorción mediante la incorporación directa de la nanopartícula vehiculizante (Desai, Labhasetwar, Amidon, y Levy, 1996; Hussain, Jaitley, y Florence, 2001; Johnson y Swindell, 1996; Oh, Curl, y Amidon, 1993; Porter y Charman, 2001).

7.4. Empleo de proteínas para el diseño de nanopartículas

Las proteínas alimentarias presentan perspectivas muy alentadoras para el desarrollo de una variedad de matrices, ya que poseen valor nutricional, son generalmente reconocidas como seguras (GRAS, por sus siglas en inglés) y tienen el potencial de incorporar compuestos nutraceuticos y proveer su liberación controlada a través de su ingestión. Existen numerosos trabajos de investigación centrados en el desarrollo de nanopartículas biopoliméricas (no sólo empleando proteínas sino también polisacáridos) como vehículos de compuestos bioactivos (Abbasi, Emam-Djomeh, Mousavi, y Davoodi, 2014; Dhayal, Gruppen, de Vries, y Wierenga, 2014; Dube, Ng, Nicolazzo, y Larson, 2010; Giroux, Houde, y Britten, 2010; Gülseren, Fang, y Corredig, 2012a, 2012b; Jun y col, 2011; Li y col, 2008; Livney, 2010; Pinho, Grootveld, Soares, y Henriques, 2014; Ron, Zimet, Bargarum, y Livney, 2010; Sivasubramanian, Thambi, y Park, 2013; Teng, Luo, y Wang, 2013; Wang, Tian, y Chen, 2011; Watanabe, Iwamoto, y Ichikawa, 2005; Zhang, Liang, Tian, Chen, y Subirade, 2012; Zimet y Livney, 2009). Sin embargo, aún no existe un amplio estudio del uso de la EW como materia prima para el diseño de nanovehículos.

8. Ácido fólico

8.1 Estructura y nomenclatura

Los folatos constituyen una familia de compuestos que difieren en el estado de oxidación de la molécula, la longitud de la cadena lateral de glutamato, y las unidades específicas de un carbono unidas a la molécula. La molécula de folato, tetrahidrofolato (THF), deriva del 5,6,7,8-tetrahydropteroilglutamato, que consiste una porción de 2-amino-4-hidroxi-pteridina (pterina) unida mediante un grupo metileno en la posición del C-6 de un ácido p-aminobenzoilglutámico (pABG) (Figura 15). El anillo de pirazina en el THF está totalmente reducido en las posiciones 5, 6, 7 y 8 y las reducciones sólo en las posiciones 7 y 8 dan lugar al dihidrofolato. La forma monoglutamato de la vitamina contiene una molécula de ácido glutámico, que puede ser convertida a una cadena de glutamatos mediante la adición de residuos de glutamato por uniones g-peptídicas. En la mayoría de los folatos que existen en la naturaleza, el número de unidades de glutamato en la cadena lateral varían entre 5 y 8.

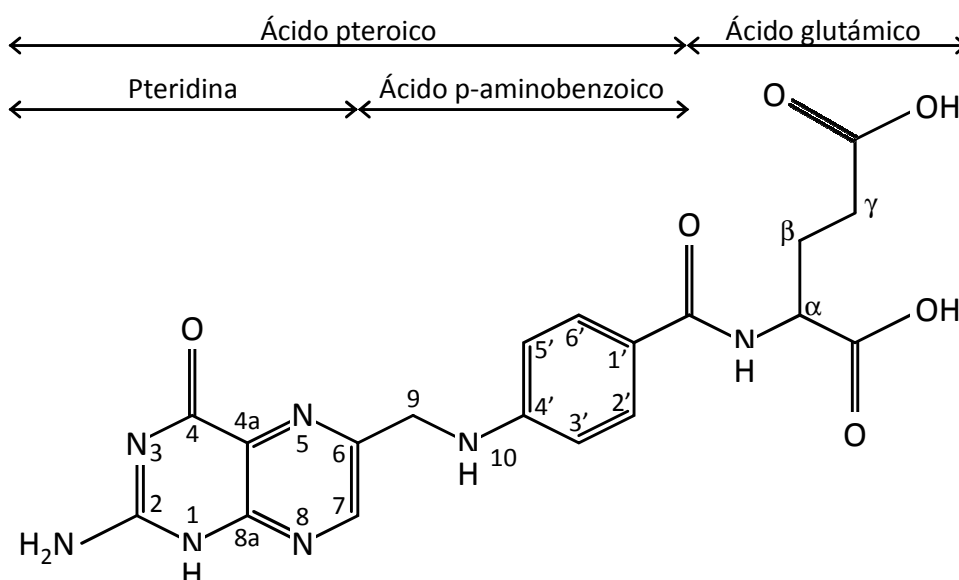


Figura 15: Estructura del ácido fólico.

La forma completamente oxidada de monoglutamato de la vitamina es la llamada ácido fólico (AF) y es la forma empleada comercialmente en suplementos y alimentos fortificados. En contraste con el poliglutamil folato, el ácido fólico raramente existe naturalmente en los alimentos.

8.2. Propiedades químicas

El peso molecular del AF es de 441,4, y aunque se suele denominar como hidrosoluble, la forma ácida es muy poco soluble en agua, en contraste con la forma de sal, que es bastante soluble. La molécula de THF es lábil en solución debido a su sensibilidad al oxígeno, la luz, y las condiciones extremas de pH. En soluciones oxigenadas, el THF se degrada y forma pterin-6-carboxilato, H₂ pterina, pterina y xantopterina. La molécula es rápidamente clivada en la unión del C-9-N-10 y forma pABG (Chippel y Scrimgeour, 1970). A diferencia del THF y del THF N-10-sustituido, que son inestables en presencia del oxígeno, el ácido fólico y el THF sustituido en el N-5 (0 N-5, N-10) son relativamente estables a la exposición al oxígeno. La inestabilidad a la luz es una característica consistente para todas las formas de folato. En soluciones acuosas, el AF se vuelve cada vez más inestable al calor a medida que el pH desciende por debajo de 5,0 (Paine-Wilson y Chen, 1979). También es sensible a la exposición a la luz en soluciones acuosas, principalmente en condiciones ácidas (Akhtar, Khan, y Ahmad, 1999).

8.3. Funciones bioquímicas y actividad biológica

En la célula, la función de los folatos reside principalmente en su capacidad para donar y captar unidades de carbono. El THF es capaz de captar el grupo metilo de la serina en una reacción reversible catalizada por la serina hidroximetil transferasa que da lugar a 5,10-metilenTHF (Figura 16). El 5,10-metilenTHF es el derivado más inestable y se disocia enseguida en formaldehído y THF. El 5-metilTHF es el derivado que cede su grupo metilo en la síntesis de metionina a partir de homocisteína en una reacción catalizada por la metionina sintasa, enzima que además requiere la presencia de vitamina B12 como cofactor. Esta es una de las reacciones principales del ciclo de la metilación, en el cual se sintetiza S-adenosilmetionina, molécula que actúa como donante de grupos metilo en un sinnúmero de reacciones de transmetilación implicadas en el metabolismo celular. Además, es la única reacción en la que el 5-metilTHF puede perder su grupo metilo. Los folatos en la circulación se encuentran principalmente en la forma de 5-metilTHF. Para que puedan ser retenidos en la célula es necesario que adquieran residuos glutámicos adicionales, pero el 5-metilTHF no es buen sustrato de la folilpoliglutamato sintasa. El 5-metilTHF debe demetilarse en la reacción catalizada por la metionina sintasa para convertirse en THF y ser susceptible de poliglutamilación,

por lo que esta reacción es también necesaria para la captación de los folatos circulantes (Selhub y Rosenberg, 1996).

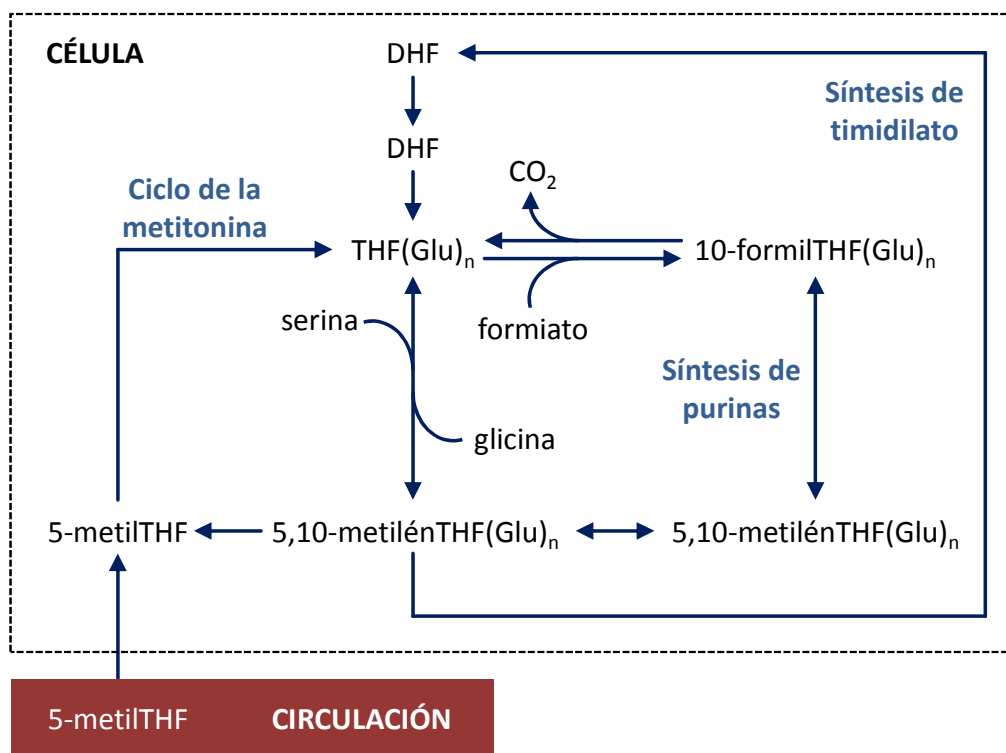


Figura 16: Metabolismo y función de los folatos en el organismo (Varela-Moreiras, Alonso Aperte, y Póo Prieto, 2000).

En resumen, los folatos participan en el metabolismo de ciertos aminoácidos, en la síntesis de S-adenosilmetionina y en la síntesis de purinas y pirimidinas. En cuanto a los aminoácidos, participan en el catabolismo de la histidina y la glicina, en la interconversión glicina-serina y en la síntesis de metionina. También participan en la síntesis de proteínas al actuar en la reacción de formilación de la metionina. La S-adenosilmetionina es la molécula donante de grupos metilo. Las purinas (adenina y guanina) y las pirimidinas (timina, citosina, uracilo) se unen a moléculas de azúcares (ribosa y desoxiribosa) y ácido fosfórico para formar los nucleótidos (AMP, GMP, TMP, CMP, UMP). Los nucleótidos forman parte de los ácidos nucleicos (ADN y ARN) y de derivados de gran importancia metabólica (AMPcíclico, ATP, GTP, etc.) (Varela-Moreiras y col, 2000)

8.4. Fuentes de la vitamina

Folato natural de los alimentos

El folato, que existe naturalmente en los alimentos, está concentrado en una serie de alimentos como el jugo de naranja, las frutillas, los vegetales de hojas verdes, los maníes y los porotos secos, tales como los porotos negros y los porotos aduki (Suitor y Bailey, 2000). La carne, en general, no es una buena fuente de folato, a excepción del hígado.

Ácido fólico en alimentos fortificados

La evidencia científica que vincula al AF como estrategia para la prevención de las enfermedades de tubo neural condujo a estrategias de salud pública de alcance masivo que aseguraran en la población cantidades fisiológicas adecuadas de folato: suplementación farmacológica y fortificación de alimentos. La ingesta diaria recomendada de ácido fólico, según el grupo etario, se presenta en la Tabla 3. Es por esta razón que el AF se agrega a un gran número de alimentos, principalmente en harinas y en productos elaborados a base de cereales, por ejemplo, cereales de desayuno, barras de cereal y *snacks* e incluso en fórmulas infantiles o de reemplazo.

En Argentina, la harina destinada a consumo que se comercializa está enriquecida, según la Ley 25.630, con 2,2 mg/kg de AF, entre otras vitaminas que también se adicionan (ANMAT, 2002), con el fin de reducir los riesgos de defectos en la formación del tubo neural. La suplementación con AF es obligatoria también en un total de 40 países a nivel mundial (Samaniego-Vaesken, Alonso-Apperte, y Varela-Moreiras, 2010), entre ellos, USA, Canadá, China, Australia, Irlanda y Reino Unido (Martin, Comeskey, Simpson, Laing, y McGhie, 2010). En países donde la fortificación es ley y obligatoria, las harinas de trigo son la materia prima adicionada con el AF y el pan es el producto vehiculizante.

Bajo el concepto de desarrollo de productos novedosos con nuevos sabores y *flavours*, que signifiquen un beneficio para la salud, impliquen un incremento en la estrategia de ventas y que el consumidor sea capaz de disfrutar por su calidad, se han estudiado numerosos casos de alimentos populares fortificados con AF.

Tabla 3: Ingesta diaria recomendada (IDR) para AF, expresada en equivalentes dietarios de folato (EDF).

Grupo	IDR (µg/día)
<i>Lactantes y Niños</i>	
0-6 meses ^a	80
7-12 meses	80
1-3 años	160
4-6 años	200
7-9 años	300
Adolescentes, 10-18 años	400
<i>Adultos</i>	
19-65 años	400
>65 años	400
Embarazo	600
Lactancia	500

^a Basado en una ingesta de leche materna de 0,75 l/día.

Fuente: FAO/WHO, 2002.

En la literatura científica se mencionan ejemplos de alimentos fortificados de origen vegetal como copos de maíz, harinas de trigo, avena y maíz, arroz y cacao, productos a base de frutas secas y cereales, germen de trigo, galletas de harina de trigo (Arcot, Shrestha, y Gusanov, 2002). Se ha evaluado su rol para prevenir tumores en intestino de ratas adicionándolo a masas de panes hechas con diferentes formulaciones, encontrándose algunos resultados alentadores en cuanto a la prevención de la carcinogénesis (Omar y col, 2009).

También se ha adicionado AF a alimentos lácteos como quesos y yogures. En este sentido, Madziva, Kailasapathy, y Phillips (2006) encapsularon AF en microcápsulas formadas por alginato y pectina, sistemas que fueron agregados a la leche destinada a quesería. Se encontró que esta estrategia presentó una alta eficiencia de encapsulación, notable estabilidad en la leche, se incrementó significativamente la capacidad de retención del AF durante la elaboración y procesamiento de la masa de

queso Cheddar. La adición del AF encapsulado, lo protegió durante la maduración, y la cantidad dosada fue mayor que la presente en los quesos en los que se había agregado el bioactivo sin encapsular. Otro producto muy popular que fue fortificado con AF fue el yogurt (Boeneke y Aryana, 2008). Los autores estudiaron el efecto de diferentes concentraciones de AF en las propiedades fisicoquímicas y sensoriales de un yogurt de limón, realizaron además estudios en el tiempo de almacenamiento. El AF fue agregado antes y después de la pasteurización de la leche, encontrándose mayor concentración del mismo en muestras adicionadas con el ácido luego del proceso térmico, aunque la viscosidad de estas mismas muestras fue levemente menor y con mayor sinéresis del suero. El nivel de AF impactó en el perfil sensorial de los yogurts, a mayores concentraciones, el *flavour* decreció.

En estudios más sofisticados, por la sensibilidad a la luz y al calor de esta especie química, Tomiuk y col (2012) estudiaron la posibilidad de proteger al folato natural (L-5-methyltetrahydrofolato). Para ello, recurrieron a su encapsulación dentro de cápsulas formadas por proteínas de la leche, las cuales fueron generadas disolviendo el AF en leche descremada y luego procediendo a su secado por aspersion. Se lograron recuperaciones de hasta un 95% del bioactivo, el cual fue posteriormente liberado en un 100% en 10 min, luego de someter a estas cápsulas a un proceso de digestión gástrica simulada *in-vitro* a 37°C. Estas cápsulas fueron empleadas también como componentes de masas panarias, se lograron recuperaciones mayores al 81%. Estas cantidades de AF se mantuvieron durante el almacenamiento del pan en condiciones usuales para la conservación de este producto, por tres días a temperatura ambiente.

El arroz es un alimento básico para muchos grupos demográficos, siendo un alimento de alcance mundial. En este sentido, se transforma por sí mismo en un vehículo potencial para el AF. Investigadores australianos han estudiado sistemáticamente la fortificación con AF de arroz parbolizado (Kam, Arcot, y Adesina, 2012; Kam, Murray, Arcot, y Ward, 2012). Los resultados mostraron que las condiciones de maceración y molienda fueron factores claves en los resultados de la fortificación. La cinética de liberación de AF siguió una cinética de primer orden. Con respecto a los análisis sensoriales, no se observaron diferencias en la textura, aromas ni sabor del arroz fortificado empleando esta metodología. Como se ha visto, mucho se ha investigado

hasta el momento en relación al uso de biopolímeros como vehiculizantes de bioactivos. Sin embargo, aún queda por explorar el empleo de EW para unir AF, con la finalidad de protegerlo durante el procesamiento de alimentos, preservar su actividad biológica y transportarlo hasta su liberación en el sitio de absorción del sistema digestivo.

9. Referencias

- Abbasi, A., Emam-Djomeh, Z., Mousavi, M. A. E., & Davoodi, D. (2014). Stability of vitamin D3 encapsulated in nanoparticles of whey protein isolate. *Food Chemistry*, 143(0), 379-383.
- Acosta, E. (2009). Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 14(1), 3-15.
- Akashi, A. (1972). The effect of egg white lysozyme on the growth of cheese starter organisms. *J Faculty of Agric*, 17, 67-69.
- Akhtar, M. J., Khan, M. A., & Ahmad, I. (1999). Photodegradation of folic acid in aqueous solution. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 19(3-4), 269-275.
- Aluko, R. E., Keeratiurai, M., & Mine, Y. (1998). Competitive adsorption between egg yolk lipoproteins and whey proteins on oil-in-water interfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 10(6), 385-393.
- ANMAT. (2002) Ley 25.630. Argentina
- Arcot, J., Shrestha, A., & Gusanov, U. (2002). Enzyme protein binding assay for determining folic acid in fortified cereal foods and stability of folic acid under different extraction conditions. *Food Control*, 13, 245-252.
- Ashokkumar, M., Lee, J., Zisu, B., Bhaskarcharya, R., Palmer, M., & Kentish, S. (2009). Hot topic: sonication increases the heat stability of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 92(11), 5353-5356.
- Augustin, M. A., & Hemar, Y. (2009). Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chemical Society Reviews*, 38(4), 902-912.
- Baxter, S., Zivanovic, S., & Weiss, J. (2005). Molecular weight and degree of acetylation of high-intensity ultrasonicated chitosan. *Food Hydrocolloids*, 19(5), 821-830.
- Bell, L. N. (2000). Stability testing of nutraceuticals and functional foods. En R. E. C. Wildman (Ed.), *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods*: CRC Press.
- Bergquist, D. H. (1995). Egg dehydration. En W. J. Stadelman & O. J. Cotterill (Eds.), *Egg Science and Technology* (4th ed., pp. 335-376). Binghamton NY: Haworth Press.
- Bernstein, L. S., Zakin, M. R., Flint, E. B., & Suslick, K. S. (1996). Cavitation thermometry using molecular and continuum sonoluminescence. *The Journal of Physical Chemistry*, 100(16), 6612-6619.
- Boeneke, C. A., & Aryana, K. J. (2008). Effect of folic acid fortification on the characteristics of lemon yogurt. *LWT - Food Science and Technology*, 41(7), 1335-1343.
- Boldyrev, V. V. (1986). Mechanical activation and its application in technology. *Journal of Chimica Physics*, 83, 821-829.
- Bullen, J. J., Rogers, H. J., & Griffiths, E. (1978). Role of iron in bacterial infection. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 80, 1-35.
- Camino, N. A., Pérez, O. E., & Pílosof, A. M. R. (2009). Molecular and functional modification of hydroxypropylmethylcellulose by high-intensity ultrasound. *Food Hydrocolloids*, 23(4), 1089-1095.
- Cann, J. R. (1949). Electrophoretic analysis of ovalbumin. *Journal of the American Chemical Society*, 71(3), 907-909.
- Chandrapala, J., Zisu, B., Palmer, M., Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2011). Effects of ultrasound on the thermal and structural characteristics of proteins in

- reconstituted whey protein concentrate. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(5), 951-957.
- Chang, P., Powrie, W. D., & Fennema, O. (1970). Disc gel electrophoresis of proteins in native and heat-treated albumen, yolk, and centrifuged whole egg. *Journal of Food Science*, 35(6), 774-778.
- Cheftel, J. C., Cuq, J. L., & Lorient, D. (1989). Las proteínas del huevo. En J. C. Cheftel, J. L. Cuq & D. Lorient (Eds.), *Proteínas Alimentarias* (Vol. 1, pp. 167-177). Zaragoza: Acribia SA.
- Chen, L., Remondetto, G. E., & Subirade, M. (2006). Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*, 17(5), 272-283.
- Chen, R. H., Chang, J. R., & Shyur, J. S. (1997). Effects of ultrasonic conditions and storage in acidic solutions on changes in molecular weight and polydispersity of treated chitosan. *Carbohydrate Research*, 299(4), 287-294.
- Chippel, D., & Scrimgeour, K. G. (1970). Oxidative degradation of dihydrofolate and tetrahydrofolate. *Canadian Journal of Biochemistry*, 48(9), 999-1009.
- Damodaran, S. (1997). Protein-stabilized foams and emulsions. En S. Damodaran & A. Paraf (Eds.), *Food Proteins and Their Applications* (pp. 57-110). New York and Basel, Switzerland: Marcel Dekker.
- Desai, M. P., Labhasetwar, V., Amidon, G. L., & Levy, R. J. (1996). Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size. *Pharmaceutical Research*, 13(12), 1838-1845.
- Dhayal, S. K., Gruppen, H., de Vries, R., & Wierenga, P. A. (2014). Controlled formation of protein nanoparticles by enzymatic cross-linking of α -lactalbumin with horseradish peroxidase. *Food Hydrocolloids*, 36(0), 53-59.
- Doi, E., & Kitabatake, N. (1997). Structure and functionality of egg proteins. En S. Damodaran & A. Paraf (Eds.), *Food proteins and their functionality* (pp. 325-340). New York and Basel, Switzerland: Marcel Dekker.
- Donovan, J. W., Mapes, C. J., Davis, J. G., & Garibaldi, J. A. (1975). A differential scanning calorimetric study of the stability of egg white to heat denaturation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 26(1), 73-83.
- Drakos, A., & Kiosseoglou, V. (2006b). Stability of acidic egg white protein emulsions containing xanthan gum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 10164-10169.
- Dube, A., Ng, K., Nicolazzo, J. A., & Larson, I. (2010). Effective use of reducing agents and nanoparticle encapsulation in stabilizing catechins in alkaline solution. *Food Chemistry*, 122(3), 662-667.
- Encyclopædia Britannica Inc. (2008). *Egg: structural components*. Disponible en: <http://www.britannica.com/EBchecked/media/182/The-structural-components-of-an-egg>. Último acceso: 26 de enero de 2014.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (FAO/WHO). (2002). *Human vitamin and mineral requirements*. Rome: FAO.
- Furukawa, T., & Ohta, S. (1983). Ultrasonic-induced modification of flow properties of soy protein dispersion. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47(4), 745-750.
- Giroux, H. J., Houde, J., & Britten, M. (2010). Preparation of nanoparticles from denatured whey protein by pH-cycling treatment. *Food Hydrocolloids*, 24(4), 341-346.

- Gordon, L., & Pilosof, A. (2010). Application of high intensity ultrasounds to control the size of whey proteins particles. *Food Biophysics*, 5(3), 203-210.
- Guérin-Dubiard, C., Pasco, M., Hietanen, A., Quiros del Bosque, A., Nau, F., & Croguennec, T. (2005). Hen egg white fractionation by ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, 7, 1-2.
- Gülseren, İ., Fang, Y., & Corredig, M. (2012a). Whey protein nanoparticles prepared with desolvation with ethanol: Characterization, thermal stability and interfacial behavior. *Food Hydrocolloids*, 29(2), 258-264.
- Gülseren, İ., Fang, Y., & Corredig, M. (2012b). Zinc incorporation capacity of whey protein nanoparticles prepared with desolvation with ethanol. *Food Chemistry*, 135(2), 770-774.
- Gülseren, İ., Güzey, D., Bruce, B. D., & Weiss, J. (2007). Structural and functional changes in ultrasonicated bovine serum albumin solutions. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14(2), 173-183.
- Güzey, D. (2002). *Modification of protein structure and functionality using high-intensity ultrasound*. Tesis de Maestría, The University of Tennessee at Chattanooga, USA - Tennessee.
- Güzey, D., Gülseren, İ., Bruce, B., & Weiss, J. (2006). Interfacial properties and structural conformation of thermosonicated bovine serum albumin. *Food Hydrocolloids*, 20(5), 669-677.
- Hayakawa, S., & Nakamura, R. (1986). Optimization approaches to thermally induced egg white lysozyme gel (Food & Nutrition). *Agricultural and Biological Chemistry*, 50(8), 2039-2046.
- Henglein, A. (1987). Sonochemistry: Historical developments and modern aspects. *Ultrasonics*, 25(6).
- Henglein, A. (1993). Contribution to various aspects of cavitation chemistry. En T. J. Mason (Ed.), *Advances in Sonochemistry* (Vol. 3, pp. 17-83). London, UK and Greenwich, CT: JAI Press.
- Hirose, J., Kitabatake, N., Kimura, A., & Narita, H. (2004). Recognition of native and/or thermally induced denatured forms of the major food allergen, ovomucoid, by human IgE and mouse monoclonal IgG antibodies. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 68(12), 2490-2497.
- Hirose, J., Murakami-Yamaguchi, Y., Ikeda, M., Kitabatake, N., & Narita, H. (2005). Oligoclonal enzyme-linked immunosorbent assay capable of determining the major food allergen, ovomucoid, irrespective of the degree of heat denaturation. *Cytotechnology*, 47(1-3), 145-149.
- Hirose, M. (2000). The structural mechanism for iron uptake and release by transferrins. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64(7), 1328-1336.
- Hunter, R. J., & Ekdawi, N. (1986). The sedimentation behaviour of coagulated particles of small radius. *Colloids and Surfaces*, 18(2-4), 325-340.
- Hussain, N., Jaitley, V., & Florence, A. T. (2001). Recent advances in the understanding of uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics. *Adv Drug Deliv Rev*, 50(1-2), 107-142.
- Iida, Y., Tuziuti, T., Yasui, K., Towata, A., & Kozuka, T. (2008). Control of viscosity in starch and polysaccharide solutions with ultrasound after gelatinization. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2), 140-146.

- Jambrak, A. R., Lelas, V., Mason, T. J., Krešić, G., & Badanjak, M. (2009). Physical properties of ultrasound treated soy proteins. *Journal of Food Engineering*, 93(4), 386-393.
- Jambrak, A. R., Mason, T. J., Lelas, V., Herceg, Z., & Herceg, I. L. (2008). Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions. *Journal of Food Engineering*, 86(2), 281-287.
- Jambrak, A. R., Mason, T. J., Lelas, V., & Kresic, G. (2010). Ultrasonic effect on physicochemical and functional properties of α -lactalbumin. *LWT - Food Science and Technology*, 43(2), 254-262.
- Johnson, K. C., & Swindell, A. C. (1996). Guidance in the setting of drug particle size specifications to minimize variability in absorption. *Pharmaceutical Research*, 13(12), 1795-1798.
- Johnson, T. M., & Zabik, M. E. (1981). Egg albumen proteins interactions in an angel food cake system. *Journal of Food Science*, 46(4), 1231-1236.
- Jun, J. Y., Nguyen, H. H., Paik, S.-Y.-R., Chun, H. S., Kang, B.-C., & Ko, S. (2011). Preparation of size-controlled bovine serum albumin (BSA) nanoparticles by a modified desolvation method. *Food Chemistry*, 127(4), 1892-1898.
- Kam, K., Arcot, J., & Adesina, A. A. (2012). Folic acid fortification of parboiled rice: Multifactorial analysis and kinetic investigation. *Journal of Food Engineering*, 108(1), 238-243.
- Kam, K., Murray, J. M., Arcot, J., & Ward, R. (2012). Fortification of parboiled rice with folic acid: Consumer acceptance and sensory evaluation. *Food Research International*, 49(1), 354-363.
- Kardos, N., & Luche, J.-L. (2001). Sonochemistry of carbohydrate compounds. *Carbohydrate Research*, 332(2), 115-131.
- Karki, B., Lamsal, B., Grewell, D., Pometto, A., van Leeuwen, J., Khanal, S., & Jung, S. (2009). Functional properties of soy protein isolates produced from ultrasonicated defatted soy flakes. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86(10), 1021-1028.
- Kashiwagi, H., Enomoto, S., & Inoue, M. (1989). Mechanochemical considerations on the maximal numbers of radicals generated in binary powders of glycolic acid and silica-alumina. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 37(12), 3181-3183.
- Kato, A., Matsuda, T., Matsudomi, N., & Kobayashi, K. (1985). Difference in the molecular weight of soluble aggregates during heat denaturation between ovalbumin and S-ovalbumin. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49, 2197-2198.
- Kato, A., & Takagi, T. (1988). Formation of intermolecular β -sheet structure during heat denaturation of ovalbumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, 1156-1159.
- Kijowski, J., & Lesnierowski, G. (1995). The application of lysozyme as a food preservative and a pharmaceutical. *Biotechnology*, 2, 131-140.
- Kint, S., & Tomimatsu, Y. (1979). A Raman difference spectroscopic investigation of ovalbumin and S-ovalbumin. *Biopolymers*, 18(5), 1073-1079.
- Kitabatake, N., & Doi, E. (1987). Conformational change of hen egg ovalbumin during foam formation detected by 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35, 953-957.

- Koseki, T., Kitabatake, N., & Doi, E. (1989). Irreversible thermal denaturation and formation of linear aggregates of ovalbumin. *Food Hydrocolloids*, 3(2), 123-134.
- Krešić, G., Lelas, V., Jambrak, A. R., Herceg, Z., & Brnčić, S. R. (2008). Influence of novel food processing technologies on the rheological and thermophysical properties of whey proteins. *Journal of Food Engineering*, 87(1), 64-73.
- Kurokawa, H., Dewan, J. C., Mikami, B., Sacchettini, J. C., & Hirose, M. (1999). Crystal structure of hen apo-ovotransferrin. Both lobes adopt an open conformation upon loss of iron. *Journal of Biological Chemistry*, 274(40), 28445-28452.
- Lechevalier, V., Croguennec, T., Pezennec, S., Guérin-Dubiard, C., Pasco, M., & Nau, F. (2003). Ovalbumin, ovotransferrin, lysozyme: Three model proteins for structural modifications at the air-water interface. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(21), 6354-6361.
- Lei, B., Majumder, K., Shen, S., & Wu, J. (2011). Effect of sonication on thermolysin hydrolysis of ovotransferrin. *Food Chemistry*, 124(3), 808-815.
- Lepoint-Mullie, F., De Pauw, D., Lepoint, T., Supiot, P., & Avni, R. (1996). Nature of the "extreme conditions" in single sonoluminescing bubbles. *The Journal of Physical Chemistry*, 100(30), 12138-12141.
- Lepoint, T., & Lepoint-Mullie, F. (1998). Theoretical bases. En J. L. Luche (Ed.), *Synthetic Organic Sonochemistry* (pp. 1-49). New York: Plenum.
- Lesmes, U., Cohen, S. H., Shener, Y., & Shimoni, E. (2009). Effects of long chain fatty acid unsaturation on the structure and controlled release properties of amylose complexes. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 667-675.
- Lesmes, U., & McClements, D. J. (2009). Structure–function relationships to guide rational design and fabrication of particulate food delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*, 20(10), 448-457.
- Lesnierowski, G., & Kijowski, J. (2007). Lysozyme. En R. Huopalahti, R. López-Fandiño, M. Anton & R. Schade (Eds.), *Bioactive Egg Compounds* (pp. 33-42): Springer Berlin Heidelberg.
- Li-Chan, E., & Nakai, S. (1989). Biochemical basis for the properties of egg white. *Critical reviews in poultry biology*, 2(1), 21-59.
- Li-Chan, E., Powrie, W. D., & Nakai, S. (1995). The chemistry of eggs and egg products. En W. J. Stadelman & O. J. Cotterill (Eds.), *Egg science and Technology* (4th ed., pp. 105-175). New York: Food Products Press.
- Li, F. Q., Su, H., Wang, J., Liu, J. Y., Zhu, Q. G., Fei, Y. B., Pan, Y. H., & Hu, J. H. (2008). Preparation and characterization of sodium ferulate entrapped bovine serum albumin nanoparticles for liver targeting. *International Journal of Pharmaceutics*, 349(1-2), 274-282.
- Linden, G., & Lorient, D. (1999). *New ingredients in food processing: Biochemistry and agriculture*: Woodhead Publishing Limited.
- Livney, Y. D. (2010). Milk proteins as vehicles for bioactives. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15(1–2), 73-83.
- Longsworth, L. G., Cannan, R. K., & MacInnes, D. A. (1940). An electrophoretic study of the proteins of egg white. *Journal of the American Chemical Society*, 62(10), 2580-2590.
- Lorimer, J. P., Mason, T. J., Cuthbert, T. C., & Brookfield, E. A. (1995). Effect of ultrasound on the degradation of aqueous native dextran. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2(1), S55-S57.

- Luche, J. L. (1993). Sonochemistry: from experiment to theoretical considerations. En T. J. Mason (Ed.), *Advances in Sonochemistry* (Vol. 3, pp. 85-124). London: JAI Press.
- Madziva, H., Kailasapathy, K., & Phillips, M. (2006). Evaluation of alginate-pectin capsules in Cheddar cheese as a food carrier for the delivery of folic acid. *LWT*, 39, 146-151.
- Maggi, E. (2008). Cadenas alimentarias - Huevos y derivados. En *Revista Alimentos Argentinos* (Vol. 42, pp. 30-32). Argentina: SAGPyA.
- Martin, H., Comeskey, D., Simpson, R. M., Laing, W. A., & McGhie, T. K. (2010). Quantification of folate in fruits and vegetables: A fluorescence-based homogeneous assay. *Analytical Biochemistry*, 402(2), 137-145.
- Martini, S., Potter, R., & Walsh, M. K. (2010). Optimizing the use of power ultrasound to decrease turbidity in whey protein suspensions. *Food Research International*, 43(10), 2444-2451.
- Mason, T. J., & Cordemans, E. D. (1996). Ultrasonic intensification of chemical processing and related operations - A review. *Transactions of the Institute of Chemical Engineers*, 74(A), 511-516.
- Mason, T. J., & Lorimer, J. P. (2003a). Synthesis. En T. J. Mason & J. P. Lorimer (Eds.), *Applied Sonochemistry* (pp. 75-130): Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Mason, T. J., & Lorimer, J. P. (2003b). Ultrasonic equipment and chemical reactor design. En T. J. Mason & J. P. Lorimer (Eds.), *Applied Sonochemistry* (pp. 267-293): Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Mason, T. J., Lorimer, J. P., Bates, D. M., & Zhao, Y. (1994). Dosimetry in sonochemistry: the use of aqueous terephthalate ion as a fluorescence monitor. *Ultrasonics Sonochemistry*, 1(2), S91-S95.
- Matsuda, T., Watanabe, K., & Sato, Y. (1981). Heat-induced aggregation of egg white proteins as studied by vertical flat-sheet polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Food Science*, 46(6), 1829-1834.
- Matsumoto, T., & Chiba, J. (1990). Rheological and small-angle X-ray scattering investigations on the shape and ordered arrangement of native ovalbumin molecules in aqueous colloids. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 86, 2877-2882.
- Matsumoto, T., Chiba, J., & Inoue, H. (1992). Effect of pH on colloidal properties of native ovalbumin aqueous systems. *Colloid and Polymer Science*, 270(7), 687-693.
- McClements, D. J. (2005). *Food Emulsions: principles, practice and techniques*. Boca Raton: CRC Press.
- McReynolds, L., O'Malley, B. W., Nisbet, A. D., Fothergill, J. E., Givol, D., Fields, S., Robertson, M., & Brownlee, G. G. (1978). Sequence of chicken ovalbumin mRNA. *Nature*, 273(5665), 723-728.
- Mine, Y. (1995). Recent advances in the understanding of egg white protein functionality. *Trends in Food Science & Technology*, 6(7), 225-232.
- Mine, Y., Noutomi, T., & Haga, N. (1990). Thermally induced changes in egg white proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(12), 2122-2125.
- Nakamura, R., Hirai, M., & Takemori, Y. (1980). Some differences noted between the properties of Ovalbumin and s-ovalbumin in native state. *Agricultural and Biological Chemistry*, 44(1), 149-153.

- Neppiras, E. (1984). Acoustic cavitation series: part one. Acoustic cavitation: an introduction. *Ultrasonics*, 22(1), 25-28.
- Nisbet, A., Saundry, R., Moir, A., Fothergill, L., & Fothergill, J. (1981). The complete amino-acid sequence of hen ovalbumin. *European Journal of Biochemistry*, 115, 335-345.
- Nys, Y., & Guyot, N. (2011). Improving the safety and quality of egg and egg products. En Y. Nys, M. Bain & F. Van Immerseel (Eds.), (Vol. 1: Egg chemistry, production and consumption pp. 83-132). Cambridge Woodhead Publishing Limited.
- Oh, D.-M., Curl, R., & Amidon, G. (1993). Estimating the fraction dose absorbed from suspensions of poorly soluble compounds in humans: A mathematical model. *Pharmaceutical Research*, 10(2), 264-270.
- Omar, R. M., Ismail, H. M., El-Lateef, B. M. A., Yousef, M. I., Gomaa, N. F., & Sheta, M. (2009). Effect of processing on folic acid fortified Baladi bread and its possible effect on the prevention of colon cancer. *Food and Chemical Toxicology*, 47(7), 1626-1635.
- Ordoñez Pereda, J. A., & de La Hoz Perales, L. (1999). Carnes, pescados y huevos. En M. Hernández Rodríguez & A. Sastre Gallego (Eds.), *Tratado de nutrición*. Madrid: Diaz de Santos S.A.
- Paine-Wilson, B., & Chen, T. S. (1979). Thermal destruction of folacin: effect of pH and buffer ions. *Journal of Food Science*, 44(3), 717-722.
- Papamokos, E., Weber, E., Bode, W., Huber, R., Empie, M. W., Kato, I., & Laskowski, M., Jr. (1982). Crystallographic refinement of Japanese quail ovomucoid, a Kazal-type inhibitor, and model building studies of complexes with serine proteases. *Journal of Molecular Biology*, 158(3), 515-537.
- Pechkova, E., Belmonte, L., Riekkel, C., Popov, D., Koenig, C., & Nicolini, C. Laser-induced microfragmentation of lysozyme crystals allows X-ray nanodiffraction characterization of individual domains. DOI: 10.2210/pdb4hv1/pdb
- Perlmann, G. E. (1952). Enzymatic dephosphorylation of ovalbumin and plakalbumin. *Journal of General Physiology*, 35(5), 711-726.
- Pinho, E., Grootveld, M., Soares, G., & Henriques, M. (2014). Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. *Carbohydrate Polymers*, 101(0), 121-135.
- Porter, C. J. H., & Charman, W. N. (2001). In vitro assessment of oral lipid based formulations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 50, Supplement 1(0), S127-S147.
- Powrie, W. D., & Nakai, S. (1986). The chemistry of eggs and egg products. En O. J. Cotterill (Ed.), *Egg science and technology* (pp. 97-139): AVI Publishing
- Prida, J. (2013). Semana mundial del huevo - Balance 2003/2013. En *Revista CAPIA Informa* (Vol. 258, pp. 6-23). Argentina: Cámara Argentina de Productores Avícolas (CAPIA).
- Proctor, V. A., & Cunningham, F. E. (1988). The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 26(4), 359-395.
- Raikos, V., Hansen, R., Campbell, L., & Euston, S. R. (2006). Separation and identification of hen egg protein isoforms using SDS-PAGE and 2D gel electrophoresis with MALDI-TOF mass spectrometry. *Food Chemistry*, 99(4), 702-710.

- Raso, J., Mañas, P., Pagán, R., & Sala, F. J. (1999). Influence of different factors on the output power transferred into medium by ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 5(4), 157-162.
- Renault, A., Pezennec, S., Gauthier, F., Vié, V., & Desbat, B. (2002). Surface rheological properties of native and S-ovalbumin are correlated with the development of an intermolecular β -sheet network at the air-water interface. *Langmuir*, 18(18), 6887-6895.
- Riener, J., Noci, F., Cronin, D. A., Morgan, D. J., & Lyng, J. G. (2009). Characterisation of volatile compounds generated in milk by high intensity ultrasound. *International Dairy Journal*, 19(4), 269-272.
- Riesz, P. (1991). Free radical generation by ultrasound in aqueous solutions of volatile and non-volatile solutes. En T. J. Mason (Ed.), *Advances in Sonochemistry* (Vol. 2, pp. 23-64). London, UK and Greenwich, CT: JAI Press.
- Ron, N., Zimet, P., Bargarum, J., & Livney, Y. D. (2010). β -lactoglobulin-polysaccharide complexes as nanovehicles for hydrophobic nutraceuticals in non-fat foods and clear beverages. *International Dairy Journal*, 20(10), 686-693.
- Rupa, P., & Mine, Y. (2005). Egg proteins. En Y. Mine & F. Shahidi (Eds.), *Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Disease* (pp. 445-459): CRC Press.
- Samaniego-Vaesken, M. d. L., Alonso-Aperte, E., & Varela-Moreiras, G. (2010). Analysis and evaluation of voluntary folic acid fortification of breakfast cereals in the Spanish market. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(5), 419-423.
- Selhub, J., & Rosenberg, I. H. (1996). Folic acid. En E. E. Ziegler & L. J. Filer (Eds.), *Present knowledge in nutrition* (7th ed., pp. 206-219). Washington, DC, EEUU: ILSI Press.
- SENASA. (2013). *Reporte comparativo del comercio exterior de productos, subproductos y derivados de origen animal*. Disponible en: <http://www.senasa.gov.ar/estadistica.php#>. Último acceso: 19 de Diciembre de 2013.
- Shenton, A. J. (1979). *Membrane composition and performance of food emulsions*. Tesis Doctoral, University of London, London.
- Sivasubramanian, M., Thambi, T., & Park, J. H. (2013). Mineralized cyclodextrin nanoparticles for sustained protein delivery. *Carbohydrate Polymers*, 97(2), 643-649.
- Sonics & Materials Inc. (2013). Disponible en: <http://www.sonics.com/index.php>. Último acceso: 7 de diciembre de 2013.
- Stein, P. E., Leslie, A. G. W., Finch, J. T., & Carrell, R. W. (1991). Crystal structure of uncleaved ovalbumin at 1.95 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 221(3), 941-959.
- Stuart, D. I., Acharya, K. R., Walker, N. P. C., Smith, S. G., Lewis, M., & Phillips, D. C. (1986). α -Lactalbumin possesses a novel calcium binding loop. *Nature*, 324(6092), 84-87.
- Suitor, C. W., & Bailey, L. B. (2000). Dietary folate equivalents: interpretation and application. *Journal American Dietists Association*, 100, 88-94.
- Suslick, K. S. (1990). Sonochemistry. *Science*, 247, 1439-1445.
- Tang, C.-H., Wang, X.-Y., Yang, X.-Q., & Li, L. (2009). Formation of soluble aggregates from insoluble commercial soy protein isolate by means of ultrasonic treatment and their gelling properties. *Journal of Food Engineering*, 92(4), 432-437.

- Teng, Z., Luo, Y., & Wang, Q. (2013). Carboxymethyl chitosan–soy protein complex nanoparticles for the encapsulation and controlled release of vitamin D3. *Food Chemistry*, 141(1), 524-532.
- Tomiuk, S., Liu, Y., Green, T. J., King, M. J., Finglas, P. M., & Kitts, D. D. (2012). Studies on the retention of microencapsulated l-5-methyltetrahydrofolic acid in baked bread using skim milk powder. *Food Chemistry*, 133(2), 249-255.
- Tomizawa, H., Yamada, H., & Imoto, T. (1994). The Mechanism of Irreversible Inactivation of Lysozyme at pH 4 and 100 .degree.C. *Biochemistry*, 33(44), 13032-13037.
- USDA. (2013a). *Statistics Report 01124, Egg, white, raw, fresh*. Disponible en: <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list>. Último acceso: 21 de diciembre de 2013.
- USDA. (2013b). *Statistics Report 01125, Egg, yolk, raw, fresh*. Disponible en: <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list>. Último acceso: 21 de diciembre de 2013.
- Valenti, P., Antonini, G., Von Hunolstein, C., Visca, P., Orsi, N., & Antonini, E. (1983). Studies of the antimicrobial activity of ovotransferrin. *International Journal of Tissue Reactions*, 5(1), 97-105.
- Varela-Moreiras, G., Alonso Aperte, E., & Póo Prieto, R. (2000). *La determinación "in vitro/in vivo" de la biodisponibilidad del ácido fólico contenido en la cerveza* Madrid: Centro de Información Cerveza y Salud.
- Velikov, K. P., & Pelan, E. (2008). Colloidal delivery systems for micronutrients and nutraceuticals. *Soft Matter*, 4(10), 1964-1980.
- Vilkhu, K., Manasseh, R., Mawson, R., & Ashokkumar, M. (2011). Ultrasonic recovery and modification of food ingredients. En H. Feng, G. V. Barbosa-Cánovas & J. Weiss (Eds.), *Ultrasound technologies for food and bioprocessing* (pp. 364). New York: Springer Science+Business Media.
- Villamiel, M., & de Jong, P. (2000). Influence of high-intensity ultrasound and heat treatment in continuous flow on fat, proteins, and native enzymes of milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 472-478.
- Wang, R., Tian, Z., & Chen, L. (2011). Nano-encapsulations liberated from barley protein microparticles for oral delivery of bioactive compounds. *International Journal of Pharmaceutics*, 406(1–2), 153-162.
- Watanabe, J., Iwamoto, S., & Ichikawa, S. (2005). Entrapment of some compounds into biocompatible nano-sized particles and their releasing properties. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 42(2), 141-146.
- Weiss, J., Kristbergsson, K., & Kjartansson, G. T. (2011). Engineering food ingredients with high-intensity ultrasound. En H. Feng, G. V. Barbosa-Cánovas & J. Weiss (Eds.), *Ultrasound technologies for food and bioprocessing* (pp. 239-285). New York: Springer Science+Business Media.
- Weiss, J., Takhistov, P., & McClements, D. J. (2006). Functional materials in food nanotechnology. *Journal of Food Science*, 71(9), R107-R116.
- Wildman, R. E. C. (2006). *Handbook of nutraceuticals and functional foods* (Segunda ed.): CRC Press.
- Woo, S. L. C., Beattie, W. G., Catterall, J. F., Dugaiczky, A., Staden, R., Brownlee, G. G., & O'Malley, B. W. (1981). Complete nucleotide sequence of the chicken

- chromosomal ovalbumin gene and its biological significance. *Biochemistry*, 20(22), 6437-6446.
- Woodward, S. (1990). Egg protein gels. En P. Harris (Ed.), *Food Gels* (pp. 175-199): Springer Netherlands.
- Zabar, S., Lesmes, U., Katz, I., Shimoni, E., & Bianco-Peled, H. (2009). Studying different dimensions of amylose–long chain fatty acid complexes: Molecular, nano and micro level characteristics. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1918-1925.
- Zhang, J., Liang, L., Tian, Z., Chen, L., & Subirade, M. (2012). Preparation and in vitro evaluation of calcium-induced soy protein isolate nanoparticles and their formation mechanism study. *Food Chemistry*, 133(2), 390-399.
- Zimet, P., & Livney, Y. D. (2009). β -Lactoglobulin and its nanocomplexes with pectin as vehicles for ω -3 polyunsaturated fatty acids. *Food Hydrocolloids*, 23(4), 1120-1126.
- Zisu, B., Bhaskaracharya, R., Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2010). Ultrasonic processing of dairy systems in large scale reactors. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(6), 1075-1081.

Objetivos

Objetivo general

El objetivo de este trabajo fue caracterizar el efecto de la aplicación de ultrasonidos de alta intensidad (USAI) en las propiedades moleculares y funcionales de un aislado de proteínas de albúmina de huevo comercial (EW) y desarrollar nanopartículas por agregación controlada mediante USAI, sólo o en combinación con altas temperaturas (termosonicación), con la finalidad de emplearlas como nanovehículos (nanocarriers) para ácido fólico (AF).

Objetivos Específicos

- Estudiar el efecto de los USAI en las propiedades moleculares, estructurales y funcionales del aislado de albúmina de huevo.
- Obtener nanopartículas de EW a partir de soluciones de esta proteína mediante el empleo de USAI o termosonicación.
- Promover la unión de estas nanopartículas con ácido fólico (AF) lo cual podría proteger este bioactivo y liberarlo controladamente en sitios específicos del tracto gastrointestinal.
- Evaluar la actividad biológica del AF luego de un proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* de los nanocarriers, mediante el agregado de los productos de la digestión al medio de crecimiento de una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* AF dependiente.

Materiales y métodos

1. Materiales

1.1. Clara de huevo

Se utilizó EW en polvo gentilmente donada por Ovoprot International S.A. (Buenos Aires, Argentina). El contenido de proteína del polvo (en base total) fue de $88,93 \pm 1,18$ % (N x 6,25), determinado por el método de Kjeldahl (AOAC, 1980). Se prepararon soluciones al 20% p/p con agua bidestilada. Se agregó azida sódica (0,02% p/p), excepto para los ensayos espectrofotométricos, fluorimétricos y microbiológico. Las soluciones fueron centrifugadas durante 1 h a $12857 \times g$ y $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Se utilizó el sobrenadante a su pH natural de $7,0 \pm 0,1$ y a pH 3, ajustando con HCl 1N. Se diluyó a las concentraciones necesarias para cada experimento.

1.2. Ácido fólico

El AF, elaborado por DSM Nutritional Products Argentina S.A., fue amablemente provisto por Laboratorios Bagó S.A. (La Plata, Argentina). La pureza del polvo (en base seca) fue de 99,5 %. Se prepararon soluciones al 1% p/p de AF diariamente y se cubrieron con papel aluminio para evitar la exposición a la luz. El pH fue ajustado a 7 con NaOH 1N o a 3 con HCl 1N.

2. Métodos

2.1. Tratamiento con ultrasonidos de alta intensidad

2.1.1. Aplicación en soluciones de EW

Se sonicaron 5 ml de soluciones de EW (10% p/p) durante 20 min, usando un procesador ultrasónico Vibra Cell Sonics, modelo VCX 750 (potencia neta máx.: 750W) a una frecuencia de 20 kHz y una amplitud de 20% (amplitud máx. 40%, 160 μm). Se empleó una sonda de aleación de titanio de 13 mm de diámetro, acoplada a un *microtip* de 3 mm de diámetro. La muestra fue sonicada a temperatura controlada, colocándola en un tubo de vidrio de 15 ml sumergido en un baño de glicerina. El baño se mantuvo a temperatura constante mediante una camisa con circulación de agua a $0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ (Polystat, Cole-Parmer).

2.1.2. Diseño de nanopartículas

Se sonicaron 5 ml de soluciones de EW (5% p/p) a pH 3 y 7 durante 5, 10, 15 y 20 min, sin calentamiento y a 80 u 85 °C (termosonicación, TS), en las mismas condiciones de frecuencia y amplitud citadas anteriormente. Se realizaron controles calentando las muestras a 80 u 85 °C durante los mismos intervalos de tiempo.

2.2. Determinación de la energía acústica

Con el objetivo de determinar la influencia de la intensidad del ultrasonido en un proceso y permitir la comparación de distintos tratamientos, es necesario medir la energía ultrasónica real transferida al medio (Cárcel, Benedito, Bon, y Mulet, 2007). La potencia acústica disipada en el líquido (potencia de salida) fue calculada según Raso y col (1999). La temperatura del líquido sonicado fue registrada en función del tiempo mediante una termocupla conectada a un registrador de temperaturas (Digi-Sense, 69202-30, Barnant Company Division, USA). El aumento de temperatura fue estimado utilizando la pendiente de la parte recta de la línea obtenida durante los primeros 80 s del experimento. La potencia de salida fue calculada según la Ecuación 1:

$$P = m C_p \frac{dT}{dt} \quad (1)$$

donde m es la masa de líquido sonicado (g), C_p es el calor específico a presión constante (J/g °C) y dT/dt es la pendiente inicial de la curva de temperatura en función del tiempo, determinada por calorimetría.

La intensidad acústica ($W\ cm^{-2}$) fue determinada dividiendo la potencia acústica por la superficie de emisión de la sonda ultrasónica empleada.

En todos los experimentos se utilizó agua bidestilada como solvente. Como los estudios previos demostraron que las mediciones de potencia disipada resultan idénticas con o sin agua circulando en la camisa (Kimura y col, 1996; Raso y col, 1999), la determinación de la potencia en este estudio fue llevada a cabo con agua circulando en la camisa.

2.3. Medición de conductividad

Se determinaron posibles cambios en la conductividad eléctrica de la EW a 25 °C, antes y después de la sonicación, usando un conductímetro Thermo Orion, 125A Plus, (USA). El conductímetro se calibró con soluciones estándar de conductividad conocida.

2.4. Determinación de grupos sulfhidrilos libres

Se determinó la concentración de grupos sulfhidrilos (SH) libres superficiales y totales de las soluciones de EW utilizando el reactivo de Ellman (ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico), DTNB) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), de acuerdo con el procedimiento de Ellman (1959) con las modificaciones de Shimada y Cheftel (1988). Los grupos SH libres se midieron como se detalla a continuación. Las soluciones de EW fueron diluidas con el buffer estándar al 0,05% p/p y fueron centrifugadas durante 20 min, a 20 °C y 12857 x g. Se usaron los sobrenadantes para la determinación. El buffer estándar (pH 8,0) contenía TRIS 86 mM, glicina 90 mM y EDTA 4 mM. Se agregaron 0,025 ml de solución del reactivo de Ellman (4 mg de DTNB/ml de buffer estándar) a una alícuota de 2,5 ml del sobrenadante de las muestras (control y USAI). Luego, las soluciones fueron mezcladas rápidamente, se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 15 min y se leyó la absorbancia a 412 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Shimatzu UV 1203, Japan). El contenido de grupos SH totales fue determinado por la misma técnica pero empleando un buffer desnaturizante que consistía en el buffer estándar más urea 8 M y dodecil sulfato de sodio 0,5% p/v. Se usaron los buffers estándar y desnaturizante como blancos de reactivo en lugar de las soluciones de proteína. Se midió un blanco de proteína en el que 0,025 ml de cada buffer reemplazó a la solución del reactivo de Ellman. Se empleó un coeficiente de extinción molar de $1,36 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para calcular los micromoles de SH/g de sólidos solubles. Los sólidos solubles se determinaron de acuerdo a la Sección 2.8.1.

2.5. Calorimetría diferencial de barrido

Se estudiaron las transiciones térmicas a pH 7 de soluciones de EW control y USAI al 10% p/p de proteína mediante un calorímetro diferencial de barrido Mettler TA 4000 Thermal Analysis System (Schwerzenbach, Switzerland). Los termogramas y parámetros térmicos correspondientes a la desnaturalización proteica se obtuvieron mediante el software de análisis TA72. Previamente se calibró el equipo con Indio según Roos y Karel (1991). Las mediciones se llevaron a cabo en cápsulas de aluminio con una capacidad de 160 μ l, herméticamente selladas, donde se colocó un volumen de 60 μ l de solución. Se utilizó una cápsula vacía como referencia. Todas las mediciones se realizaron a una velocidad de calentamiento de 10 $^{\circ}$ C/min, desde 5 a 120 $^{\circ}$ C. Se calculó temperatura de pico (T_p) de la endoterma que indica la temperatura aparente de desnaturalización de la proteína y se determinó la entalpía de desnaturalización (ΔH_d).

2.6. Determinación de hidrofobicidad superficial

La hidrofobicidad superficial (H_0) de las soluciones de proteína fue determinada con la sonda fluorescente 1-anilino-8-naftaleno-sulfonato (ANS) de acuerdo con el método de Kato y Nakai (1980). Las dispersiones de proteína control y tratadas por USAI se diluyeron en buffer fosfato (0,1 M, pH 7) y se centrifugaron a 1000 x g durante 30 minutos a 15 $^{\circ}$ C. Se tomó el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas por el método de Biuret, según se explica en la Sección 2.8.2. Luego se realizaron diluciones en un rango de concentraciones de 0,025-0,4 mg/ml. Se colocaron las diluciones en cubetas de cuarzo y se registró la intensidad de fluorescencia (IF) a 25 $^{\circ}$ C usando un espectrofluorímetro Kontron S25 a 390 nm (longitud de onda de excitación, apertura 2,5 nm), 468 nm (longitud de onda de emisión, apertura 2,5 nm) y una velocidad de escaneo de 10 nm/s. Luego, se agregaron 12,5 μ l de solución de ANS (8,0 mM en buffer fosfato 0,01 M, pH 7) a 2,5 ml de soluciones proteicas y se midió nuevamente la IF. La IF neta para cada concentración de proteína se registró como la diferencia entre las IF medidas para cada solución con y sin sonda. La H_0 fue calculada como la pendiente inicial del gráfico de IF neta en función de la concentración de proteína.

2.7. Distribución de tamaño y potencial zeta de las partículas

2.7.1. Dispersión dinámica de luz (DLS)

Tamaño de partícula

El tamaño de partícula de las soluciones de EW control y sonicada se midió mediante DLS con un analizador Zetasizer Nano-Zs, de Malvern Instruments (Worcestershire, Reino Unido). El equipo cuenta con un láser He-Ne (633 nm) y un correlador digital Modelo ZEN3600. Las mediciones se realizaron a un ángulo fijo de 173°, dentro de un rango de 0,6 nm a 6 μm, según especificaciones del equipo. Las muestras fueron diluidas al 0,1% p/p y colocadas dentro de cubetas de poliestireno descartables.

El fundamento de la medición se basa en el movimiento Browniano constante de las partículas, que se debe a la colisión al azar de las moléculas del líquido que rodea a la partícula. Las partículas pequeñas se mueven rápidamente y las grandes lo hacen más lentamente. En DLS, la muestra es iluminada con un láser y la intensidad de la luz dispersada por las partículas fluctúa a una velocidad que es dependiente del tamaño de las partículas. El análisis de la intensidad de estas fluctuaciones correlaciona el coeficiente de difusión de la partícula y a partir de éste el tamaño de la partícula. La relación entre el tamaño de la partícula y el coeficiente de difusión se define por la ecuación de Stokes-Einstein (2):

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (2)$$

donde, $d(H)$ es el diámetro hidrodinámico (m); D es el coeficiente de difusión traslacional ($m^2 s^{-1}$); k es la constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} N m K^{-1}$); T es la temperatura absoluta (K) y; η es la viscosidad del solvente ($N s m^{-2}$).

Se utilizaron dos aproximaciones para obtener la información de tamaño. Primero, se empleó el algoritmo de CONTIN para analizar los datos de distribución porcentual de tamaños de partícula/agregados (Štěpánek, 1993). La distribución de tamaño obtenida es un gráfico de la intensidad relativa de luz dispersada por las partículas de varias clases de tamaño y es, por lo tanto, conocida como una distribución de tamaño en intensidad. Si la distribución presenta una “cola” sustancial o más de un pico, entonces puede aplicarse la teoría de Mie para convertir la distribución en intensidad en una

distribución en volumen o en número. Estas darán una visión más realista de la importancia de la cola o la segunda población presente. En términos generales se verifica que $d(\text{intensidad}) > d(\text{volumen}) > d(\text{número})$, ya que la intensidad de dispersión es proporcional a d^6 , de acuerdo con la aproximación de Rayleigh, mientras que el volumen de una esfera es proporcional a d^3 y el número está ponderado por el d^1 (Figura 1).

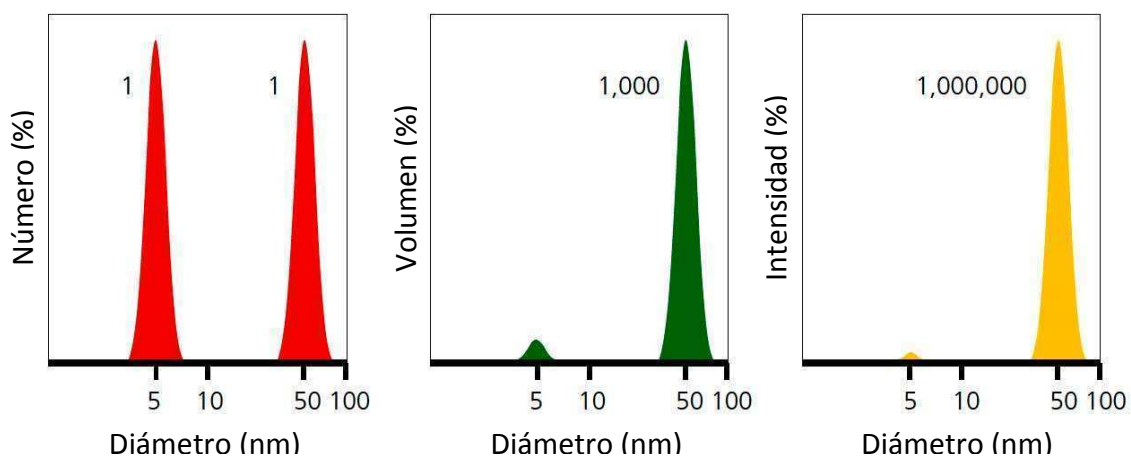


Figura 1: Distribución en número, volumen e intensidad de una muestra bimodal de partículas de 5 y 50 nm presentes en igual cantidad.

Fuente: Malvern Instruments Ltd. (2012).

Luego, se utilizó el método de cumulantes para calcular el tamaño promedio (diámetro hidrodinámico promedio o *Z-average*). Los resultados que se obtienen mediante este análisis son aplicables para citar un único valor promedio con el propósito de realizar una comparación pero son inadecuados para dar una completa descripción de los resultados de la distribución en sistemas polidispersos.

Se informa el promedio de dos repeticiones por muestra.

Potencial zeta

Con el mismo analizador se realizaron mediciones de potencial zeta (ζ) a un ángulo fijo de 17° . Las soluciones (control y USAI) se diluyeron al 0,01% p/p con agua bidestilada y se colocaron en celdas capilares provistas de electrodos a cada lado (Figura 2). Se informa el promedio de dos repeticiones por muestra

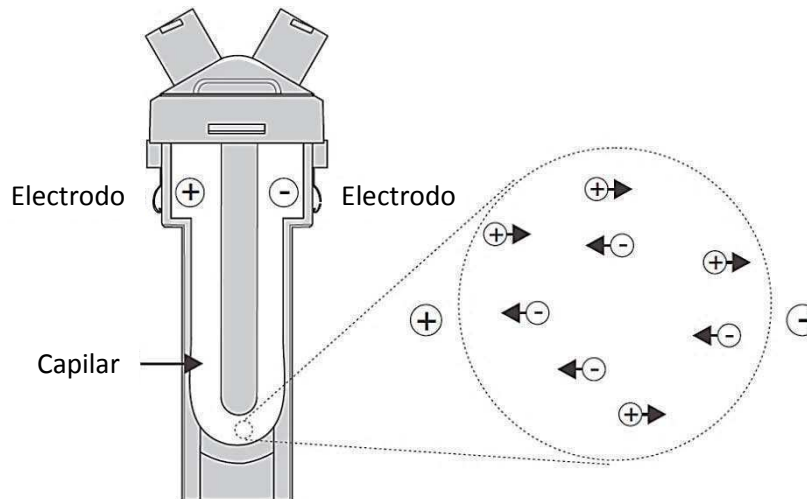


Figura 2: Celda capilar con electrodos a cada lado.

Fuente: Malvern Instruments Ltd. (2013).

El fundamento físico de la técnica es el de la electroforesis. La dispersión se coloca en la celda y se aplica un campo eléctrico en los electrodos a 25 °C. Las partículas cargadas migrarán hacia el electrodo con carga opuesta. Las fuerzas viscosas que actúan sobre las partículas tienden a oponerse a este movimiento. Cuando se alcanza el equilibrio entre estas fuerzas opuestas, las partículas se mueven a una velocidad constante. La velocidad a la que migran las partículas se conoce como movilidad electroforética y está relacionada con su potencial zeta, mediante la ecuación de Henry (3):

$$U_E = \frac{2 \varepsilon \zeta f(ka)}{3 \mu} \quad (3)$$

donde ζ es el potencial zeta, U_E es la movilidad electroforética, ε es la constante dieléctrica, μ es la viscosidad y $f(ka)$ es la función de Henry. En medio acuoso y con baja concentración de electrolitos se usa una aproximación de $f(ka)$ igual a 1,0 (aproximación de Huckel).

El desarrollo de una carga neta en la superficie de una partícula afecta la distribución de iones de la región interfacial circundante. Esto resulta en un aumento de la concentración de iones de carga opuesta a la partícula que están cercanos a la superficie. Así, una doble capa eléctrica se genera alrededor de cada partícula (Figura 3).

La capa de líquido que rodea a la partícula tiene dos partes: una región interna, conocida como capa de Stern donde los iones están fuertemente ligados, y una región externa, conocida como capa difusa, donde los iones están ligados más débilmente. Existe un límite imaginario que termina en la capa difusa, donde los iones y la partícula forman una entidad estable (capa de Stern).

Cuando una partícula se mueve (debido a la gravedad por ejemplo), lo hace con los iones que conforman la capa Stern y la difusa, pero los iones que se encuentran por fuera del límite no se mueven con la partícula. Este límite se conoce como plano de deslizamiento. El potencial que existe en este límite se conoce como potencial zeta (Figura 3).

La magnitud del potencial zeta es un indicador de la estabilidad del sistema coloidal en estudio.

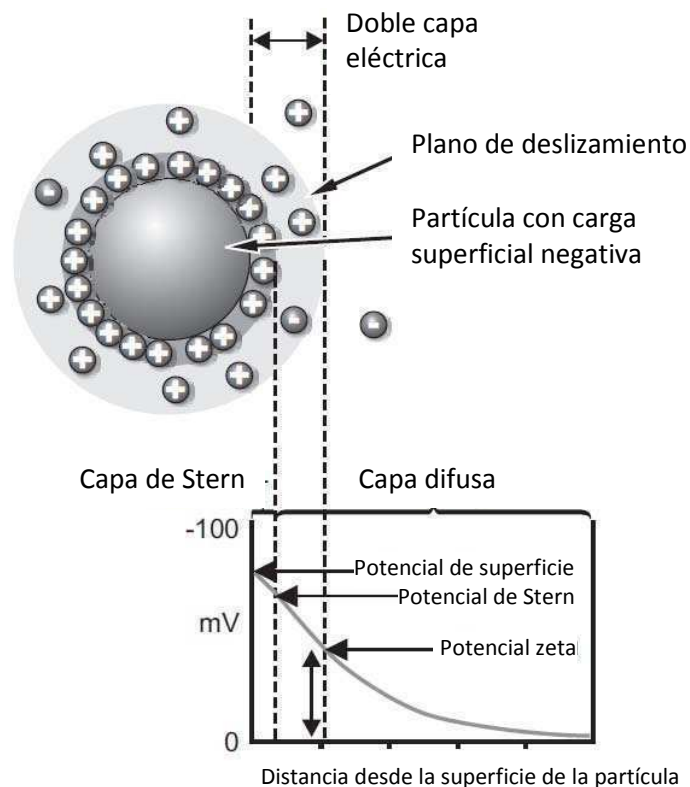


Figura 3: Esquema de una partícula cargada y de la doble capa que la rodea.

Fuente: Malvern Instruments Ltd. (2013).

2.7.2. Dispersión estática de luz (SLS)

Los diámetros promedio y las curvas de distribución de tamaño de partícula se determinaron por también por SLS en un equipo Mastersizer 2000 con una unidad de dispersión Hydro 2000MU provisto con un láser He-Ne (633 nm) (Malvern Instruments, Worcestershire, Inglaterra). El rango de medición del equipo se encuentra entre los 0,1 μm a 1000 μm . La velocidad de la hélice se mantuvo en 1800 rpm. Se utilizó el índice de refracción (IR) de la fase dispersa (1,354) y su parámetro de absorción (0,001). El tamaño de partícula se informa como diámetros promedio [D3,2] y [D4,3]. [D3,2] es el diámetro promedio de volumen-superficie o diámetro de Sauter ($[D3,2] = \sum n_i d_i^3 / \sum n_i d_i^2$) donde n_i es el número de partículas de diámetro d_i (Huang, Kakuda, y Cui, 2001; Leroux, Langendorff, Schick, Vaishnav, y Mazoyer, 2003). [D4,3] es el diámetro promedio de volumen equivalente o diámetro De Broucker ($[D4,3] = \sum n_i d_i^4 / \sum n_i d_i^3$) donde n_i es el número de partículas de diámetro d_i (Galazka, Dickinson, y Ledward, 1996; Gu, Decker, y McClements, 2005; Güzey, Kim, y McClements, 2004; Huang y col, 2001; Leroux y col, 2003).

2.8. Determinación de la solubilidad

2.8.1. Sólidos solubles

Se usó el procedimiento de Martínez, Carrera Sánchez, Rodríguez Patino, y Pilosof (2009). Las muestras preparadas al 10% p/p fueron sonicadas y luego diluidas al 2% p/p en el buffer correspondiente (estándar o desnaturizante). Las soluciones control se prepararon directamente al 2% p/p. Las muestras se centrifugaron a 12857 x g durante 30 min a temperatura ambiente. El sobrenadante que contenía la fracción soluble total se liofilizó durante 48 h en un liofilizador Stokes (Barber-Colman, Philadelphia PA 19120, USA), con una placa condensadora a una temperatura de -40 $^{\circ}\text{C}$ y una presión menor a 100 mm Hg. Luego, se pesaron las muestras y la solubilidad se expresó como:

$$\text{Solubilidad (\%)} = \frac{\text{sólidos solubles totales (g)}}{\text{sólidos totales (g)}} \times 100 \quad (4)$$

2.8.2. Proteína soluble

La concentración de proteína soluble se determinó por el método de Biuret. Este método se basa en la medición de la absorbancia del complejo púrpura-violeta formado entre la proteína y el ión Cu^{2+} (Gornall, Bardawill, y David, 1949; Pilosof, 2000) y posee una sensibilidad de 0,1 a 10 mg de proteína/ml (Layne, 1957).

La muestra se preparó en buffer fosfato según la Sección 2.6. Luego, para la determinación se preparó una solución conteniendo 1 ml de muestra y 4 ml de reactivo de Biuret (solución acuosa de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 6 mM, tartrato de Na y K tetrahidrato, $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 21 mM y e NaOH 0,75 M). Se incubó durante 20 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia de las muestras a $\lambda = 550$ nm. Se calculó mediante la curva patrón de albúmina utilizada para la calibración la concentración de proteína soluble.

2.9. Medición de la viscosidad

Se obtuvieron las curvas de flujo de las soluciones control y tratada por USAI en un viscosímetro de cono y plato DV-LVT Brookfield a 25 °C. Se usó un cono CP-41 con un ángulo de 3°. El rango de velocidad de deformación empleado fue dependiente de cada muestra (1/s). Las curvas de flujo se ajustaron al modelo de Ostwald o la ley de la potencia de acuerdo a:

$$\tau = k \times \dot{\gamma}^n \quad (5)$$

donde τ es la esfuerzo de corte, $\dot{\gamma}$ es la velocidad de deformación, n es el índice de comportamiento de flujo y k es el índice de consistencia.

2.10. Propiedades espumantes

2.10.1. Formación de la espuma

Se batieron 20 ml de solución de EW al 5% p/p (control y USAI) a 25 °C en un tubo graduado (diámetro 3 cm) durante 3 min con un agitador (Griffin & George, Ltd., Great Britain) a 2500 rpm. Se calculó la capacidad de espumado (CE) según la siguiente ecuación (Martinez, Baeza, Millán, y Pilosof, 2005):

$$CE (\%) = \frac{V_e - V_i}{V_i} 100 \quad (6)$$

donde V_e es el volumen de espuma y V_i es el volumen inicial de solución.

2.10.2. Drenado y colapso de la espuma

Luego, se registró la variación en el tiempo del volumen de líquido drenado hacia el fondo del tubo y la altura de la espuma (colapso).

Para ajustar los datos de drenado en función del tiempo se utilizó el siguiente modelo matemático empírico (Carp, Bartholomai, y Pilosof, 1997):

$$v(t) = \frac{V t^n}{c + t^n} \quad (7)$$

donde $v(t)$ es el volumen drenado a tiempo t ; V es el máximo volumen drenado; n es una constante relacionada con la forma sigmoidea de la curva; y c es una constante relacionada al tiempo medio de drenado mediante $c^{1/n}$.

La constante de velocidad de drenado (K_{dr}) se calculó de acuerdo con Carp y col (1997):

$$K_{dr} = \frac{n}{V c^{1/n}} \quad (8)$$

Se informa el valor promedio de dos repeticiones, como mínimo.

2.11. Propiedades de emulsificación

2.11.1. Preparación de la emulsión

Se emulsificó una solución de EW al 2% p/p con aceite de girasol comercial en una relación 80:20, utilizando un homogeneizador Ultraturrax T-8 (IKA-Labortechnik, Staufen, Alemania). La velocidad del rotor (S8N-5G, Staufen, Alemania) se ajustó en 25000 rpm y el tiempo de homogeneización fue de 3,5 min.

2.11.2. Determinación del tamaño de gota inicial

Los diámetros promedio y las curvas de distribución de tamaño de gota de las emulsiones se determinaron por SLS utilizando la misma metodología que se empleó para las dispersiones (Sección 2.7.2). Se utilizó el índice de refracción (RI) del aceite (1,473) y su parámetro de absorción (0,000). El tamaño de gota se informa como

diámetros promedio [D3,2] y [D4,3]. El diámetro [D3,2] brinda una medida del diámetro promedio en donde se encuentran la mayoría de las gotas. El diámetro [D4,3] está relacionado con cambios en el tamaño de partícula que involucran procesos de desestabilización.

También se informa el índice de polidispersidad (IP), que representa el ancho de la distribución y se calcula como:

$$IP = \frac{d(v,0.9) - d(v,0.1)}{d(v,0.5)} \quad (9)$$

donde $d(v,0.9)$, $d(v,0.5)$ y $d(v,0.1)$ son lecturas de volumen “porcentuales” estándar del análisis (BS2955, 1993).

El área interfacial específica o área superficial por unidad de masa de la fase dispersa, es calculada por el *software* del equipo mediante el valor del diámetro promedio [D3,2] (Carrera Sanchez y Rodriguez Patino, 2005; Cornec y col, 1998).

Los parámetros informados corresponden al promedio de dos mediciones realizadas de cada muestra.

2.11.3. Estabilidad de las emulsiones

Se evaluó la estabilidad global de las emulsiones con un analizador vertical de dispersiones coloidales Turbiscan MA 2000 (Formulaction, Toulouse, Francia), que permite evaluar la desestabilización global de emulsiones, suspensiones y espumas sin dilución, con tamaños de partícula entre 0,05 a 5000 μm y una concentración de 60 % v/v, determinando los diferentes mecanismos que la conducen.

Este equipo consiste de una cabeza lectora que se mueve a lo largo de un tubo de vidrio donde la muestra es almacenada estacionariamente durante un cierto período de tiempo. La cabeza lectora es una fuente pulsante de radiación electromagnética en el infrarrojo cercano ($\lambda = 850 \text{ nm}$), conjuntamente con dos detectores sincrónicos: el de transmitancia, que detecta la radiación transmitida a través de la muestra y el de *backscattering*, que recibe la radiación dispersada por la muestra en una dirección de 135° respecto a la fuente (Pan, Tomás, y Añón, 2002) (Figura 4).

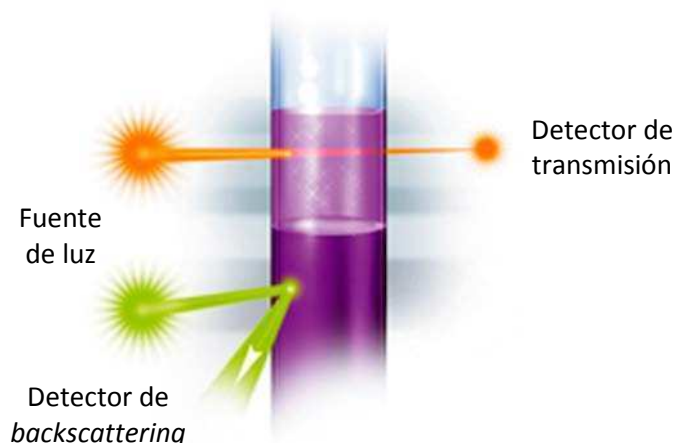


Figura 4: Principio de medición del analizador vertical de dispersiones.

Fuente: Formulacion S.A. (2014)

Este equipo permite medir la desestabilización en emulsiones concentradas, las cuales son medios ópticamente opacos. El principio de medición del equipo se basa en la teoría de dispersión múltiple de luz: los valores de transmitancia (T%) y de *backscattering* (BS %) dependen no sólo del diámetro de las gotas, sino también de la fracción volumétrica de la fase dispersa (ϕ). El principio de medición del analizador óptico vertical ha sido exhaustivamente estudiado por (Mengual, Meunier, Cayré, Puech, y Snabre, 1999). La cabeza lectora adquiere los datos de transmitancia (T %) y de *backscattering* (BS %) cada 40 μm a lo largo de la celda, en una longitud máxima de 80 mm, realizando un barrido vertical de la emulsión contenida en la celda. Los resultados son presentados mediante un software como curvas de T % y de BS % en función de la altura del tubo. La adquisición de datos puede repetirse a lo largo del tiempo de una forma programada y los resultados son expresados en función del tiempo. El análisis de los perfiles de T % y BS % obtenidos permite determinar la cinética para un dado mecanismo de desestabilización (cremado o coalescencia) si se elige adecuadamente la zona del tubo (Pan y col, 2002).

Inmediatamente después de preparar la emulsión, se monitorearon los perfiles de *backscattering* (%BS) a lo largo del tubo cada 2 minutos durante la primera hora y luego de almacenar la muestra a temperatura ambiente por 24 h se tomó una medición más.

Para facilitar el cálculo de la cinética de desestabilización los perfiles de *backscattering* a cada tiempo se comparan con una referencia, que es el perfil correspondiente al tiempo 0 del almacenamiento. Por lo tanto, la diferencia del perfil a un tiempo dado y a tiempo 0 da origen al perfil de ΔBS . Cuando ocurre cremado-floculación en una emulsión se observa en las curvas de ΔBS un pico a una altura comprendida entre 0-20 mm. La cinética de desestabilización por cremado-floculación se evaluó midiendo el ancho del pico a 50% de la altura del último tiempo de medición. La pendiente de la zona lineal en el gráfico del ancho de pico en función del tiempo da una idea de la velocidad de migración (Álvarez Cerimedo, Iriart, Candal, y Herrera, 2010).

2.12. Dinámica de gelificación

2.12.1. Viscoelasticidad dinámica

Las determinaciones reológicas se realizaron en un reómetro oscilatorio dinámico Paar Physica MCR 300 con esfuerzo de corte controlado. Se utilizó un sistema de platos paralelos (PP30/S) separados por un espacio de 1 mm, entre los cuales se colocó aproximadamente 0,7 ml de soluciones de EW al 10% p/p, para llenar completamente el espacio entre ellos. La temperatura del plato inferior fue controlada mediante un sistema Peltier y un baño termostatzado (Viscotherm VT2, Paar Physica).

Luego de colocada la solución, se aplicó silicona líquida con el objetivo de impedir la evaporación de agua de la muestra y evitar la adherencia de la misma al sistema de platos. Las condiciones de medición fueron evaluadas en la región viscoelástica lineal y se definieron las siguientes: frecuencia, 1 Hz; deformación, 0,01 %.

Durante las mediciones se registró la evolución del módulo de almacenamiento o elástico (G'), el módulo de pérdida o viscoso (G''), y la tangente del ángulo de pérdida ($\tan \delta$), que es igual a la relación entre G''/G' .

La transición de una estructura viscosa (sol) a una viscoelástica (gel) durante el calentamiento es determinada por el punto de cruce entre el módulo viscoso (G'') y el elástico (G'), momento en el cual el ángulo de desfasaje es de 45° y la $\tan \delta$ es igual a 1. Luego de este punto de cruce o "punto gel" G' asciende notoriamente y se observa el consecuente descenso de la $\tan \delta$.

Según las condiciones de calentamiento, puede determinarse la temperatura de transición (T_{gel}), si se registra la variación de los parámetros mediante el uso de una rampa a una baja velocidad de calentamiento. La rampa de temperatura utilizada fue un aumento desde una temperatura inicial de 25 °C hasta 90 °C a una velocidad de 5 °C/min, se mantuvo a 90 °C durante 10 minutos, se disminuyó la temperatura de 90 °C a 25 °C a una velocidad de 25 °C/min y por último se mantuvo otros 10 minutos a 25 °C.

2.12.2. Dependencia de la frecuencia

Luego de terminada la medición, antes de sacar la muestra, se realizó un barrido de frecuencia a una deformación de 1 %, entre 0,01 y 10 Hz. La dependencia del módulo elástico con la frecuencia da información sobre el tipo de estructura que presenta el gel. El grado de dependencia de G' con la frecuencia puede ser expresado por medio de la constante n , según la ecuación propuesta por Egelandstad, Fretheim, y Harbitz (1986):

$$\log G' = n \times \log f + K \quad (10)$$

donde, G' es el modulo elástico, f la frecuencia de oscilación, K una constante y n es la pendiente en un gráfico log-log de G' versus f . Un gel covalente tiene un $n = 0$, mientras que uno físico tiene un $n > 0$. La pendiente entonces una medida de la similitud del gel a un gel covalente (Egelandstad y col, 1986; Stading y Hermansson, 1990).

2.13. Cinética de agregación térmica

2.13.1. Preparación de las muestras

Se calentaron soluciones de EW (5% p/p), control y tratadas por USAI, en un baño seco (Thermoline Dri-Bath, Barnstead, USA) a 70, 75, 80 and 85 °C por diferentes períodos de tiempo desde 0 a 25 min. Luego de finalizado el calentamiento, las muestras fueron enfriadas inmediatamente en un baño de hielo para su posterior análisis.

2.13.2. Determinación del tamaño de partícula

Se determinó el tamaño de partícula de las muestras calentadas (control y USAI) por SLS como se describió en la Sección 2.7.2.

Se informan los promedios de dos mediciones realizadas de cada muestra.

2.14. Generación de nanocarriers de AF

Se seleccionaron dos tratamientos a pH 3 para obtener nanopartículas de EW y evaluar su unión con AF: (A) USAI (sin calentamiento), 20 min y (B) TS, 85 °C, 20 min. Se agregaron 100 µl de solución de AF (1% w/w, pH 7) a 4 ml de solución de nanopartículas, con agitación continua durante 5 min. Las mezclas se cubrieron con papel aluminio hasta su uso y se prepararon diariamente para cada experimento.

2.15. Microscopía óptica

Se tomaron imágenes de las soluciones de AF a pH 3 y de los nanocarriers formados según la Sección 2.14 con un microscopio óptico Olympus Corp. modelo BX43 (Tokyo, Japón) equipado con una cámara digital (Q-Color 3C, Canadá). Se empleó el objetivo de 40X y las muestras se observaron directamente sin agregado de colorantes. Se adquirieron imágenes digitales en formato TIFF en 1024 x 1024 píxeles de resolución mediante el *software* (Qcapture pro® 6.0, QImaging, Canadá) también de Olympus Corp.

2.16. Evaluación del grado de unión de AF

El porcentaje de AF unido a las nanopartículas de EW se determinó por diferencia entre la cantidad de AF agregada y la no asociada (AF libre). Esta se determinó por ultrafiltración con filtros de centrifuga de corte molecular de 10K (Amicon® Ultra-15, Millipore, Ireland). Primero, se centrifugaron 5 ml de las mezclas o del blanco (AF 0,025%, pH 7) en tubos de plástico de 15 ml (12857 x g, 15 min, 20 °C). A continuación, se trasvasaron 3 ml del sobrenadante al filtro (previamente tarado), se pesó y se centrifugó (5000 x g, 15 min, 20 °C). Se pesó el tubo donde se recuperó el filtrado. Este se diluyó al 50% en DMSO:H₂O (50:50) y se realizó la lectura espectrofotométrica de su absorbancia a 365 nm. Se realizó una curva de calibración de AF (Zhang y col, 2011). La cantidad de AF unido (%AFU) se calculó, considerando la densidad de las soluciones igual a la del agua, de la siguiente manera:

$$\% \text{ AFU} = \left[1 - \frac{(M_1 C_1 + F_{\text{ad}})}{M_0 C_0} \right] \times 100 \quad (11)$$

donde, $F_{\text{ad}} = M_{0,F}C_{0,F} - M_{1,F}C_{1,F}$ es la cantidad de AF adsorbido en la membrana del filtro; $M(X)$ es la masa y $C(X)$ es la concentración de (X): (0) la solución inicial; (1) el filtrado; (0,F) la solución del blanco inicial; (1,F) el filtrado del blanco. Se informan los valores de dos duplicados por muestra.

2.17. Microscopía láser confocal

Se tomaron imágenes de los sistemas con y sin AF con un microscopio láser confocal (Model FV300, Olympus, UK), provisto de un láser He-Ne (543 nm). Se usó un objetivo PLAN APO 60X y un zoom digital de 2.5X. Se adquirieron imágenes digitales en formato TIFF en 1024 x 1024 píxeles de resolución. Se marcó la proteína de manera no covalente con unas gotas de solución de rodamina B al 10% p/p ($\lambda_{\text{exc}} = 560 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em max}} = 625 \text{ nm}$).

2.18. Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Se adsorbieron 5 μl de muestra en una superficie de mica clivada (adherida a discos de acero). Se incubó a temperatura ambiente durante 5 min y luego se enjuagó con 1 ml de agua Milli-Q (Millipore, Ireland) y se secó con una corriente de nitrógeno filtrado y seco. En algunos casos, las muestras fueron secadas posteriormente bajo vacío. Las imágenes se tomaron en modo *tapping* en aire en un microscopio Veeco-Digital Instruments modelo Multimode (MMAFM) NanoScope IIIa-Quadrex, con un escáner vertical J, que tiene un rango máximo lateral de 150 μm . Se utilizaron cantilevers estándares de silicio de 125 μm de largo y se ajustó su frecuencia de oscilación a 280-320 nm. Las muestras fueron escaneadas a 3-5 líneas/s. Las imágenes fueron procesadas aplicándoles *flattering* mediante el *software* Nanoscope, para eliminar el ruido de fondo.

2.19. Mediciones de fluorescencia

Para demostrar la interacción entre las nanopartículas de EW y FA fueron llevadas a cabo mediciones fluorimétricas. El espectro de emisión de fluorescencia fue registrado utilizando un espectrofluorómetro Kontron S25 a $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ y λ_{em} de 320 a 550 nm.

Para todas las muestras se utilizaron diluciones de 1:200. Todas las mediciones fueron realizadas en cubetas estándar de cuarzo de 10 mm. Se informan los valores promedio de dos duplicados por muestra.

2.20. Deshidratación de los nanocarriers

Las mezclas fueron liofilizadas durante 24 h en un liofilizador ALPHA 1-4 LD (Christ, Osterode am Harz, Germany). Luego, el polvo seco fue resuspendido en agua bidestilada a la misma concentración original. Se determinó la distribución de tamaño de partícula y el potencial zeta (Sección 2.7.1) y se tomaron imágenes con el microscopio confocal (Sección 2.17), como se describió anteriormente.

2.21. Digestión gastrointestinal *in vitro*

Se realizó según el método de Moreno, Mellon, Wickham, Bottrill, y Mills (2005) con algunas modificaciones. Se diluyeron 5 ml de muestra en 4 ml de una solución que simula el fluido gástrico (SGF, NaCl 0,15M, pH 2,5). Se ajustó el pH a 2,5 con HCl 1M. Se añadió una solución de pepsina (P7000) en una proporción de 182U de enzima por mg de proteína (diluida en 1 ml de SGF) y se incubó a 37 °C por 2 h, con agitación continua. Al finalizar esta etapa se ajustó el pH a 7,0 con NaHCO₃ 1M, con un volumen máximo de 1 ml. En el caso de requerirse menor volumen, se completó hasta 1 ml con agua bidestilada. Luego, se agregaron 3 ml de una solución que simula el fluido intestinal (SIF, 39 mM K₂HPO₄, 150 mM NaCl y 30 mM CaCl₂, pH 7,0). Luego, se adicionaron 80 mg de sales biliares (B3883) (en 1 ml de SIF), tripsina (T8003) y α -quimotripsina (C4129) en una proporción de 34,5U y 0,44U de enzima por mg de proteína, respectivamente (cada una disuelta en 0,5 ml de agua bidestilada). Las muestras se incubaron a 37 °C durante 2 h y, al finalizar, la tripsina y la α -quimotripsina se inactivaron en un baño de agua a 80 °C durante 5 min. Las soluciones digeridas fueron liofilizadas.

2.22. Ensayo microbiológico

Lactobacillus casei subsp. rhamnosus (NCIMB10463) fue activada en medio MRS (Britania, Argentina) e incubada a 37 °C durante 24 h. Luego, el cultivo fue centrifugado (8000 x g, 5 min, 21 °C) y las células se lavaron y resuspendieron a su volumen original con solución fisiológica (0,85% m/v). La suspensión celular fue

inoculada al 2% (v/v) en un medio libre de vitamina FACM (Folic Acid Casei Medium, Difco, Argentina), y se incubó a 37 °C durante 24 h. A continuación, el cultivo fue lavado nuevamente e inoculado al 2% (v/v) en el medio FACM doblemente concentrado (2X), al que se le agregaron diferentes concentraciones de AF comercial (Sigma, Argentina) o la muestra de estudio (digeridos), en el mismo volumen que el medio 2X. La cepa con la muestra o el AF fue incubada durante 48 h a 37 °C y se midió la densidad óptica a 580 nm.

2.23. Análisis estadístico

Todas las determinaciones fueron realizadas en duplicado, y cada valor representa el promedio de al menos dos mediciones de dos tratamientos de ultrasonido independientes. Las diferencias significativas entre los parámetros estudiados de las muestras fueron determinadas por análisis de varianza (*One Way ANOVA*) usando el procedimiento de modelo lineal (Statgraphics 3.0). Se utilizó un nivel de alfa de 0,05 ($p < 0,05$) para determinar la significancia. Los valores estadísticamente diferentes son indicados con diferentes superíndices.

3. Referencias

- Álvarez Cerimedo, M. S., Iriart, C. H., Candal, R. J., & Herrera, M. L. (2010). Stability of emulsions formulated with high concentrations of sodium caseinate and trehalose. *Food Research International*, 43(5), 1482-1493.
- AOAC. (1980). *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists* (13th ed.). Washington DC, USA.
- BS2955. (1993). Glossary of terms relating to particle technology, British Standards Institution. In.
- Cárcel, J. A., Benedito, J., Bon, J., & Mulet, A. (2007). High intensity ultrasound effects on meat brining. *Meat Science*, 76(4), 611-619.
- Carp, D. J., Bartholomai, G. B., & Pilosof, A. M. R. (1997). A kinetic model to describe liquid drainage from soy protein foams over an extensive protein concentration range. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 30(3), 253-258.
- Carrera Sanchez, C., & Rodriguez Patino, J. M. (2005). Interfacial, foaming and emulsifying characteristics of sodium caseinate as influenced by protein concentration in solution. *Food Hydrocolloids*, 19, 406-416.
- Cornec, M., Wilde, P., Gunning, P., Mackie, A., Husband, F., Parker, M., & Clark, D. (1998). Emulsions stability as affected by competitive adsorption between an oil-soluble emulsifier and milk proteins at the interface. *Journal of Food Science*, 63, 39-43.
- Egelandsdal, B., Fretheim, K., & Harbitz, O. (1986). Dynamic rheological measurements on heat-induced myosin gels: An evaluation of the method's suitability for the filamentous gels. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 37(9), 944-954.
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82(1), 70-77.
- Formulation S.A. (2014). *Turbiscan MA 2000*. Disponible en: www.formulaction.com. Último acceso: 29 de enero de 2014.
- Galazka, V. B., Dickinson, E., & Ledward, D. A. (1996). Effect of high pressure on the emulsifying behaviour of β -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, 10(2), 213-219.
- Gornall, A. J., Bardawill, C. J., & David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 177, 751-766.
- Gu, Y. S., Decker, A. E., & McClements, D. J. (2005). Production and characterization of oil-in-water emulsions containing droplets stabilized by multilayer membranes consisting of β -lactoglobulin, l-carrageenan and gelatin. *Langmuir*, 21(13), 5752-5760.
- Güzey, D., Kim, H. J., & McClements, D. J. (2004). Factors influencing the production of o/w emulsions stabilized by β -lactoglobulin-pectin membranes. *Food Hydrocolloids*, 18(6), 967-975.
- Huang, X., Kakuda, Y., & Cui, W. (2001). Hydrocolloids in emulsions: Particle size distribution and interfacial activity. *Food Hydrocolloids*, 15(4-6), 533-542.
- Kato, A., & Nakai, S. (1980). Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 624(1), 13-20.
- Kimura, T., Sakamoto, T., Leveque, J.-M., Sohmiya, H., Fujita, M., Ikeda, S., & Ando, T. (1996). Standardization of ultrasonic power for sonochemical reaction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 3(3), S157-S161.

- Layne, E. (1957). Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods in Enzymology*, 10, 447-455.
- Leroux, J., Langendorff, V., Schick, G., Vaishnav, V., & Mazoyer, J. (2003). Emulsion stabilizing properties of pectin. *Food Hydrocolloids*, 17(4), 455-462.
- Malvern Instruments Ltd. (2012). *A basic guide to particle characterization*. Disponible en: www.malvern.com
- Malvern Instruments Ltd. (2013). *Zetasizer nano user manual*. United Kingdom: Malvern Instruments Ltd.
- Martinez, K. D., Baeza, R. I., Millán, F., & Pilosof, A. M. R. (2005). Effect of limited hydrolysis of sunflower protein on the interactions with polysaccharides in foams. *Food Hydrocolloids*, 19(3), 361-369.
- Martínez, K. D., Carrera Sánchez, C., Rodríguez Patino, J. M., & Pilosof, A. M. R. (2009). Interfacial and foaming properties of soy protein and their hydrolysates. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2149-2157.
- Mengual, O., Meunier, G., Cayré, I., Puech, K., & Snabre, P. (1999). TURBISCAN MA 2000: multiple light scattering measurement for concentrated emulsion and suspension instability analysis. *Talanta*, 50(2), 445-456.
- Moreno, F. J., Mellon, F. A., Wickham, M. S. J., Bottrill, A. R., & Mills, E. N. C. (2005). Stability of the major allergen Brazil nut 2S albumin (Ber e 1) to physiologically relevant in vitro gastrointestinal digestion. *FEBS Journal*, 272(2), 341-352.
- Pan, L. G., Tomás, M. C., & Añón, M. C. (2002). Effect of sunflower lecithins on the stability of water-in-oil and oil-in-water emulsions. *Journal of Surfactants and Detergents*, 5(2), 135-143.
- Pilosof, A. M. R. (2000). Solubilidad. En A. M. R. Pilosof & G. B. Bartholomai (Eds.), *Caracterización funcional y estructural de proteínas* (pp. 31-40). Buenos Aires, Argentina: Eudeba.
- Raso, J., Mañas, P., Pagán, R., & Sala, F. J. (1999). Influence of different factors on the output power transferred into medium by ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 5(4), 157-162.
- Roos, Y., & Karel, M. (1991). Phase transitions of mixtures of amorphous polysaccharides and sugars. *Biotechnology Progress*, 7(1), 49-53.
- Shimada, K., & Cheftel, J. C. (1988). Determination of sulfhydryl groups and disulfide bonds in heat-induced gels of soy protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(1), 147-153.
- Stading, M., & Hermansson, A. M. (1990). Viscoelastic behaviour of β -lactoglobulin gel structures. *Food Hydrocolloids*, 4(2), 121-135.
- Štěpánek, P. (1993). *Dynamic Light Scattering. The Method and Some Applications*, 177-241.
- Zhang, Y., Li, J., Lang, M., Tang, X., Li, L., & Shen, X. (2011). Folate-functionalized nanoparticles for controlled 5-Fluorouracil delivery. *Journal of Colloid and Interface Science*, 354(1), 202-209.

Resultados

Capítulo I

*Efectos de los ultrasonidos de alta intensidad
en las propiedades moleculares, estructurales
y funcionales de la clara de huevo*

I.1. Determinación de la energía acústica

Los generadores ultrasónicos transforman la energía eléctrica en energía ultrasónica, que es una energía mecánica. La potencia ultrasónica o acústica se expresa usualmente como la potencia eléctrica de entrada o de salida desde o hacia el generador ultrasónico. Sin embargo, la eficiencia de la transformación de energía depende no sólo del equipamiento en sí mismo, sino también de las condiciones de ultrasonicación (Raso y col, 1999). Para poder comparar resultados informados por diferentes autores es necesario conocer las diferencias entre los parámetros de tratamiento y las metodologías empleadas en el tratamiento de USAI. Por lo tanto, la cantidad de energía acústica entregada al medio líquido no puede ser medida solamente determinando la cantidad de energía eléctrica empleada para producir la vibración mecánica. Como toda la energía transferida al líquido eventualmente se convierte en calor (Berlan y Mason, 1992), la potencia transferida al medio de tratamiento puede ser medida calorimétricamente, empleando la relación: $P = m C_p dT/dt$, tal como se explica en la Sección de Materiales y Métodos. Si esta potencia acústica se divide por la superficie de emisión de la sonda ultrasónica se obtiene lo que se conoce como intensidad acústica. Por ende, en primer lugar, se procedió a registrar la evolución de la temperatura con el tiempo de sonicación en una muestra de EW (Figura I.1), con el fin de calcular la energía acústica transferida a la muestra. Como se aprecia, la mayor velocidad de ascenso de la temperatura se produjo durante los primeros 5 min de tratamiento, y se alcanzó un máximo que no superó los 49 °C hasta el final del tratamiento. Esta temperatura es inferior a los umbrales para la desnaturalización térmica de las proteínas de la EW a los pHs estudiados (pH 3 y 7). Los umbrales de desnaturalización para la EW son de 56 °C, a pH 3,5 (Watanabe, Matsuda, y Nakamura, 1985) y de 60 °C, a pH 7 (Matsuda y col, 1981). Finalmente, se calculó la pendiente inicial (dT/dt) de la curva de temperatura en función del tiempo (Figura I.1) y, reemplazando los valores correspondientes en la ecuación dada, se calculó la potencia o energía acústica, que fue de $4,27 \pm 0,71$ W. Luego, se dividió por la superficie de emisión de la sonda, que tiene un diámetro de 3 mm y se obtuvo así el valor de la intensidad acústica, que fue de $60,4 \pm 10,0$ W cm⁻².

Por otra parte, dado que estudios previos habían demostrado que la temperatura del agua de la camisa no interfería en el aumento inicial de la temperatura (Kimura y col, 1996; Raso y col, 1999), la determinación de la potencia se realizó con circulación de agua a 0,5 °C dentro de la camisa termostatazada. De esta manera, fue posible determinar si las condiciones experimentales que se utilizarían para el procesamiento de las muestras eran eficientes para minimizar los efectos de calentamiento generados por el tratamiento. Para ello, al finalizar la sonicación el tubo con la solución tratada se dejó sumergido en el baño para determinar el tiempo necesario para restablecer su condición inicial de temperatura (25 °C). Se comprobó que, por efecto de la refrigeración, sólo se necesitarían 2 min para llevar las muestras a temperatura ambiente luego de finalizado el tratamiento.

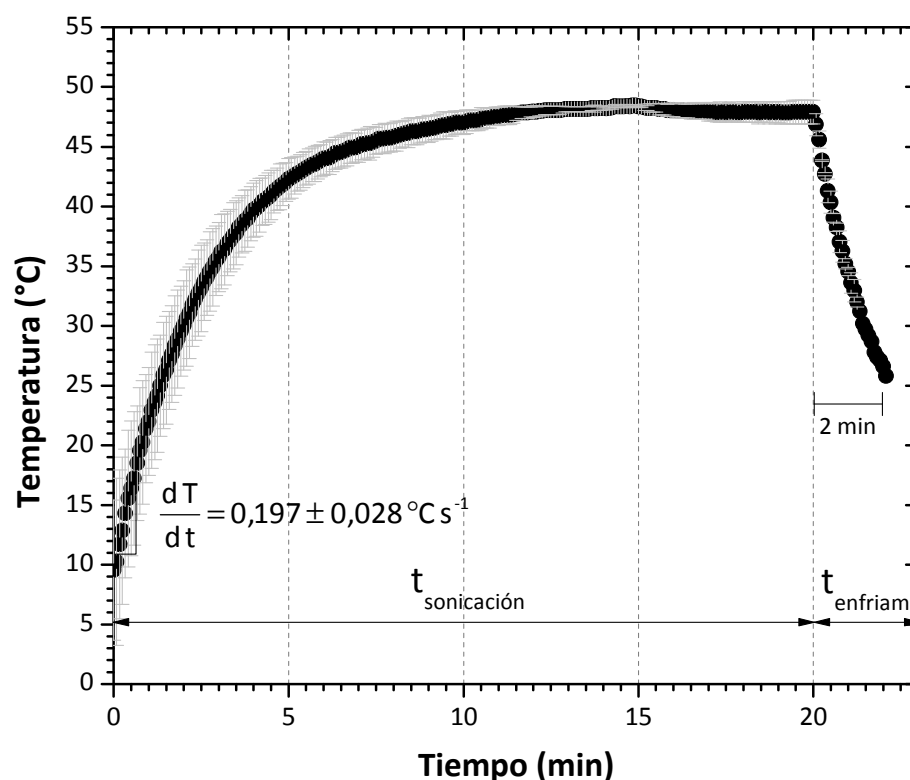


Figura I.1: Evolución de la temperatura de una solución de EW al 10% p/p en función del tiempo de sonicación y del tiempo de enfriamiento (Condiciones USAI: 20 kHz de frecuencia, 20% de amplitud, 20 min de tratamiento).

En los ensayos siguientes se realizó un tratamiento ultrasónico en soluciones de EW con la sonda ultrasónica de 20 kHz de frecuencia, utilizando un 20% de amplitud y

durante 20 min. La elección del tiempo de sonicación se basó en resultados de estudios anteriores realizados en el grupo de investigación, en los que se determinó que los mayores efectos se produjeron hasta los 20 min de tratamiento, sin que se observaran mayores cambios luego de ese tiempo. En esta primera serie de ensayos las soluciones de EW fueron sonicadas en las condiciones naturales en las que se encuentra en el huevo, por lo tanto, el polvo deshidratado fue resuspendido a una concentración de 10% y el pH no se ajustó, presentando un valor de $7,0 \pm 0,1$.

I.2. Efecto de los USAI en las propiedades moleculares y estructurales de la EW

I.2.1. Conductividad eléctrica

La conductividad de las soluciones de EW control fue similar a los valores informados previamente en la literatura, de $7,1 \pm 0,7$ mS/cm (Wang, Tang, Wang, y Swanson, 2009) y $7,82 \pm 0,16$ mS/cm (Ragni, Al-Shami, Mikhaylenko, y Tang, 2007). Este parámetro no se modificó con el tratamiento USAI (Tabla I.1). Se ha reportado que la generación de radicales libres durante el tratamiento con USAI, entre ellos los radicales hidroxilo, podrían ocasionar un incremento en la conductividad de la solución (Petrier, Jeunet, Luche, y Reverdy, 1992). Sin embargo, en las condiciones de tratamiento empleadas en este trabajo no se manifestó este fenómeno. En contraste, Jambrak y col (2008) han observado un aumento en la conductividad de suspensiones de proteínas de suero lácteo luego de la sonicación, utilizando un tratamiento con una sonda ultrasónica de 20 kHz. Los autores atribuyeron el aumento a la formación de especies reactivas, como radicales libres, que podrían producir reacciones de oxidación. Sin embargo, al emplear baños ultrasónicos de 40 o 500 kHz obtuvieron una disminución en la conductividad de las muestras. En este caso, explicaron que el descenso se debía a la presencia de agregados iónicos que no participan en el proceso de conducción, y a la vez a un aumento en la viscosidad que podía resultar en una menor conductividad. Aunque estos autores emplearon, entre otros, un dispositivo y una amplitud similares a las usadas en este estudio, el volumen de solución y los tiempos de sonicación fueron diferentes, 100 ml y 30 min, respectivamente, lo que podría originar las diferencias expuestas. A su vez, los resultados discrepantes pueden deberse a que las proteínas utilizadas son diferentes y, por lo tanto, podrían presentar un comportamiento distinto frente al mismo tratamiento.

1.2.2. Grupos sulfhidrilo libres

Como es sabido, los grupos sulfhidrilo y las uniones disulfuro tienen una gran influencia en las propiedades funcionales de las proteínas alimentarias y juegan un papel importante en la formación de estructuras relativamente rígidas como los geles proteicos. Los puentes disulfuro se forman durante la gelificación térmica por medio de la oxidación de grupos sulfhidrilo, e influyen en la estructura del gel y su resistencia mecánica (Shimada y col, 1988). Sin embargo, los entrecruzamientos disulfuro intermoleculares no son necesarios para la gelificación, pero pueden producir geles más estables (Mine, 1995). La ovoalbúmina contiene 1 unión disulfuro y 4 grupos SH libres que se encuentran ocultos en el interior de la estructura proteica (Doi y col, 1997; Onda, Tatsumi, Takahashi, y Hirose, 1997a, 1997b; Takahashi y Hirose, 1992) y, por lo tanto, no son reactivos al DTNB cuando la proteína se encuentra en su estado nativo (Diez, Osuga, y Feeney, 1964). En consecuencia, en las muestras de EW en ausencia de agentes desnaturizantes, no se observó una reacción evidente con el DTNB. En cambio, en presencia de SDS y urea, como agentes desnaturizantes, el contenido de grupos SH totales de la EW fue de $50,53 \pm 0,61$ $\mu\text{moles/g}$ sólidos solubles (Tabla I.1), valor similar a los informados previamente, de 47,9-51,6 $\mu\text{mol/g}$ proteína (Beveridge, Toma, y Nakai, 1974; Howell y Taylor, 1995). Las muestras tratadas con USAI mostraron una muy leve, aunque significativa, disminución del contenido de grupos SH totales (Tabla I.1). La aplicación de USAI, ya sea porque produce focos de alta presión y temperatura de muy corta duración o por la generación de radicales libres, podría provocar la oxidación de una pequeña proporción de grupos sulfhidrilo, causando una disminución en el total de grupos libres dosados. Los grupos tiol inaccesibles pueden exponerse debido a la aplicación de USAI, lo que llevaría a la formación de uniones disulfuro inter e intramoleculares por medio del intercambio tiol-disulfuro y de reacciones de oxidación. Los datos encontrados en la literatura para otras proteínas sonicadas resultaron disímiles. Gülseren y col (2007) encontraron que la cantidad grupos SH libres en la BSA disminuyó con el tiempo de sonicación (hasta 90 min, controlando la temperatura con un baño a 2 °C). Los investigadores argumentaron que la cavitación genera peróxido de hidrógeno que podría oxidar grupos funcionales susceptibles, entre ellos, los grupos SH. Por su parte, Huang, Kwok,

y Liang (2008) informaron que el contenido de grupos SH del inhibidor de tripsina de Browman-Birk (BBTI) no se alteró durante los primeros 5 min de sonicación, pero que el del inhibidor de tripsina de Kunitz (KTI) se incrementó linealmente con el tiempo de tratamiento a 20kHz y 25 ± 3 °C de temperatura, controlada mediante circulación de agua fría. De manera similar, Lei y col (2011) determinaron que la sonicación de ovotransferrina a 6 kHz, bajo condiciones pulsadas de USAI y control de temperatura por inmersión en un baño de hielo y agua, no afectó el contenido de grupos SH totales hasta los 480 s de tratamiento, pero luego de ese tiempo lo incrementó. Algunos autores explican la modificación en el contenido de grupos SH en términos de las características moleculares de cada proteína. La ovotransferrina contiene 15 uniones disulfuro, mientras que el BBTI posee 7 y el KTI posee 2 (Huang y col, 2008); la diferencia en el número de uniones disulfuro entre las proteínas podría justificar por qué la ovotransferrina necesita tiempos más largos y potencias ultrasónicas más altas (4-8 min a 60 kHz) para que se rompan dichas uniones. En resumen, resultados dispares pueden obedecer a muchas razones que operan simultáneamente, lo que incluye características moleculares como el número de uniones disulfuro y grupos SH en la molécula, el peso molecular, la probabilidad de que los grupos SH libres sean expuestos hacia el medio circundante y condiciones del procesamiento con USAI, tales como el tiempo, la potencia, el modo de aplicación, en pulsos o continuo y la temperatura de tratamiento.

Tabla I.1: Efecto de los USAI en la hidrofobicidad superficial (H_0), el contenido de grupos sulfhidrilo (SH) y la conductividad de soluciones de EW al 10% p/p.

Muestra	Control	Sonicada
Conductividad (mS/cm)	$6,48 \pm 0,21^a$	$5,75 \pm 1,12^a$
SH totales (μ moles/g sólidos solubles)	$50,53 \pm 0,61^a$	$47,94 \pm 1,62^b$
H_0 (u.a.)	$22,4 \pm 0,4^a$	$34,4 \pm 0,5^b$

Diferentes letras indican una diferencia significativa con $p < 0,05$.

Por otra parte, se han informado cambios reversibles en las proteínas de EW empleando otras tecnologías. Por ejemplo, Fernandez-Diaz, Barsotti, Dumay, y Cheftel

(2000) estudiaron los efectos de los pulsos eléctricos en soluciones de ovoalbúmina y clara de huevo dializada. Dichos autores encontraron que el procesamiento eléctrico indujo una desnaturalización parcial de la estructura proteica terciaria, exponiendo los cuatro grupos SH de la ovoalbúmina hacia la superficie. Sin embargo, cuando la solución de ovoalbúmina procesada eléctricamente era mantenida a 4 °C, se observaba que los grupos SH se volvían menos reactivos, lo que sugería que la desnaturalización parcial de la proteína o la ionización de grupos SH aumentada era transitoria y rápidamente reversible. Por otra parte, Van der Plancken, Van Loey, y Hendrickx (2005) registraron un aumento en la exposición de grupos SH libres de soluciones de EW al 10% v/v tratadas con altas presiones hidrostáticas (100-700 MPa). Además, observaron que en presencia de oxígeno los grupos SH eran oxidados y que las altas presiones (por encima de los 300 MPa) aumentaban la sensibilidad de estos grupos a la oxidación.

1.2.3. Propiedades térmicas

Los parámetros térmicos relacionados con la desnaturalización de la EW se obtuvieron mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). Los termogramas registrados exhibieron dos picos endotérmicos. A modo de ejemplo se muestra el termograma obtenido para la solución de EW sin tratamiento (Figura 1.2). El primer pico corresponde a la desnaturalización de la conalbúmina, que debido a su baja termoestabilidad aparece en la endoterma más baja. Según la literatura, la temperatura de desnaturalización para la conalbúmina aislada es de 61 °C. La segunda endoterma dominante a 84 °C corresponde a la ovoalbúmina. La endoterma correspondiente a la lisozima (temperatura de desnaturalización, 75 °C) no aparece como un pico separado, ya que se encuentra contenida dentro del primer pico (Donovan y col, 1975). Los picos endotérmicos correspondientes a cada proteína se compararon con los obtenidos para EW fresca, medida a la misma concentración de proteína (no mostrados). Se concluyó que luego del proceso de secado por *spray* utilizado por el fabricante para producir el aislado comercial, este conserva un 89% de la proteína total en estado nativo.

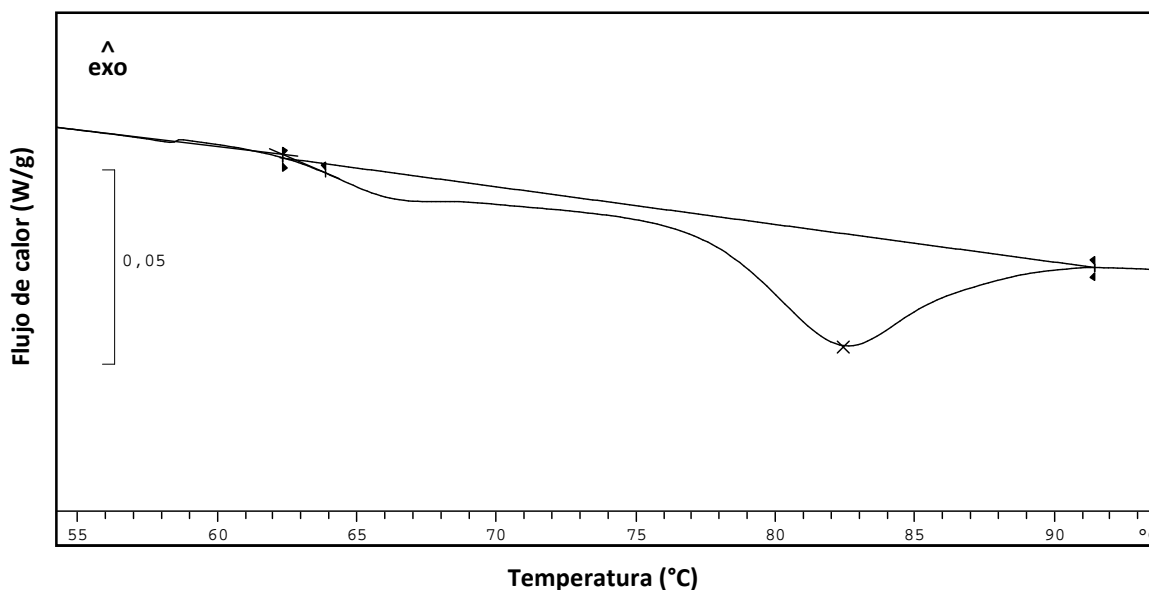


Figura I.2: Termograma obtenido por DSC para una solución de EW, 10% p/p.

La Tabla I.2 resume los parámetros térmicos obtenidos para EW sin y con tratamiento de USAI. Las temperaturas de los dos picos y la entalpía de desnaturalización no fueron modificadas por la aplicación de USAI. Gülseren y col (2007) encontraron para la albúmina de suero lácteo bovino, que las variaciones en las temperaturas de desnaturalización de muestras de proteína nativa y ultrasonicada no eran significativas, mientras que la entalpía de desnaturalización disminuía con el tiempo de ultrasonificación (de 15 a 45 min, temperatura controlada a 2 °C, 20 W cm⁻² de intensidad acústica). Los autores concluyeron que el tratamiento de soluciones de proteínas con USAI no causaba una desnaturalización completa de las mismas, pero las volvía más susceptibles al tratamiento térmico, de acuerdo a la disminución en la entalpía de desnaturalización. Chandrapala y col (2011) estudiaron los efectos de la sonicación en las propiedades estructurales y térmicas de las proteínas de un concentrado de lactosuero reconstituido al 5% p/p. En su trabajo, procesaron 60 ml de solución en un recipiente de vidrio con una camisa de enfriamiento, para mantener la temperatura a 6 ± 4 °C, empleando una sonda ultrasónica a una frecuencia de 20 kHz, 31 W de potencia y a una amplitud del 50%, durante 1, 5, 10, 20, 30 y 60 min. Observaron que la temperatura de desnaturalización no cambió luego de 20 o 30 min de tratamiento, como en el presente trabajo. Sin embargo, la entalpía de desnaturalización disminuyó cuando se sonicaron soluciones del concentrado por hasta 5 min, lo que atribuyeron a la destrucción de uniones entre las proteínas. A

tiempos de sonicación mayores a 5 min, encontraron un aumento en la entalpía, y sugirieron que podría deberse a una reagregación potencial. En consecuencia, concluyeron que la sonicación podría dar como resultado la disrupción de fuerzas intramoleculares de las proteínas debido a fuerzas de corte y podría conducir a la formación de agregados a tiempos de sonicación largos, tal como sucede por acción del calor, que a tiempos cortos puede romper interacciones de puente de hidrógeno, no polares, hidrofóbicas, entre otras, pero a tiempos prolongados se revierte este proceso y se promueve la agregación proteica. Finalmente, la potencia acústica empleada en el presente trabajo en la sonicación es mucho menor (4,27 W) que las empleadas por los dos trabajos mencionados anteriormente (aproximadamente 25,4 W y 31 W), y esta diferencia puede ser el motivo por el cual no se encontraron cambios en la entalpía de desnaturalización de la EW.

Tabla I.2: Efecto de los USAI en las temperaturas de transición (T_{pico}) y las entalpías de desnaturalización (ΔH_d) de soluciones de EW al 10% p/p.

Muestra	Control	Sonicada
$T_{\text{pico 1}}^*$ (°C)	$65,58 \pm 1,07^a$	$65,10 \pm 0,32^a$
$T_{\text{pico 2}}^{**}$ (°C)	$81,54 \pm 1,29^a$	$81,40 \pm 0,40^a$
ΔH_d (J/g proteína) [†]	$17,9 \pm 2,8^a$	$17,9 \pm 3,0^a$

Diferentes letras indican una diferencia significativa con $p < 0,05$.

* Desnaturalización de la conalbúmina.

** Desnaturalización de la ovoalbúmina.

† Entalpía total de desnaturalización, incluyendo ambos picos.

I.2.4. Hidrofobicidad superficial

La hidrofobicidad superficial (H_0) de las proteínas es una de las características estructurales que evidencia cambios en la conformación proteica debidos al procesamiento y que tienen gran impacto en las propiedades funcionales (Kato y col, 1980). La sonda fluorescente ANS ha sido extensamente empleada para evaluar la hidrofobicidad de proteínas. Esta sonda es prácticamente no fluorescente en agua, pero en solventes orgánicos no polares, o cuando se une a proteínas, exhibe una fuerte fluorescencia y un corrimiento hacia el azul de la fluorescencia máxima en

comparación con la del agua (Kosower y Kanety, 1983). En la Figura I.3 se pueden ver los espectros de emisión para cada concentración medida de EW control y sonicada. Los valores informados de intensidad de fluorescencia neta (IF_{neta}) se calculan mediante la diferencia entre las IF medidas para cada solución con y sin la sonda. Para ambas muestras, control y sonicada, se observa el efecto de corrimiento hacia el azul de la fluorescencia máxima, a medida que aumenta la concentración de proteína, lo que está relacionado con la disminución de la polaridad del medio circundante a la sonda ANS. Además, se observa que a cada concentración la muestra sonicada siempre presentó una mayor fluorescencia en comparación con la muestra control.

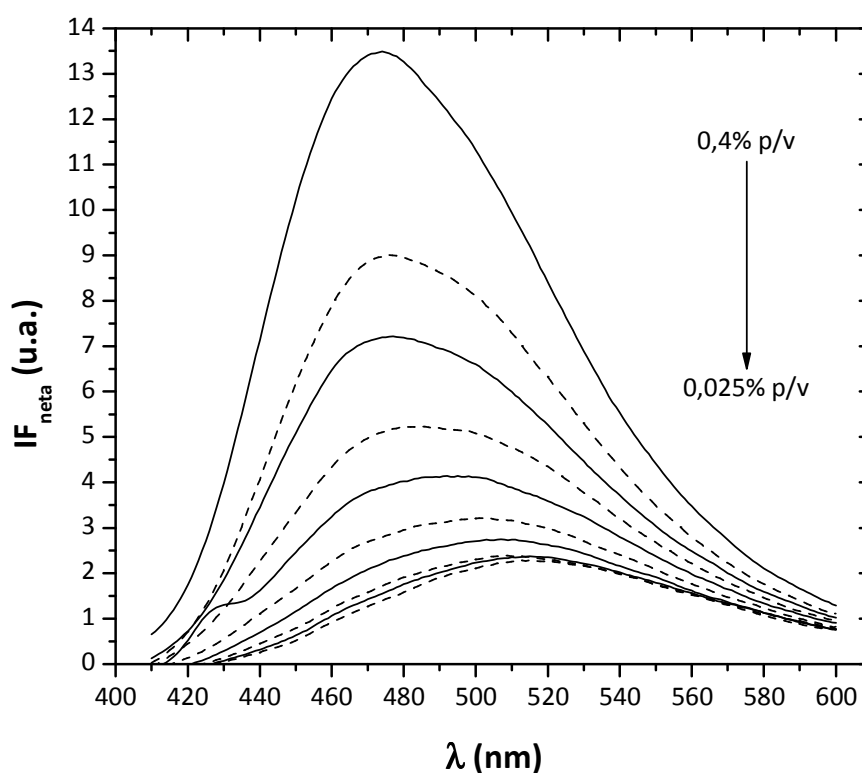


Figura I.3: Espectros de emisión de fluorescencia de soluciones de EW control (línea punteada) y sonicada (línea sólida) diluidas sucesivamente al medio desde 0,4 hasta 0,025% p/v.

A partir de los espectros de emisión se graficó la intensidad de fluorescencia máxima en función de la concentración de proteína, corregida según el método de Biuret (Figura I.4). El valor de longitud de onda correspondiente al máximo del espectro se fijó en 468 nm, independientemente del efecto de corrimiento, a fines de poder estandarizar la medición. Luego, se ajustaron los datos por medio de una regresión

lineal. El valor de la pendiente inicial se utiliza como índice de la H_0 de la proteína. Para la mayoría de las proteínas, la IF máxima neta se incrementa linealmente con la concentración (Hall, 1996).

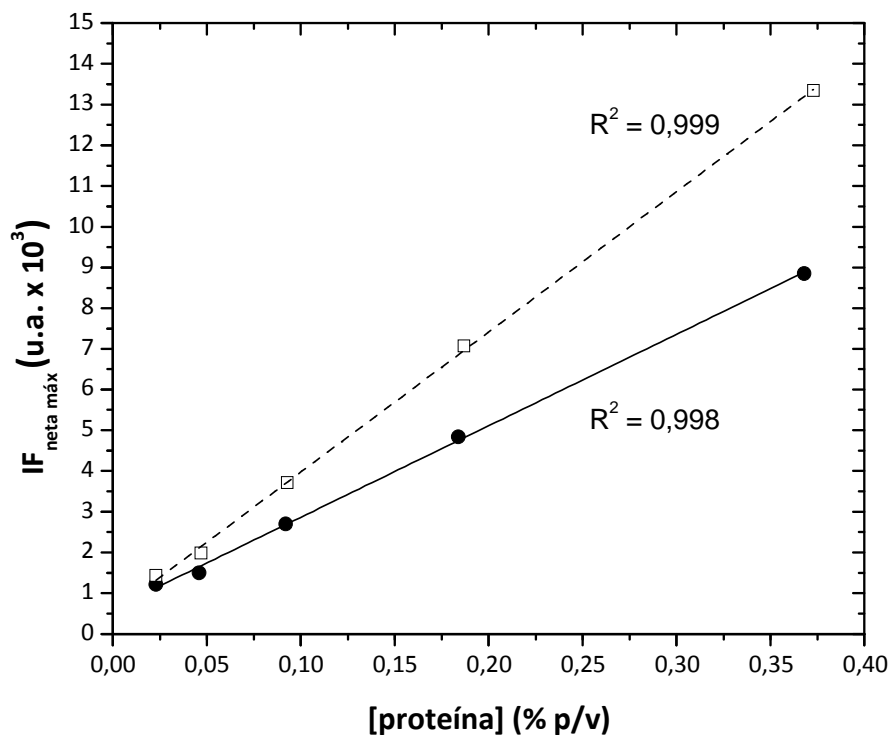


Figura I.4: Intensidad de fluorescencia neta máxima ($\lambda = 468$ nm) en función de la concentración de proteína de soluciones de EW control (●) y sonicada (□). Las líneas graficadas corresponden a las regresiones lineales realizadas sobre las series de datos.

Los resultados de la H_0 se presentan en la Tabla I.1. La H_0 aumentó con la aplicación de USAI. Como se ha mostrado anteriormente, los resultados de DSC indicaron que el tratamiento con USAI no causó una desnaturalización en las proteínas, por lo tanto, esta no sería la razón por la cual se produjo un aumento en la hidrofobicidad. Sin embargo, la sonicación podría inducir un cambio en la estructura proteica sin provocar una desnaturalización, es decir, podría convertirse en una forma similar a lo que se conoce como glóbulo fundido o *molten globule*, en inglés. Estructuralmente, este estado es intermediario entre el estado nativo y el completamente desnaturalizado y se caracteriza por la presencia de una cantidad sustancial de estructura secundaria similar a la del estado nativo, la ausencia de la mayor parte de la estructura terciaria asociada con el empaque de las cadenas laterales, y la presencia de un núcleo

hidrofóbico con un plegado más holgado, y, por lo tanto, más accesible a las moléculas de solvente (Arai y Kuwajima, 2000; Kuwajima, 2002; Kuwajima y Arai, 2000). Gülseren y col (2007) informaron que la hidrofobicidad superficial de soluciones de BSA aumentó en un 24% luego del tratamiento con USAI durante 45 min a 20 W cm^{-2} . Estos autores concluyeron que tal efecto fue el resultado de la exposición de grupos hidrofóbicos previamente ocultos. Este incremento fue considerado significativo, aunque pequeño en comparación con los aumentos típicos observados para la desnaturalización térmica de proteínas. Estos resultados tienen una gran importancia en la agregación/gelificación térmica de las proteínas, porque las interacciones hidrofóbicas intermoleculares dominan la primera etapa de formación del gel (Mine, 1995).

I.2.5. Determinación del tamaño de partícula

El tamaño de partícula de las soluciones de EW control y sonicada sin filtrar se determinó por dispersión estática (SLS) y dinámica de luz (DLS). El primer método mide la intensidad de luz dispersada en diferentes ángulos promediada en el tiempo (intensidad estática). Esta intensidad dispersada es proporcional al peso molecular y a la concentración de la partícula. Se obtiene una distribución de tamaño de partícula en volumen, que puede transformarse en una distribución en número. También pueden calcularse los diámetros $D[3,2]$ y $D[4,3]$, que son diámetros promedio ponderados en superficie y en volumen, respectivamente. El diámetro $D[3,2]$ presenta una alta sensibilidad a las partículas pequeñas, debido a que estas tienen una gran área superficial específica, mientras que el diámetro $D[4,3]$ es particularmente útil para la detección de partículas grandes, ya que estas contienen la mayor parte del material. El rango de medición de esta técnica es de 0,1-1000 μm . En la Figura I.5.A y B se presenta la distribución en volumen y en número para las muestras de EW control y sonicada y en la Tabla I.3, sus diámetros promedio asociados.

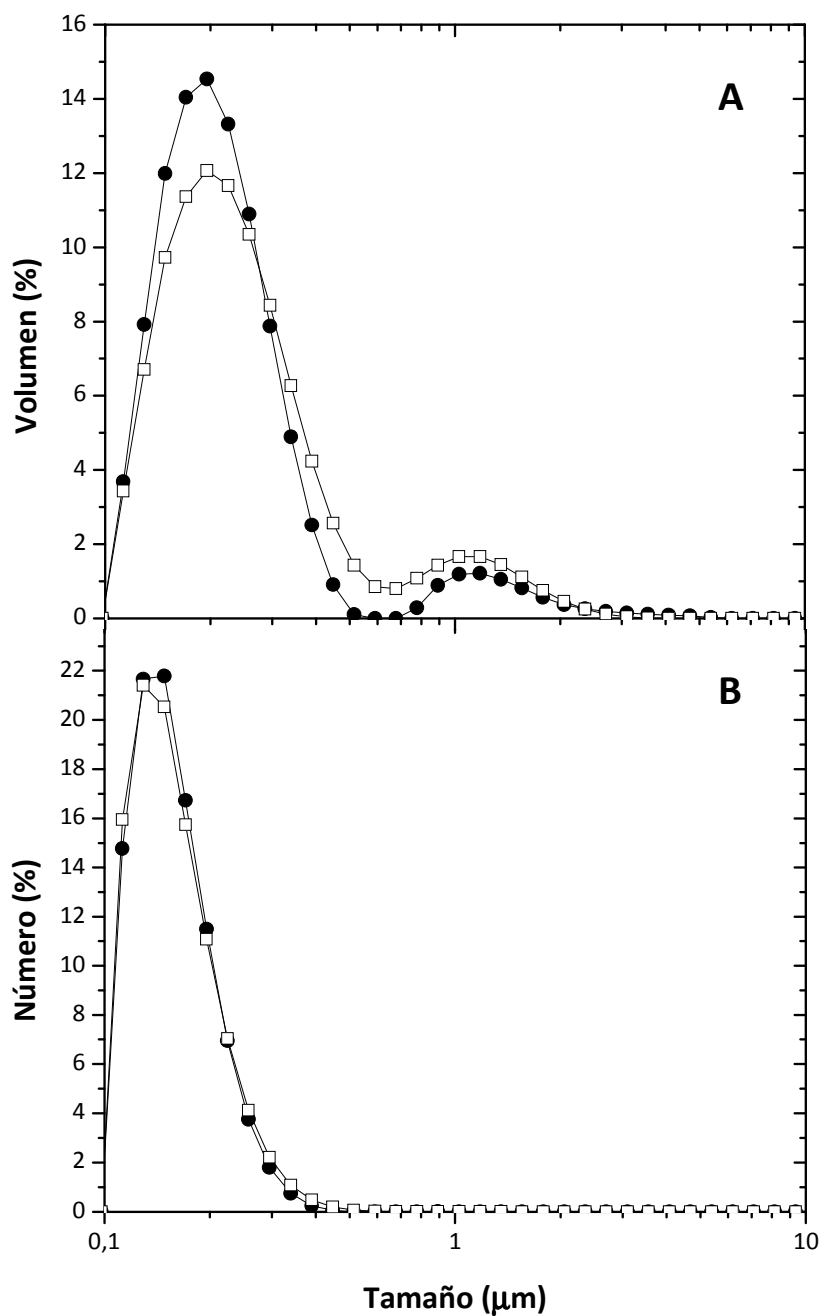


Figura I.5: Distribución de tamaño de partícula en volumen (A) y número (B) de soluciones de EW al 10% p/p, control (●) y sonicada (□), determinada por dispersión estática de luz.

La distribución de la muestra control en volumen fue bimodal; la primera población tuvo un máximo en 0,20 μm y la segunda población, alrededor de 1,35 μm . Al sonicar la muestra de EW, se observó que se conservaron ambas poblaciones de partículas, pero en distinta proporción, es decir, se redujo la población de menor tamaño y aumentó la población de las partículas de mayor tamaño. Cuando se hizo la conversión

de la distribución en volumen a número, se vio que la población principal era la de menor tamaño, cuyo máximo se desplazó a $0,15 \mu\text{m}$ y no se encontraron diferencias significativas entre la muestra sonicada y la muestra control. El desplazamiento del pico se debe a que en el cálculo del diámetro ponderado en número cobran mayor importancia las partículas de menor tamaño, mientras que en el diámetro en volumen, tienen más importancia las partículas grandes, ya que está ponderado por el d^3 . Por otra parte, se encontraron diferencias en los diámetros promedio, $D[3,2]$ y $D(4,3)$, observándose un aumento al sonicar las muestras. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que estos diámetros representan un promedio de toda la distribución y pueden no describir adecuadamente a cada población, en especial, si se trata de un sistema polidisperso.

Tabla I.3: Diámetros de partícula promedio de soluciones de EW al 10% p/p, control y sonicada.

Diámetro promedio	Control	USAI
$D[3,2] (\mu\text{m})$	$0,204 \pm 0,004^a$	$0,224 \pm 0,001^b$
$D(4,3) (\mu\text{m})$	$0,306 \pm 0,007^a$	$0,343 \pm 0,007^b$

Diferentes letras indican una diferencia significativa con $p < 0,05$.

Debido a que las partículas de EW presentaron diámetros menores a $2 \mu\text{m}$ y el límite inferior del equipo es $0,1 \mu\text{m}$, se determinó ulteriormente el tamaño de partícula mediante DLS, cuyo rango es $0,6-6000 \text{ nm}$ y, por lo tanto, permite un mejor análisis. El principio de esta técnica se basa en la medición en un ángulo fijo de las fluctuaciones en la intensidad de dispersión de luz que producen las partículas debido al movimiento Browniano (intensidad dinámica). Por medio del registro de la variación del patrón de dispersión en el tiempo se calcula un coeficiente de difusión; aplicando la Ley de Stokes se puede obtener el diámetro hidrodinámico. Se obtiene una distribución en intensidad, que puede ser transformada en volumen y número. En la Figura I.6.A, B y C se muestran las distribuciones en intensidad, volumen y número para las muestras de EW sin filtrar, control y sonicada.

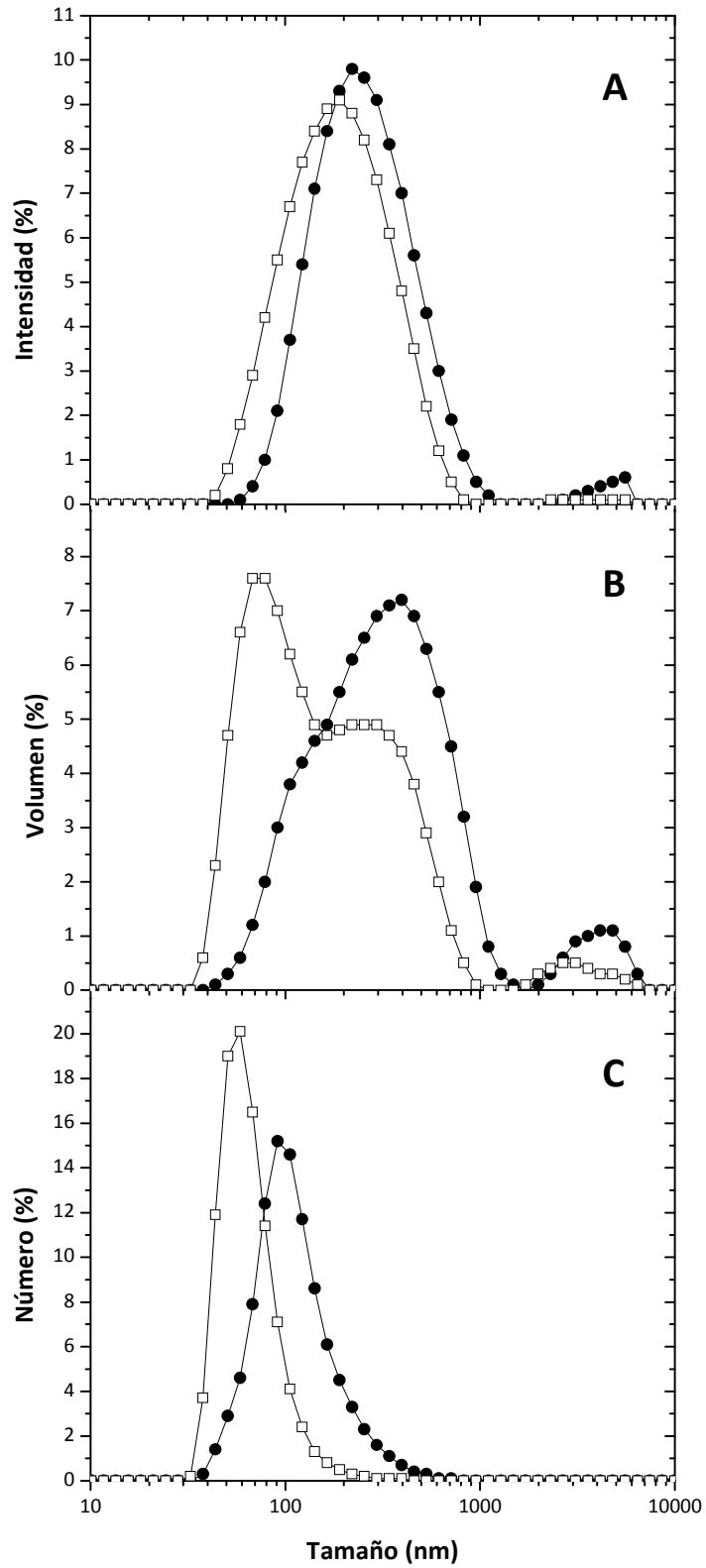


Figura I.6: Distribución de tamaño de partícula en intensidad (A), volumen (B) y número (C) de soluciones de EW, control (●) y sonicada (□), determina por dispersión dinámica de luz.

En la distribución en intensidad de la muestra control se observó una población principal, con un máximo en 220 nm y una “cola” de una población sobre el límite de detección superior del equipo. Al sonicar esta muestra, se observó un corrimiento del pico principal a menores tamaños, con un máximo en 190 nm y casi no se detectó la otra población que se encontraba cerca del límite de detección. Al convertir los datos en volumen, ambas distribuciones se transformaron en trimodales. En el caso de la muestra control, la población principal apareció en 396 nm y presentó un “hombro” alrededor de los 100 nm, indicativo de que no se pudieron resolver bien distintas poblaciones involucradas en ese mismo pico. La población de mayor tamaño se registró sobre los 4500 nm, aproximadamente. En cuanto a la muestra sonicada, la distribución se desplazó levemente hacia menores tamaños. La población principal se resolvió un poco mejor, en dos picos de alrededor de 68 nm y 255 nm. Sobre el límite de detección se observó la población de partículas de 2800 nm. La transformación de la distribución a número dio como resultado una sola población principal, con un máximo en 91 nm, para la muestra control y cerca de 59 nm, para la muestra sonicada.

Si se comparan los resultados de las distribuciones en volumen para ambas técnicas empleadas (Figura I.5.A y I.6.B) podría concluirse que los resultados obtenidos por DLS son discordantes con los de SLS. Sin embargo, las diferencias aparentes podrían surgir de las características inherentes a cada técnica. Varios argumentos respaldan el uso de DLS para determinar las diferencias surgidas del tratamiento con USAI. Primero, dado que la distribución de tamaño de partícula de esta técnica es en intensidad, los diámetros calculados de esta distribución están ponderados por el d^6 , con lo cual, la sensibilidad para detectar pequeñas cantidades de agregados es muy alta. Si hubiese habido agregación de la muestra luego de someterla al tratamiento con USAI, fácilmente podría haberse detectado. Si, en cambio, la agregación hubiese sido muy pronunciada, los agregados precipitarían durante la medición. Esto se reflejaría en el informe de errores que provee el análisis de datos, realizado por el *software*, sin embargo, no hubo indicios de partículas que estuviesen sedimentando durante la medición. Por otra parte, las poblaciones principales de partículas presentes en la EW están mejor incluidas dentro del rango de detección de DLS, por lo que se esperaría una mejor resolución de los datos, en comparación con la técnica de SLS, en donde la

población principal se encuentra muy cercana al límite inferior de detección. Finalmente, más adelante se verá que las modificaciones causadas por los USAI en algunas propiedades funcionales (solubilidad, viscosidad, drenado de espumas) correlacionan muy bien con la disminución del tamaño de partícula. Cabe aclarar que tanto las distribuciones obtenidas por SLS como por DLS no corresponden a las proteínas individuales de la EW, ya que estas se encontrarían en diámetros mucho menores (por debajo de 10 nm). Por el contrario, las distribuciones obtenidas corresponderían a agregados de proteínas presentes en las muestras incluso antes de sonicarlas. En investigaciones previas, en donde se trabajó con EW secada por *spray*, se encontró que las soluciones preparadas a partir del polvo contenían una fracción de agregados solubles menores a 50 nm y otra de agregados insolubles mayores a 7 μm provenientes de la desnaturalización parcial de proteínas ocasionada por el calentamiento durante el proceso de secado al que habían sido sometidas (Nicorescu y col, 2011). En el presente trabajo, como se utilizó el sobrenadante de muestras centrifugadas, los agregados insolubles se eliminaron y sólo se observaron en la distribución de tamaño de partícula los agregados solubles.

En lo que respecta al efecto de la aplicación de USAI en el tamaño de partícula, en la literatura se citan ambos efectos. Por ejemplo, se determinó la formación de agregados de soluciones de HPMC sonicadas, aunque reversibles en el tiempo (Camino y col, 2009). Por otra parte, Gülseren y col (2007) encontraron un incremento en el tamaño de partícula de albúmina de suero bovina (BSA), a tiempos de sonicación largos (>40 min), lo que atribuyeron a la formación de agregados pequeños. En cambio, la mayoría de los autores que investigaron el efecto de los USAI en el tamaño de partícula en polisacáridos o en proteínas informaron una reducción de tamaño (Ashokkumar y col, 2009; Baxter y col, 2005; Chen y col, 1997; Furukawa y col, 1983; Iida y col, 2008; Jambrak y col, 2009; Jambrak y col, 2010; Lorimer y col, 1995; Tang y col, 2009; Villamiel y col, 2000; Zisu y col, 2010).

1.3. Efecto de los USAI en las propiedades funcionales de la EW

1.3.1. Solubilidad

La solubilidad es una de las medidas más prácticas para evaluar la desnaturalización y agregación proteica y, por ende, es un buen índice de la funcionalidad de las proteínas. La solubilidad fue determinada en buffer TRIS y fosfato, como porcentaje de sólidos solubles o de proteína soluble. En la Tabla I.4 se muestran los resultados para las muestras de EW control y sonicada.

Tabla I.4: Porcentajes de proteína y de sólidos solubles de EW control y sonicada.

Muestra	Control	Sonicada
% sólidos solubles*	81,62 ± 5,64	84,75 ± 6,36
% proteína soluble**	91,88 ± 1,94	93,26 ± 1,56

*En buffer TRIS 86 mM, glicina 90 mM y EDTA 4 mM, pH 8.

**En buffer fosfato de potasio 0,1 M, pH 7.

De los resultados presentados en la Tabla I.4 no se pudieron establecer diferencias concretas debido a los USAI, si bien pareciera haber una tendencia a que aumente la solubilidad luego de sonicar las muestras. Otros trabajos demostraron que la aplicación de USAI fue eficiente para solubilizar biopolímeros (Jambrak y col, 2009; Jambrak y col, 2008; Jambrak y col, 2010; Krešić y col, 2008; Martini y col, 2010; Tang y col, 2009).

1.3.2. Propiedades de flujo

La viscosidad de la EW es una variable de calidad importante, ya que está relacionada con las características funcionales de la misma, como su capacidad de espumado, de emulsificación y gelificación, entre otras (Kemps y col, 2010). A su vez, es una propiedad muy sensible, ya que se modifica fácilmente por diferentes factores, como el tiempo de almacenamiento, la temperatura, la agitación, entre otros (Romanoff y Romanoff, 1949; Tung, Watson, y Richards, 1971). En este estudio, se utilizó EW secada por *spray* reconstituida, por lo tanto, los parámetros de flujo pueden ser diferentes respecto a los de la EW sin tratamiento. Al respecto, Radványi y col (2012)

han informado índices de consistencia (k) que difieren en un orden de magnitud para EW secada por *spray* reconstituida en relación a la proteína sin tratamiento ($5,38 \pm 0,89$ y $72,67 \pm 20,34$ mPa.s, respectivamente). En la Figura I.7 se muestran las curvas de flujo obtenidas para soluciones de EW tratada con USAI y su control sin sonicar. Los resultados fueron ajustados según el modelo de Ostwald o Ley de la potencia y los parámetros obtenidos se informan en la Tabla I.5. El índice de consistencia (k) representa una medida de la viscosidad aparente del sistema, mientras que el índice de flujo (n) indica el tipo de comportamiento, que puede ser newtoniano ($n=1$), pseudoplástico ($n<1$) o dilatante ($n>1$), según el valor que asuma.

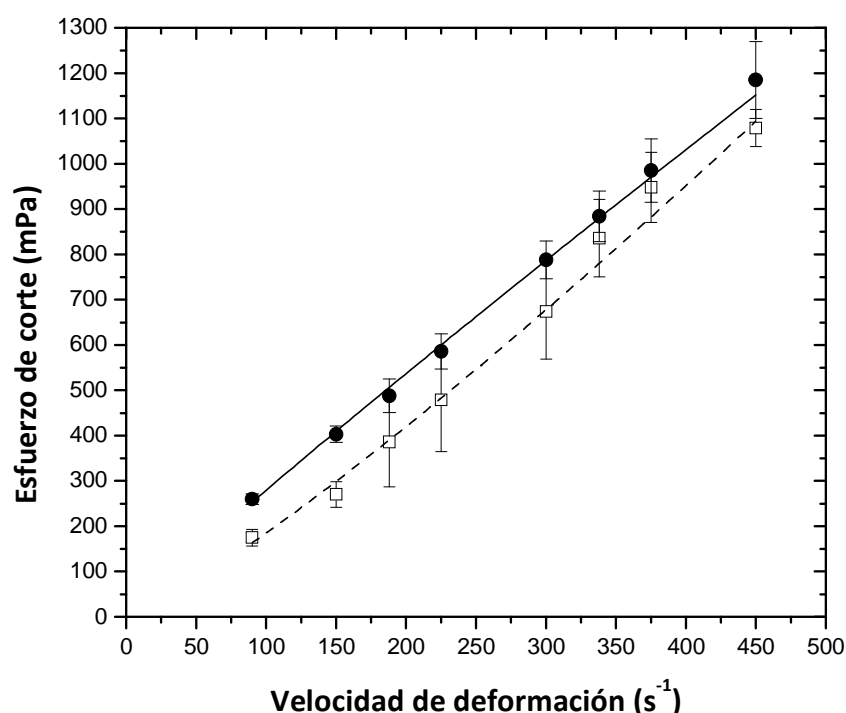


Figura I.7: Curvas de flujo registradas para soluciones de EW al 10% p/p, control (●) y sonicada (□).

Se puede apreciar una gran reducción en el valor de k , luego del tratamiento ultrasónico. De la misma manera, anteriormente se demostró que otras tecnologías empleadas con la finalidad de reducir patógenos en la EW, tales como la pasteurización por calor, la irradiación (Mészáros, Horti, y Farkas, 2006; Pinto y col, 2004), la microfiltración (Mukhopadhyay y col, 2009) y las altas presiones hidrostáticas (Ahmed, Ramaswamy, Alli, y Ngadi, 2003), entre otras, también causaban una disminución en la viscosidad aparente de la EW. Por su parte, también se registró un

aumento en el índice de flujo, lo que indica que se modificó su comportamiento inicial prácticamente newtoniano. Si bien el valor de n de las soluciones sonicadas corresponde a un fluido dilatante según el ajuste matemático, ese valor podría no tener un significado físico real, teniendo en cuenta la dispersión de los datos experimentales (Figura I.7). Por lo tanto, no se podría concluir que el tratamiento con USAI modificó el comportamiento newtoniano, aunque si se observa que el índice de consistencia de las soluciones se vio disminuido, lo que se pudo notar también visualmente.

Tabla I.5: Efecto de los USAI en la viscosidad de soluciones de EW al 10% p/p.

Muestra	Control	Sonicada
k (mPa.s)	3,68 ± 0,32	0,81 ± 0,19
n	0,94 ± 0,02	1,18 ± 0,04
R ²	0,997	0,994

La disminución en la consistencia o viscosidad aparente de las soluciones tratadas con USAI se ha confirmado en numerosos estudios que emplearon diferentes proteínas y polisacáridos (Ashokkumar y col, 2009; Baxter y col, 2005; Camino y col, 2009; Furukawa y col, 1983; Iida y col, 2008; Karki y col, 2009; Seshadri, Weiss, Hulbert, y Mount, 2003; Zisu y col, 2010). Muchos autores han relacionado este efecto con las altas fuerzas de corte, el intenso micromezclado y la consecuente posible degradación de las cadenas poliméricas, que se producen por la cavitación ultrasónica. En el presente trabajo, la disminución de la viscosidad se correlaciona con la disminución de tamaño de partícula de la EW causada por el efecto de USAI, lo cual fue observado por DLS (Figura I.6).

I.3.3. Espumas: formación y estabilidad

Las espumas líquidas son sistemas de dos fases que consisten en una fase de aire discontinua dispersa en una fase líquida laminar continua. La EW ha sido utilizada ampliamente en sistemas aireados para mejorar características deseables de merengues, turrónes, *bavarois*, cremas batidas y mousses, entre otros (Raikos,

Campbell, y Euston, 2007). Una de propiedades más importantes es su capacidad para formar espumas voluminosas y con gran estabilidad (Foegeding, Luck, y Davis, 2006). Esta propiedad depende de las propiedades químicas individuales (peso molecular, pl, glicosilación, fosforilación, contenido de sulfhidrilos/disulfuro) de un amplio rango de proteínas que interactúan durante la formación de la espuma (Li-Chan y col, 1989). De estas proteínas, se cree que la conalbúmina, la ovomucina y las ovoglobulinas son las principales proteínas responsables de la estabilización de la espuma (Cunningham, 1976; Hayakawa y Sato, 1976; Johnson y col, 1981; Kato, Oda, Yamanaka, Matsudomi, y Kobayashi, 1985; Sato, Hayakawa, y Nakamura, 1976). La ovoalbúmina también estaría involucrada en la estabilización de la espuma, pero en menor medida (Kitabatake y Doi, 1982; Nakamura, 1964). Las espumas se caracterizan por dos factores, el volumen de espuma y su estabilidad (Kato, Takahashi, Matsudomi, y Kobayashi, 1983). La capacidad de espumado está relacionada con el volumen de aire introducido en la solución de proteína y se determina midiendo el aumento en el volumen de la espuma. La estabilidad de la espuma se determina midiendo la velocidad de drenado de líquido de la espuma o como la velocidad de disminución del volumen de espuma en el tiempo. La estabilidad de la espuma es importante para la vida útil y la apariencia de los alimentos espumados y debe mantenerse cuando el producto se somete a diversos procesos, tales como el calentamiento y el mezclado (Foegeding y col, 2006). Existen tres procesos importantes que determinan la estabilidad de una espuma: el drenaje de la película, la coalescencia de las burbujas y la desproporción de las mismas. El drenaje de la película se refiere al líquido que fluye de la espuma, impulsado por la fuerza de gravedad. La coalescencia de las burbujas se produce por el colapso de la película fina que se encuentra rodeando dos burbujas, de manera que estas se fusionan para formar una burbuja de mayor tamaño. Finalmente, la desproporción, también llamada maduración de Ostwald, es el proceso por el cual el gas que se encuentra dentro de pequeñas burbujas difunde a través de la fase líquida hacia burbujas más grandes (Bisperink, Ronteltap, y Prins, 1992).

Los parámetros relacionados con la capacidad y la estabilidad de las espumas preparadas por batido de soluciones de EW control y sonicada se resumen en la Tabla I.6. La capacidad de espumado (CE) disminuyó considerablemente con la aplicación de

USAI. La Figura I.8 muestra la cinética de drenado de dichas espumas. Las muestras sonicadas presentaron un mayor volumen drenado a lo largo del tiempo.

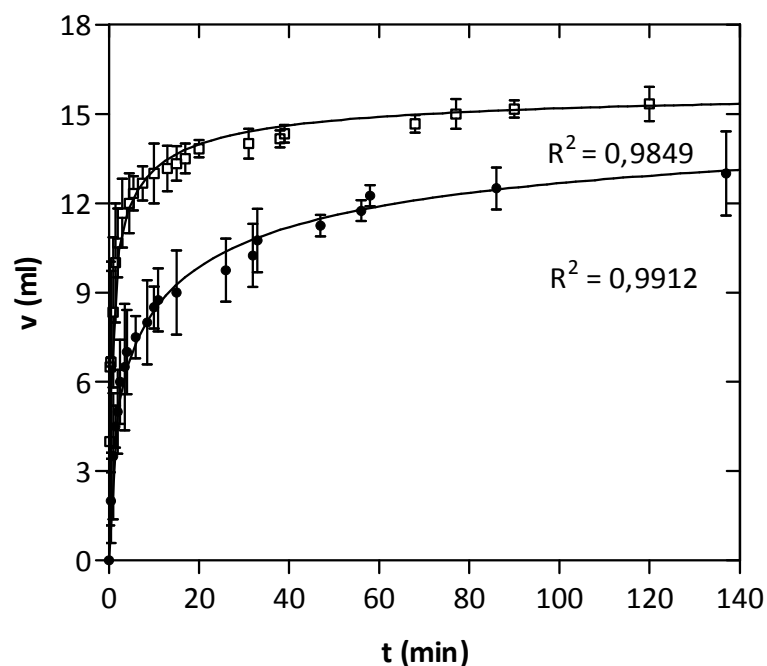


Figura I.8: Volumen drenado (v) en función del tiempo para espumas de EW, al 5% p/p, control (●) y sonicada (□).

Las curvas representadas en la Figura I.8 corresponden a los ajustes realizados sobre los datos experimentales utilizando un modelo matemático empírico, desarrollado por Carp y col (1997) para describir la cinética de drenado de líquido en espumas. La constante K_{dr} es un indicador de la velocidad de drenado y se calcula con las constantes del ajuste de la cinética de drenado. El tiempo medio de drenado ($c^{1/n}$), corresponde al tiempo necesario para que drene la mitad del volumen máximo de líquido drenado. Como se muestra en la Tabla I.6, la K_{dr} aumentó en un orden, mientras que $c^{1/n}$ fue un orden menor para las muestras tratadas con USAI, es decir, la velocidad de drenado de líquido es mayor en las espumas de EW sonicada respecto al control. Todos estos parámetros indican que el tratamiento de USAI causa un deterioro en las propiedades espumantes de la EW.

Tabla I.6: Influencia de los USAI en los parámetros de formación y estabilidad de espumas de EW al 5% p/p.

Muestra	Control	Sonicada
CE (%)	205 ± 21 ^a	127 ± 25 ^b
K _{dr} (ml min ⁻¹ , x 10 ⁻³)	4,14 ± 0,89 ^a	46,3 ± 7,9 ^b
c ^{1/n} (min)	8,24 ± 0,82 ^a	0,79 ± 0,07 ^b

Diferentes letras indican una diferencia significativa con $p < 0,05$.

Considerando el aumento en la hidrofobicidad superficial observado se esperaría obtener una mejora en las propiedades espumantes de las muestras sonicadas. Sin embargo, Townsend y Nakai (1983) no pudieron establecer una relación significativa entre la capacidad espumante y la hidrofobicidad superficial de diferentes proteínas no tratadas, pero sí pudieron correlacionar la hidrofobicidad total con la capacidad espumante. En un trabajo anterior, Kato & Nakai (1980) estudiaron la hidrofobicidad en presencia de SDS, lo cual les dio una mejor correlación con las propiedades espumantes. Sin embargo, no encontraron una relación significativa entre la hidrofobicidad superficial de las proteínas estudiadas y su capacidad espumante. Estos resultados sugirieron que las proteínas están ampliamente desplegadas en la interfase aire/agua. Por lo tanto, la hidrofobicidad total, más que la superficial, tendría una correlación altamente significativa con la capacidad de espumado. Por otra parte, se sabe que cuanto mayor sea el índice de consistencia o viscosidad aparente, mayor será la estabilidad esperada de las espumas de EW (Stadelman y Cotterill, 1995). En consecuencia, las modificaciones ocasionadas por los USAI en el comportamiento de flujo de la EW podrían ser un factor determinante de los efectos deletéreos en la estabilidad de la EW.

Respecto al colapso de la espuma, tanto las muestras control como las tratadas con USAI mostraron una alta estabilidad, ya que la altura de la espuma se redujo sólo alrededor de un 9%, luego de 5 h de haberla batido.

I.3.4. Emulsiones: formación y estabilidad

Una emulsión consiste en gotas esféricas pequeñas de un líquido disperso en otro en el cual es al menos parcialmente inmiscible (McClements y Weiss, 2005). Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables debido al contacto desfavorable entre las fase agua y aceite, y dado que estas fases tienen densidades diferentes, tenderán a separarse en el tiempo (Dickinson, 1992; McClements, D. Julian, 2005; Stauffer, 1999; Walstra, 1996). La inestabilidad física da lugar a una alteración en la distribución espacial o la organización estructural de las moléculas. El cremado, la floculación, la coalescencia, la inversión de fases y la maduración de Ostwald son ejemplos de inestabilidad física (Dickinson, 1992; Dickinson y Stainsby, 1982; Walstra, 1996, 2003). La separación de la emulsión comúnmente es retrasada mediante el uso de emulsionantes, que son ingredientes con actividad superficial que se adsorben sobre la superficie de las gotas de aceite apenas formadas durante la homogeneización (Dickinson, 1992; McClements, D. Julian, 2005; Stauffer, 1999; Walstra, 1993). Una vez adsorbidos, disminuyen la tensión interfacial, lo que facilita la reducción del tamaño de las gotas producida durante la homogeneización. Los emulsionantes también reducen la tendencia de las gotas a agregarse formando membranas protectoras y/o generando fuerzas repulsivas entre las gotas (Moreau, Kim, Decker, y McClements, 2003). La EW es altamente apreciada por sus propiedades de gelificación y espumado, sin embargo, su potencial como emulsionante generalmente se considera bastante escaso en comparación con el de la yema. Las apolipoproteínas de esta, altamente flexibles y penetrantes, se adsorben a una velocidad mayor y desplazan competitivamente a las proteínas globulares de la EW, u otras proteínas de naturaleza similar, de la superficie de las gotas de aceite presentes en la emulsión (Aluko y col, 1998; Shenton, 1979). A pesar de ello, los aderezos libres de colesterol, basados en EW, se encuentran frecuentemente en el mercado, lo que indica que las proteínas de EW pueden actuar de manera efectiva en condiciones de pH bajo y contenido de NaCl relativamente alto, y asistir en la formación y estabilización física de estos sistemas emulsionados (Drakos y Kiosseoglou, 2006a).

En el presente estudio, se emulsionaron aceite de girasol comercial y soluciones de EW al 2% p/p, control y sonicada, en una relación 20:80. Como se ha señalado

anteriormente, la distribución de tamaño de gota inicial es un factor determinante en la estabilidad de las emulsiones y, dado que los tamaños de gotas suelen tener entre 0,1 y los 100 μm de diámetro (Dickinson, 1992; Dickinson y col, 1982; Walstra, 1996), se recurrió a la técnica de dispersión estática de luz para determinar las distribuciones de tamaño de gotas de las emulsiones preparadas. La Figura I.9.A muestra la distribución de tamaño de gota en volumen para ambas emulsiones. En la muestra control, se observaron dos poblaciones de gotas principales, una de 5,38 μm de diámetro y otra de 37,24 μm , y esta última fue la mayoritaria en volumen. En cambio, la muestra sonicada presentó tres poblaciones de gotas, la principal en volumen tuvo un diámetro de 32,43 μm , y las otras dos presentaron diámetros de 0,59 y 4,08 μm . Sin embargo, como se mencionó anteriormente para las determinaciones de tamaño de partícula, la contribución de cada gota en esta distribución se relaciona con el volumen de esa gota, es decir, que la contribución relativa será proporcional al d^3 . Por lo tanto, es importante analizar la distribución en número para conocer la contribución de cada gota según la cantidad de cada población que hay en la emulsión. En la Figura I.9.B se puede ver la distribución de tamaño de gota en número para ambas emulsiones. En la muestra control la población principal tuvo un diámetro de 3,56 μm (correspondiente a 5,38 μm en volumen), aunque también se observa una baja proporción gotas de 16,26 μm . En cambio, en la muestra sonicada la población principal presentó un diámetro de 0,39 μm (correspondiente a 0,59 μm en volumen). Cabe aclarar que las distribuciones basadas en el volumen de las partículas siempre estarán desplazadas hacia mayores tamaños en comparación con las distribuciones basadas en su número. Es por esto que los diámetros informados para cada población en volumen presentaron valores mayores a los señalados para la distribución en número.

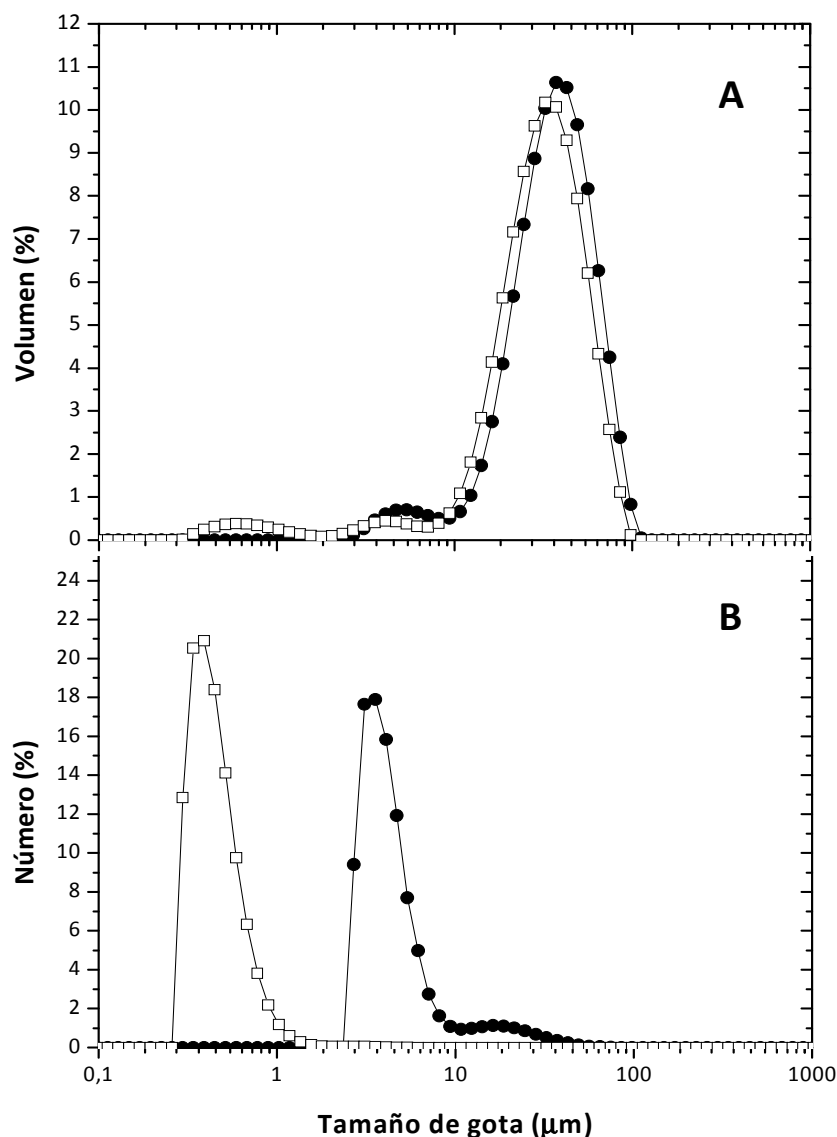


Figura I.9: Distribuciones de tamaño de gota promedio para emulsiones o/w de EW, control (●) y sonicada (□), con aceite de girasol en relación 20:80.

Por otra parte, se analizaron otros parámetros relacionados con la distribución y el tamaño de gota que se muestran en la Tabla I.7. Como se vio anteriormente, el diámetro $D[3,2]$ presenta una alta sensibilidad a las partículas pequeñas, mientras que el diámetro $D[4,3]$ es particularmente útil para la detección de partículas grandes. En cuanto al diámetro $D[4,3]$ de las emulsiones, se observó una leve disminución en la muestra sonicada, pero las mayores diferencias se detectaron en el diámetro $D[3,2]$, cuyo valor se desplazó hacia un tamaño menor, debido al aumento de la población de gotas pequeñas en la muestra sonicada, que poseen mayor área superficial específica. El índice de polidispersidad (IP), que es indicativo del ancho de la distribución,

aumentó en la muestra sonicada y esto está relacionado con la tercera población de partículas pequeñas que contiene esta emulsión, a diferencia de la muestra control. El área superficial específica aumenta, debido a la generación de gotas de menor tamaño, que poseen una mayor relación superficie/volumen.

La desestabilización de emulsiones por cremado se describe mediante la ley de Stokes, e indica que las gotas de aceite que tengan un tamaño pequeño migrarán hacia la parte superior de la emulsión a una velocidad menor que las gotas grandes y, en consecuencia, se esperaría que las emulsiones preparadas con EW sonicada tengan mayor estabilidad al cremado debido a su menor tamaño.

Tabla I.7: Parámetros relacionados con la distribución y el tamaño de gotas de emulsiones de EW al 2% p/p, control y sonicada.

Parámetro	Control	Sonicada
D[3,2] (μm)	25,64 \pm 0,05	10,85 \pm 0,01
D[4,3] (μm)	38,55 \pm 0,06	33,19 \pm 0,02
IP	1,355 \pm 0,006	1,440 \pm 0,001
Área superficial específica (m^2/g)	0,234 \pm 0,000	0,553 \pm 0,001

Diferentes letras indican una diferencia significativa con $p < 0,05$.

Para determinar si esta hipótesis era cierta se procedió a analizar la estabilidad de las emulsiones mediante dispersión múltiple de luz. En esta técnica una fuente de luz irradia fotones a la emulsión y se mide la luz que atraviesa la muestra (transmisión, en muestras no opacas) y la retrodispersión (o *backscattering*, en muestras opacas) que producen las partículas, a lo largo de la longitud del tubo, de manera que se obtiene el perfil de *backscattering* (BS). Estos perfiles constituyen la huella macroscópica de la emulsión en un momento dado (Mengual, Meunier, Cayre, Puech, y Snabre, 1999). Un aumento en la intensidad de *backscattering* indica que la concentración, el tamaño o la reflectancia de la partícula ha aumentado, mientras que una disminución en la intensidad de *backscattering* indica una disminución en la concentración, tamaño o reflectancia de la partícula (Durand, Franks, y Hosken, 2003). La Figura I.10 muestra los

perfiles de BS a lo largo del tiempo de almacenamiento a 25 °C para las muestras estudiadas.

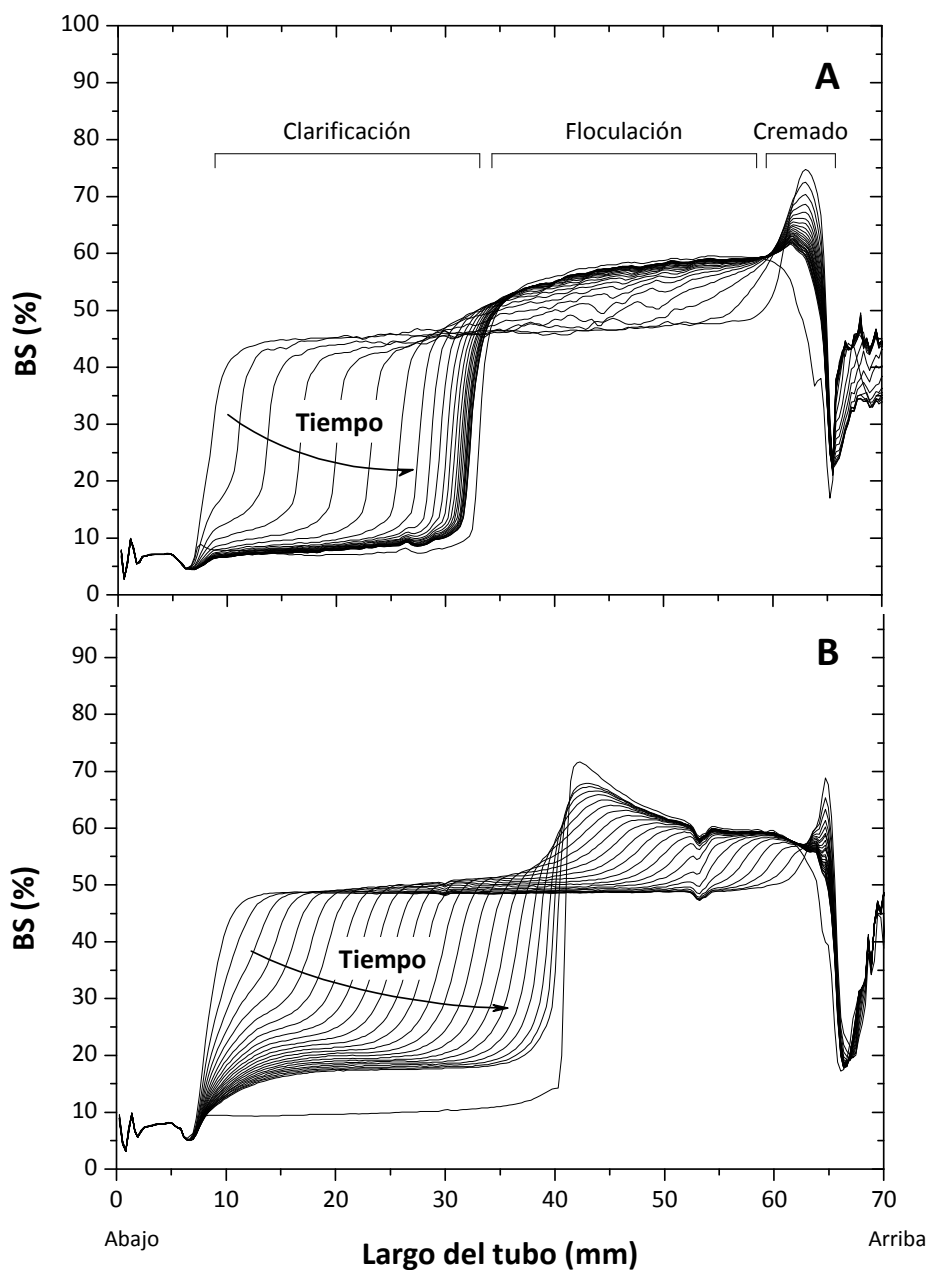


Figura I.10: Cambio de los perfiles de *backscattering* (BS%) con el tiempo en función de la altura de la muestra en el tubo para emulsiones de EW control (A) y sonicada (B).

Se observó una gran variación con el tiempo, especialmente en las muestras control (Figura I.10.A). Las variaciones de BS en las distintas zonas del tubo representan los diversos fenómenos asociados con la desestabilización. Así, la parte baja del tubo corresponde a la clarificación, la zona intermedia a la floculación y la parte superior al

cremado. Los perfiles de las emulsiones hechas con soluciones de EW tratadas USAI (Figura I.10.B) mostraron una variación menor con el tiempo de almacenamiento, lo cual guarda coherencia con su menor tamaño de gota (Figura I.9), y es indicativo de una estabilidad mayor.

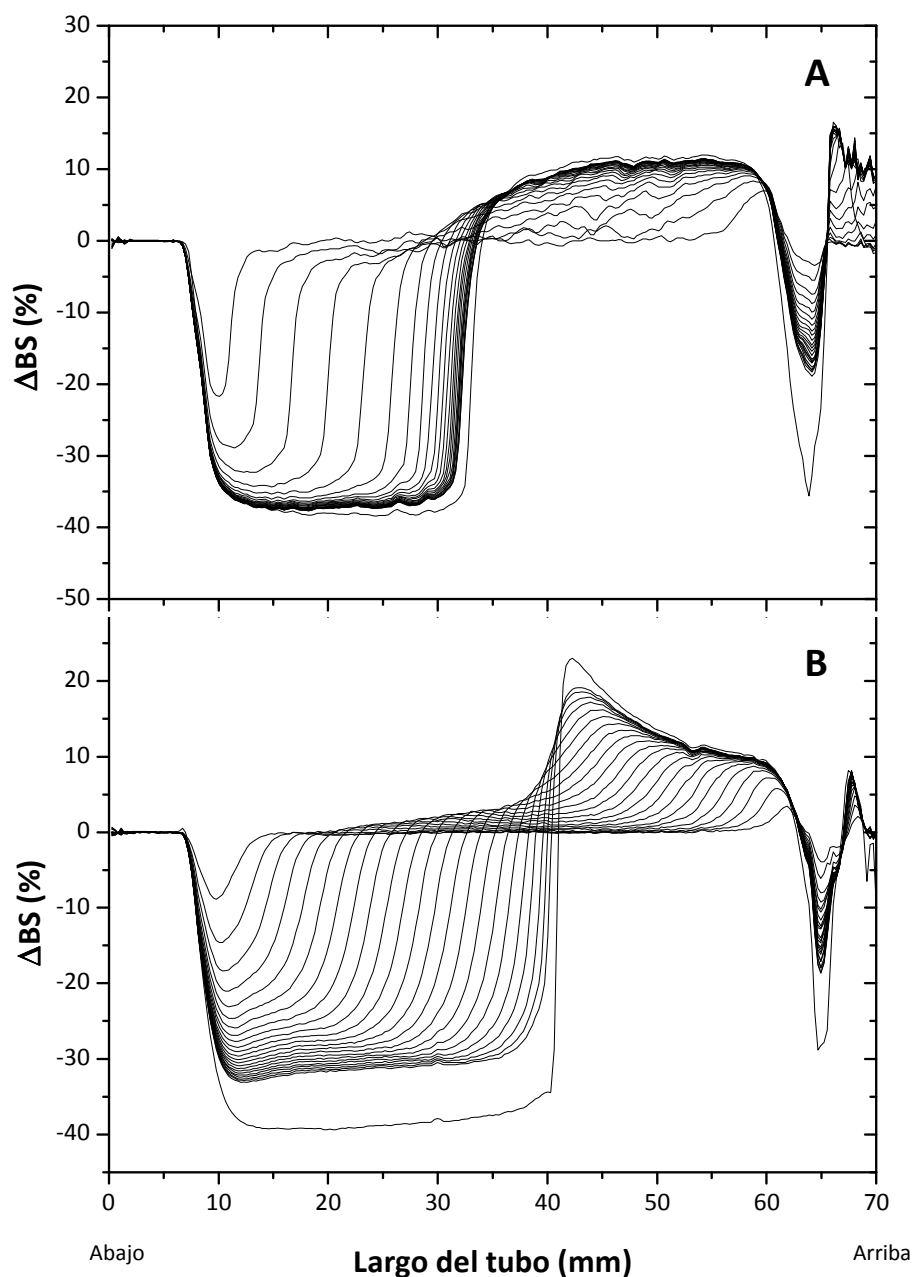


Figura I.11: Cambio de los perfiles de ΔBS con el tiempo en función de la altura de la muestra en el tubo para emulsiones de EW control (A) y sonicada (B).

Para el cálculo de la cinética de desestabilización los perfiles de *backscattering* a cada tiempo se comparan con una referencia, que es el perfil correspondiente al tiempo 0

del almacenamiento. Por lo tanto, la diferencia del perfil a un tiempo dado y a tiempo 0 da origen al perfil de ΔBS . En la Figura I.11 se presenta el perfil de ΔBS para las muestras de EW control y tratada por USAI. El pico en la zona de la base se ensancha a medida que avanza el proceso de cremado (en este caso aparece entre 0 y 40 mm).

Luego, se midió el ancho del pico para cada tiempo en la zona de clarificación, tomando como punto de medición el 50% de la amplitud máxima del pico medido al mayor tiempo de almacenamiento. La constante de velocidad de cremado se calculó mediante la pendiente del ajuste de los datos en la zona lineal del ascenso, como se muestra en la Figura I.12. La constante de velocidad de cremado fue $1,59 \pm 0,03$ mm/min para la emulsión control y disminuyó hasta un valor de $0,84 \pm 0,01$ mm/min para la muestra sonicada.

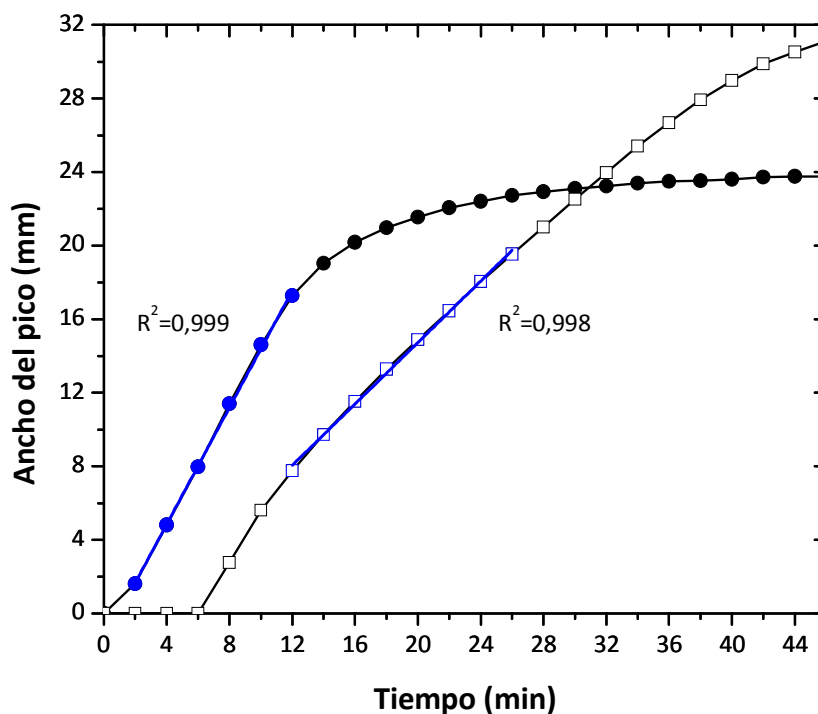


Figura I.12: Ancho del pico de clarificación en función del tiempo de almacenamiento para emulsiones de EW control (●) y sonicada (□). La zona lineal del ascenso se ajustó por regresión lineal.

Esto indica que el tratamiento ultrasónico de las soluciones de EW previo a la formación de la emulsión aumenta su estabilidad. Hasta el momento se conoce muy poco sobre el efecto concreto de los USAI en la capacidad de las proteínas para

estabilizar emulsiones. Actualmente, numerosos estudios emplean los ultrasonidos para producir la emulsión final y, por ende, los efectos benéficos observados podrían derivar predominantemente de la acción mecánica de los USAI más que del efecto sonoquímico (Weiss y col, 2011). Entre los limitados estudios que pueden citarse, Camino y col (2009) no encontraron diferencias en los diámetros de gota de emulsiones preparadas con HPMC sin tratamiento y sometida a USAI, en las mismas condiciones de sonicación que las empleadas en el presente trabajo. Sin embargo, cabe destacar que el método empleado para generar las emulsiones fue la homogeneización con USAI. Por lo tanto, de allí podrían surgir las diferencias, dado que en el presente estudio se utilizó un homogeneizador de alta velocidad. Por otro lado, Jambrak y col (2009) encontraron en su investigación que el tratamiento con USAI (sonda de 20 kHz y baños de 40 y 500 kHz, 0-30 min) de soluciones de concentrados y aislados de proteína de soja mejoró sus propiedades emulsionantes y disminuyó el tamaño de gota de las emulsiones preparadas posteriormente. Como es sabido, la principal fuerza impulsora para la absorción de proteínas en las interfases aceite-agua es el efecto hidrofóbico. Las zonas hidrofóbicas de la proteína interactúan preferentemente con la fase de aceite dispersa, mientras que los aminoácidos hidrofílicos prefieren interactuar con la fase acuosa. En consecuencia, cuando las proteínas son dispersadas en un sistema acuoso que contiene una fase de aceite dispersa, se adsorben en la interfase aceite-agua, luego se despliegan y se reorganizan para optimizar las interacciones de aminoácidos hidrofóbicos con el aceite y las interacciones de aminoácidos hidrofílicos con el agua. La adsorción también reduce el área de contacto entre las moléculas de aceite y de agua, lo que reduce la tensión interfacial (McClements, David Julian, 2005). Los ultrasonidos podrían potencialmente alterar el número de zonas de aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos que se encuentran en la superficie de las proteínas plegadas, de manera que se alteraría la fuerza impulsora para el proceso de adsorción. Además, si se pierde la estructura terciaria o cuaternaria debido a la aplicación de USAI, la proteína podría asumir nuevas configuraciones en la interfase más rápidamente, y acelerar el proceso de adsorción (Weiss y col, 2011). En el presente trabajo, el aumento en la hidrofobicidad superficial encontrado confirmaría esta suposición y sería la causa de la disminución en el tamaño de gota de las emulsiones y la mejora de su estabilidad al proceso de cremado.

I.3.5. Geles: dinámica de gelificación y características reológicas

Viscoelasticidad dinámica

El tratamiento térmico de proteínas provoca, en general, un incremento en la absorción de agua y el hinchamiento a medida que se desnaturalizan. Esto resulta en un aumento en el volumen hidrodinámico y en la resistencia al flujo (Kinsella, 1984). Las moléculas de proteína desnaturalizadas se asocian a través de interacciones intermoleculares y forman agregados de moléculas desnaturalizadas de manera irreversible, que pueden llevar a precipitación, coagulación o gelificación (Edwards, Lillford, y Blanshard, 1987). Dado que la formación de geles es una de las propiedades funcionales más importantes de la EW resulta imprescindible evaluar si el tratamiento con USAI altera dicha propiedad. La reología dinámica, en la que se aplica un esfuerzo o deformación oscilante en forma sinusoidal, es el método preferido para caracterizar los alimentos viscoelásticos (Stanley y Yada, 1994). Las mediciones dinámicas permiten monitorear la coagulación y la gelificación ya que las deformaciones inducidas son generalmente tan pequeñas que su efecto en la estructura es despreciable. De estas mediciones, se obtienen dos parámetros independientes: el módulo de almacenamiento (G'), que describe la cantidad de energía que se almacena de manera elástica en la estructura y el módulo de pérdida (G''), que es una medida de la pérdida de energía o la respuesta viscosa. El ángulo de fase (δ) es una medida de qué tan desfasados están el esfuerzo y la deformación entre ellos. Para un material completamente elástico, el ángulo de fase es 0° y para un fluido puramente viscoso δ es 90° (Stading y col, 1990). La relación G''/G' , llamada tangente de pérdida, es igual a la tangente del ángulo de fase y es proporcional a la (energía disipada)/(energía almacenada) por ciclo (Boye, Ma, y Harwalkar, 1997). Por lo tanto, a fines de caracterizar las distintas etapas de la formación de los geles de EW se procedió a registrar la evolución del módulo de almacenamiento (G'), el módulo de pérdida (G'') y la tangente del ángulo de fase ($\tan \delta$) a lo largo del tiempo de calentamiento. Se utilizó un programa de temperaturas que consistió de una rampa de calentamiento a velocidad constante, seguida de una etapa de calentamiento isotérmico, luego de una rampa de enfriamiento a velocidad constante y finalmente, una última etapa de enfriamiento isotérmico (Figura I.13).

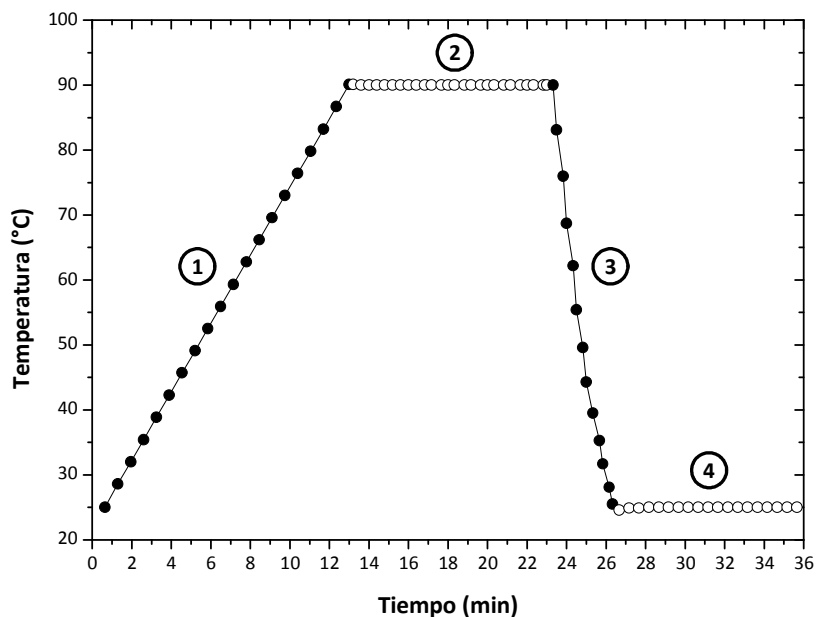


Figura I.13: Perfil térmico empleado en la formación de geles de EW:

(1) 25-90 °C a 5 °C/min, (2) 90 °C, 10 min, (3) 90-25 °C a 25 °C/min, (4) 25 °C, 10 min.

En la Figura I.14 se muestra la evolución de los parámetros reológicos medidos. En las mediciones reológicas de la EW se pueden observar cuatro fenómenos principales relacionados con su gelificación. Al inicio de la medición existe una gran oscilación en los parámetros G' y G'' , y este último suele superar en magnitud al módulo de almacenamiento, ya que a bajas temperaturas la EW se comporta como un fluido con propiedades viscosas. A medida que la temperatura se va incrementando, se llega a lo que se denomina el punto de gelificación, momento que marca la transición del estado fluido al sólido, y donde comienza la desnaturalización y agregación de proteínas; en este caso, la conalbúmina es la primera que atraviesa este proceso por ser la menos termoestable (Hsieh, Regenstein, y Rao, 1993; Perez y Pilosof, 2003).

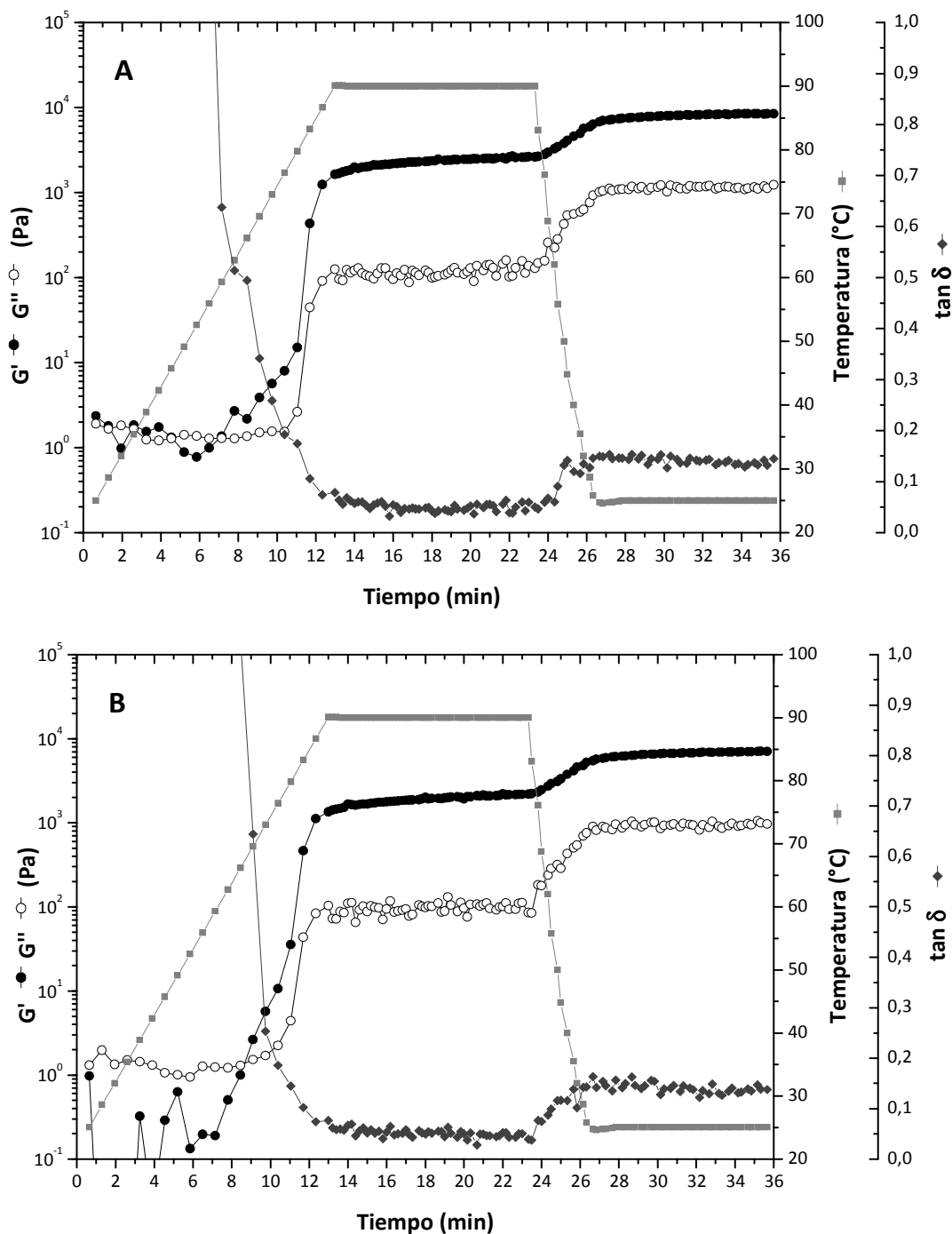


Figura I.14: Evolución del módulo elástico (G'), módulo viscoso (G'')

y de la tangente del ángulo de fase ($\tan \delta$) en función del tiempo de calentamiento para soluciones de EW al 10% p/p, control (A) y sonicada (B).

El primer punto de gelificación coincide con el cruce de G' y G'' ($\tan \delta = 1$), por lo tanto, de allí puede determinarse la temperatura a la que ocurre la gelificación (T_{g1}) y el tiempo (t_{g1}) (Winter, 1987). A partir de este punto, el módulo G' comienza a tomar valores mayores a los de G'' y se mantiene por encima de este a lo largo del resto de la

medición. Luego de atravesar el punto de gelificación, a medida que sigue aumentando la temperatura, se observa otro salto abrupto en los valores de los módulos. Este salto corresponde principalmente a la gelificación de la ovoalbúmina (Hsieh y col, 1993; Perez y col, 2003), proteína mayoritaria de la EW, y a la consecuente formación de la red tridimensional del gel y el desarrollo de su elasticidad. En el comienzo de este ascenso se puede determinar esta segunda temperatura de gelificación ($T_{g\ 2}$) y su tiempo asociado ($t_{g\ 2}$). En la etapa de calentamiento isotérmico a 90 °C, se llega a un *plateau* en los valores de G' , aunque puede observarse un leve aumento por el refuerzo de la estructura del gel. En esta etapa se calcula el valor de G'_c , como el promedio de los valores registrados en la zona de calentamiento isotérmico. Finalmente, en las últimas etapas de enfriamiento se refuerza más la estructura y los valores de G' aumentan más, lo que indica un mayor carácter elástico del gel. En esta última etapa se calcula el valor de G'_f , de la misma manera que se realizó para G'_c . Tres tipos de interacciones identifican los sucesos que ocurren durante la gelificación de la EW. La gelificación de la EW puede dividirse en tres pasos, luego de la desnaturalización inicial de la proteína nativa. El primer paso es el desarrollo de turbidez durante los primeros minutos de calentamiento, como resultado de la formación de agregados esféricos. Este paso está regido probablemente por interacciones hidrofóbicas (Hermansson, 1979). El segundo paso es el intercambio sulfhidrilo-disulfuro y la oxidación de grupos sulfhidrilo que refuerza los agregados preformados y que favorece la adherencia entre agregados. El tercer paso es un repentino y gran aumento de la elasticidad que ocurre en el enfriamiento debido a la rápida formación de múltiples uniones de puente de hidrógeno (Catsimpoilas y Meyer, 1970), lo que provoca un aumento marcado en la rigidez de los agregados.

Los parámetros reológicos obtenidos durante la formación de geles de EW al 10% p/p, control y sonicada, se presentan en la Tabla I.8. Los valores de $T_{g\ 1}$ y $T_{g\ 2}$ determinados se corresponden con los valores obtenidos por DSC (Sección 1.2.3.) y no se encontraron diferencias entre las muestras control y las tratadas con USAI. Tampoco se encontraron diferencias en los valores de G'_c y G'_f en las condiciones en las que se realizó la determinación. Clark, Judge, Richards, Stubbs, y Suggett (1981) previamente habían sugerido que la agregación térmica de proteínas globulares requiere de cierto

grado de desdoblamiento (exposición hacia el medio acuoso de grupos de aminoácidos inicialmente ocultos) para favorecer las uniones de puente de hidrógeno, los puentes iónicos y las interacciones hidrofóbicas. Relkin, Meylheuc, Launay, y Raynal (1998) han demostrado, mediante espectroscopía Raman y dicroísmo circular, que tanto las moléculas de β -lactoglobulina como las de EW aumentan su interacción en solución mediante uniones hidrofóbicas cuando se agregan por efecto térmico. Sin embargo, el incremento de la hidrofobicidad superficial encontrado en este trabajo no se refleja en la dinámica de gelificación.

Tabla I.8: Influencia de los USAI en los parámetros reológicos dinámicos para EW al 5% p/p.

Muestra	Control	Sonicada
T_{g1} (°C)	$63,61 \pm 3,26^a$	$66,17 \pm 4,83^a$
t_{g1} (min)	$7,96 \pm 0,62^a$	$8,45 \pm 0,92^a$
T_{g2} (°C)	$78,14 \pm 1,97^a$	$76,43 \pm 0,01^a$
t_{g2} (min)	$10,73 \pm 0,38^a$	$10,40 \pm 0,00^a$
G'_c (Pa)	2289 ± 234^a	1890 ± 264^a
$\tan \delta_c$	$0,051 \pm 0,002^a$	$0,052 \pm 0,002^a$
G'_f (Pa)	7826 ± 1466^a	6464 ± 1103^a
$\tan \delta_f$	$0,144 \pm 0,08^a$	$0,141 \pm 0,003^a$
n	$0,090 \pm 0,003^a$	$0,085 \pm 0,005^a$

Diferentes letras indican una diferencia significativa con $p < 0,05$.

El empleo de la $\tan \delta$ para evaluar las características de la red gelificada tiene la ventaja de incorporar las contribuciones de G' y G'' en un solo parámetro y, por lo tanto, puede brindar una apreciación más realista de la importancia relativa de estos parámetros en términos de la red gelificada formada. Al respecto, un valor bajo de $\tan \delta$ podría ser indicativo de una red más elástica, mientras que valores altos de $\tan \delta$ están asociados con un producto agregado (Arntfield, Murray, Ismond, y Bernatsky, 1989). Los valores medidos fueron bajos para todos los geles formados, lo que

demuestra su estructura mayormente elástica y no se encontraron diferencias entre muestras sonicadas y sin tratamiento aplicado.

Espectros mecánicos

Las mediciones de reología dinámica pueden proveer información sobre la estructura del gel y, para ello, se puede emplear el espectro mecánico para determinar la semejanza de una muestra de gel con un gel fuerte, covalente. Un gel covalente es independiente de la frecuencia, mientras que un gel físico es levemente dependiente de la frecuencia (Stading y col, 1990). Entonces, una vez constituidos los geles y sin levantar el plato superior del reómetro, se procedió a realizar el espectro mecánico para cada uno de ellos (Figura I.15). A lo largo del barrido de frecuencia, el módulo G' se mantuvo alrededor de un orden de magnitud por encima del módulo G'' , y esto evidencia la formación de un gel verdadero. Esto ocurrió tanto para la muestra control como para la sonicada en todo el rango de frecuencias aplicado, sin diferencias estadísticamente significativas.

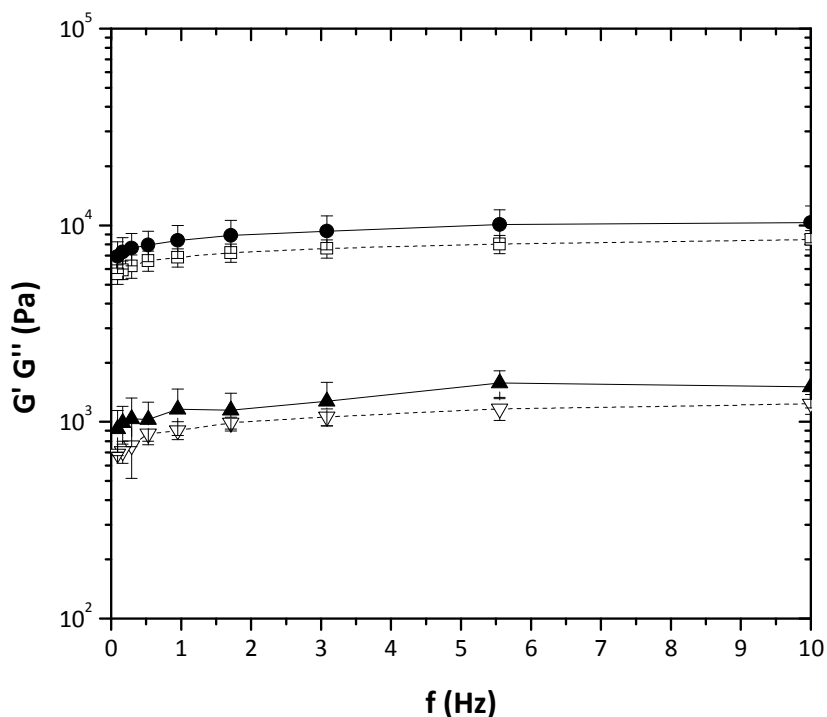


Figura I.15: Espectros mecánicos de los geles de EW al 10% p/p, control (G' ●; G'' ▲) y sonicada (G' □; G'' ▼).

El grado de dependencia de G' con la frecuencia puede expresarse cuantitativamente mediante la constante n , propuesta por Egeland y col (1986). Mediante la representación del logaritmo de G' en función del logaritmo de la frecuencia de oscilación, se puede calcular el valor de n de la pendiente de la recta resultante (Figura I.16). Un gel covalente tiene un $n = 0$, mientras que un gel físico tiene un $n > 0$. La pendiente de la recta es entonces una medida de la semejanza del gel a un gel covalente. Los valores de n se muestran en la Tabla I.8.

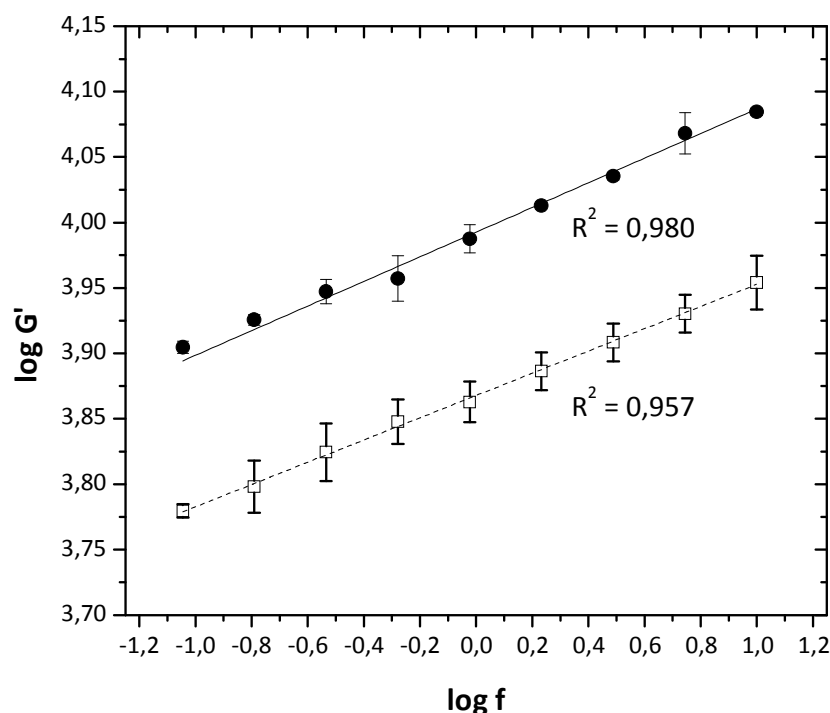


Figura I.16: Ajuste de los espectros mecánicos de los geles de EW al 10% p/p, control (●) y sonicada (□) al modelo propuesto por Egeland y col (1986).

Se observó una leve dependencia de la frecuencia, lo cual indicaría que los geles de EW son geles físicos, según la definición de Clark y Ross-Murphy (1987) y no hubo diferencias entre la muestra control y la sometida al tratamiento con USAI. En la literatura se pueden citar distintos efectos de la aplicación de USAI y su efecto en las propiedades reológicas de biopolímeros. Por ejemplo, se encontró que el tratamiento con USAI (20 kHz, 20 min) de soluciones de HPMC no afectaba su T_g , determinada mediante *tilting test* (Camino y col, 2009). Contrariamente, la sonicación de un aislado de proteína de soja (15 kHz, 10 min) demostró ser favorable en sus propiedades de

gelificación, y se obtuvieron mayores valores del módulo G' durante el calentamiento, respecto al control. Además, luego de realizar el espectro mecánico, se demostró que el aislado sonicado presentaba las propiedades de un gel elástico, mientras que la muestra control se asemejaba a un gel viscoso (Tang y col, 2009).

I.3.6. Agregación térmica: Cinética y microestructura

Cinética de formación de agregados

Como se demostró en la Sección anterior, los resultados obtenidos en los ensayos reológicos no revelaron cambios en la dinámica de gelificación de las muestras sonicadas, contrariamente a lo que podría haberse esperado, de acuerdo con el incremento en la hidrofobicidad superficial encontrado. Teniendo en consideración que las interacciones hidrofóbicas participan en la primera etapa de la gelificación de la EW, se decidió evaluar si se detectaban cambios en la formación de agregados en soluciones más diluidas que las empleadas para la formación de geles. Para tal fin, se recurrió a la técnica de dispersión estática de luz, ya que esta tiene una gran sensibilidad para detectar la formación de agregados (Ahrer, Buchacher, Iberer, y Jungbauer, 2004; Wyatt, 1993). Esto se debe a que los agregados tienen mayor peso molecular, por lo que dispersan más fuertemente luz y, en consecuencia, se detectan con mayor facilidad, aun estando presentes en bajas concentraciones. Entonces, las soluciones de EW al 5% p/p tratadas o no con USAI fueron calentadas utilizando diferentes combinaciones de tiempo y temperatura, y luego se determinó el tamaño y la distribución de los agregados formados. Para todas las temperaturas evaluadas (70, 75, 80 y 85 °C) se observó la misma tendencia en la agregación cuando se compararon las muestras sonicadas con sus respectivos controles; la única diferencia encontrada entre las temperaturas evaluadas fue que al emplear temperaturas cada vez más altas en el calentamiento, se formaron agregados de mayor tamaño a tiempos cada vez menores. En la Figura I.17 se muestra la distribución de tamaño de partícula de muestras calentadas a 75 °C durante diferentes períodos de tiempo.

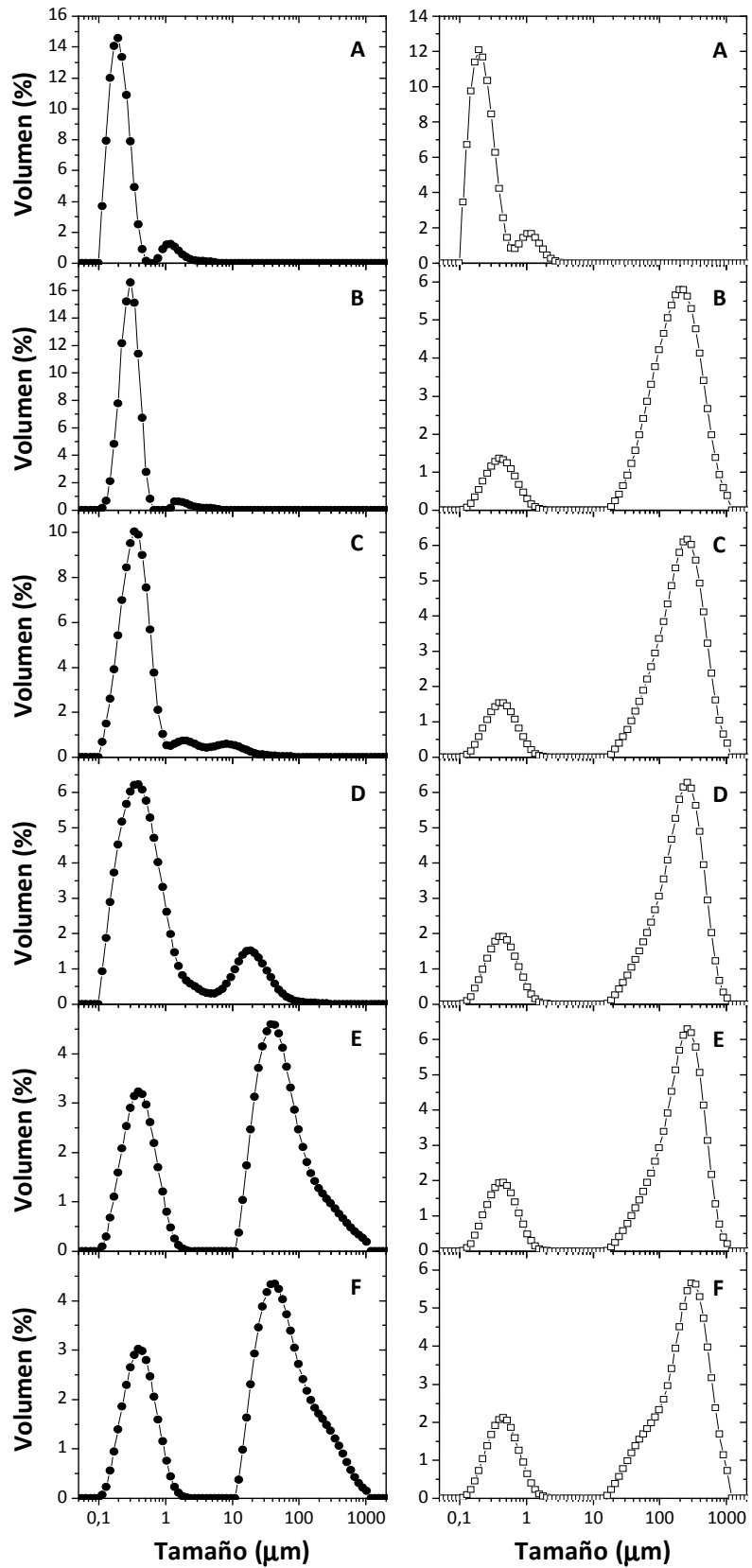


Figura I.17: Distribución de tamaño de partícula de soluciones de EW, 5% p/p, control (●) y sonicada (□), calentadas durante 0 (A), 5 (B), 10 (C), 15 (D), 20 (E) y 25 min (F) a 75 °C.

Para la EW control se puede observar que la población principal, comprendida entre 0,1 y 1 μm , aproximadamente, va disminuyendo para dar lugar a la formación de otra población que se va desplazando hacia mayores tamaños a medida transcurre el tiempo de calentamiento. En cambio, para la EW sonicada la población principal, también comprendida entre 0,1 y 1 μm , aproximadamente, disminuye más abruptamente y se forman agregados más grandes a tiempos menores. Por ejemplo, luego de 15 min de calentamiento (Figura I.17.D), en la muestra control aparece una población de alrededor de 5-200 μm , con un pico máximo en 19 μm , mientras que en la muestra sonicada se forma una población de 13-1000 μm , con un pico máximo en 258 μm . Se sabe que la agregación térmica de las proteínas de la EW se incrementa significativamente mediante la exposición de residuos hidrofóbicos hacia la superficie de las moléculas (Mine y col, 1990). La mayor velocidad con la que se forman los agregados en las muestras sonicadas podría estar relacionado con la mayor hidrofobicidad superficial que presentan estas soluciones ya desde el tiempo inicial de calentamiento. Estos resultados guardan similitud con los encontrados por otros autores que investigaron la agregación de soluciones de biopolímeros sonicados. Camino y col (2009) reportaron que el *cloud point* de soluciones de HPMC disminuyó alrededor de 8-9 °C, y señalaron que el tratamiento con USAI modificó el comportamiento de la HPMC durante la primera etapa del proceso de gelificación, relacionada con el *cloud point*. Por su parte, Chandrapala, Zisu, Kentish, y Ashokkumar (2013) observaron que la sonicación (20 KHz, 31 W, 0-30 min) de soluciones de caseína micelar al 5% p/p incrementó su hidrofobicidad superficial y favoreció la formación de geles firmes.

Luego, para estimar la velocidad de la reacción, se evaluó el descenso de la amplitud máxima del pico correspondiente a la población principal inicial ($\sim 0,1-1 \mu\text{m}$) en función del tiempo de calentamiento a cada temperatura de calentamiento. Los datos recopilados se graficaron y se calculó la pendiente inicial, como una aproximación de la constante de velocidad de agregación (k) (los valores de R^2 fueron de 0,782–1,000). Luego se aplicó la ecuación de Arrhenius, se graficó el logaritmo de los valores de k en función de la inversa de la temperatura y los datos fueron ajustados mediante

regresión lineal (Figura I.18). De este análisis se obtuvieron las energías de activación (E_a) para la formación de agregados, representadas por las pendientes de las rectas.

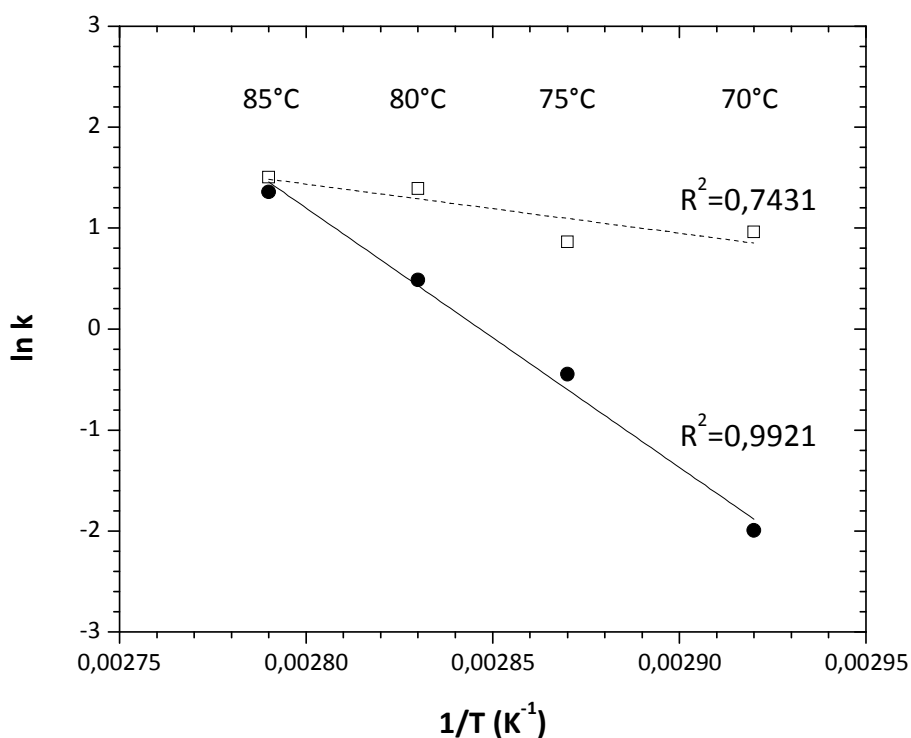


Figura I.18: Cinética de agregación de soluciones de EW control (●) y sonicada (□), calentadas a 70, 75, 80 y 85 °C durante diferentes períodos de tiempo.

De acuerdo con las E_a calculadas, la velocidad de agregación de las muestras sonicadas fue menos dependiente de la temperatura ($E_a = 40 \pm 17$ kJ/mol) que las muestras de EW sin tratamiento ($E_a = 214 \pm 14$ kJ/mol).

Microestructura de los agregados

La microscopía laser confocal (CSLM, sus siglas en inglés) es una herramienta óptica poderosa para la visualización de la estructura de mezclas de biopolímeros (Tromp, van de Velde, van Riel, y Paques, 2001) y de productos alimenticios (Blonk, von Eendenburg, Koning, Weisenborn, y Winkel, 1995) en la escala micrométrica. En la CSLM, el contraste se obtiene mediante diferencias en la fluorescencia, ya sea por autofluorescencia del material o por la adición de colorantes fluorescentes específicos. Cuando se añade una sonda fluorescente a la muestra, las moléculas de dicha sonda se esparcen sobre la muestra de acuerdo a la accesibilidad local y a su afinidad (van de Velde, Weinbreck, Edelman, van der Linden, y Tromp, 2003). En el presente trabajo se

utilizó rodamina como sonda fluorescente. La Figura I.19 muestra que la microestructura de la muestra control es más homogénea que la de la muestra USAI, que se ve altamente agregada. Estas observaciones corroboran los resultados de las medidas realizadas por dispersión de luz.

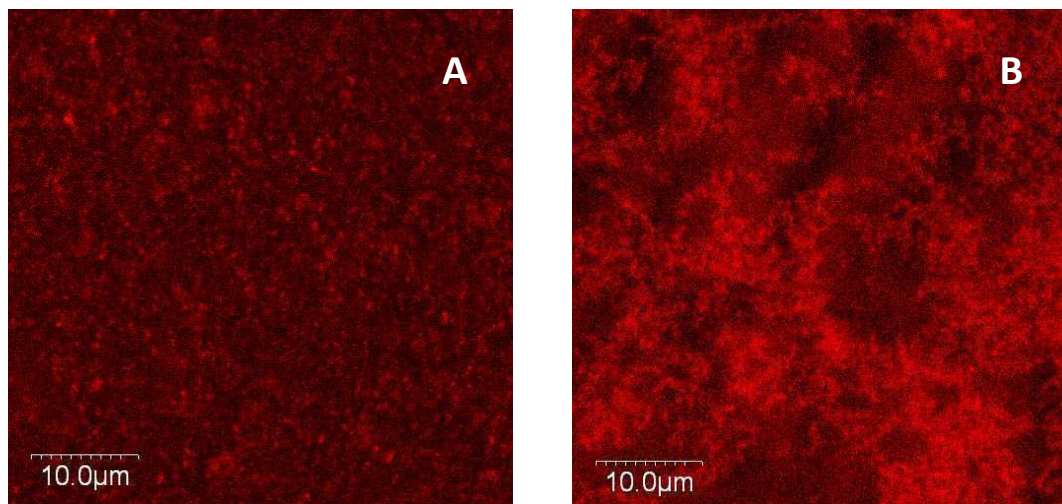


Figura I.19: Imágenes de microscopía confocal de soluciones de EW al 5% p/p, control (A) y sonicada (B), calentadas a 80 °C durante 10 min.

Otros autores observaron que los geles formados luego de la sonicación de concentrados de proteínas lácteas, tratados en un procesador ultrasónico a escala piloto, operando en continuo a 20 kHz, y 1 o 4 kW de potencia, resultaban más densos y que las redes proteicas eran más compactas, comparados con los geles de las proteínas no sonicadas (Zisu y col, 2010).

I.4. Conclusiones

La aplicación de USAI en soluciones de EW provocó cambios en las propiedades moleculares y estructurales que impactaron sobre las propiedades funcionales.

Los atributos moleculares más afectados luego de la sonicación fueron la hidrofobicidad superficial y la concentración de sulfhidrilos totales. Este hecho guarda especial importancia en cuanto a la reactividad molecular y a la potencialidad de generar nuevos enlaces intermoleculares, lo que puede impactar en las propiedades funcionales. Por otra parte, los USAI actuaron como agentes disgregantes de las partículas constitutivas del aislado comercial, como se manifestó en la reducción del tamaño de partícula.

Dichas alteraciones en las propiedades moleculares y estructurales tuvieron consecuencias en la funcionalidad de la EW. La disminución de tamaño de partícula provocó la reducción de la viscosidad de las soluciones y esto perjudicó el desempeño de la EW como espumante, que se vio reflejado en el aumento de la velocidad de drenado y la disminución del tiempo medio de drenado. En cambio, hubo una mejora en la capacidad emulsionante, mediada por el aumento en la hidrofobicidad superficial, que influyó en la formación de gotas de menor tamaño y en una menor velocidad de cremado. Por último, si bien no hubo diferencias en la dinámica de gelificación, sí se observó un comportamiento diferente en la primera etapa de formación de agregados, en la que se demostró que, para las soluciones de EW tratada con USAI, la velocidad de formación fue mayor, relacionada con el aumento en la hidrofobicidad superficial.

I.5. Referencias

- Ahmed, J., Ramaswamy, H. S., Alli, I., & Ngadi, M. (2003). Effect of high pressure on rheological characteristics of liquid egg. *LWT - Food Science and Technology*, 36(5), 517-524.
- Ahrer, K., Buchacher, A., Iberer, G., & Jungbauer, A. (2004). Detection of aggregate formation during production of human immunoglobulin G by means of light scattering. *Journal of Chromatography A*, 1043(1), 41-46.
- Aluko, R. E., Keeratiurai, M., & Mine, Y. (1998). Competitive adsorption between egg yolk lipoproteins and whey proteins on oil-in-water interfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 10(6), 385-393.
- Arai, M., & Kuwajima, K. (2000). Role of the molten globule state in protein folding. En C. R. Matthews (Ed.), *Advances in Protein Chemistry* (Vol. 53, pp. 209-282): Academic Press.
- Arntfield, S. D., Murray, E. D., Ismond, M. A. H., & Bernatsky, A. M. (1989). Role of the thermal denaturation-aggregation relationship in determining the rheological properties of heat induced networks for ovalbumin and vicilin. *Journal of Food Science*, 54(6), 1624-1631.
- Ashokkumar, M., Lee, J., Zisu, B., Bhaskarcharya, R., Palmer, M., & Kentish, S. (2009). Hot topic: sonication increases the heat stability of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 92(11), 5353-5356.
- Baxter, S., Zivanovic, S., & Weiss, J. (2005). Molecular weight and degree of acetylation of high-intensity ultrasonicated chitosan. *Food Hydrocolloids*, 19(5), 821-830.
- Berlan, J., & Mason, T. J. (1992). Sonochemistry: from research laboratories to industrial plants. *Ultrasonics*, 30(4), 203-212.
- Beveridge, T., Toma, S. J., & Nakai, S. (1974). Determination of SH- and SS-groups in some food proteins using Ellman's reagent. *Journal of Food Science*, 39(1), 49-51.
- Bisperink, C. G. J., Ronteltap, A. D., & Prins, A. (1992). Bubble-size distributions in foams. *Advances in Colloid and Interface Science*, 38(0), 13-32.
- Blonk, J. C. G., von Eendenburg, J., Koning, M. M. G., Weisenborn, P. C. M., & Winkel, C. (1995). A new CLSM based method for determination of the phase behavior of aqueous mixtures of biopolymers. *Carbohydrate Polymers*, 28, 287-295.
- Boye, J. I., Ma, C. Y., & Harwalkar, V. R. (1997). Thermal denaturation and coagulation of proteins. En S. Damodaran & A. Paraf (Eds.), *Food Proteins and Their Applications* (pp. 25-56). New York and Basel, Switzerland: Marcel Dekker.
- Camino, N. A., Pérez, O. E., & Pílosof, A. M. R. (2009). Molecular and functional modification of hydroxypropylmethylcellulose by high-intensity ultrasound. *Food Hydrocolloids*, 23(4), 1089-1095.
- Carp, D. J., Bartholomai, G. B., & Pílosof, A. M. R. (1997). A kinetic model to describe liquid drainage from soy protein foams over an extensive protein concentration range. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 30(3), 253-258.
- Catsimpoolas, N., & Meyer, E. W. (1970). Gelation phenomena of soybean globulins. I. Protein-protein interactions. *Cereal Chemistry*, 47, 559-570.
- Clark, A., & Ross-Murphy, S. (1987). Structural and mechanical properties of biopolymer gels. En *Biopolymers* (Vol. 83, pp. 57-192): Springer Berlin / Heidelberg.

- Clark, A. H., Judge, F. J., Richards, J. B., Stubbs, J. M., & Suggett, A. (1981). Electron microscopy of network structures in thermally-induced globular protein gels. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 17(3), 380-392.
- Cunningham, F. E. (1976). Properties of egg white foam drainage. *Poultry Science*, 55(2), 738-743.
- Chandrapala, J., Zisu, B., Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2013). Influence of ultrasound on chemically induced gelation of micellar casein systems. *Journal of Dairy Research*, 80(02), 138-143.
- Chandrapala, J., Zisu, B., Palmer, M., Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2011). Effects of ultrasound on the thermal and structural characteristics of proteins in reconstituted whey protein concentrate. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(5), 951-957.
- Chen, R. H., Chang, J. R., & Shyur, J. S. (1997). Effects of ultrasonic conditions and storage in acidic solutions on changes in molecular weight and polydispersity of treated chitosan. *Carbohydrate Research*, 299(4), 287-294.
- Dickinson, E. (1992). *An introduction to food colloids*. USA: Oxford University Press.
- Dickinson, E., & Stainsby, G. (1982). *Colloids in food*. Barking, Essex: Applied Science Publishers.
- Diez, M. J. F., Osuga, D. T., & Feeney, R. E. (1964). The sulfhydryls of avian ovalbumins, bovine β -lactoglobulin, and bovine serum albumin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 107(3), 449-458.
- Doi, E., & Kitabatake, N. (1997). Structure and functionality of egg proteins. En S. Damodaran & A. Paraf (Eds.), *Food proteins and their functionality* (pp. 325-340). New York and Basel, Switzerland: Marcel Dekker.
- Donovan, J. W., Mapes, C. J., Davis, J. G., & Garibaldi, J. A. (1975). A differential scanning calorimetric study of the stability of egg white to heat denaturation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 26(1), 73-83.
- Drakos, A., & Kiosseoglou, V. (2006a). Stability of acidic egg white protein emulsions containing xanthan gum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 10164-10169.
- Durand, A., Franks, G. V., & Hosken, R. W. (2003). Particle sizes and stability of UHT bovine, cereal and grain milks. *Food Hydrocolloids*, 17(5), 671-678.
- Edwards, S. F., Lillford, P. J., & Blanshard, J. M. V. (1987). Gels and networks in practice and theory. En J. M. V. Blanshard & P. J. Lillford (Eds.), *Food Structure and Behaviour* USA: Elsevier Science & Technology Books.
- Egelandsdal, B., Fretheim, K., & Harbitz, O. (1986). Dynamic rheological measurements on heat-induced myosin gels: An evaluation of the method's suitability for the filamentous gels. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 37(9), 944-954.
- Fernandez-Diaz, M. D., Barsotti, L., Dumay, E., & Cheftel, J. C. (2000). Effects of pulsed electric fields on ovalbumin solutions and dialyzed egg white. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2332-2339.
- Foegeding, E. A., Luck, P. J., & Davis, J. P. (2006). Factors determining the physical properties of protein foams. *Food Hydrocolloids*, 20(2-3), 284-292.
- Furukawa, T., & Ohta, S. (1983). Ultrasonic-induced modification of flow properties of soy protein dispersion. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47(4), 745-750.

- Gülseren, I., Güzey, D., Bruce, B. D., & Weiss, J. (2007). Structural and functional changes in ultrasonicated bovine serum albumin solutions. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14(2), 173-183.
- Hall, G. M. (1996). *Methods of testing protein functionality*. London: Blackie Academic & Professional.
- Hayakawa, S., & Sato, Y. (1976). Studies on the dissociation of the soluble ovomucin by sonication. *Agricultural and Biological Chemistry*, 40(12), 2397-2404.
- Hermansson, A. M. (1979). Aggregation and denaturation involved in gel formation. En A. Pour-El (Ed.), *Functionality and Protein Structure* (Vol. 92, pp. 81-103): AMERICAN CHEMICAL SOCIETY.
- Howell, N. K., & Taylor, C. (1995). Effect of ascorbic acid on the foaming and gelling of globular proteins. *International Journal of Food Science & Technology*, 30(3), 321-334.
- Hsieh, Y. L., Regenstein, J. M., & Rao, M. A. (1993). Gel point of whey and egg proteins using dynamic rheological data. *Journal of Food Science*, 58(1), 116-119.
- Huang, H., Kwok, K.-C., & Liang, H.-H. (2008). Inhibitory activity and conformation changes of soybean trypsin inhibitors induced by ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(5), 724-730.
- Iida, Y., Tuziuti, T., Yasui, K., Towata, A., & Kozuka, T. (2008). Control of viscosity in starch and polysaccharide solutions with ultrasound after gelatinization. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2), 140-146.
- Jambrak, A. R., Lelas, V., Mason, T. J., Krešić, G., & Badanjak, M. (2009). Physical properties of ultrasound treated soy proteins. *Journal of Food Engineering*, 93(4), 386-393.
- Jambrak, A. R., Mason, T. J., Lelas, V., Herceg, Z., & Herceg, I. L. (2008). Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions. *Journal of Food Engineering*, 86(2), 281-287.
- Jambrak, A. R., Mason, T. J., Lelas, V., & Kresic, G. (2010). Ultrasonic effect on physicochemical and functional properties of α -lactalbumin. *LWT - Food Science and Technology*, 43(2), 254-262.
- Johnson, T. M., & Zabik, M. E. (1981). Egg albumen proteins interactions in an angel food cake system. *Journal of Food Science*, 46(4), 1231-1236.
- Karki, B., Lamsal, B., Grewell, D., Pometto, A., van Leeuwen, J., Khanal, S., & Jung, S. (2009). Functional properties of soy protein isolates produced from ultrasonicated defatted soy flakes. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86(10), 1021-1028.
- Kato, A., & Nakai, S. (1980). Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 624(1), 13-20.
- Kato, A., Oda, S., Yamanaka, Y., Matsudomi, N., & Kobayashi, K. (1985). Functional and structural properties of ovomucin. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49(12), 3501-3504.
- Kato, A., Takahashi, A., Matsudomi, N., & Kobayashi, K. (1983). Determination of foaming properties of proteins by conductivity measurements. *Journal of Food Science*, 48(1), 62-65.
- Kemps, B. J., Bamelis, F. R., Mertens, K., Decuyper, E. M., De Baerdemaeker, J. G., & De Ketelaere, B. (2010). The assessment of viscosity measurements on the

- albumen of consumption eggs as an indicator for freshness. *Poultry Science*, 89(12), 2699-2703.
- Kimura, T., Sakamoto, T., Leveque, J.-M., Sohmiya, H., Fujita, M., Ikeda, S., & Ando, T. (1996). Standardization of ultrasonic power for sonochemical reaction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 3(3), S157-S161.
- Kinsella, J. E. (1984). Milk proteins: physicochemical and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 21(3), 197-262.
- Kitabatake, N., & Doi, E. (1982). Surface tension and foaming of protein solutions. *Journal of Food Science*, 47(4), 1218-1221.
- Kosower, E. M., & Kanety, H. (1983). Intramolecular donor-acceptor systems. 10. Multiple fluorescences from 8-(N-phenylamino)-1-naphthalenesulfonates. *Journal of the American Chemical Society*, 105(20), 6236-6243.
- Krešić, G., Lelas, V., Jambrak, A. R., Herceg, Z., & Brnčić, S. R. (2008). Influence of novel food processing technologies on the rheological and thermophysical properties of whey proteins. *Journal of Food Engineering*, 87(1), 64-73.
- Kuwajima, K. (2002). The role of the molten globule state in protein folding: the search for a universal view of folding. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 68, 333-340.
- Kuwajima, K., & Arai, M. (2000). The molten globule state: the physical picture and biological significance. En R. H. Pain (Ed.), *Mechanisms of protein folding* (pp. 138-174). Oxford: Oxford University Press.
- Lei, B., Majumder, K., Shen, S., & Wu, J. (2011). Effect of sonication on thermolysin hydrolysis of ovotransferrin. *Food Chemistry*, 124(3), 808-815.
- Li-Chan, E., & Nakai, S. (1989). Biochemical basis for the properties of egg white. *Critical reviews in poultry biology*, 2(1), 21-59.
- Lorimer, J. P., Mason, T. J., Cuthbert, T. C., & Brookfield, E. A. (1995). Effect of ultrasound on the degradation of aqueous native dextran. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2(1), S55-S57.
- Martini, S., Potter, R., & Walsh, M. K. (2010). Optimizing the use of power ultrasound to decrease turbidity in whey protein suspensions. *Food Research International*, 43(10), 2444-2451.
- Matsuda, T., Watanabe, K., & Sato, Y. (1981). Heat-induced aggregation of egg white proteins as studied by vertical flat-sheet polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Food Science*, 46(6), 1829-1834.
- McClements, D. J. (2005). Emulsion ingredients. En F. M. Clydesdale (Ed.), *Food Emulsions: principles, practice, and techniques* Boca Raton: CRC Press.
- McClements, D. J. (2005). *Food Emulsions: principles, practice and techniques*. Boca Raton: CRC Press.
- McClements, D. J., & Weiss, J. (2005). Lipid emulsions En F. Shahidi (Ed.), *Bailey's Industrial Oil and Fat Products* (Vol. 3). United Kingdom: Wiley-Interscience.
- Mengual, O., Meunier, G., Cayre, I., Puech, K., & Snabre, P. (1999). Characterisation of instability of concentrated dispersions by a new optical analyser: the TURBISCAN MA 1000. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 152(1-2), 111-123.
- Mészáros, L., Horti, K., & Farkas, J. (2006). Changes of hen eggs and their components caused by non-thermal pasteurizing treatments I. gamma irradiation of shell eggs. *Acta Alimentaria*, 35(2), 229-236.

- Mine, Y. (1995). Recent advances in the understanding of egg white protein functionality. *Trends in Food Science & Technology*, 6(7), 225-232.
- Mine, Y., Noutomi, T., & Haga, N. (1990). Thermally induced changes in egg white proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(12), 2122-2125.
- Moreau, L., Kim, H. J., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2003). Production and characterization of oil-in-water emulsions containing droplets stabilized by β -lactoglobulin-pectin membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(22), 6612-6617.
- Mukhopadhyay, S., Tomasula, P. M., Van Hekken, D., Luchansky, J. B., Call, J. E., & Porto-Fett, A. (2009). Effectiveness of cross-flow microfiltration for removal of microorganisms associated with unpasteurized liquid egg white from process plant. *J Food Sci*, 74(6), 1750-3841.
- Nakamura, R. (1964). Studies on the foaming property of the chicken egg white. Part VII. On the foaminess of the denatured ovalbumin. *Agricultural and Biological Chemistry*, 28(6), 403-407.
- Nicorescu, I., Vial, C., Talansier, E., Lechevalier, V., Loisel, C., Della Valle, D., Riaublanc, A., Djelveh, G., & Legrand, J. (2011). Comparative effect of thermal treatment on the physicochemical properties of whey and egg white protein foams. *Food Hydrocolloids*, 25, 797-808.
- Onda, M., Tatsumi, E., Takahashi, N., & Hirose, M. (1997a). Refolding of urea-denatured ovalbumin that comprises non-native disulfide isomers. *Journal of Biochemistry*, 122(1), 83-89.
- Onda, M., Tatsumi, E., Takahashi, N., & Hirose, M. (1997b). Refolding process of ovalbumin from urea-denatured state. Evidence for the involvement of nonproductive side chain interactions in an early intermediate. *Journal of Biological Chemistry*, 272(7), 3973-3979.
- Perez, O. E., & Pilosof, A. M. R. (2003). Influence of pulsed electric field processing on the structure and gelation of egg white. En F. C. E. Dickinson and T.V. Vliet (Ed.), *Food Colloids, Biopolymers and Biomaterials*, RSC (pp. 119-132).
- Petrier, C., Jeunet, A., Luche, J. L., & Reverdy, G. (1992). Unexpected frequency effects on the rate of oxidative processes induced by ultrasound. *Journal of the American Chemical Society*, 114, pp. 3148-3150.
- Pinto, P., Ribeiro, R., Sousa, L., Verde, S. C., Lima, M. G., Dinis, M., Santana, A., & Botelho, M. L. (2004). Sanitation of chicken eggs by ionizing radiation: functional and nutritional assessment. *Radiation Physics and Chemistry*, 71(1-2), 35-38.
- Radványi, D., Juhász, R., Németh, C., Suhajda, A., Balla, C., & Barta, J. (2012). Evaluation of the stability of whipped egg white. *Czech Journal of Food Science*, 30, 412-420.
- Ragni, L., Al-Shami, A., Mikhaylenko, G., & Tang, J. (2007). Dielectric characterization of hen eggs during storage. *Journal of Food Engineering*, 82(4), 450-459.
- Raikos, V., Campbell, L., & Euston, S. R. (2007). Effects of sucrose and sodium chloride on foaming properties of egg white proteins. *Food Research International*, 40(3), 347-355.
- Raso, J., Mañas, P., Pagán, R., & Sala, F. J. (1999). Influence of different factors on the output power transferred into medium by ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 5(4), 157-162.

- Relkin, P., Meylheuc, T., Launay, B., & Raynal, K. (1998). Heat-induced gelation of globular protein mixtures. A DSC and scanning electron microscopic study. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 51(3), 747-755.
- Romanoff, A. L., & Romanoff, J. (1949). *The avian egg*. New York: John Wiley and Sons Inc.
- Sato, Y., Hayakawa, S., & Nakamura, R. (1976). Studies on factors of solubilization of insoluble ovomucin during thick white thinning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24(4), 798-803.
- Seshadri, R., Weiss, J., Hulbert, G. J., & Mount, J. (2003). Ultrasonic processing influences rheological and optical properties of high-methoxyl pectin dispersions. *Food Hydrocolloids*, 17(2), 191-197.
- Shenton, A. J. (1979). *Membrane composition and performance of food emulsions*. Tesis Doctoral, University of London, London.
- Shimada, K., & Cheftel, J. C. (1988). Determination of sulfhydryl groups and disulfide bonds in heat-induced gels of soy protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(1), 147-153.
- Stadelman, W. J., & Cotterill, O. (1995). *Egg science and technology*. New York: Food Products Press.
- Stading, M., & Hermansson, A. M. (1990). Viscoelastic behaviour of β -lactoglobulin gel structures. *Food Hydrocolloids*, 4(2), 121-135.
- Stanley, D. W., & Yada, R. Y. (1994). Physical consequences of thermal reactions in food protein system. En H. G. Schwartzberg & R. W. Hartel (Eds.), *Physical chemistry of food* (pp. 669–733). New York: Marcel Dekker.
- Stauffer, C. E. (1999). *Emulsifiers*. St. Paul, Minnesota: Eagan Press.
- Takahashi, N., & Hirose, M. (1992). Reversible denaturation of disulfide-reduced ovalbumin and its reoxidation generating the native cystine cross-link. *Journal of Biological Chemistry*, 267(16), 11565-11572.
- Tang, C.-H., Wang, X.-Y., Yang, X.-Q., & Li, L. (2009). Formation of soluble aggregates from insoluble commercial soy protein isolate by means of ultrasonic treatment and their gelling properties. *Journal of Food Engineering*, 92(4), 432-437.
- Townsend, A.-A., & Nakai, S. (1983). Relationships between hydrophobicity and foaming characteristics of food proteins. *Journal of Food Science*, 48(2), 588-594.
- Tromp, R. H., van de Velde, F., van Riel, J., & Paques, M. (2001). Confocal scanning light microscopy (CSLM) on mixtures of gelatine and polysaccharides. *Food Research International*, 34(10), 931-938.
- Tung, M. A., Watson, E. L., & Richards, J. F. (1971). Rheology of egg albumen. *Transactions of the American Society of Agricultural and Biological Engineers*, 14(1), 17-19.
- van de Velde, F., Weinbreck, F., Edelman, M. W., van der Linden, E., & Tromp, R. H. (2003). Visualisation of biopolymer mixtures using confocal scanning laser microscopy (CSLM) and covalent labelling techniques. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 31(1-4), 159-168.
- Van der Plancken, I., Van Loey, A., & Hendrickx, M. E. (2005). Changes in sulfhydryl content of egg white proteins due to heat and pressure treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(14), 5726-5733.

- Villamiel, M., & de Jong, P. (2000). Influence of high-intensity ultrasound and heat treatment in continuous flow on fat, proteins, and native enzymes of milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 472-478.
- Walstra, P. (1993). Principles of emulsion formation. *Chemical Engineering Science*, 48(2), 333-349.
- Walstra, P. (1996). Emulsion stability. En P. Becher (Ed.), *Encyclopedia of emulsion technology* (Vol. 4). New York: Marcel Dekker Inc.
- Walstra, P. (2003). *Physical chemistry of foods*. New York: Marcel Dekker Inc.
- Wang, J., Tang, J., Wang, Y., & Swanson, B. (2009). Dielectric properties of egg whites and whole eggs as influenced by thermal treatments. *LWT - Food Science and Technology*, 42(7), 1204-1212.
- Watanabe, K., Matsuda, T., & Nakamura, R. Y. O. (1985). Heat-induced aggregation and denaturation of egg white proteins in acid media. *Journal of Food Science*, 50(2), 507-510.
- Weiss, J., Kristbergsson, K., & Kjartansson, G. T. (2011). Engineering food ingredients with high-intensity ultrasound. En H. Feng, G. V. Barbosa-Cánovas & J. Weiss (Eds.), *Ultrasound technologies for food and bioprocessing* (pp. 239-285). New York: Springer Science+Business Media.
- Winter, H. H. (1987). Can the gel point of a cross-linking polymer be detected by the $G' - G''$ crossover? *Polymer Engineering & Science*, 27(22), 1698-1702.
- Wyatt, P. J. (1993). Mean square radius of molecules and secondary instrumental broadening. *Journal of Chromatography A*, 648(1), 27-32.
- Zisu, B., Bhaskaracharya, R., Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2010). Ultrasonic processing of dairy systems in large scale reactors. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(6), 1075-1081.

Capítulo II

***Empleo de los ultrasonidos de alta
intensidad como estrategia para el diseño
de nanopartículas de clara de huevo***

II.1. Justificación de la estrategia empleada

En el Capítulo I se demostró que la aplicación de USAI puede emplearse para modificar las propiedades de agregación de la EW. A su vez, tanto en el presente trabajo como en la literatura relacionada se determinó la efectividad de los USAI para reducir el tamaño de partícula de soluciones de biopolímeros (Ashokkumar y col, 2009; Baxter y col, 2005; Chen y col, 1997; Furukawa y col, 1983; Iida y col, 2008; Jambrak y col, 2009; Jambrak y col, 2010; Lorimer y col, 1995; Tang y col, 2009; Villamiel y col, 2000; Zisu y col, 2010). Por otra parte, es bien sabido que el calentamiento de soluciones proteicas provoca su desnaturalización y agregación, lo que resulta en un aumento en el tamaño de partícula y que las propiedades de agregación y el tipo de estructuras que se forman dependen del pH del medio en el que se encuentra disuelta la proteína (Alting y col, 2004; Alleoni, 2006; Matsuda y col, 1981; Seideman, Cotterill, y Funk, 1963; Watanabe y col, 1985). En este Capítulo se presentan los resultados del efecto de los USAI en el tamaño de partícula, influenciado por tres variables experimentales: el pH, el tiempo y la temperatura de sonicación. En cuanto al pH, se estudió el efecto al pH natural de la EW, de 7, y a pH 3, es decir, se evaluaron dos pHs, uno por encima y otro por debajo del pI de la EW. Se evaluaron tiempos de sonicación desde 5 hasta 20 min para determinar cómo se altera la proteína en diferentes instancias del tratamiento. En lo que respecta a la variable temperatura, se realizaron tratamientos de USAI con calentamiento simultáneo, lo que se conoce como termosonicación (TS), empleando temperaturas de 80 y 85 °C. Para determinar el tamaño de partícula se recurrió a la técnica de dispersión dinámica de luz, ya que el rango de medición del equipo resultó más adecuado para las muestras sonicadas y termosonicadas. Todos los tratamientos se realizaron a una concentración de proteína de 5% p/p y luego se diluyeron en agua bidestilada al 0,1% p/p para realizar las mediciones por DLS.

II.2. Caracterización del tamaño de partícula de EW

En la Figura II.1 se muestran comparativamente las distribuciones de tamaño de partícula en intensidad, volumen y número de soluciones de EW a pH 7 y 3. La caracterización de la EW a pH 7 se realizó previamente en el Capítulo I. La distribución de tamaño de partícula en intensidad de la muestra sin filtrar exhibió un pico principal de rango amplio con un máximo correspondiente a 220 nm, que incluyó partículas

desde los 51 a los 1281 nm. En volumen, la población principal apareció en 396 nm y presentó un “hombro” alrededor de los 100 nm. La conversión en número dio como resultado una sola población bastante uniforme, con un máximo en 91 nm.

A pH 3, la distribución de tamaño de partícula en intensidad mostró un pico principal a 1106 nm, con un rango desde 106 a 3091 nm, mayor que el medido a pH 7. Además, se encontró una cola de otra población cerca del límite de detección superior del equipo. En volumen la distribución permaneció similar, aunque se observó que la contribución de partículas correspondientes a la población con mayores diámetros fue menor. Finalmente, en la distribución en número solo fue importante el pico de menor tamaño, cuyo máximo fue de 396 nm, aunque con un rango bastante amplio, abarcando desde 79 hasta 3091 nm. Es decir, que la EW a pH 3 experimentó un aumento notable del tamaño de partícula, que indicaría una agregación mediada por enlaces no covalentes (Hagolle, Launay, y Relkin, 1998).

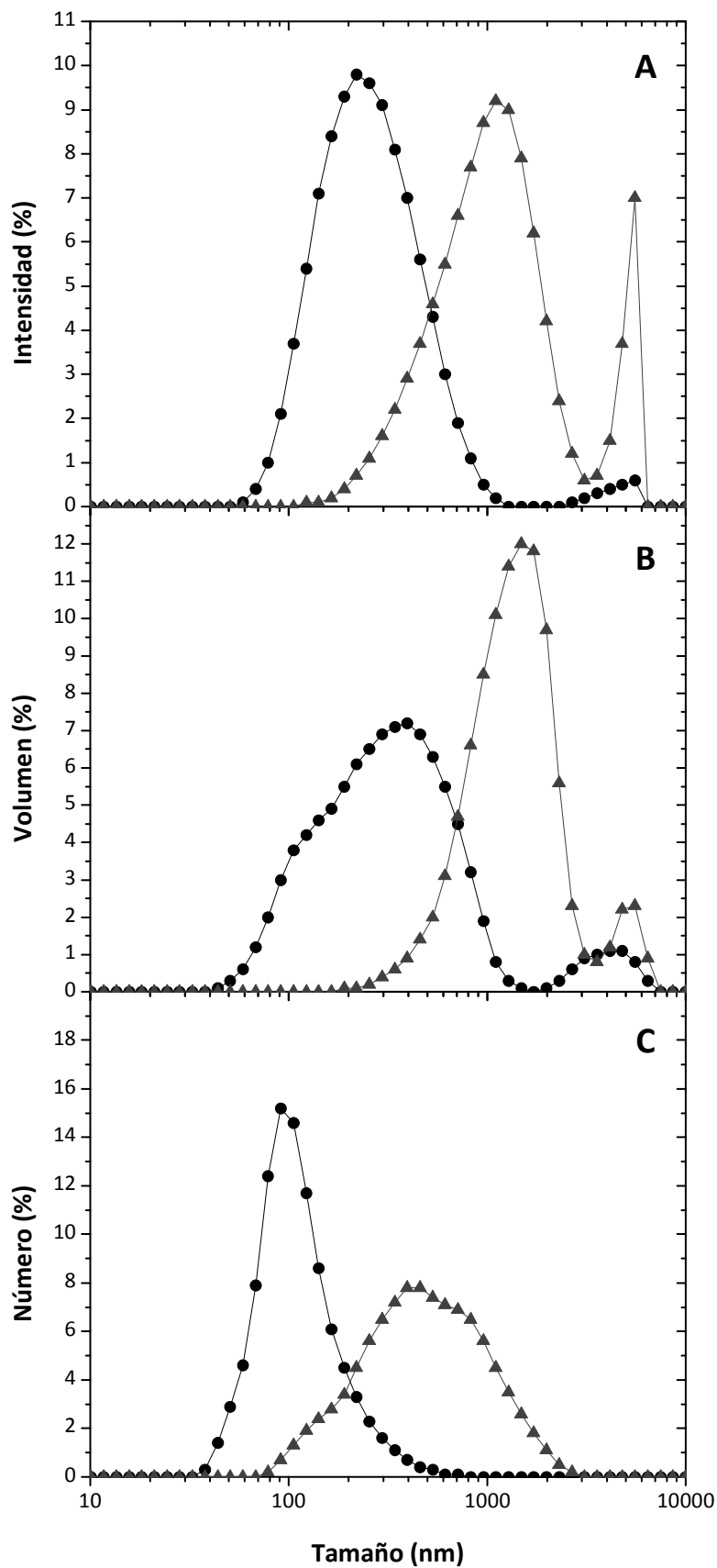


Figura II.1: Distribución de tamaño de partícula en intensidad (A), en volumen (B) y en número (C) de soluciones de EW al 0,1% p/p a pH 7 (●) y 3 (▲).

II.3. Influencia de los USAI (sin calentamiento) en el tamaño de partícula

En el Capítulo I se mostró que a pH 7, la aplicación de USAI redujo el tamaño de partícula, luego de 20 min de tratamiento. Al aplicar el tratamiento con USAI durante tiempos menores, se vio que los mayores cambios se produjeron en los primeros minutos de la sonicación y luego siguieron avanzando pero más gradualmente (Figura II.2). En la distribución en intensidad se observó una población monomodal, con un máximo que rondó los 190 nm. Al convertir los datos en volumen, las distribuciones de la muestra control y las sonicadas se transformaron en trimodales. En cuanto a la muestra sonicada, se observó que con el avance del tiempo de sonicación fue aumentando la proporción de partículas de tamaño menor a 100 nm. La transformación de la distribución a número dio como resultado una única población principal, con un máximo en 91 nm, para la muestra control y que fue disminuyendo a 74, 68 y 59 nm, para las muestras sonicadas durante 10, 15 y 20 min. Se observó una leve desviación de esta tendencia hacia menores tamaños para la muestra sonicada durante 5 min. Por otra parte, a pH 3, la aplicación de USAI causó una gran reducción del tamaño de partícula luego de 5 min de procesamiento, que continuó disminuyendo con el tiempo aunque a una tasa menor (Figura II.3). La distribución de tamaño fue monomodal, con un máximo que osciló entre 220 y 255 nm, durante los diferentes tiempos de procesamiento. En volumen y número se confirmó la distribución monomodal de las muestras sonicadas.

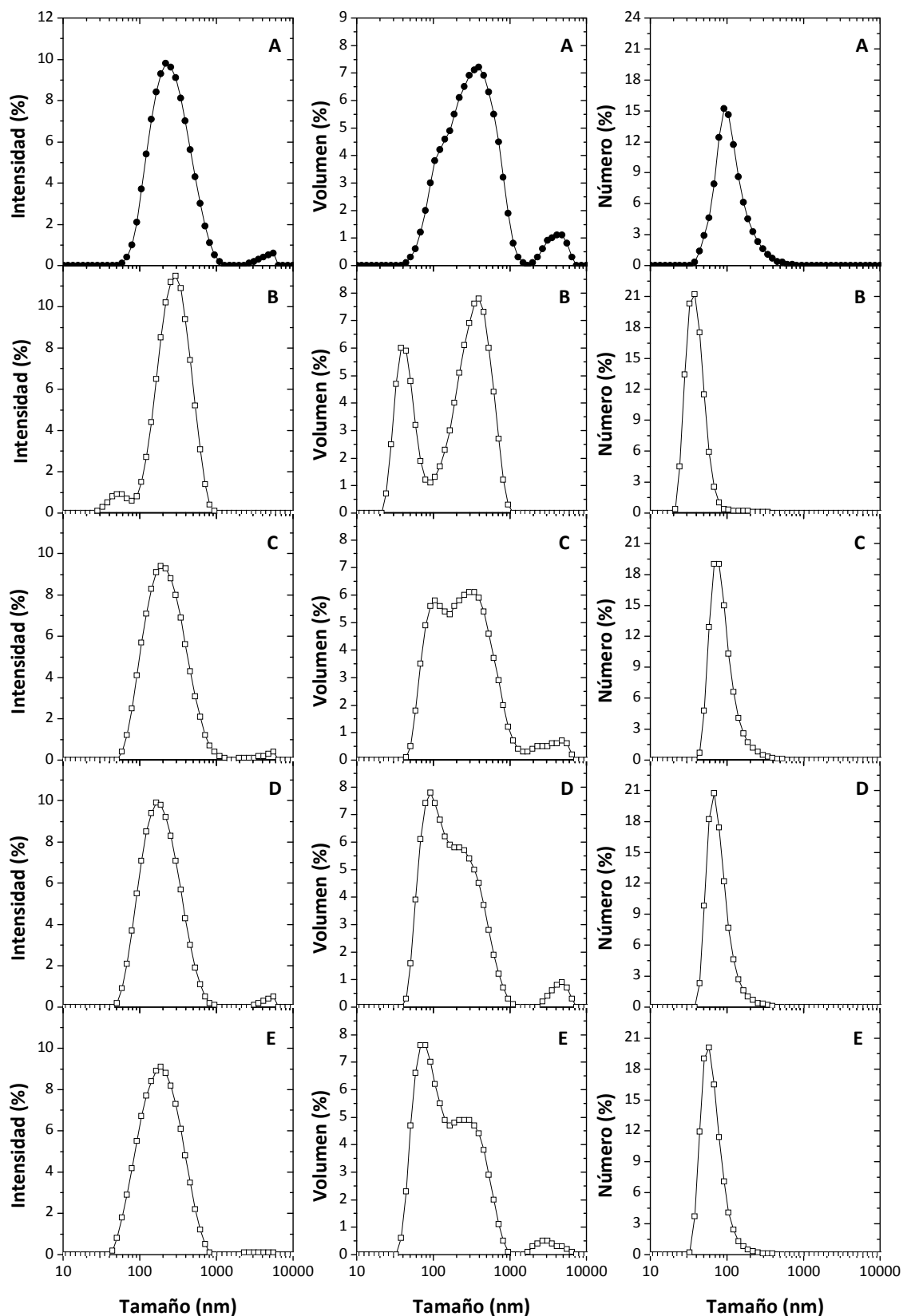


Figura II.2: Distribución de tamaño de partícula en intensidad, volumen y número de soluciones de EW, 5% p/p, pH 7, control (●) y sonicada (□) durante 0 (A), 5 (B), 10 (C), 15 (D) y 20 min (E).

La disminución de tamaño se evidenció muy claramente en la distribución de tamaño de partícula en número, donde el pico principal de 396 nm presente en la muestra control fue disminuyendo hacia 164, 132, 122 y 114 nm para 5, 10, 15 y 20 min de tiempo de tratamiento ultrasónico, respectivamente. Del mismo modo, Gordon y col (2010) encontraron que el tamaño de partícula de soluciones de WPI al 7,5% p/p disminuyó bajo los efectos de los ultrasonidos aplicados a temperatura ambiente y que esta reducción fue mayor durante los primeros 2 min de sonicación, y luego de los 5 min tales efectos se atenuaron. Por su parte, Iida y col (2008) encontraron que la despolimerización de almidones de distintas fuentes gelatinizados fue más intensa durante los primeros 10-30 min de sonicación, y luego los cambios fueron más graduales. Se podría concluir que el tratamiento de la EW con USAI a pH 7 produjo una alta proporción de partículas de menor tamaño que a pH 3, pero también se detectó la presencia de partículas de mayor tamaño, es decir, las muestras sonicadas a pH 7 fueron bimodales. Sin embargo, a pH 3 se logró obtener una población monodispersa de 220 nm en intensidad, para el tiempo mayor de sonicación, de 20 min.

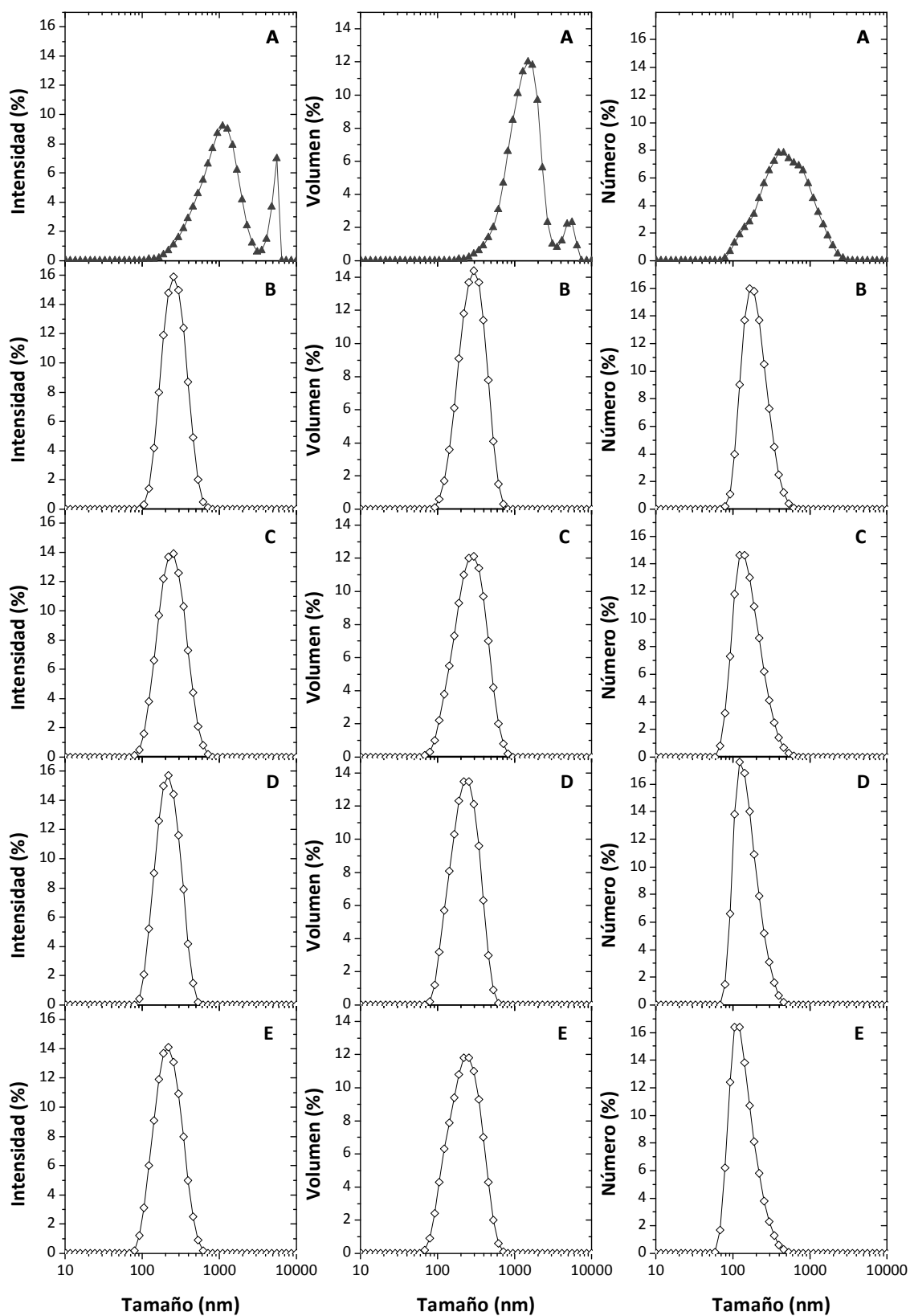


Figura II.3: Distribución de tamaño de partícula en intensidad, volumen y número de soluciones de EW, 5% p/p, pH 3, control (\blacktriangle) y sonicada (\diamond) durante 0 (A), 5 (B), 10 (C), 15 (D) y 20 min (E).

En la Figura II.4 se muestra el aspecto de las soluciones de EW, control y sonicada, a cada pH evaluado. A los fines prácticos sólo se presentan las soluciones control y las sonicadas durante 20 min. Las soluciones de EW control a pH 3 fueron levemente más turbias que a pH 7 (no apreciable en la foto). Sin embargo, luego del tratamiento con USAI, las soluciones a pH 3 se volvieron más transparentes. El cambio en la apariencia está relacionado con la forma de dispersar la luz de las partículas suspendidas en la solución y está, en consecuencia, estrechamente vinculado al tamaño de las partículas. En las soluciones de partida, a pH 3 hay una mayor proporción de partículas grandes, por lo tanto, a este pH la solución de EW presenta mayor turbidez que a pH 7. Luego, al sonicarlas, si bien la solución a pH 7 contiene un número mayor de partículas más chicas, también hay presentes partículas de mayor tamaño (como se muestra en la distribución en volumen) que pueden ser las causantes de una mayor turbidez en la solución a pH 7. En cambio, a pH 3, hay una población más homogénea (monodispersa) de partículas de menor tamaño, lo que resulta en una solución más translúcida.

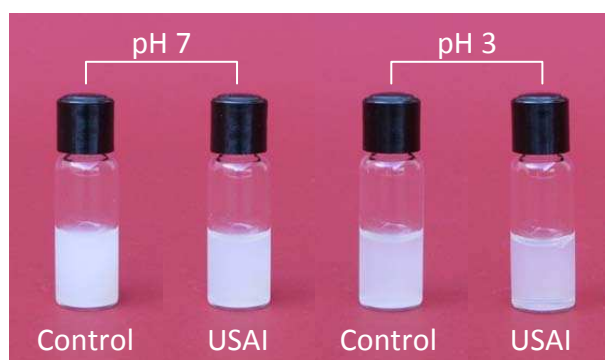


Figura II.4: Apariencia macroscópica de soluciones de EW, 5% p/p, a pH 7 y 3, control y sonicada durante 20 min.

II.4. Influencia de la TS en el tamaño de partícula

En primer lugar, se estudió el efecto del calentamiento a 80 u 85 °C en el tamaño de las partículas de EW. El tamaño de partícula se incrementó continuamente a lo largo del tiempo de calentamiento como resultado de la desnaturalización y agregación de proteínas. En la Figura II.5 se observa el avance de la agregación con el tiempo de calentamiento, a pH 7. Debido a que se trabajó cerca del límite de detección superior del equipo y a la gran heterogeneidad de las muestras calentadas, no es recomendable realizar la conversión de la distribución en intensidad a distribuciones en volumen o

número, por lo tanto, sólo se presentan los datos en intensidad. A 80 °C, la población principal de alrededor de 220 nm se fue desplazando hacia valores de tamaño mayores, correspondientes a 712, 825, 1383 y 1990 nm, para 5, 10, 15 y 20 min de calentamiento, respectivamente. A 85 °C la agregación fue mayor que a 80 °C y se observó el corrimiento del pico hacia 1484 nm, transcurridos 5 min de calentamiento. Luego de 10 min, se observaron dos picos, a 1106 y 4801 nm, que se desplazaron hacia mayores valores pasados 15 min de tratamiento térmico. El primer pico aparece alrededor de 1990 nm y el segundo aparece truncado sobre el límite de detección del equipo. Después de 15 min de calentamiento, no fue posible realizar la medición de tamaño por DLS, debido a la presencia de agregados que excedieron el límite de detección superior del equipo.

A pH 3, la agregación fue mucho más extensiva que a pH 7, lo que originó partículas muy grandes que sedimentaron durante la determinación por DLS, dando lugar a errores en la medición.

Al respecto, Hagolle y col (1998) encontraron que el calentamiento de soluciones al 5% p/p de ovoalbúmina a pH 3 producía un mayor porcentaje de agregados a menores temperaturas que a pH 7, según evaluaron por electroforesis en geles de poliacrilamida. Los autores además informaron que, por encima de los 52 °C, se formaban agregados no covalentes a pH 3, seguidos de la creación de estructuras de hoja β intermoleculares, mientras que a pH 7 se desarrollaban agregados covalentes.

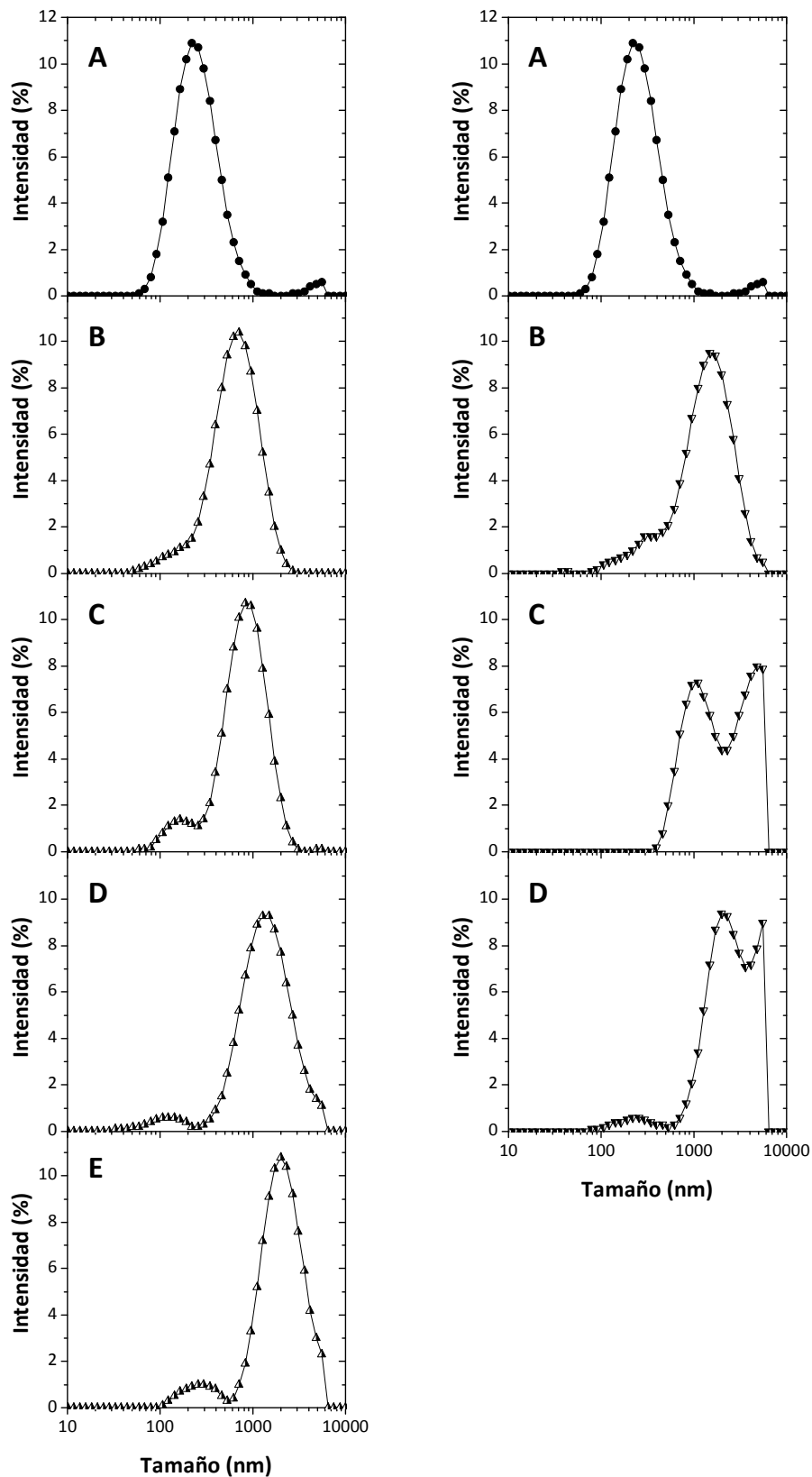


Figura II.5: Distribución de tamaño de partícula en intensidad de soluciones de EW, 5% p/p, pH 7, control (●) y calentada a 80 °C (▲) y 85 °C (▼) durante 0 (A), 5 (B), 10 (C), 15 (D) y 20 min (E).

Cuando se aplicó el tratamiento de TS a 80 u 85 °C, se observaron tendencias similares para ambas temperaturas. A pH 7, el tamaño de partícula en intensidad del pico principal aumentó desde 220 hasta 615 nm, a los 5 min y luego descendió gradualmente a 573, 531 y 459, a los 10, 15 y 20 min de tratamiento con TS a 80 °C (Figura II.6), respectivamente. Como puede apreciarse, luego de 5 min de calentamiento el incremento fue notorio, sin embargo, a tiempos mayores el efecto de la sonicación comenzó a amortiguar la agregación ocasionada por el calentamiento, y se generó una población minoritaria por debajo de los 100 nm. De todas formas, el resultado global, al cabo del mayor tiempo de tratamiento fue un aumento en el tamaño de partícula. Esta tendencia se observó tanto a 80 como a 85 °C (Figura II.7). La única diferencia encontrada fue que a 85 °C se observó una agregación levemente mayor en los primeros minutos de TS; el pico principal alcanzó valores de 664 y 615 nm a 5 y 10 min de tratamiento, respectivamente. Las distribuciones en volumen fueron similares a las presentadas en intensidad. En la distribución en número, se evidenció que la proporción de partículas menores a 100 nm aumentó a mayores tiempos de TS, debido al efecto disruptor de los USAI.

Estos resultados muestran un balance entre la agregación producida por el tratamiento térmico (Figura II.5) y la disrupción causada por la sonicación (Figura II.2), es decir, los USAI impedirían que las partículas crezcan continuamente debido al calentamiento. Por su parte, Gordon y col (2010) encontraron que al termosonicar soluciones de WPI (12% p/p, pH neutro) a 85-93 °C durante 10 min el efecto de agregación proteica debido al calentamiento prevaleció ante el efecto disruptor de la sonicación y se produjo un aumento de tamaño desde $2,02 \pm 0,01 \mu\text{m}$ hasta $4,50 \pm 0,01 \mu\text{m}$. Si bien en dicho estudio no se presentan los tamaños de partícula de muestras de WPI agregadas únicamente por calor, es probable que tales tamaños fuesen mayores a los encontrados para la termosonicación y que la aplicación de USAI amortigüe el incremento de tamaño provocado por el tratamiento térmico.

A diferencia de lo encontrado a pH 7, cuando se termosonicó EW a pH 3 y 80 °C se observó una fuerte disminución del tamaño de partícula (Figura II.8). La distribución fue bimodal, con una población alrededor de 70 nm y otra cuyo pico fue disminuyendo levemente conforme fue avanzando la TS, con valores de 396 nm, para 5 y 10 min y de

319 y 295 nm, para 15 y 20 min de tratamiento, respectivamente. Al igual que a pH 7, los mayores cambios se produjeron en los primeros minutos de tratamiento, y luego ocurrieron más gradualmente.

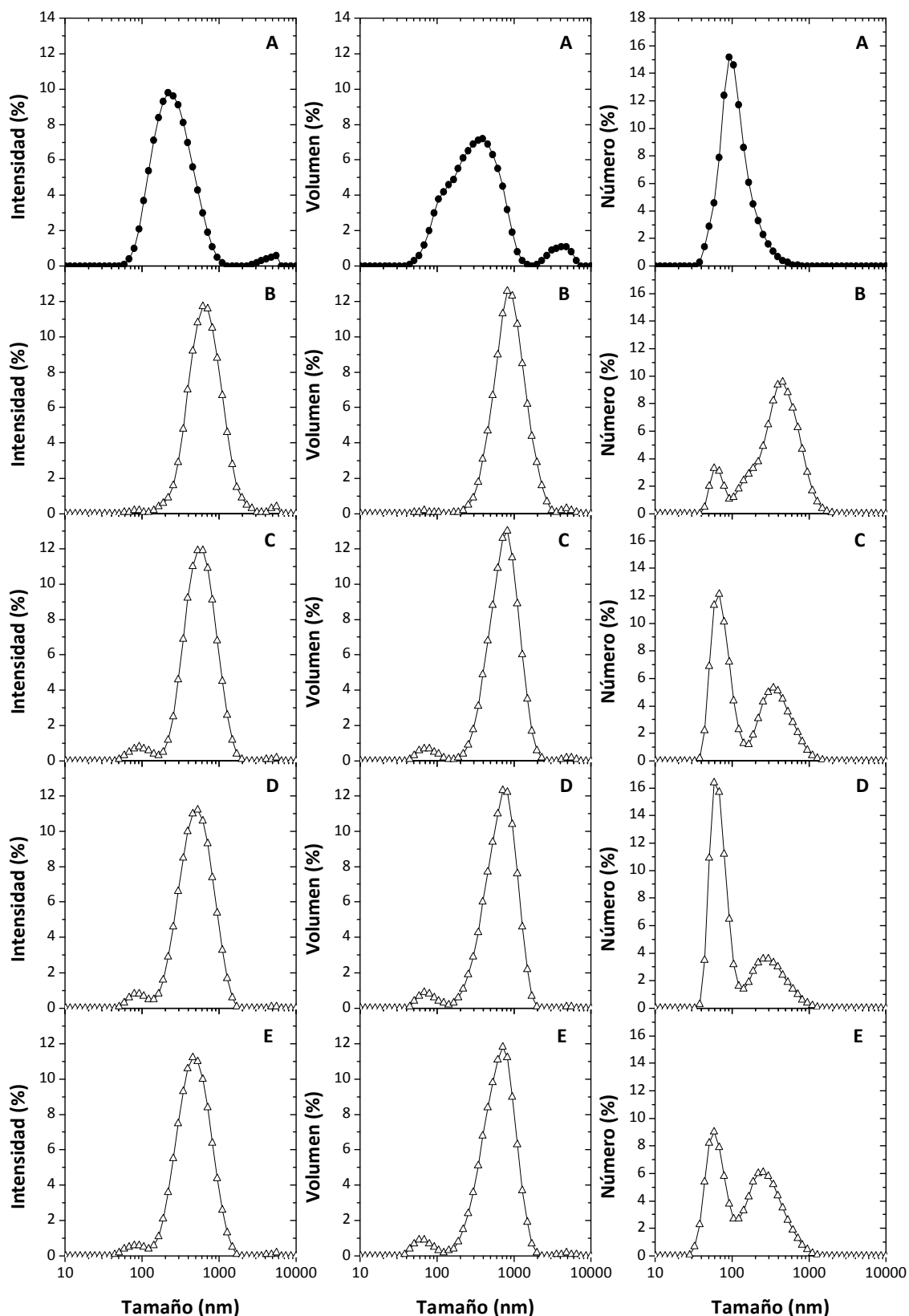


Figura II.6: Distribución de tamaño de partícula en intensidad, volumen y número de soluciones de EW, 5% p/p, pH 7, control (●) y termosónica a 80 °C (Δ) durante 0 (A), 5 (B), 10 (C), 15 (D) y 20 min (E).

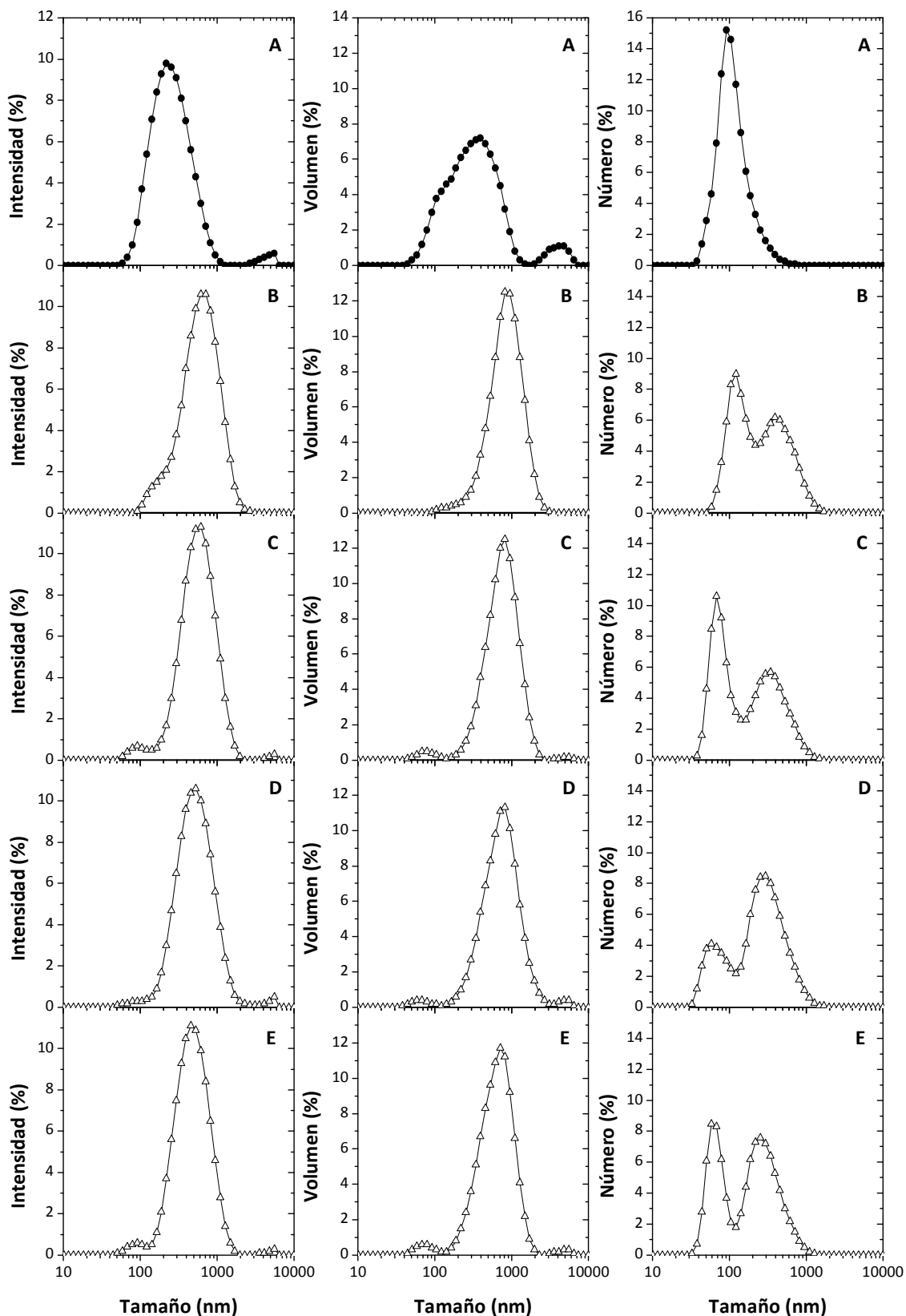


Figura II.7: Distribución de tamaño de partícula en intensidad, volumen y número de soluciones de EW, 5% p/p, pH 7, control (●) y termosónica a 85 °C (△) durante 0 (A), 5 (B), 10 (C), 15 (D) y 20 min (E).

La distribución en volumen también mostró las mismas poblaciones pero, además, se reveló que la población de menor tamaño fue la predominante. La conversión a una distribución en número confirmó que la mayor cantidad de partículas es la presente en el pico de menor diámetro hidrodinámico (población correspondiente a 70 nm en intensidad). Se verificó la misma tendencia general para el tratamiento de TS a 85 °C (Figura II.9). La única diferencia encontrada fue que a esta última temperatura se observó una disminución menos marcada del pico correspondiente a las partículas de mayor tamaño en los primeros minutos de TS, que tomó un valor de 459 nm luego de 5 min de tratamiento.

En resumen, a pH 3 el efecto disruptor de la sonicación prevaleció frente al efecto de agregación provocado por el calentamiento, lo que resultó en una disminución neta del tamaño de partícula. Este resultado podría estar relacionado con el mayor tamaño inicial y durante el calentamiento de la EW a pH 3 respecto a pH 7, ya que las partículas más grandes tienen una mayor probabilidad de ser atacadas por la energía de cavitación, mientras que las partículas pequeñas tienen tiempos de relajación menores y, por lo tanto, pueden disipar el estrés impuesto por la sonicación más fácilmente (Tsaih y Chen, 2003).

Por otra parte, a ambos pHs se constató que, a pesar de que existieran diferencias en los primeros minutos de la TS según se realizaba a 80 u 85 °C, a tiempos de tratamiento cada vez mayores, los resultados a ambas temperaturas confluían en un mismo punto. Es decir, que alcanzado un determinado tiempo de procesamiento se arribaría a un equilibrio entre los efectos contrapuestos de la sonicación y el calentamiento, de desagregación *versus* agregación, en el que se obtienen los mismos resultados independientemente de la temperatura empleada en la TS.

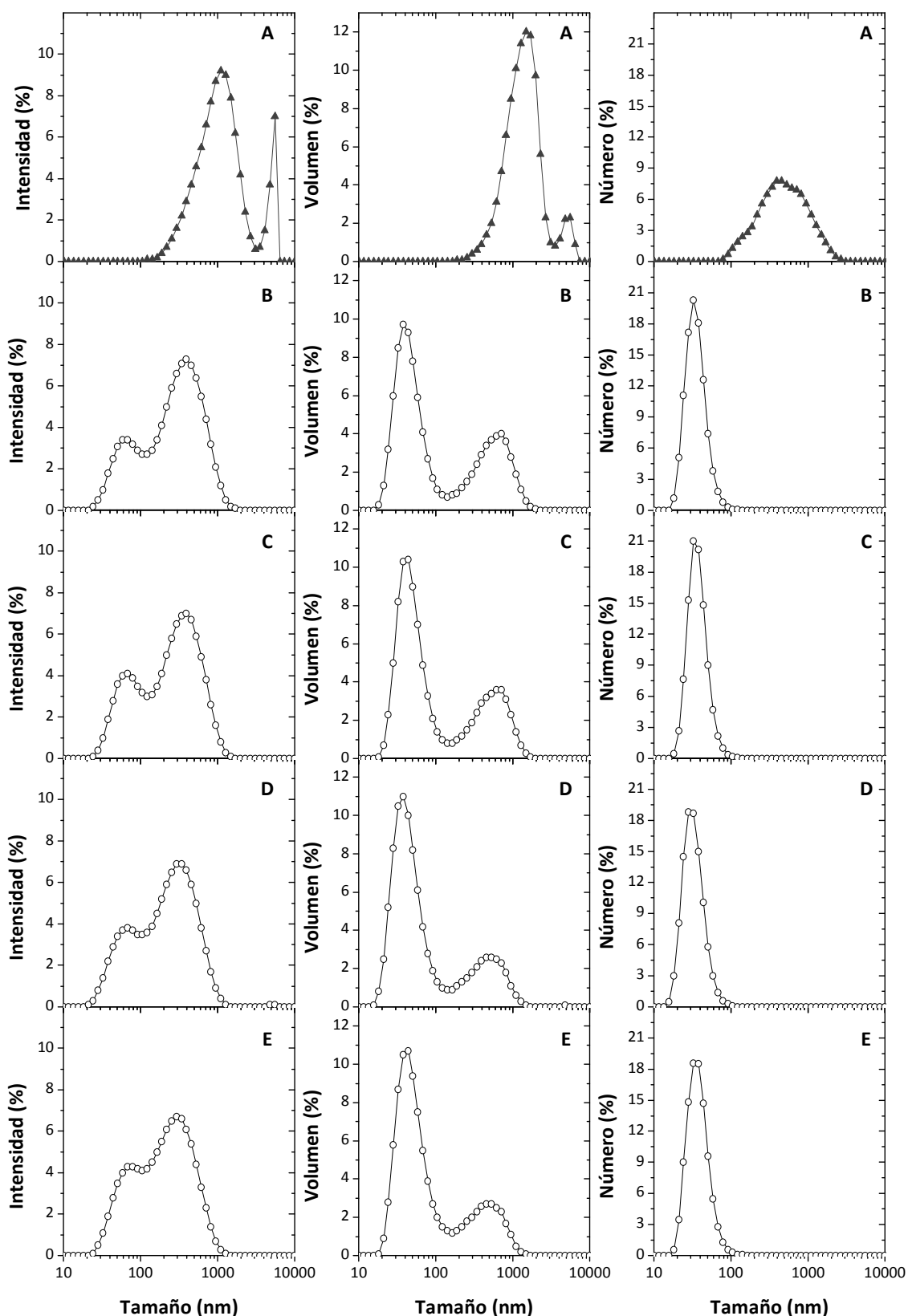


Figura II.8: Distribución de tamaño de partícula en intensidad, volumen y número de soluciones de EW, 5% p/p, pH 3, control (▲) y termosónica a 80 °C (○) durante 0 (A), 5 (B), 10 (C), 15 (D) y 20 min (E).

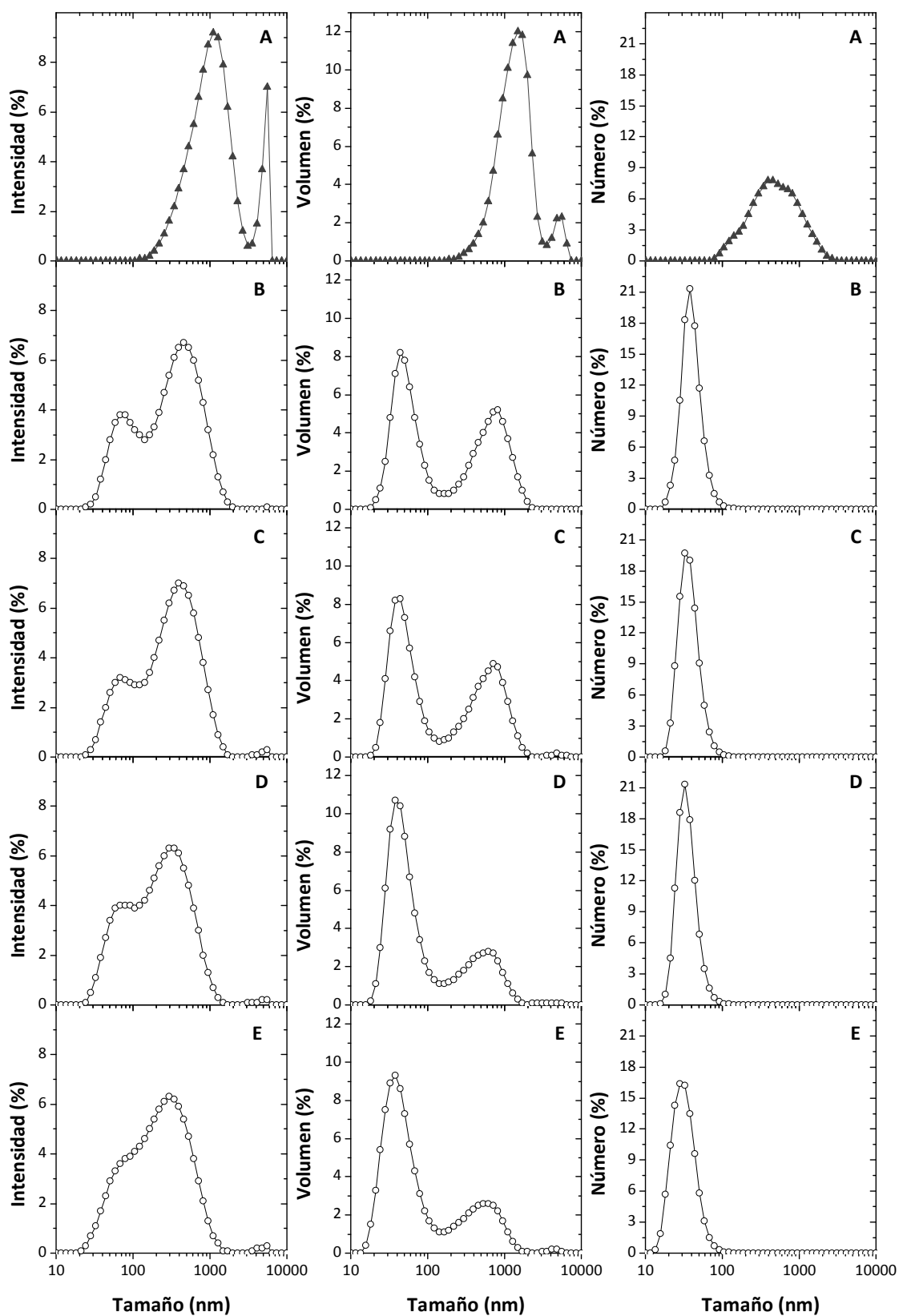


Figura II.9: Distribución de tamaño de partícula en intensidad, volumen y número de soluciones de EW, 5% p/p, pH 3, control (▲) y termosonicada a 85 °C (○) durante 0 (A), 5 (B), 10 (C), 15 (D) y 20 min (E).

En la Figura II.9 se muestra el aspecto de las soluciones de EW control, calentada y termosonicada (TS85). A los fines prácticos, sólo se muestran las soluciones tratadas a 85 °C. Las soluciones calentadas a pH neutro fueron opacas, mientras que a pH ácido fueron transparentes. De manera similar, Qin (1997) obtuvo geles transparentes, turbios u opacos luego de calentar clara de huevo fresca a 80 °C durante 1 h a pH 3,5, 5,5 y 7,5, respectivamente. Las propiedades ópticas de los agregados obtenidos se relacionan con su microestructura, ya que el aspecto transparente correlaciona con una estructura más ordenada de agregados lineales, mientras que el aspecto turbio corresponde a una estructura más desordenada de agregados formados al azar (Handa, Takahashi, Kuroda, y Froning, 1998; Weijers, Sagis, Veerman, Sperber, y van der Linden, 2002). Se ha demostrado que existe una estructura fina y filamentosa en geles transparentes de EW. A pH 5 y 7 la estructura tridimensional es más aglomerada y abierta, debido a la formación de agregados al azar (Tani y col, 1993). De manera similar, Woodward y Cotterill (1986) informaron que la red tridimensional del gel de EW inducido por calor a pH 5, examinada por microscopía electrónica de barrido, era muy agregada y al azar, con gran cantidad de huecos con formas irregulares. Meyer y Hood (1973) observaron, mediante microscopía electrónica de transmisión, masas esféricas en muestras de albumen denso cocido a pH 7,4. A pH 3 y 9, los agregados fueron más sueltos y la estructura fue intermedia entre la red altamente agregada observada a pH 7 y la red fina uniforme observada a pH 11 (Handa y col, 1998).

Si bien a simple vista las soluciones calentadas y las termosonicadas aparentan ser similares, las que fueron tratadas por TS presentaron mayor fluidez respecto a las soluciones que sólo fueron calentadas, tal como se muestra en la Figura II.9. Esto está relacionado con la ruptura, por efecto de los ultrasonidos, de la red formada por el tratamiento térmico.

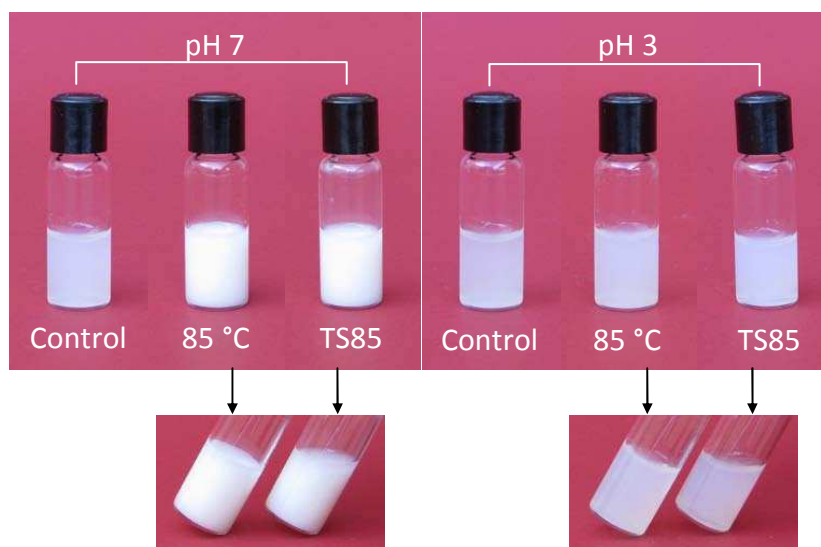


Figura II.9: Apariencia macroscópica de soluciones de EW al 5% p/p a pH 7 y 3, control, calentada (85 °C) y termosonicada (TS85).

II.5. Evolución del tamaño promedio de las partículas

Con la finalidad de realizar una comparación global del tamaño de partícula promedio obtenido en los diferentes tratamientos aplicados a la EW, se evaluó el diámetro hidrodinámico promedio o *Z-average* (Z-av) de las muestras. En la Figura II.10 se muestra el Z-av de la EW sonicada, calentada y termosonicada a ambos pHs. Del mismo modo que lo concluido anteriormente en el análisis de las distribuciones de tamaño de partícula, a pH 7 el tratamiento con USAI produjo una leve disminución en el Z-av, mientras que a pH 3 indujo una disminución muy notable, probablemente debido a que el tamaño de las partículas a este pH fue inicialmente mayor que a pH 7 y pudieron ser disgregadas por la sonicación más fácilmente. La aplicación de TS a pH 7 produjo inicialmente (5 min) un aumento importante debido a que, al principio, las partículas serían muy pequeñas para ser atacadas por las ondas ultrasónicas, por lo tanto sólo se agregarían por efecto del calor. Pero este fenómeno continuaría hasta un tamaño crítico a partir del cual los ultrasonidos empezaría a disgregar las partículas, limitando el aumento de su tamaño a lo largo del resto del tiempo de procesamiento.

Por otra parte, el tratamiento de TS a pH 3 provocó una reducción del Z-av, mayor que la observada al aplicar USAI, y esta diferencia puede atribuirse a que los efectos de la sonicación son más evidentes sobre estructuras más agregadas, es decir, las producidas por calentamiento a este pH. En conclusión, el efecto global del tratamiento con TS a pH 7 fue opuesto al obtenido a pH 3.

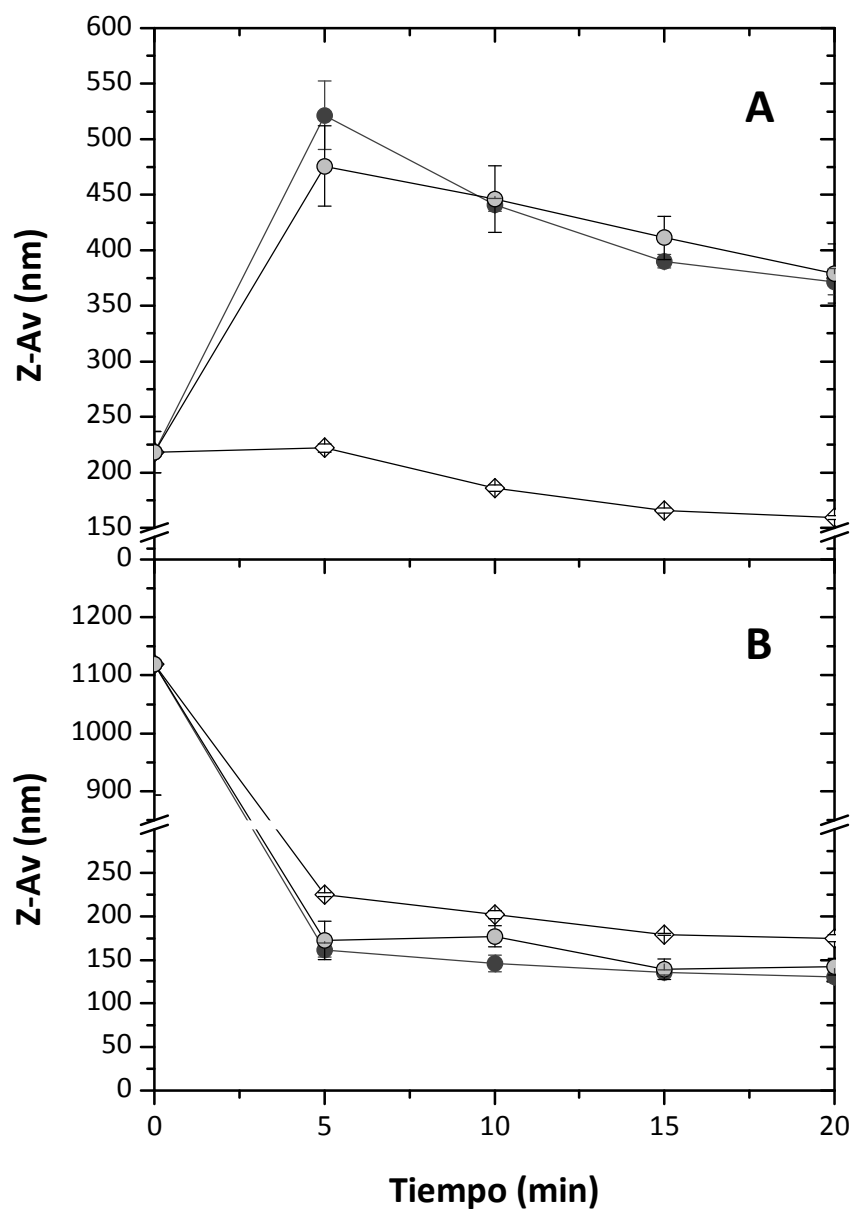


Figura II.10: Evolución del Z-av de soluciones de EW, 5% p/p, a pH 7 (A) y 3 (B), sonicadas (◇) y termosonicadas a 80 (●) y 85 °C (●) durante 0-20 min.

II.6. Carga superficial de las partículas: estabilidad coloidal

La estabilidad física de las proteínas en solución depende fuertemente, además de la conformación de su estructura secundaria y terciaria (Van Buren, Rehder, Gadgil, Matsumura, y Jacob, 2009), de las interacciones atractivas y repulsivas entre las moléculas de proteína y sus interacciones con co-solutos (Harding y Johnson, 1985; Le Brun, Friess, Bassarab, y Garidel, 2010; Le Brun, Friess, Bassarab, Mühlau, y Garidel, 2010; Le Brun, Friess, Schultz-Fademrecht, Muehlau, y Garidel, 2009; Valente, Payne, Manning, Wilson, y Henry, 2005). Estas interacciones se deben principalmente a fuerzas no covalentes como uniones puente hidrógeno, fuerzas electrostáticas, interacciones hidrofóbicas, a propiedades de hidratación de las moléculas o a interacciones con otras especies presentes (Wagner, Reiche, Blume, y Garidel, 2012). La estabilidad coloidal de las partículas en solución puede ser predicha por la teoría de Derjaguin, Landau, Verwey and Overbeek (DLVO), la cual fue desarrollada en 1940 y está basada sobre el balance de interacciones atractivas y repulsivas (Derjaguin, 1940; Verwey, 1940; Verwey y Overbeek, 1946).

Una forma de estimar las fuerzas electrostáticas intervinientes en la estabilidad coloidal es determinando el potencial electrocinético, también conocido como potencial zeta, que es el potencial eléctrico operativo en el plano de corte de una partícula cargada durante el movimiento electroforético (Cheema y col, 2007; Müller, 1996). De acuerdo a la teoría DLVO, altos potenciales electrocinéticos resultan en alta repulsión electrostática entre partículas, lo que conduce a alta estabilidad coloidal (Müller, 1996).

Las partículas de EW control a pH 7 y pH 3 presentaron un potencial ζ de $-15,9 \pm 1,1$ y $+22,7 \pm 0,5$, respectivamente. Estos resultados fueron comparables con valores previamente informados para una serie de muestras comerciales de clara de huevo secadas por spray (dispersadas al 1% en buffer fosfato 0,01 M), que variaban desde $-16,4$ hasta $-29,5$, a pH 7, y desde $+12,6$ hasta $+20,9$, a pH 3 (Cheng, 2001).

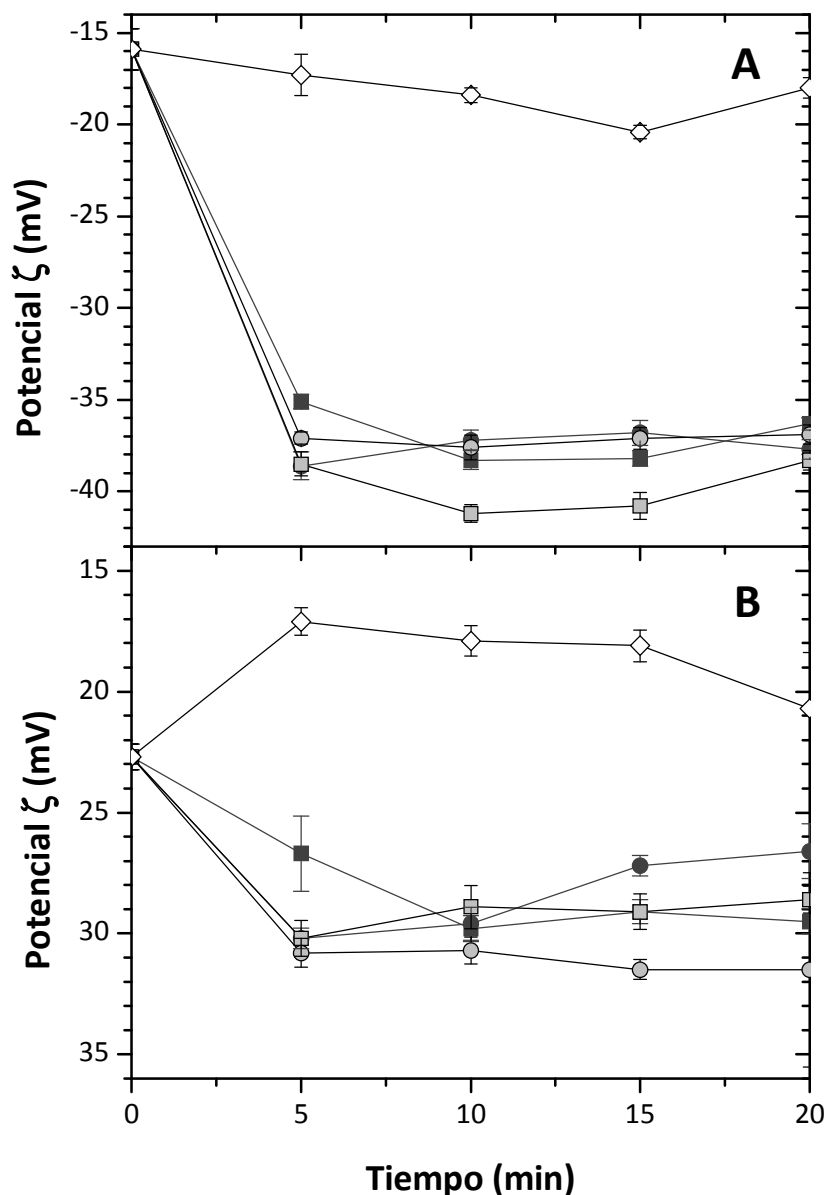


Figura II.11: Evolución del potencial ζ de soluciones de EW, 5% w/w, a pH 7 (A) y pH 3 (B), sonicadas (\diamond), calentadas a 80 (\blacksquare) y 85 °C (\blacksquare) y termosonicadas a 80 (\bullet) y 85 °C (\bullet) durante 0–20 min.

La Figura II.11 muestra la evolución de la carga superficial de las partículas con el tiempo de sonicación. A pH 7, no hubo una reducción significativa del potencial ζ en las soluciones tratadas con USAI. Sin embargo, se observó un gran aumento de la carga negativa cuando las muestras fueron calentadas a 80 y 85 °C, lo que sugiere una mayor exposición de cargas debido a la desnaturalización proteica, que produce una pérdida de la estructura nativa y la consecuente exposición de grupos cargados originalmente ocultos. En el tratamiento combinado de TS, el efecto térmico parece ser determinante

del potencial ζ de las partículas. Los cambios más significativos se produjeron en los primeros 5 min de tratamiento. Luego, las modificaciones se tornaron más graduales.

A pH 3, la carga superficial global positiva de las partículas de EW fue reducida por la sonicación. Al calentar la EW, se indujo un incremento en la carga positiva de las partículas, que no alcanzó la misma magnitud que a pH 7. La termosonicación también provocó un aumento en la carga. Al igual que a pH 7, la desnaturalización provocaría una exposición de grupos cargados hacia la superficie de las partículas de EW mayor que la sonicación.

El potencial zeta es un indicador importante y útil para predecir y controlar la estabilidad de suspensiones coloidales. Cuanto mayor sea el potencial zeta, mayor es la probabilidad de que una suspensión permanezca estable, ya que las partículas cargadas se repelen entre ellas y, en consecuencia, pueden vencer la tendencia natural a agregarse (Benitez y Lozano, 2006). Como límite entre suspensiones estables e inestables, se asume un valor de potencial $\zeta = |30 \text{ mV}|$ (Sherman, 1970). Por lo tanto, bajo este criterio, la termosonicación podría mejorar la estabilidad coloidal de las partículas al producir un aumento en su carga neta a valores $\geq |30 \text{ mV}|$.

Por otra parte, se analizaron los resultados de potencial ζ en relación con el aspecto macroscópico de los agregados formados. Como es sabido, la cinética de agregación y la estructura de los agregados están gobernadas por el balance entre las interacciones atractivas y repulsivas entre las moléculas de proteína (Renard y Lefebvre, 1992). Un aspecto macroscópico transparente resulta de un proceso de agregación lineal, cuando la repulsión electrostática es alta, y un aspecto opaco se produce debido a la unión de agregados al azar, cuando la repulsión es baja (Clark y Lee-Tuffnell, 1986; Doi, 1993; Koseki y col, 1989; Murata, Tani, Higasa, Kitabatake, y Doi, 1993; Richardson y Ross-Murphy, 1981).

Según lo expuesto anteriormente, y de acuerdo con los altos valores de potencial ζ obtenidos a ambos pH a elevadas temperaturas, se esperaría que los agregados de EW fuesen transparentes tanto en condiciones ácidas como alcalinas. En una investigación previa, en donde se estudió la relación entre el potencial ζ , la opalescencia y la estabilidad coloidal de diferentes proteínas en solución, se encontró una alta

correlación entre la evolución de la opalescencia y el potencial ζ para el caso de la proteína globular lisozima; es decir, que un aumento en el potencial ζ de la proteína produjo una disminución en la opalescencia de la solución. Sin embargo, cuando se estudió esta relación para un anticuerpo monoclonal, se observó que a bajos valores de pH, en donde la proteína presentaba un potencial ζ positivo, la opalescencia de la solución era baja, lo cual era esperable considerando que una alta repulsión de las moléculas de proteína también reduce su tendencia a la auto-asociación. Luego, a medida que el pH fue aumentando y el potencial ζ disminuyendo, la opalescencia fue disminuyendo, hasta llegar a un punto en donde a medida que el potencial ζ se seguía acercando a 0 la opalescencia comenzaba a disminuir, lo cual no era esperable. Los investigadores también encontraron esta misma tendencia al estudiar otros anticuerpos monoclonales. Esto significa que el potencial ζ no puede ser empleado como única herramienta para predecir la estabilidad coloidal, ya que además de la interacción debida al potencial ζ existen otras fuerzas que pueden ser dominantes en la estabilidad coloidal de las proteínas (Wagner y col, 2012).

II.7. Conclusiones

Mediante el control de las condiciones empleadas en el tratamiento de sonicación, es decir, la temperatura y el tiempo de procesamiento, como de las condiciones de pH, fue posible controlar el tamaño de partícula de la EW.

Las principales modificaciones se produjeron en los primeros minutos de sonicación, y los efectos dependieron mayormente del pH de la EW.

A pH 7, se logró una ligera disminución de tamaño de partícula con USAI (sin calentamiento), lo que no significó un cambio que justifique su aplicación para controlar el tamaño. Sin embargo, con la termosonicación se generaron partículas grandes de Z-av entre 372 y 522 nm, con una distribución de tamaño de partícula en intensidad que presentó un rango de 50-2000 nm.

A pH 3, se logró obtener, tanto con USAI (sin calentamiento) como con TS, poblaciones de partículas de Z-av entre 130 y 225 nm. Con USAI se obtuvo una población monomodal con un diámetro máximo de 220 nm, para el tiempo de tratamiento mayor, de 20 min. En cambio, la TS generó una distribución bimodal, compuesta por una población predominante de 70 nm en intensidad y otra minoritaria con un diámetro máximo de 295 nm, luego de 20 min de procesamiento.

En conclusión, controlando las variables del proceso de sonicación es posible obtener partículas de EW de diferentes tamaños en el rango submicrónico, es decir, nanopartículas.

II.8. Referencias

- Alting, A. C., Weijers, M., de Hoog, E. H. A., van de Pijpekamp, A. M., Cohen Stuart, M. A., Hamer, R. J., de Kruif, C. G., & Visschers, R. W. (2004). Acid-Induced Cold Gelation of Globular Proteins: Effects of Protein Aggregate Characteristics and Disulfide Bonding on Rheological Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(3), 623-631.
- Alleoni, A. C. C. (2006). Albumen protein and functional properties of gelation and foaming. *Scientia Agricola*, 63, 291-298.
- Ashokkumar, M., Lee, J., Zisu, B., Bhaskarcharya, R., Palmer, M., & Kentish, S. (2009). Hot topic: sonication increases the heat stability of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 92(11), 5353-5356.
- Baxter, S., Zivanovic, S., & Weiss, J. (2005). Molecular weight and degree of acetylation of high-intensity ultrasonicated chitosan. *Food Hydrocolloids*, 19(5), 821-830.
- Benitez, E. I., & Lozano, J. E. (2006). Influence of the soluble solids on the zeta potential of a cloudy apple juice. *Latin American Applied Research*, 36, 163-168.
- Clark, A. H., & Lee-Tuffnell, C. D. (1986). Gelation of globular proteins. En J. R. Mitchell, D. A. Ledward & D. G. Dalgleish (Eds.), *Functional properties of food macromolecules* (pp. 203-272). London: Elsevier Applied Science
- Cheema, M. A., Siddiq, M., Barbosa, S., Castro, E., Egea, J. A., Antelo, L. T., Taboada, P., & Mosquera, V. (2007). Compressibility, isothermal titration calorimetry and dynamic light scattering analysis of the aggregation of the amphiphilic phenothiazine drug thioridazine hydrochloride in water/ethanol mixed solvent. *Chemical Physics*, 336(2-3), 157-164.
- Chen, R. H., Chang, J. R., & Shyur, J. S. (1997). Effects of ultrasonic conditions and storage in acidic solutions on changes in molecular weight and polydispersity of treated chitosan. *Carbohydrate Research*, 299(4), 287-294.
- Cheng, E. S. Y. (2001). *A study of protein surface hydrophobicity and structure-function analysis of proteins in spray dried egg albumen*. Tesis de Maestría, University of British Columbia, Canada.
- Derjaguin, B. (1940). On the repulsive forces between charged colloid particles and on the theory of slow coagulation and stability of lyophobic sols. *Transactions of the Faraday Society*, 35, 203-215.
- Doi, E. (1993). Gels and gelling of globular proteins. *Trends in Food Science & Technology*, 4(1), 1-5.
- Furukawa, T., & Ohta, S. (1983). Ultrasonic-induced modification of flow properties of soy protein dispersion. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47(4), 745-750.
- Gordon, L., & Pilosof, A. (2010). Application of high intensity ultrasounds to control the size of whey proteins particles. *Food Biophysics*, 5(3), 203-210.
- Hagolle, N., Launay, B., & Relkin, P. (1998). Impact of structural changes and aggregation on adsorption kinetics of ovalbumin at the water/air interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 10(4), 191-198.
- Handa, A., Takahashi, K., Kuroda, N., & Froning, G. W. (1998). Heat-induced egg white gels as affected by pH. *Journal of Food Science*, 63(3), 403-407.
- Harding, S. E., & Johnson, P. (1985). The concentration-dependence of macromolecular parameters. *Biochemical Journal*, 231(3), 543-547.

- Iida, Y., Tuziuti, T., Yasui, K., Towata, A., & Kozuka, T. (2008). Control of viscosity in starch and polysaccharide solutions with ultrasound after gelatinization. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2), 140-146.
- Jambrak, A. R., Lelas, V., Mason, T. J., Krešić, G., & Badanjak, M. (2009). Physical properties of ultrasound treated soy proteins. *Journal of Food Engineering*, 93(4), 386-393.
- Jambrak, A. R., Mason, T. J., Lelas, V., & Kresic, G. (2010). Ultrasonic effect on physicochemical and functional properties of α -lactalbumin. *LWT - Food Science and Technology*, 43(2), 254-262.
- Koseki, T., Kitabatake, N., & Doi, E. (1989). Irreversible thermal denaturation and formation of linear aggregates of ovalbumin. *Food Hydrocolloids*, 3(2), 123-134.
- Le Brun, V., Friess, W., Bassarab, S., & Garidel, P. (2010). Correlation of protein-protein interactions as assessed by affinity chromatography with colloidal protein stability: A case study with lysozyme. *Pharmaceutical Development and Technology*, 15(4), 421-430.
- Le Brun, V., Friess, W., Bassarab, S., Mühlau, S., & Garidel, P. (2010). A critical evaluation of self-interaction chromatography as a predictive tool for the assessment of protein-protein interactions in protein formulation development: A case study of a therapeutic monoclonal antibody. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 75(1), 16-25.
- Le Brun, V., Friess, W., Schultz-Fademrecht, T., Muehlau, S., & Garidel, P. (2009). Lysozyme-lysozyme self-interactions as assessed by the osmotic second virial coefficient: Impact for physical protein stabilization. *Biotechnology Journal*, 4(9), 1305-1319.
- Lorimer, J. P., Mason, T. J., Cuthbert, T. C., & Brookfield, E. A. (1995). Effect of ultrasound on the degradation of aqueous native dextran. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2(1), S55-S57.
- Matsuda, T., Watanabe, K., & Sato, Y. (1981). Heat-induced aggregation of egg white proteins as studied by vertical flat-sheet polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Food Science*, 46(6), 1829-1834.
- Meyer, R., & Hood, L. F. (1973). The effect of pH and heat on the ultrastructure of thick and thin hen's egg albumen. *Poultry Science*, 52(5), 1814-1817.
- Müller, R. H. (1996). *Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
- Murata, M., Tani, F., Higasa, T., Kitabatake, N., & Doi, E. (1993). Heat-induced transparent gel formation of bovine serum albumin. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 57(1), 43-46.
- Qin, L. (1997). *Structural analysis of proteins in thermally induced ovalbumin and egg white gels*. Tesis de Maestría, University of British Columbia, Canada.
- Renard, D., & Lefebvre, J. (1992). Gelation of globular proteins: effect of pH and ionic strength on the critical concentration for gel formation. A simple model and its application to β -lactoglobulin heat-induced gelation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 14(5), 287-291.
- Richardson, R. K., & Ross-Murphy, S. B. (1981). Mechanical properties of globular protein gels: II concentration, pH concentration, pH and ionic strength dependence. *British Polymer Journal*, 13(1), 11-16.

- Seideman, W. E., Cotterill, O. J., & Funk, E. M. (1963). Factors affecting heat coagulation of egg white. *Poultry Science*, 42(2), 406-417.
- Sherman, P. (1970). Rheology of dispersed systems. En *Industrial Rheology* (pp. 97-183): Academic Press Inc.
- Tang, C.-H., Wang, X.-Y., Yang, X.-Q., & Li, L. (2009). Formation of soluble aggregates from insoluble commercial soy protein isolate by means of ultrasonic treatment and their gelling properties. *Journal of Food Engineering*, 92(4), 432-437.
- Tani, F., Murata, M., Higasa, T., Goto, M., Kitabatake, N., & Doi, E. (1993). Heat-induced transparent gel from hen egg lysozyme by a two-step heating method. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 57(2), 209-214.
- Tsaih, M. L., & Chen, R. H. (2003). Effect of degree of deacetylation of chitosan on the kinetics of ultrasonic degradation of chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*, 90(13), 3526-3531.
- Valente, J. J., Payne, R. W., Manning, M. C., Wilson, W. W., & Henry, C. S. (2005). Colloidal behavior of proteins: Effects of the second virial coefficient on solubility, crystallization and aggregation of proteins in aqueous solution. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 6(6), 427-436.
- Van Buren, N., Rehder, D., Gadgil, H., Matsumura, M., & Jacob, J. (2009). Elucidation of two major aggregation pathways in an IgG2 antibody. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(9), 3013-3030.
- Verwey, E. J. W. (1940). Electrical double layer and stability of emulsions. *Transactions of the Faraday Society*, 35(0), 192-203.
- Verwey, E. J. W., & Overbeek, J. T. G. (1946). Long distance forces acting between colloidal particles. *Transactions of the Faraday Society*, 42(0), B117-B123.
- Villamiel, M., & de Jong, P. (2000). Influence of high-intensity ultrasound and heat treatment in continuous flow on fat, proteins, and native enzymes of milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 472-478.
- Wagner, M., Reiche, K., Blume, A., & Garidel, P. (2012). The electrokinetic potential of therapeutic proteins and its modulation: Impact on protein stability. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 415(0), 421-430.
- Watanabe, K., Matsuda, T., & Nakamura, R. Y. O. (1985). Heat-induced aggregation and denaturation of egg white proteins in acid media. *Journal of Food Science*, 50(2), 507-510.
- Weijers, M., Sagis, L. M. C., Veerman, C., Sperber, B., & van der Linden, E. (2002). Rheology and structure of ovalbumin gels at low pH and low ionic strength. *Food Hydrocolloids*, 16(3), 269-276.
- Woodward, S. A., & Cotterill, O. J. (1986). Texture and microstructure of heat-formed egg white gels. *Journal of Food Science*, 51(2), 333-339.
- Zisu, B., Bhaskaracharya, R., Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2010). Ultrasonic processing of dairy systems in large scale reactors. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(6), 1075-1081.

Capítulo III

*Construcción de nanocarriers de
clara de huevo para ácido fólico*

III.1. Formación de nanocarriers de ácido fólico

A partir de la serie de experimentos llevados a cabo en el Capítulo anterior, se seleccionaron dos tipos de nanopartículas: aquellas obtenidas por USAI y las generadas por TS a 85 °C, ambas a pH 3 durante 20 min (llamadas, de aquí en adelante, US y TS, respectivamente).

Se evaluó la capacidad de las nanopartículas elegidas para unir ácido fólico (AF) y actuar como transportadores para dicha vitamina (nanocarriers). Para ello, se probaron distintas estrategias para generar nanopartículas con AF (llamadas de ahora en más USF y TSF, según la nanopartícula empleada). En un primer intento, se mezcló la solución de las nanopartículas a pH 3 (5% p/p) con una solución de AF al mismo pH (1% p/p), para obtener una concentración final de AF en la mezcla de 0,025%. A este pH el AF tiene muy baja solubilidad en agua y se encuentra en forma de cristales aciculares (Figura III.1.A).

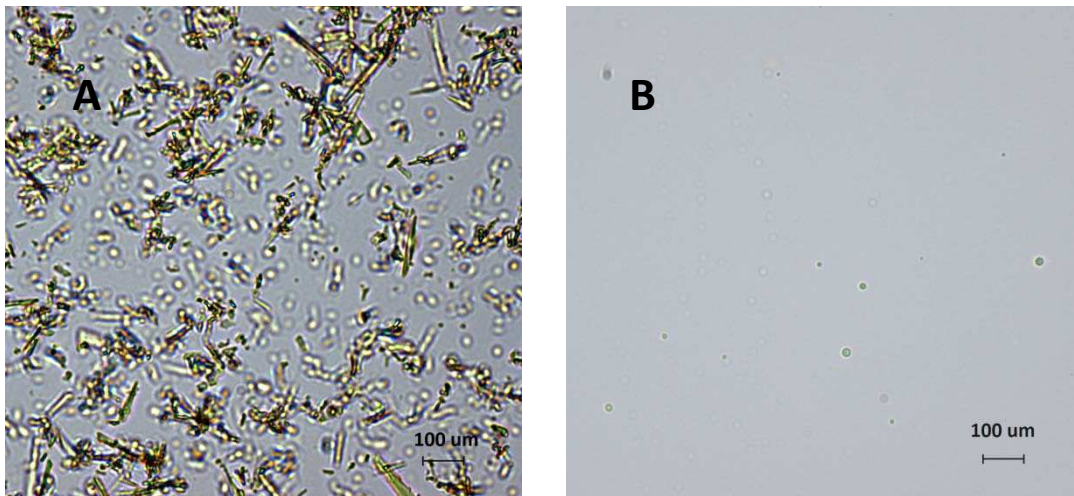


Figura III.1: Imágenes de microscopía óptica de soluciones de AF (A) y de nanocarriers USF (B), a pH 3.

Cuando se realizó la mezcla a este pH se observó mediante microscopía óptica que los cristales no se disolvían en la mezcla y, por lo tanto, no interactuaban con las nanopartículas de proteína.

Luego, se probó realizar la mezcla a pH 7, ya que en esta condición el AF tiene una solubilidad en agua muy alta, y posteriormente se ajustó el pH 3. Cuando se realizó este ensayo, las nanopartículas se desestabilizaron a pH 7 y se agregaron. De todas formas, la mezcla se preparó y luego se ajustó el pH 3 para determinar si los cambios que sufrían las nanopartículas eran reversibles; sin embargo, no se consiguió retornarlas a su estado inicial.

Finalmente, se decidió mezclar las soluciones de nanopartículas a pH 3 con la solución de AF a pH 7 con agitación suave y continua. Las mezclas se observaron al microscopio óptico y no se detectaron cristales de AF. A modo de ejemplo, se muestra la imagen correspondiente a los nanocarriers USF (Figura III.1.B). El pH de las mezclas se midió y se confirmó que se mantuvo constante en 3, luego del agregado de AF.

Una vez realizadas las mezclas con AF, se midió su tamaño de partícula y se comparó con las distribuciones obtenidas para las nanopartículas solas. Como se puede ver en la Figura III.2 la distribución de tamaño de partícula de las nanopartículas US permaneció prácticamente igual (220 nm) luego del agregado de AF. Sin embargo, se observó un incremento pequeño en el tamaño de partícula de las nanopartículas TS cuando se unieron con AF (Figura III.3). Las poblaciones que en un principio se encontraban cerca de 70 y 295 nm en intensidad se desplazaron hacia 91 y 615 nm. En volumen se observó una tendencia similar, aunque con una contribución mayor de la población grande. Sin embargo, la población principal en número fue la de menor tamaño, aunque algo desplazada hacia un diámetro mayor, de 44 nm. El análisis de las distribuciones en volumen y número indicaría que se formaron algunos agregados más grandes, ya que esto se evidencia en la distribución en volumen; sin embargo, estos representaron una muy baja proporción de la muestra, como se confirmó en la distribución en número.

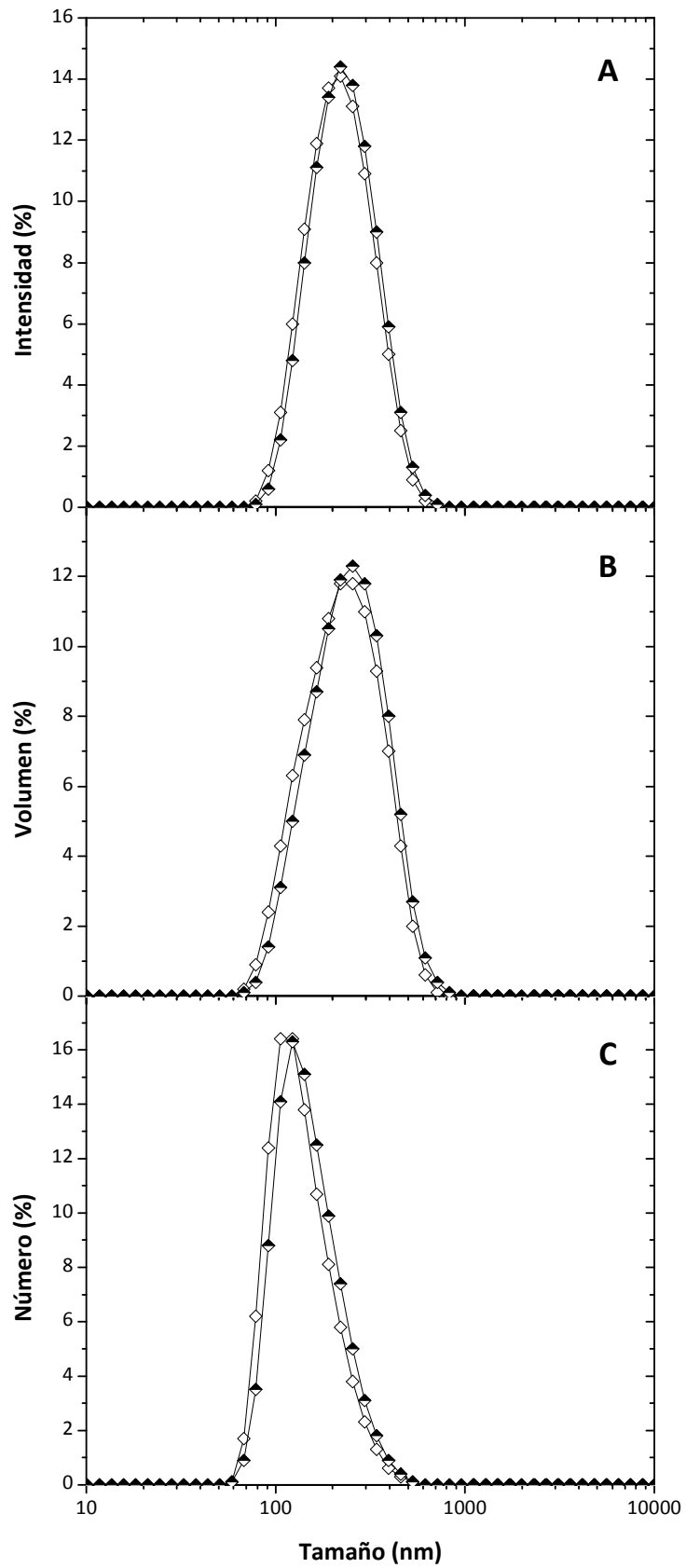


Figura III.2: Distribución de tamaño de partícula en intensidad (A), volumen (B) y número (C) de nanopartículas US (◆) y nanocarriers USF (◇).

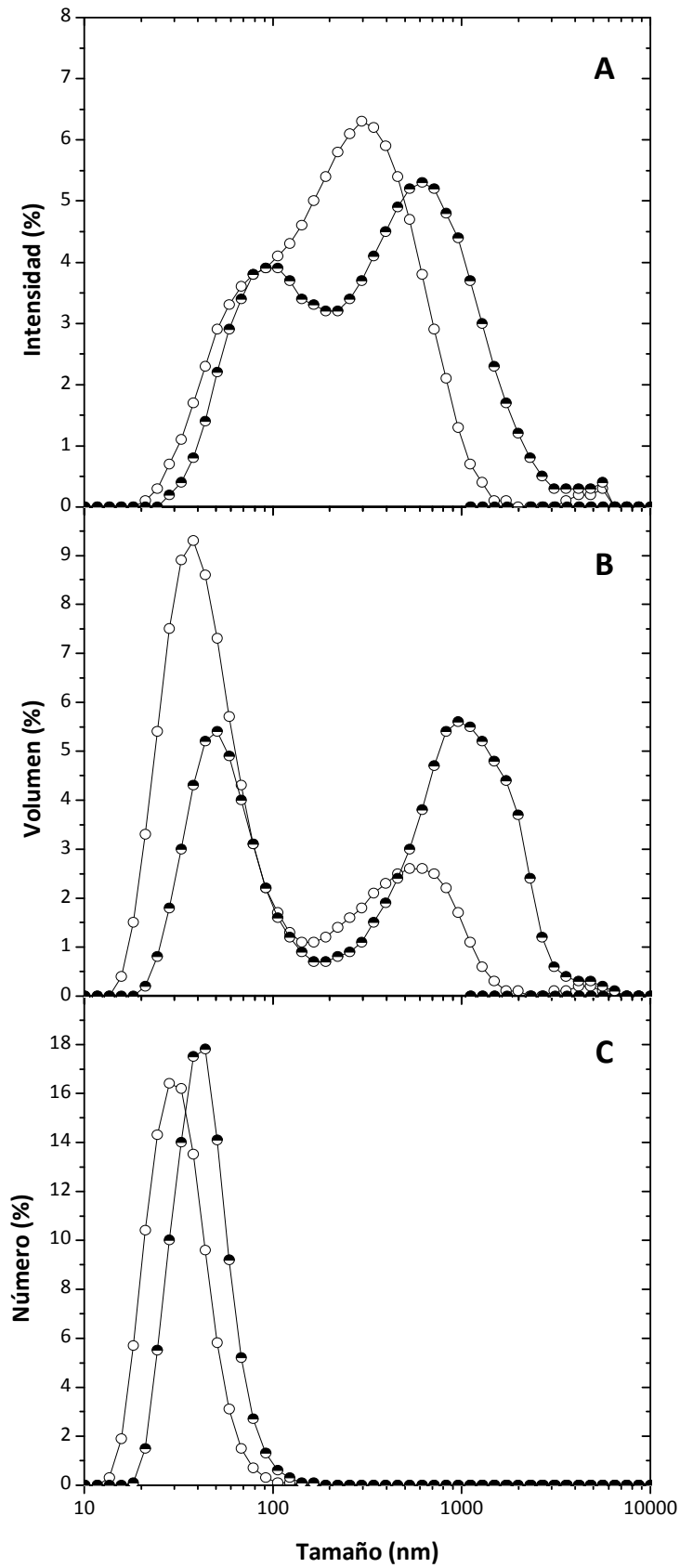


Figura III.3: Distribución de tamaño de partícula en intensidad (A), volumen (B) y número (C) de nanopartículas TS (●) y nanocarriers TSF (○).

La Figura III.4 muestra la apariencia de las mezclas de nanocarriers de AF. Sólo se detectaron cambios en la coloración de las soluciones hacia un tono más amarillento, pero su translucidez no se vio afectada por el agregado de AF; la cual está relacionada con los pequeños cambios en el tamaño de las partículas al unirse con AF.

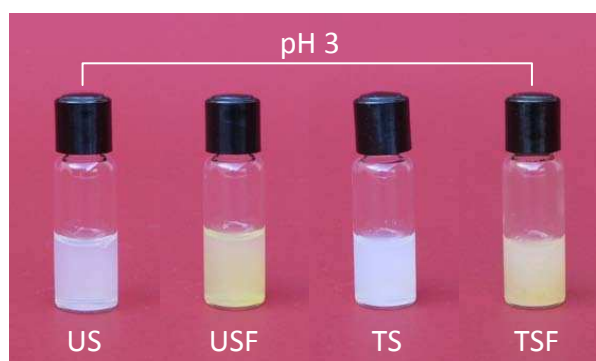


Figura III.4: Apariencia de soluciones nanopartículas de EW al 5% p/p y sus mezclas con AF al 0,025% p/p.

Luego de la caracterización del tamaño, se procedió a determinar cómo se afectaban otras propiedades de las nanopartículas debido a la unión de AF. El potencial ζ no mostró ningún cambio significativo luego de la adición de AF, como puede apreciarse en la Tabla III.1.

Tabla III.1: Intensidad de fluorescencia y potencial zeta de nanopartículas de EW y de los nanocarriers de AF (USF y TSF).

	IF (u.a.)	Pot ζ (mV)
US	$2,24 \pm 0,09^a$	$+20,7 \pm 2,3^a$
USF	$2,02 \pm 0,05^a$	$+20,9 \pm 1,2^a$
TS	$2,31 \pm 0,16^b$	$+31,5 \pm 4,0^b$
TSF	$1,90 \pm 0,24^b$	$+28,4 \pm 2,2^b$

Diferentes letras indican una diferencia significativa con $p < 0,05$.

El *quenching* (o apagamiento) de la fluorescencia se refiere a cualquier proceso que disminuya la intensidad de fluorescencia de una muestra. Muchos tipos de interacciones moleculares pueden resultar en *quenching* de la fluorescencia. El *quenching* resultante de encuentros por colisiones entre el fluoróforo y el *quencher* es

llamado *quenching* colisional o dinámico. En cambio, en el *quenching* estático se forma un complejo entre la muestra fluorescente y el *quencher* que no es fluorescente. Tanto el *quenching* estático como el dinámico requieren el contacto molecular entre el fluoróforo y el *quencher*, por eso se emplea para determinar interacciones moleculares (Lakowicz, Joseph R. , 2006).

Como es sabido, las proteínas presentan fluorescencia intrínseca; el fluoróforo dominante es el grupo indol del triptofano. El indol absorbe cerca de los 280 nm y emite alrededor de los 340 nm. Su espectro de emisión es altamente sensible a la polaridad del solvente. La emisión del indol puede ser desplazada hacia el azul si el grupo está alojado dentro de la estructura de una proteína nativa o puede desplazarse hacia longitudes de onda mayores (desplazamiento hacia el rojo) cuando la proteína está desplegada (Lakowicz, Joseph R., 2006). En la literatura se ha informado previamente que las proteínas mayoritarias de la clara de huevo, ovoalbúmina, conalbúmina y lisozima, contienen 3, 12 y 6 residuos de triptofano, respectivamente (Levine y Federici, 1982; Spies, 1967).

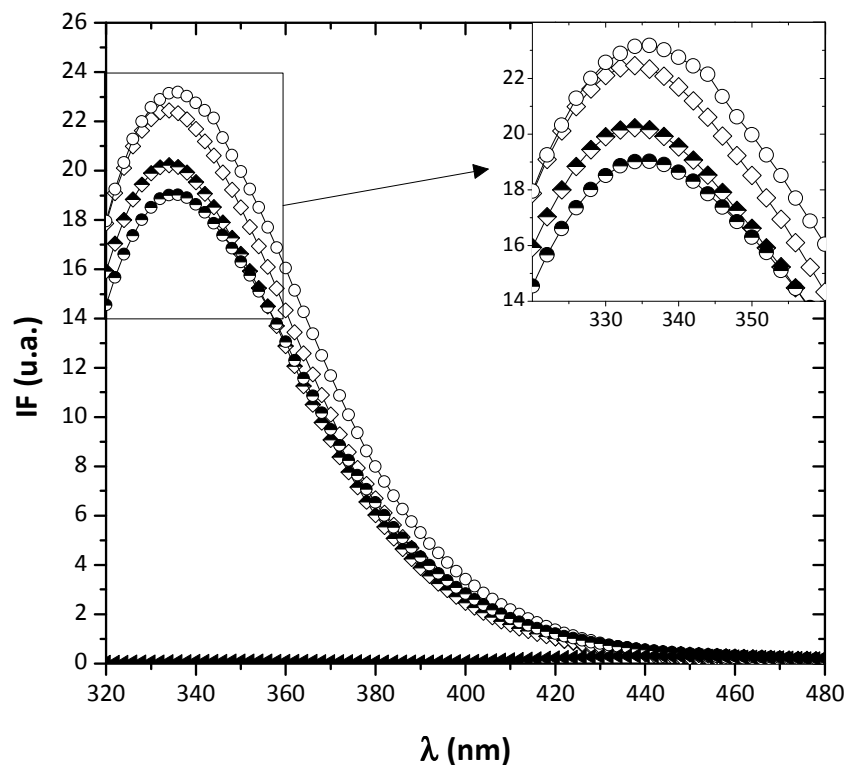


Figura III.5: Intensidad de fluorescencia de soluciones de nanopartículas US (◇) y TS (○), de nanocarriers USF (◆) y TSF (●) y de AF sólo (◀). En el inserto se muestra aumentada la zona correspondiente al pico máximo de fluorescencia.

De esta forma, el *quenching* de la fluorescencia intrínseca de la proteína por el AF podría ser una primera aproximación para conocer si existe interacción entre ambos.

Por lo tanto, la intensidad de fluorescencia fue registrada para las nanopartículas de EW y para los nanocarriers de AF (Figura III.5). Los resultados para ambas nanopartículas mostraron una intensidad de fluorescencia máxima a 334 nm, es decir, se observa un corrimiento al azul respecto a la longitud de onda de emisión del grupo indol, a 340 nm. Esto indica que los residuos de triptofano estarían alojados dentro de la proteína. Esta longitud de onda de emisión máxima se mantuvo constante luego de la adición de AF, por lo que se puede inferir que la conformación de las nanopartículas se mantiene estable cuando se mezcla con la vitamina. Se verificó una disminución leve de la intensidad de fluorescencia en la longitud máxima de emisión (334 nm) para las mezclas (Tabla III.1), que podría atribuirse a un efecto de *quenching* de la fluorescencia del AF debido a su interacción con las nanopartículas de proteína. Otros autores han informado anteriormente un apagamiento en la fluorescencia de diferentes proteínas por el AF y lo correlacionaron con su unión (Bourassa, Hasni, y Tajmir-Riahi, 2011; Jha y Kishore, 2011; Liang y Subirade, 2002; Liang, Zhang, Zhou, y Subirade, 2013). Sin embargo, un análisis estadístico de los datos reveló en el presente estudio que la disminución observada no fue significativa, por ende esta determinación no resultó concluyente.

En consecuencia, se procedió a realizar una evaluación del AF unido a las nanopartículas de EW mediante la determinación espectrofotométrica de AF libre permeado luego de la ultrafiltración de las muestras. Se calculó el porcentaje de ácido fólico unido (% AFU) como la relación porcentual entre la cantidad de AF unido a las nanopartículas y la cantidad de AF agregado en la mezcla. Para calcular la cantidad de AF unido, se realizó la diferencia entre la cantidad de AF agregado a la mezcla y la cantidad presente en el permeado. El % AFU fue de $78,0 \pm 9,1$ y de $79,7 \pm 9,0$ para las muestras USF y TSF, respectivamente. De esta manera, se confirmó la interacción entre el AF y las nanopartículas de EW. Las cantidades de AFU encontradas en este estudio fueron comparables a las informadas por Verwei, Arkbage, Mocking, Havenaar, y Groten (2004) para la unión de AF con proteína ligante de AF, lo que indicaría que tendrían una afinidad similar por la vitamina. El % AFU expresado en miligramos de AF

unido por gramo de proteína representa $3,90 \pm 0,46$ y $3,99 \pm 0,45$ mg AFU/g proteína, para las mezclas USF y TSF, respectivamente. Si se comparan estos resultados con los valores de fortificación actuales utilizados en la Argentina, se puede concluir que el porcentaje de AF unido a las nanopartículas está muy por encima de los niveles que contienen los alimentos adicionados con esta vitamina. Por ejemplo, el enriquecimiento de la harina según la Ley 26.630 indica que este alimento debe contener 2,2 mg de AF por kilo de producto, lo que correspondería a $2,2 \mu\text{g AF/g}$ de harina, es decir, aproximadamente una millonésima parte de lo que contienen las nanopartículas diseñadas en este trabajo. Por otra parte, la leche, que es uno de los alimentos de mayor importancia, actualmente puede encontrarse en el mercado fortificada con AF, en una relación de $18 \mu\text{g AF}$ por cada 100 ml de leche. Esto equivale a $0,18 \mu\text{g}$ por gramo de producto (considerando una densidad de 1 g/ml), una vez más un valor bastante inferior al de los nanocarriers USF y TSF. En conclusión, los nanocarriers de AF podrían ser empleados como un aditivo alimentario más que como un ingrediente.

Cabe aclarar que el AF no unido a las nanopartículas también se encontrará presente en la mezcla si esta se agregara a un alimento y podría representar un aporte adicional de esta vitamina, aunque al no estar unido a la proteína podría ser más vulnerable a condiciones adversas durante el procesamiento, como el calentamiento, la exposición a la luz o al oxígeno, entre otras.

III.2. Secado y estabilidad de los nanocarriers

Según se determinó en la Sección anterior, el alto contenido de AF en las mezclas y su elevado porcentaje de unión a las nanopartículas las convertiría en un potencial aditivo para ser empleado en la fortificación de alimentos. Por consiguiente, surge la necesidad de deshidratar las mezclas para así obtener un producto en polvo, que sería más adecuado para su transporte, almacenamiento y conservación. Por esta razón, también es crucial conocer la estabilidad de los sistemas luego de su deshidratación y redispersión en agua. Para ello, las mezclas se sometieron a un proceso de liofilización, luego fueron resuspendidas en agua y se evaluó la distribución de tamaño de partícula. En las Figuras III.6 y III.7 se presentan las distribuciones de tamaño de partícula para las muestras USF y TSF antes y después de la liofilización.

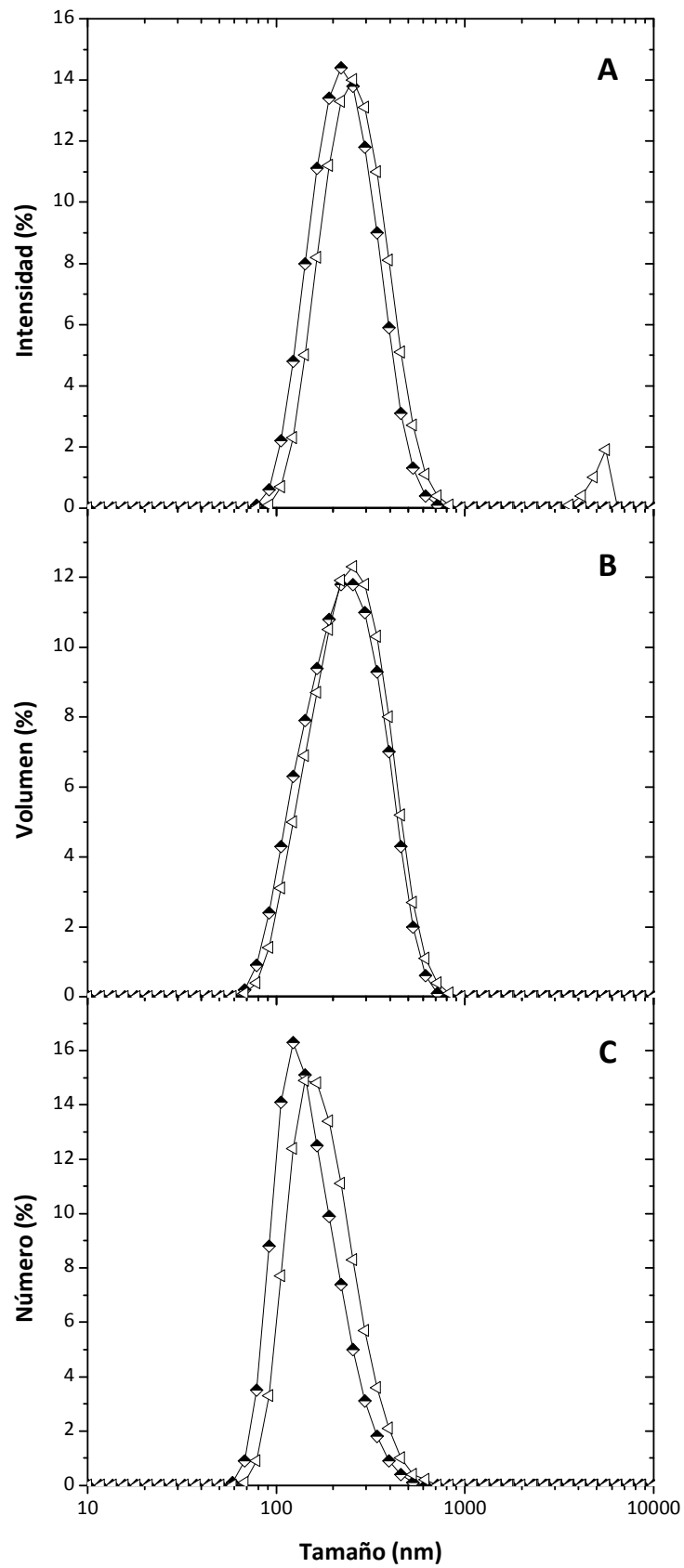


Figura III.6: Distribución de tamaño de partícula en intensidad (A), volumen (B) y número (C) de nanocarriers USF antes (◈) y después (◁) de la liofilización.

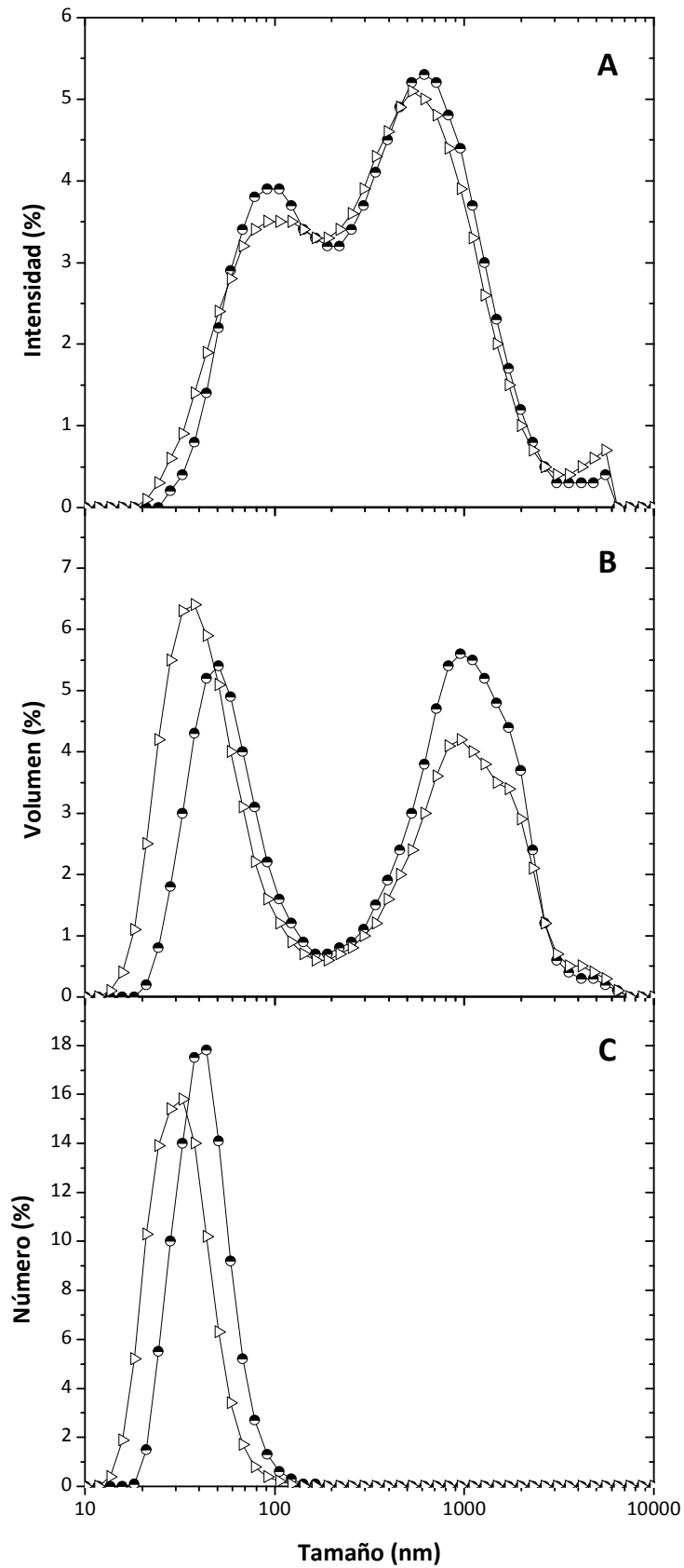


Figura III.7: Distribución de tamaño de partícula en intensidad (A), volumen (B) y número (C) de nanopartículas TSF antes (●) y después (▷) de la liofilización.

La población principal de la muestra USF (Figura III.6) no sufrió una variación significativa en el tamaño luego de la liofilización y redispersión, aunque apareció una población de menor proporción, cerca del límite de detección, probablemente debido a la agregación de partículas de proteína durante el proceso de deshidratación. En las distribuciones expresadas en volumen y número esta población de agregados no se observó, por lo tanto, se puede inferir que se encontraron en una muy baja proporción.

En la Figura III.7 se muestra que el proceso de liofilización no provocó modificaciones aparentes en el tamaño de partícula de la muestra TSF, de acuerdo con el desvío estándar de los duplicados (no mostrado para una visualización más clara de los resultados).

La literatura científica no indica un efecto general y claro respecto del proceso de liofilización de estos sistemas particulados. Trabajos previos han reportado que dicho proceso indujo cambios en morfología y en el patrón microestructural de estructuras proteicas agregadas, por ejemplo, Shapiro y Cohen (1997) concluyeron que la velocidad de congelación influenció estructuras gelificadas de alginato, y su rehidratación fue más rápida cuando la congelación se realizó con nitrógeno líquido que cuando se hizo por congelación convencional en *freezer*. Por otro lado, DeGroot y Neufeld (2001) reportaron que sistemas *core-shell* constituidos por alginato recubierto con quitosano recuperaron parcialmente su diámetro original luego de la liofilización y rehidratación. Más recientemente, Callewaert, Laurent-Maquin, y Edwards-Lévy (2007) encontraron que el espesor de partículas formadas por albúmina de suero bovino y alginato de propilenglicol presentaron roturas superficiales cuando fueron congeladas por inmersión en nitrógeno líquido.

En la Figura III.8 se muestran imágenes de microscopía láser confocal de las soluciones de nanopartículas de EW, de nanocarriers de AF y de las mezclas resuspendidas luego de la liofilización. Las mismas confirman lo que fue hallado por dispersión dinámica de luz, y también revelaron un cierto grado de agregación en la muestra TSF luego de la liofilización (Figura III.7), que no fue apreciado en la distribución de tamaño de partícula.

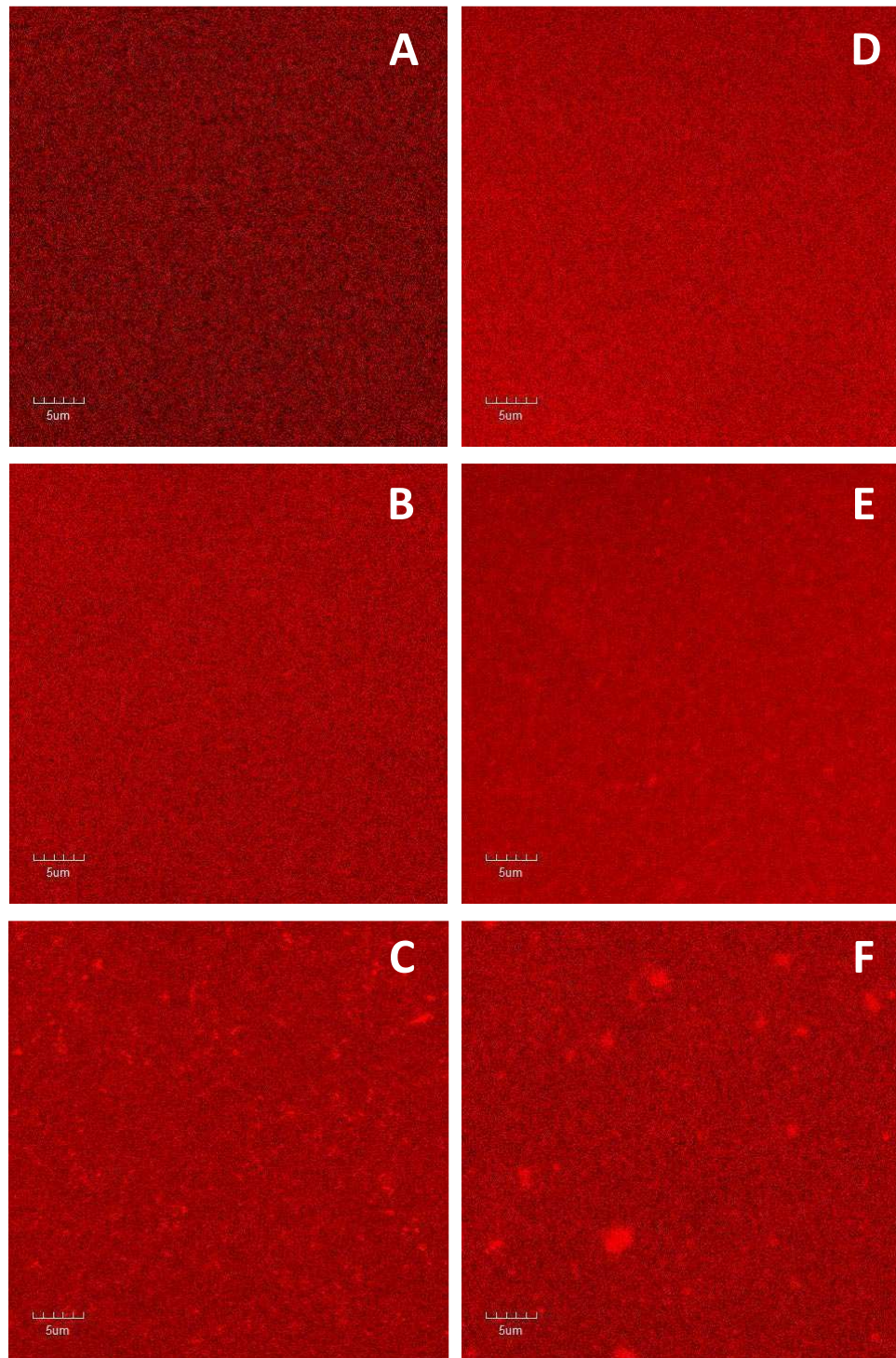


Figura III.8: Imágenes de microscopía láser confocal de nanopartículas US (A) y TS (D), y de nanocarriers USF (B), USF liofilizados (C), TSF (E) y TSF liofilizados (F).

III.3. Caracterización estructural de los nanocarriers

Se empleó microscopía de fuerza atómica (AFM) a los fines de caracterizar la estructura de los nanocarriers diseñados. Las muestras de nanopartículas US, como las de los nanocarriers con AF (USF) presentaron estructuras redondeadas y regulares de aproximadamente 14 nm de diámetro (Figura III.9). Este valor no resultó comparable con el diámetro hidrodinámico obtenido por DLS (220 nm). Cabe destacar que, en la técnica de AFM, las muestras fueron medidas en aire, luego de lavarlas y secarlas. Por lo tanto, existe la posibilidad de que no todas las partículas presentes en la solución permanezcan adsorbidas en la mica, ya que, al lavar, gran parte de la proteína es removida de la superficie (Younes-Metzler, Ben, y Giorgi, 2011). Asimismo, se sabe que en DLS las partículas muy pequeñas pueden quedar “opacadas” por las más grandes y, por lo tanto, no aparecer en la distribución. A fin de corroborar la existencia de partículas menores a 220 nm se filtraron las muestras US y USF por filtros de 0,22 y 0,02 μm de tamaño de poro y se midieron nuevamente por DLS (Figura III.10). Cuando se filtró por 0,22 μm la distribución fue trimodal. Si bien se siguió viendo el pico principal de 220 nm, también apareció una población de 24 nm y otra de 6,5 nm en menor proporción. En volumen y número las dos poblaciones de menor tamaño fueron más significativas. El pico de 24 nm se atribuyó a agregados de proteína también presentes en la muestra (Hagolle y col, 1998) y la última población de 6,5 nm correspondería a la proteína mayoritaria de la EW, la ovoalbúmina. El peso molecular de esta proteína es de 45 kDa y, por medio del *software* del equipo de DLS, se corroboró el diámetro equivalente al peso molecular de esta proteína globular, que fue de 6 nm. Otras proteínas presentes en la EW también quedan comprendidas dentro del rango que abarca este mismo pico (3,6-16 nm), por ejemplo, la conalbúmina (PM = 76 kDa, diámetro equivalente 7,6 nm), el ovomucoide (PM = 28 kDa, diámetro equivalente 4,9 nm) y la lisozima (PM = 14 kDa, diámetro equivalente 3,7 nm), entre otras. Al filtrar la solución por 0,02 μm , se observaron los picos de 6,5 y 220 nm, aunque este último se presentó sólo en intensidad, es decir, que no hubo una proporción significativa de esta población.

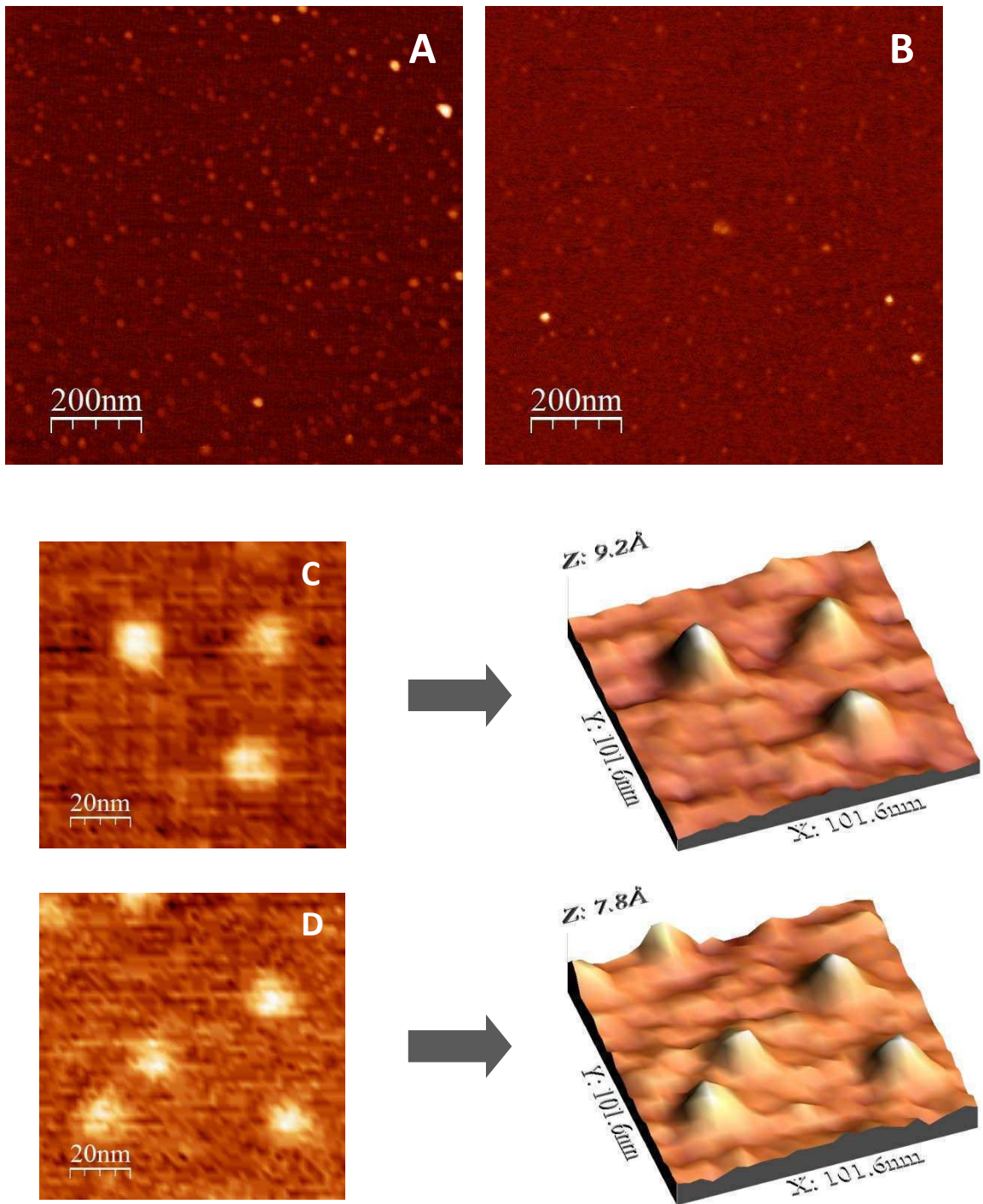


Figura III.9: Imágenes de microscopía de fuerza atómica de nanopartículas US (A) y USF (B) y detalle de la estructura en vista 2D y 3D de nanopartículas US (C) y USF (D).

Al comparar los diámetros obtenidos por DLS para las muestras filtradas con los obtenidos por AFM se encontró nuevamente que no había coincidencias.

Sin embargo, se observó que las partículas medidas por AFM tenían una relación diámetro/altura bastante alta (Figura III.9), por lo que es probable que en la etapa de secado, durante la preparación de las muestras, las partículas se aplastaran sobre la mica, es decir, adquirieran una forma de disco y en consecuencia un diámetro mayor. Posiblemente estas partículas podrían ser la fracción de menor tamaño determinada por DLS, de 6,5 nm.

Para comprender las diferencias entre los tamaños medidos por AFM y DLS se calculó el volumen de la partícula de acuerdo con Chávez Benavides (2008), basándose en los datos obtenidos por cada técnica. Cabe aclarar que los estos cálculos son sólo estimativos y a los fines de la identificación cualitativa de la población correspondiente.

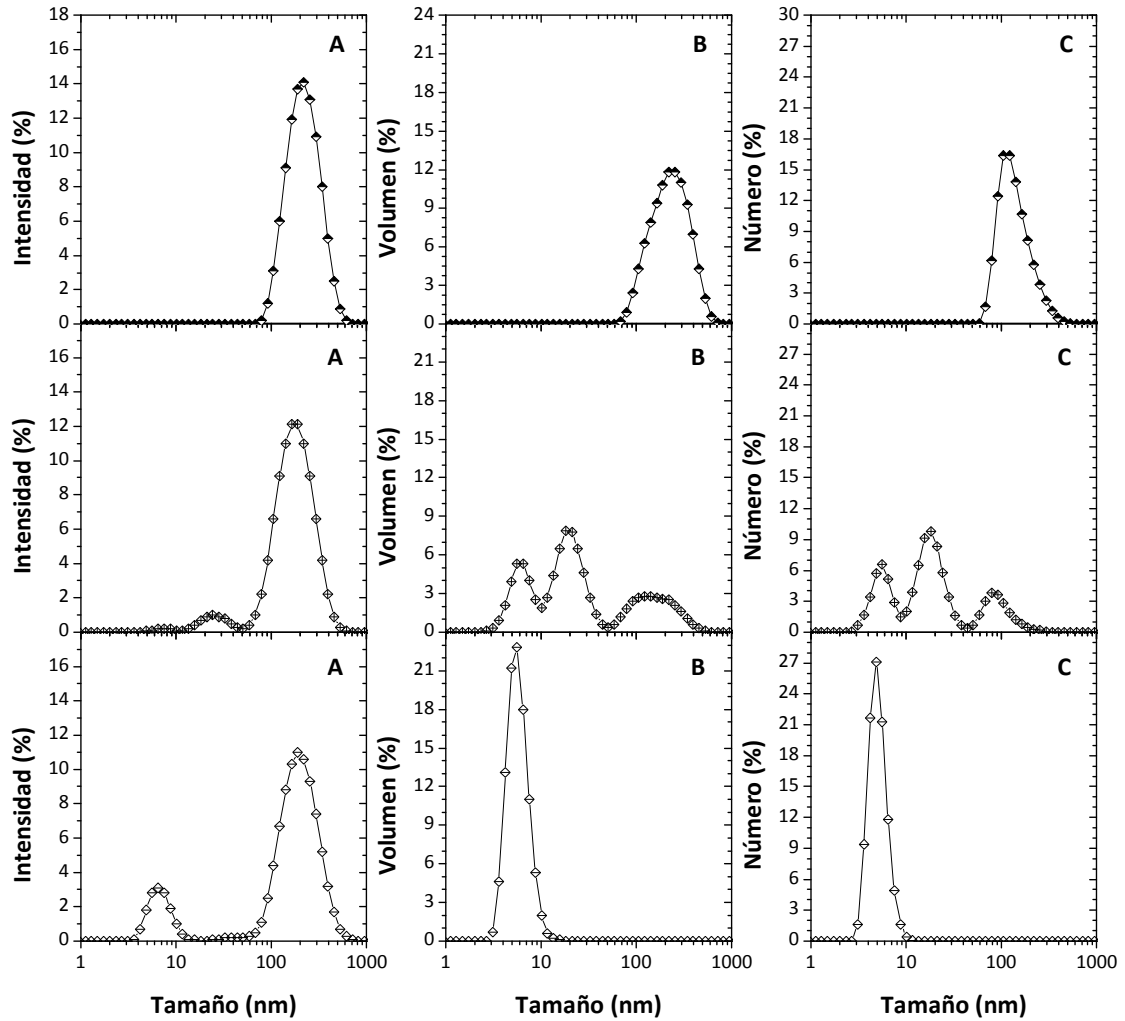


Figura III.10: Distribuciones de tamaño de partícula en intensidad (A), volumen (B) y número (C) de nanopartículas USF sin filtrar (\blacklozenge), filtradas por $0,22\ \mu\text{m}$ (\diamond) y filtradas por $0,02\ \mu\text{m}$ (\diamond).

Debido a que el diámetro calculado por DLS se obtiene mediante el ajuste de los datos suponiendo partículas esféricas, el volumen se calculó con la fórmula: $\text{Vol}_{\text{DLS}} = 4/3 \times (\pi r^3)$, siendo r el radio hidrodinámico. Cuando las partículas se depositaron sobre la mica y se evaporó el solvente, se observaron estructuras con forma de disco, entonces, el volumen se calculó aproximando las partículas a un cilindro y se empleó la fórmula $\text{Vol}_{\text{AFM}} = (\pi r^2) \times h$, donde r es la mitad del diámetro y h la altura, obtenidos del análisis del perfil de la partícula, realizado por AFM (Figura III.9). El Vol_{DLS} fue $144\ \text{nm}^3$, considerando un diámetro hidrodinámico de $6,5\ \text{nm}$ (radio de $3,25\ \text{nm}$), mientras que el Vol_{AFM} fue $120\ \text{nm}^3$, tomando en cuenta un diámetro de $14\ \text{nm}$ (radio de $7\ \text{nm}$) y una

altura de 0,78 nm (valores promedio de 10 partículas medidas con el *software* del equipo). La técnica de AFM brinda el diámetro físico de las nanopartículas en un sustrato, mientras que DLS proporciona un diámetro hidrodinámico, que tiene en cuenta la esfera de hidratación y de iones que rodean a la partícula. Por lo tanto, las diferencias que existen en los volúmenes calculados por ambas técnicas son esperables. Los resultados obtenidos para los volúmenes son comparables, por lo tanto, se podría afirmar que corresponden a la misma población de partículas, y que coincide principalmente con la ovoalbúmina, y con las demás proteínas presentes en menor proporción, como la conalbúmina, el ovomucoide y la lisozima, entre otras. Es decir, los agregados presentes en la muestra observados por DLS no quedarían retenidos en la mica.

Luego, se observaron las nanopartículas TS y los nanocarriers TSF por AFM (Figura III.11). Tal como sucedió para el sistema anterior no se encontraron diferencias significativas entre las nanopartículas y los nanocarriers de AF. En este caso, las muestras fueron más heterogéneas y presentaron dos clases de partículas: una clase compuesta por cadenas de longitudes diversas y otra clase que contenía partículas de forma más esférica con bordes irregulares, de alrededor de 10-30 nm de diámetro.

Las proteínas de la EW a pH 3 se agregan por calentamiento formando cadenas lineales de tipo “collar de perlas” y la aplicación de TS provoca la ruptura de esas cadenas en fragmentos de menor tamaño, que fueron las observadas por AFM. Según la distribución de tamaño determinada por DLS se encontraron dos poblaciones principales: una población de partículas grandes (295 nm), que podría corresponder a los agregados lineales, y otra población de menor tamaño (70 nm) que podría estar relacionada con las partículas de alrededor de 10-30 nm, visualizadas por AFM. La diferencia de tamaños puede deberse a que por la gran heterogeneidad de longitudes que presentaron los fragmentos de cadenas lineales, los de menor tamaño podrían estar contenidos en ese mismo pico de 70 nm donde se encuentran las partículas pequeñas de 10-30 nm y, por lo tanto, aquel se desplazó hacia valores mayores de diámetro.

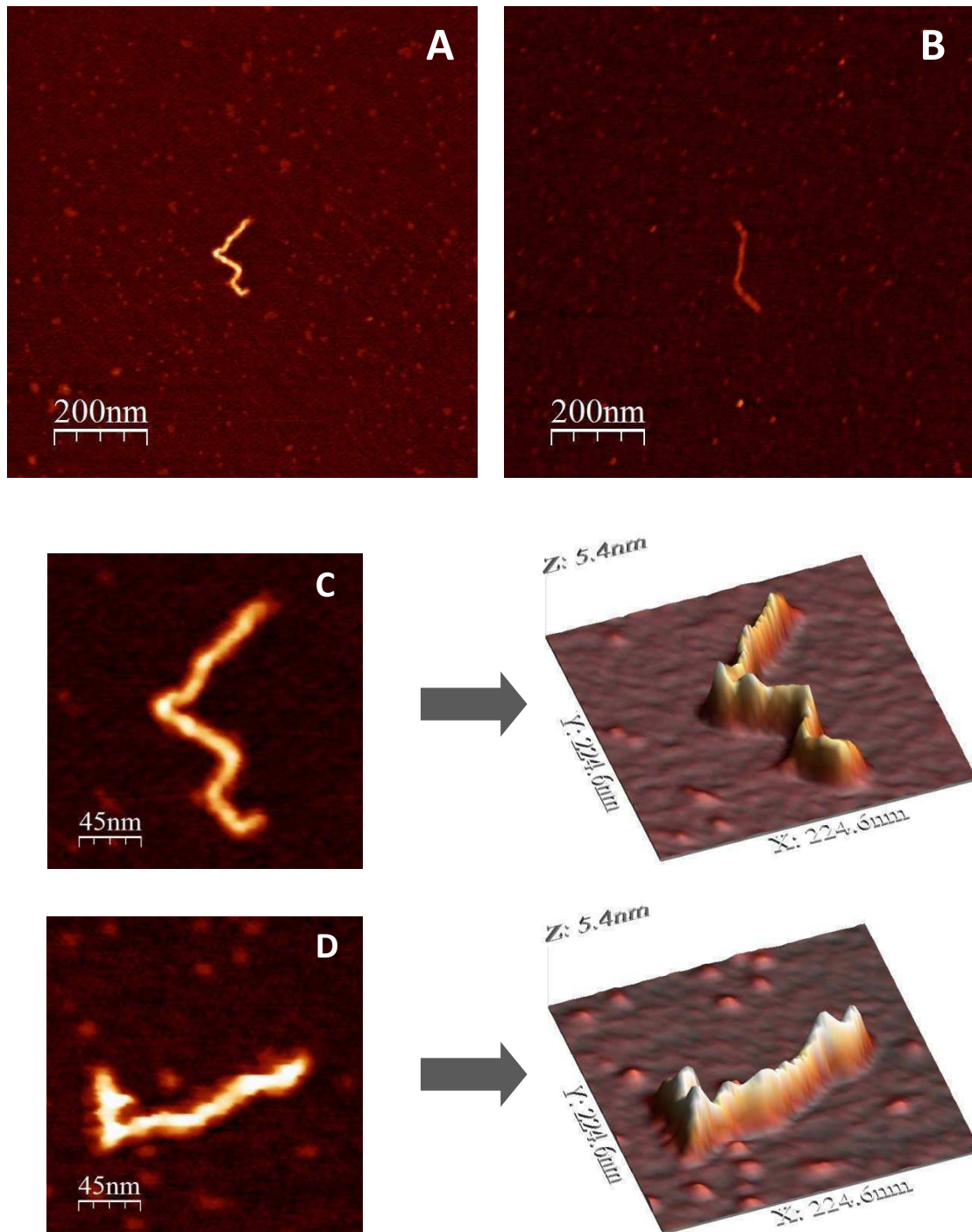


Figura III.11: Imágenes de microscopía de fuerza atómica de nanopartículas TS (A) y TSF (B) y detalle de la estructura en vista 2D y 3D de nanopartículas TS (C) y TSF (D).

Los resultados del análisis comparativo de las técnicas de DLS y AFM demostraron que ninguna de las dos técnicas puede emplearse por sí sola para la caracterización del tamaño de nanopartículas. Por un lado, la técnica de AFM puede ser usada para investigar una pequeña “cola” de la distribución de tamaño, mientras que DLS es

bastante menos sensible en reconocer nanopartículas muy pequeñas cuando la distribución de partículas es muy amplia (Chicea, Indrea, y Cretu, 2012), aunque proporciona una medición rápida y sencilla, y bastante confiable para muestras monodispersas. Por su parte, las imágenes de AFM no siempre pueden emplearse para calcular con exactitud la relación entre los diferentes tamaños de nanopartículas en las mezclas, ya que los métodos de deposición pueden sesgar la distribución de tamaño (Hoo, Starostin, West, y Mecartney, 2008).

III.4. Evaluación de las propiedades funcionales de los nanocarriers

Para comprobar la conservación de las propiedades funcionales de la EW luego de su interacción con AF, se evaluaron las propiedades de espumado, emulsificación y gelificación en uno de los nanocarriers desarrollados (USF), utilizando los mismos métodos que se emplearon en el Capítulo I.

III.4.1. Propiedades de espumado

La capacidad de espumado fue similar para ambas muestras (Tabla III.2). En la Figura III.12 se puede apreciar el aspecto de las espumas preparadas a pH 3 con nanopartículas US y los nanocarriers USF. El agregado de AF otorgó una tonalidad más amarillenta al líquido drenado, pero no se distinguieron diferencias en el color de la espuma.



Figura III.12: Espumas de soluciones de nanocarriers USF (izquierda) y nanopartículas US (derecha).

Luego, se estudió la estabilidad de las espumas preparadas. En la Figura III.13 se muestran las curvas de drenado para ambas muestras. Como se observa, no se encontraron diferencias entre ambos sistemas, lo cual fue confirmado, además, mediante los parámetros cinéticos (Tabla III.2), K_{dr} y $c^{1/n}$, calculados a partir del ajuste de las curvas de drenado al modelo empírico de Carp y col (1997) (ver Sección de Materiales y Métodos).

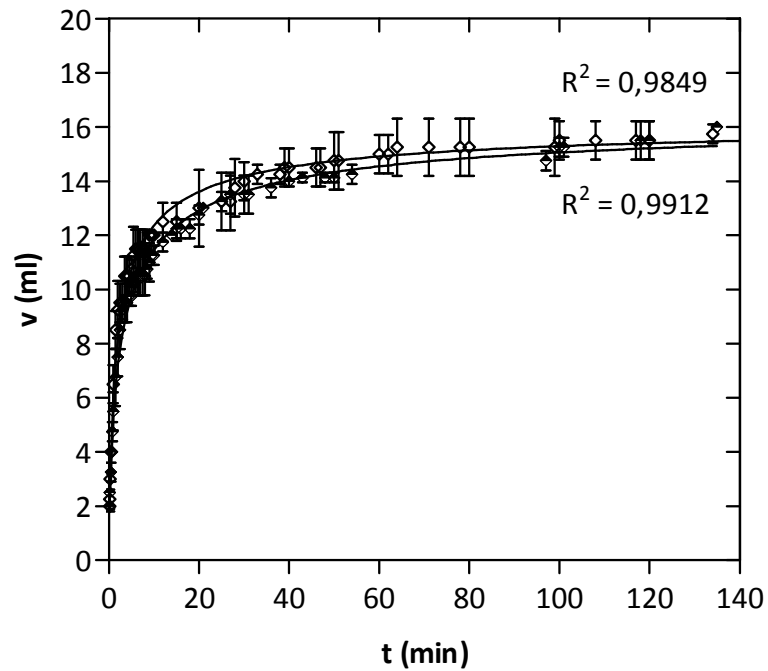


Figura III.13: Volumen drenado (v) en función del tiempo para espumas (5% p/p de proteína) de nanopartículas US (\diamond) y nanocarriers USF (\blacklozenge).

En cuanto al porcentaje de colapso, las dos muestras fueron bastante estables, y la disminución de la altura de la espuma fue similar y de alrededor de 30% luego de 2 h de formada.

Tabla III.2: Parámetros de formación y estabilidad de espumas preparadas con soluciones de nanopartículas US y nanocarriers USF.

Muestra	US	USF
CE (%)	195 ± 7^a	185 ± 7^a
K_{dr} (ml min ⁻¹ , x 10 ⁻³)	$2,37 \pm 0,40^a$	$1,37 \pm 0,21^a$
$c^{1/n}$ (min)	$1,85 \pm 0,12^a$	$2,91 \pm 0,14^a$

Diferentes letras indican una diferencia significativa con $p < 0,05$.

III.4.2. Propiedades de emulsificación

En la Figura III.14 se muestran las emulsiones preparadas con las nanopartículas US y los nanocarriers USF apenas formadas y luego de desestabilizarse. Se puede observar en ambos casos que no existen diferencias apreciables a la vista, excepto por una leve coloración amarillenta en las emulsiones USF, distinguible especialmente en la fase clarificada de las emulsiones desestabilizadas.

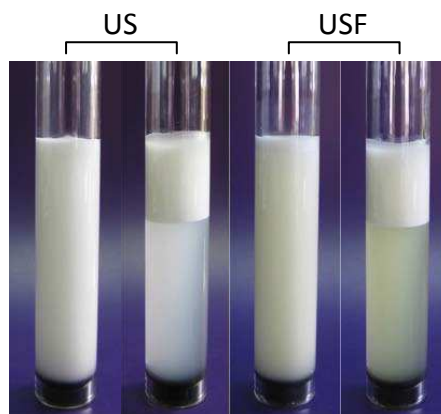


Figura III.14: Emulsiones preparadas con nanopartículas US y nanocarriers USF (2% p/p de proteína) recién preparadas y luego de desestabilizarse.

En la Figura III.15 se presenta la distribución de tamaño de gota inicial en volumen y número de las emulsiones preparadas con las nanopartículas US y los nanocarriers USF. Es evidente que no existen diferencias en los sistemas con y sin AF agregado, lo que demuestra que se mantuvieron las propiedades emulsionantes de la EW, aun cuando ésta se encontró unida a AF.

Tabla III.3: Parámetros relacionados con la distribución y el tamaño de gotas para emulsiones de nanopartículas US y nanocarriers USF.

Muestra	US	USF
D[3,2] (μm)	$25,3 \pm 0,3^a$	$26,0 \pm 0,5^a$
D[4,3] (μm)	$39,1 \pm 0,2^a$	$40,3 \pm 0,2^a$
IP	$1,41 \pm 0,24^a$	$1,39 \pm 0,03^a$
Área superficial específica (m^2/g)	$0,237 \pm 0,003^a$	$0,232 \pm 0,004^a$

Diferentes letras indican una diferencia significativa con $p < 0,05$.

De la distribución en volumen, se destacó una población de gotas de alrededor de 40 μm ; sin embargo, en número la población predominante se encuentra cerca de los 4 μm . En la Tabla III.3 se resumen los parámetros relacionados con la distribución de tamaño. No se encontraron diferencias significativas en los diámetros promedio D[4,3] y D[3,2] y tampoco en el área superficial específica y el índice de polispersidad (IP).

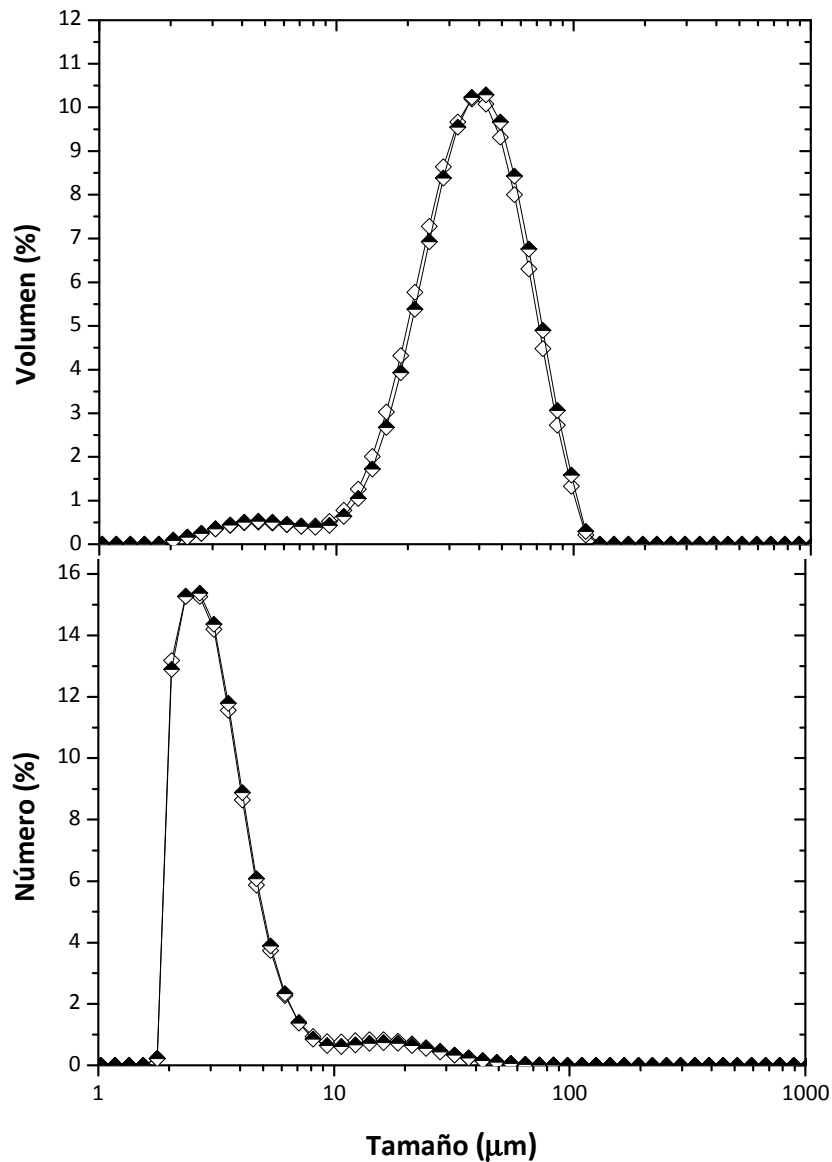


Figura III.15: Distribuciones de tamaño y diámetros de gota promedio para emulsiones de nanopartículas US (\diamond) y nanocarriers USF (\blacklozenge).

También se analizó la estabilidad de las emulsiones mediante los perfiles globales de *backscattering* (BS) en función del largo del tubo (Figura III.16). Los perfiles de ambas emulsiones mostraron una gran variación con el tiempo de almacenamiento, aunque no presentaron diferencias entre ellas.

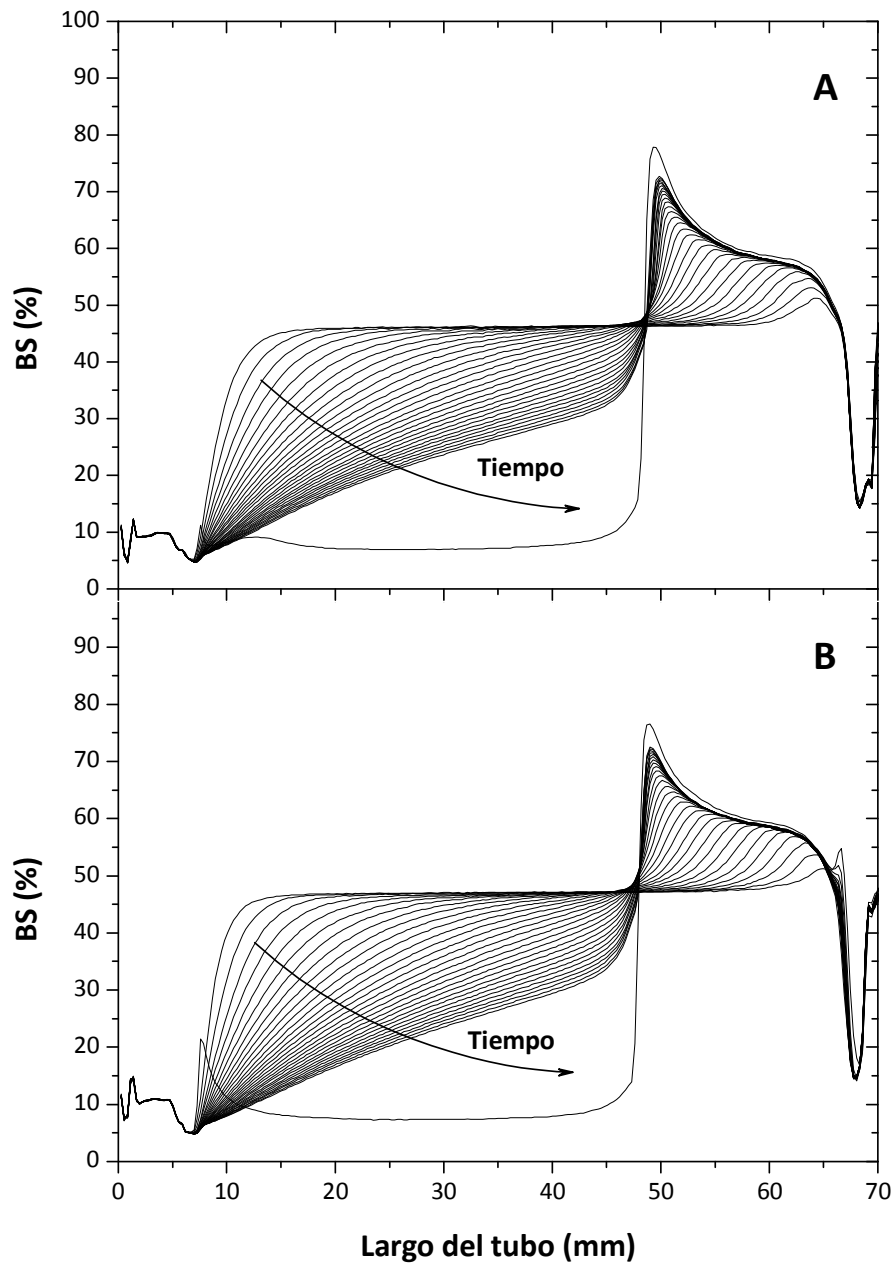


Figura III.16: Cambio de los perfiles de *backscattering* (BS%) con el tiempo en función de la altura de la muestra para emulsiones de nanopartículas US (A) y nanocarriers USF (B).

Tal como se desarrolló en el Capítulo I para las emulsiones de EW, se calculó la diferencia del perfil a cada tiempo y a tiempo 0 para generar el perfil de ΔBS y así facilitar el cálculo de la cinética de cremado. Luego, se midió el ancho del pico para

cada tiempo en la zona de clarificación, tomando como punto de medición el 50% de la amplitud máxima del pico medido al mayor tiempo de almacenamiento. La constante de velocidad de cremado se calculó mediante la pendiente del ajuste de los datos en la zona lineal del ascenso. El ajuste se muestra en la Figura III.17. La constante de velocidad de cremado fue de $0,492 \pm 0,002$ mm/min para las emulsiones US y de $0,497 \pm 0,002$ mm/min para las USF, es decir, prácticamente no hubo diferencias significativas entre las muestras.

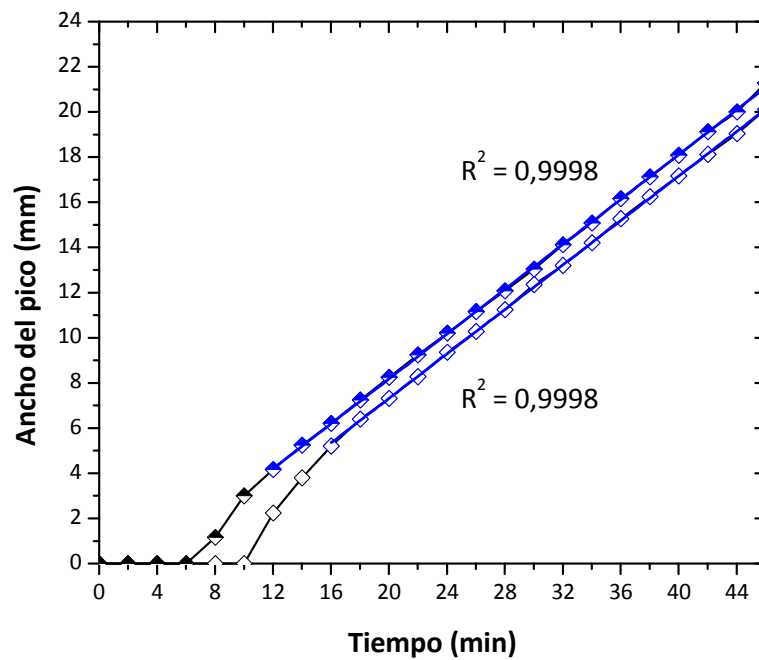


Figura III.17: Ancho del pico de clarificación en función del tiempo de almacenamiento para emulsiones de nanopartículas US (◇) y nanocarriers USF (◆). La zona lineal del ascenso se ajustó por regresión lineal.

III.4.3. Propiedades de gelificación

Viscoelasticidad dinámica

La Figura III.18 ilustra la evolución de G' durante las diferentes etapas de la formación del gel.

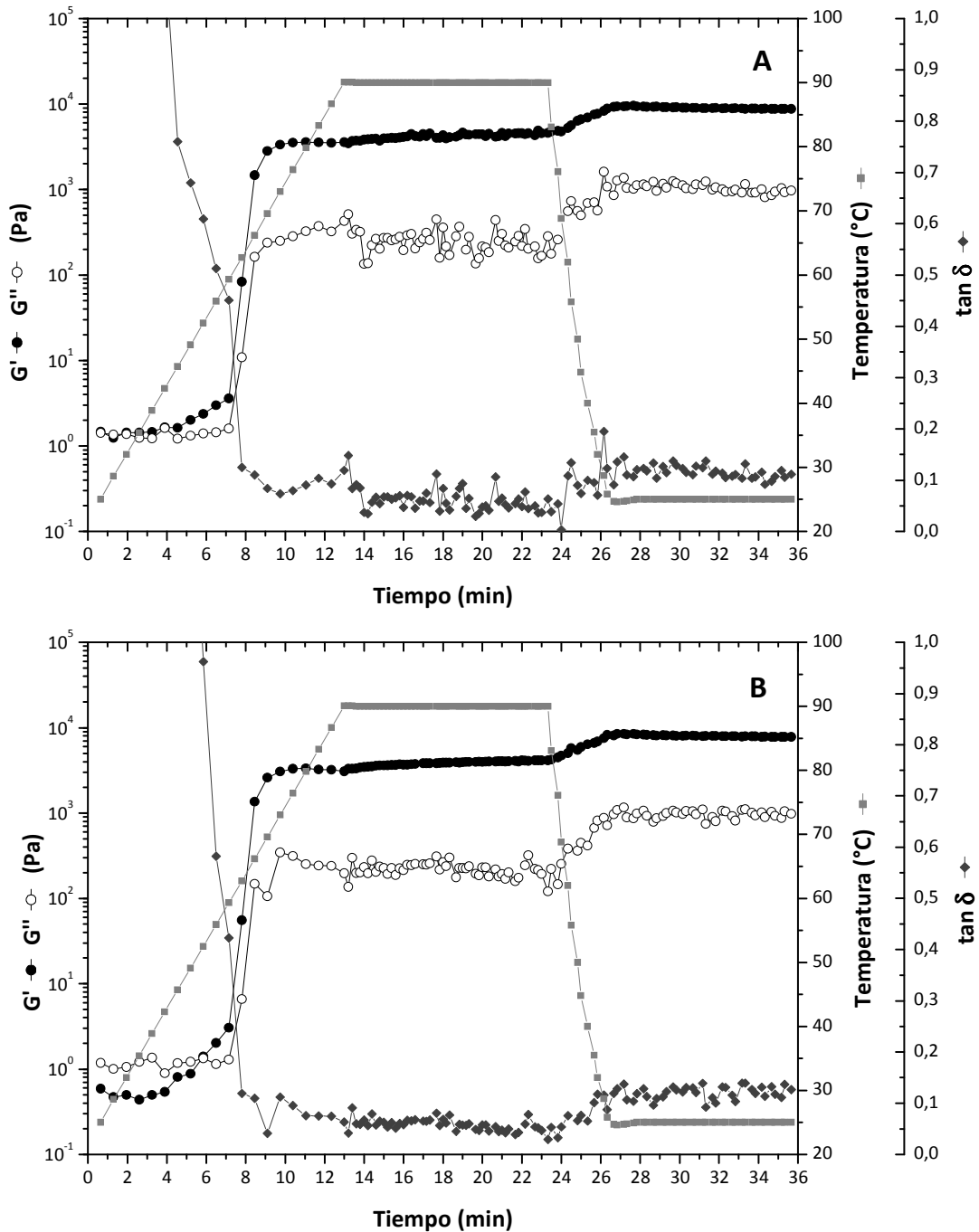


Figura III.18: Evolución del módulo elástico (G'), módulo viscoso (G'') y de la tangente del ángulo de fase ($\tan \delta$) en función del tiempo de calentamiento para soluciones de nanopartículas US (A) y nanocarriers USF (B) (10% p/p de proteína).

Los módulos G' y G'' evolucionaron de manera similar y los valores de G' resultaron ser considerablemente mayores en magnitud que los de G'' para todos los geles, lo que es indicativo de un comportamiento predominantemente elástico.

Los parámetros reológicos asociados a las mediciones realizadas (Tabla III.4) indican que la asociación del AF a las nanopartículas de EW no modificó sus propiedades de gelificación.

Tabla III.4: Parámetros reológicos de geles de nanopartículas US y nanocarriers USF.

Muestra	US	USF
T_{g1} (°C)	$45,7 \pm 0,0^a$	$49,1 \pm 4,8^a$
t_{g1} (min)	$4,6 \pm 0,0^a$	$5,2 \pm 0,9^a$
T_{g2} (°C)	$59,3 \pm 0,0^a$	$59,3 \pm 0,0^a$
t_{g2} (min)	$7,2 \pm 0,0^a$	$7,2 \pm 0,0^a$
G'_c (Pa)	4302 ± 211^a	3877 ± 191^a
$\tan \delta_c$	$0,059 \pm 0,010^a$	$0,058 \pm 0,009^a$
G'_f (Pa)	9018 ± 244^a	8000 ± 322^a
$\tan \delta_f$	$0,117 \pm 0,012^a$	$0,121 \pm 0,010^a$
n	$0,070 \pm 0,003$	$0,078 \pm 0,014$

Diferentes letras indican una diferencia significativa con $p < 0,05$.

Espectros mecánicos

La pendiente n , calculada a partir del ajuste lineal de los barridos de frecuencia realizados en los geles formados (Figura III.19), demostró que el comportamiento de las muestras fue levemente dependiente de la frecuencia (Tabla III.4). Esto indica que los geles presentaron un carácter levemente físico, y no se observaron diferencias entre las muestras que contenían AF y las que no tenían agregado de la vitamina.

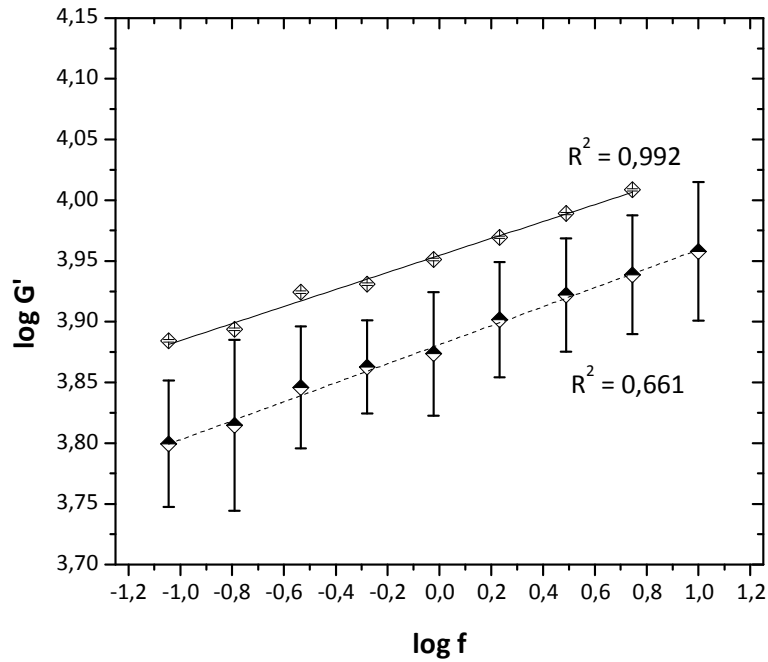


Figura III.19: Ajuste de los espectros mecánicos de los geles de nanopartículas US (\diamond) y de nanocarriers USF (\blacklozenge) al modelo propuesto por Egelandtsdal y col (1986).

III.5. Conclusiones

En primer lugar, se demostró que las nanopartículas de EW desarrolladas, US y TS, lograron unir AF efectivamente y presentaron una capacidad de carga de la vitamina muy alta, lo cual genera la posibilidad de emplearlos como carriers de AF para alimentos que se deseen fortificar. Además, se comprobó que el sistema podía someterse a un proceso de deshidratación y redispersión sin presentar mayores cambios en su distribución de tamaño.

Por otra parte, se evaluaron las propiedades funcionales de las nanopartículas y se concluyó que la interacción con AF no ocasiona cambios desfavorables en sus propiedades de espumado, emulsificación y gelificación. Únicamente se vio afectado el color. La conservación de las propiedades funcionales de las nanopartículas de EW probablemente se debió a que la proporción de AF a proteínas en las mezclas fue muy baja como para ejercer alguna modificación.

Por último, el agregado de la vitamina unida a proteínas podría incrementar la conservación de su bioactividad luego de someterse a factores adversos durante el procesamiento.

III.6. Referencias

- Bourassa, P., Hasni, I., & Tajmir-Riahi, H. A. (2011). Folic acid complexes with human and bovine serum albumins. *Food Chemistry*, 129(3), 1148-1155.
- Callewaert, M., Laurent-Maquin, D., & Edwards-Lévy, F. (2007). Albumin–alginate-coated microspheres: Resistance to steam sterilization and to lyophilization. *International Journal of Pharmaceutics*, 344(1–2), 161-164.
- Carp, D. J., Bartholomai, G. B., & Pilosof, A. M. R. (1997). A kinetic model to describe liquid drainage from soy protein foams over an extensive protein concentration range. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 30(3), 253-258.
- Chávez Benavides, J. L. (2008). *Synthesis and characterization of core-shell nanoparticles, and a study of their use as encapsulation agents*. Tesis Doctoral, University of Florida, Estados Unidos.
- Chicea, D., Indrea, E., & Cretu, C. M. (2012). Assessing Fe₃O₄ nanoparticle size by DLS, XRD and AFM. *Journal of optoelectronics and advanced materials*, 14(5-6), 460-466.
- DeGroot, A. R., & Neufeld, R. J. (2001). Encapsulation of urease in alginate beads and protection from α -chymotrypsin with chitosan membranes. *Enzyme and Microbial Technology*, 29(6–7), 321-327.
- Egelandsdal, B., Fretheim, K., & Harbitz, O. (1986). Dynamic rheological measurements on heat-induced myosin gels: An evaluation of the method's suitability for the filamentous gels. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 37(9), 944-954.
- Hagolle, N., Launay, B., & Relkin, P. (1998). Impact of structural changes and aggregation on adsorption kinetics of ovalbumin at the water/air interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 10(4), 191-198.
- Hoo, C., Starostin, N., West, P., & Mecartney, M. (2008). A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. *Journal of Nanoparticle Research*, 10(1), 89-96.
- Jha, N. S., & Kishore, N. (2011). Thermodynamic studies on the interaction of folic acid with bovine serum albumin. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 43(5), 814-821.
- Lakowicz, J. R. (2006). Introduction to fluorescence. En J. R. Lakowicz (Ed.), *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (pp. 15): Springer US.
- Lakowicz, J. R. (2006). Quenching of fluorescence. En J. R. Lakowicz (Ed.), *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (pp. 277-330): Springer US.
- Levine, R. L., & Federici, M. M. (1982). Quantitation of aromatic residues in proteins: model compounds for second-derivative spectroscopy. *Biochemistry*, 21(11), 2600-2606.
- Liang, L., & Subirade, M. (2002). Study of the acid and thermal stability of β -lactoglobulin-ligand complexes using fluorescence quenching. *Food Chemistry*, 132(4), 2023-2029.
- Liang, L., Zhang, J., Zhou, P., & Subirade, M. (2013). Protective effect of ligand-binding proteins against folic acid loss due to photodecomposition. *Food Chemistry*(0).
- Shapiro, L., & Cohen, S. (1997). Novel alginate sponges for cell culture and transplantation. *Biomaterials*, 18(8), 583-590.
- Spies, J. R. (1967). Determination of tryptophan in proteins. *Analytical Chemistry*, 39(12), 1412-1416.

- Verwei, M., Arkbage, K., Mocking, H., Havenaar, R., & Groten, J. (2004). The binding of folic acid and 5-methyltetrahydrofolate to folate-binding proteins during gastric passage differs in a dynamic in vitro gastrointestinal model. *Journal of Nutrition*, 134(1), 31-37.
- Younes-Metzler, O., Ben, R. N., & Giorgi, J. B. (2011). The adsorption of antifreeze glycoprotein fraction 8 on dry and wet mica. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 82(1), 134-140.

Capítulo IV

***Evaluación de la actividad biológica
del ácido fólico en nanocarriers
luego de la digestión in-vitro***

IV.1. Ensayos de biodisponibilidad *in vitro*

Debido a que la interacción de las nanopartículas de EW con AF podría modificar la actividad biológica de esta vitamina, resulta necesario elucidar el rol que aquellas ejercen en la biodisponibilidad de AF (Grajek y Olejnik, 2004). La biodisponibilidad, que se define como la cantidad ingerida de un nutriente que es absorbida y disponible para funciones fisiológicas, depende de la digestión, de la liberación de la matriz alimentaria, de la absorción por las células intestinales y el transporte hacia las células del cuerpo (Etcheverry, Grusak, y Fleige, 2012). Para realizar esta determinación existen métodos *in vivo* e *in vitro*. Los primeros, sin embargo, son difíciles de manejar, ya que es imposible observar el interior de los intestinos, y la toma de muestras para su análisis es muy complicada. En consecuencia, surge la necesidad de desarrollar modelos *in vitro* que puedan simular las condiciones del tracto gastrointestinal (Grajek y col, 2004). Se debe tener en cuenta que la biodisponibilidad, que tiene un punto final fisiológico o metabólico, nunca puede ser medido en su totalidad por ningún método *in vitro*. Además, las condiciones del individuo pueden influenciar la absorción del nutriente y es imposible incluirlas en los ensayos *in vitro*. Sin embargo, los métodos para determinar biodisponibilidad/bioaccesibilidad *in vitro* son útiles para proveer conocimiento sobre el efecto en la capacidad de absorción de un nutriente (indicador de la biodisponibilidad) o en el potencial para que sea absorbido (es decir, la bioaccesibilidad) de: las interacciones posibles entre los nutrientes y los componentes de los alimentos, los factores del lumen (pH y enzimas), las prácticas de preparación y procesamiento de alimentos y la naturaleza de la matriz alimentaria. Los métodos *in vitro* son menos costosos, más rápidos y ofrecen un mejor control de las variables experimentales que los estudios en humanos o en animales (Etcheverry y col, 2012; Sandberg, 2005). Aunque los procesos biológicos *in vivo* e *in vitro* pueden ser muy diferentes, las investigaciones *in vitro* pueden proveer alguna evidencia preliminar de las ventajas del uso de las nanopartículas (Zhao y col, 2010).

En el presente trabajo, se utilizó un modelo *in vitro* para simular la digestión gastroduodenal de los nanocarriers de AF y un modelo microbiano para estimar la actividad biológica y tener una primera indicación de su potencial biodisponibilidad.

Dicho método microbiológico es el oficial aprobado por la “*Association of Official Analytical Chemists*”, AOAC, que permite valorar el contenido de folatos totales en alimentos y, por su comodidad, es el más utilizado (Arcot y Shrestha, 2005). El método está basado en el uso de un microorganismo que tiene una respuesta al crecimiento que es folato-dependiente. La bacteria más utilizada es el *Lactobacillus rhamnosus*, y actúa sobre todos los derivados de folatos encontrados en el alimento, a diferencia de muchas otras bacterias investigadas (Eitenmiller, Landen, y Ye, 2007). A un pH adecuado, el crecimiento de *L. rhamnosus* es igual para todos los folatos mono-, di- y tri-glutamatos aunque no responde ante los ácidos pteróicos, producto común de la degradación de los folatos (Martin, 1995). *L. rhamnosus* exhibe un crecimiento no solo en respuesta al folato sino también a los productos del metabolismo de un carbono, y crece en ausencia completa de folato si el medio contiene timidina, purinas, metionina, serina, glicina y pantotenato (Shane y Stokstad, 1977). El plasma humano contiene concentraciones significativas de estos compuestos, excepto de timidina. Por esta razón, el medio para *L. rhamnosus* contiene aminoácidos, purinas y pantotenato. Bajo estas condiciones, el crecimiento de *L. rhamnosus* en respuesta al folato se debe al requerimiento del organismo de folato para la síntesis de timidilato (Shane, 2011).

En el presente trabajo, luego de la digestión gastrointestinal *in vitro*, las muestras se incorporaron al medio de crecimiento en la misma concentración de AF, por ende, las diferencias que pudieran encontrarse en el crecimiento del microorganismo estarían relacionadas con una mayor o menor actividad biológica del AF en esas muestras, y esto sería una medida de la mayor o menor biodisponibilidad de la vitamina.

Si bien los resultados del ensayo microbiológico no pueden ser directamente extrapolados a lo que sucedería en el cuerpo humano, constituyen una primera aproximación de cómo puede influir la interacción entre las nanopartículas de la EW y el AF en el proceso de digestión y absorción de la vitamina.

IV.2. Estabilidad de los nanocarriers de AF al cambio de pH

Durante la digestión gastrointestinal, el alimento es sometido a variaciones en el pH. Luego de la digestión parcial en la cavidad oral, el alimento pasa por un proceso de disolución en el estómago en condiciones ácidas (pH ~ 1 a 2), donde se liberan diversas

enzimas para ayudar a descomponer algunas proteínas y carbohidratos. A medida que la comida digerida abandona el estómago y entra al duodeno, se mezcla con las sales biliares, que emulsifican las grasas y otros compuestos hidrofóbicos presentes en la suspensión. También se libera en el duodeno una solución de bicarbonato que contiene enzimas (tripsina, entre otras), lo que eleva el pH de la solución a 6-7. Luego, la suspensión ingresa a la parte más larga del intestino delgado, en donde reside por alrededor de 3 a 5 h antes de pasar al intestino grueso y continuar con el proceso de digestión. Por ello, antes de realizar el ensayo *in vitro*, se evaluó la estabilidad de la unión de AF a los nanocarriers en las distintas condiciones de pH involucradas en la digestión gastrointestinal. En la Figura IV.1 se puede observar el cambio en la apariencia de los nanocarriers luego de ajustar el pH desde 3 a 7.

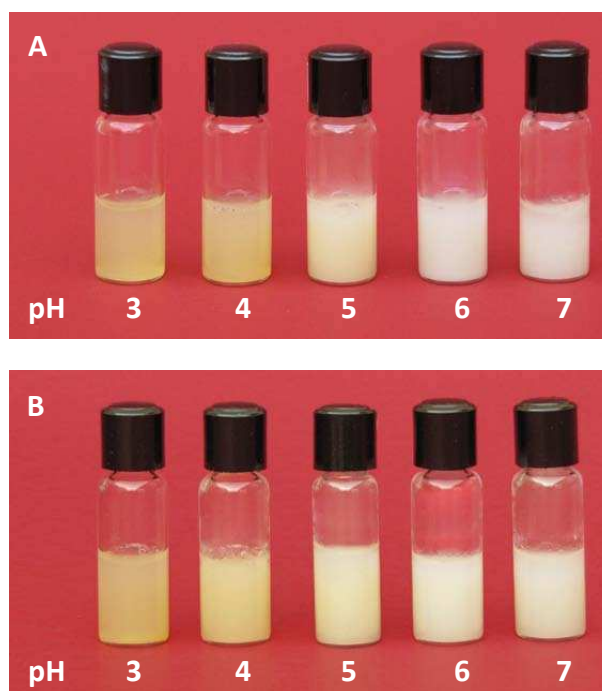


Figura IV.1: Apariencia macroscópica de los nanocarriers de AF, (A) USF (B) TSF, a distintos valores de pH.

Al ajustar el pH a 4 se apreció un aspecto macroscópico bastante similar al que presentaban las soluciones de los nanocarriers de AF a pH 3. Sin embargo, cuando se ajustó el pH a 5 y valores mayores, se observó un aumento en la turbidez y una pérdida de la tonalidad amarilla de las soluciones. El valor de pH a partir del cual se observaron los cambios más notorios coincide con el valor del punto isoeléctrico de la mayoría de las proteínas presentes en la EW (~5).

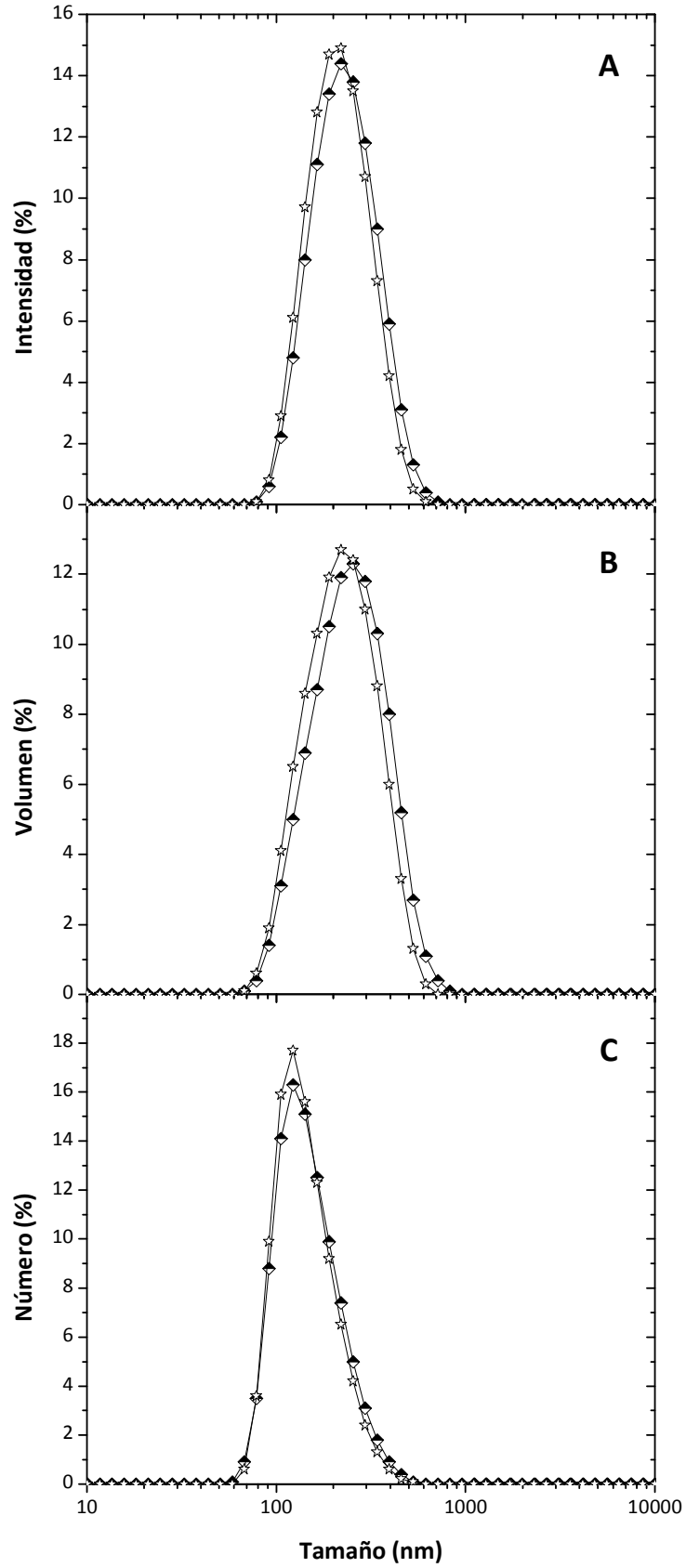


Figura IV.2: Distribución de tamaño de partícula en intensidad (A), volumen (B) y número (C) de nanopartículas USF a pH 3 (◆) y luego de ajustar el pH a 4 (☆).

Este hecho podría estar relacionado con el cambio en la carga neta de las partículas, desde un valor positivo ($\text{pH} < \text{pI}$) a uno negativo ($\text{pH} > \text{pI}$), lo que podría ocasionar modificaciones estructurales y en el tipo de interacciones presentes entre las moléculas de proteína y/o entre las proteínas y el AF. En la Figura IV.2 se compara la distribución de tamaño de partícula de uno de los nanocarriers (USF) a pH 3 y luego de ajustar el pH a 4. La distribución de tamaño de partícula permaneció inalterada luego del ajuste de pH a este valor. De manera contraria, cuando el pH se ajustó a un valor de 5, 6 o 7 la distribución de tamaño no se pudo obtener por dispersión dinámica de luz, ya que se presentaron errores en las mediciones debido a la sedimentación de partículas grandes, cuyos tamaños serían superiores al límite de detección del equipo ($6 \mu\text{m}$).

A fin de cuantificar el porcentaje de AF que permaneció unido a las nanopartículas de EW luego del cambio de pH, se eligió uno de los sistemas (USF) y se determinó, mediante el ensayo de ultrafiltración previamente mencionado, el porcentaje de AF libre luego de ajustar el pH a 4 y 7. En la Tabla IV.1 se observa que el porcentaje de AF unido no disminuyó significativamente al ajustar el pH de 3 a 4, lo que significaría que en ese rango de pH el complejo se mantendría estable. Sin embargo, al ajustar el pH a 7 el % AFU disminuyó a menos de la mitad, es decir, que el nanocarrier sería inestable en estas condiciones y se produciría su disociación parcial a pH 7. Esto podría indicar que la unión estaría mediada en gran medida por interacciones electrostáticas. Por lo tanto, la unión del AF a la nanopartícula a pH 3 y su posterior liberación a pH 7 sería una premisa para la probable protección de la vitamina durante su pasaje por la digestión gástrica y su posterior liberación en el sitio de absorción, que se produciría durante la digestión intestinal a pH 7.

Tabla IV.1: Porcentaje de AF unido a nanopartículas US a distintos valores de pH.

pH	% AFU
3	$78,0 \pm 9,1$
4	$75,9 \pm 0,8$
7	$27,0 \pm 0,5$

IV.3. Evaluación de la actividad biológica de nanocarriers de AF en un modelo microbiano

Como se señaló al principio del Capítulo, se evaluó la actividad biológica del AF en los nanocarriers digeridos utilizando el modelo microbiano de *L. rhamnosus*, que habitualmente se emplea para cuantificar AF en alimentos. El protocolo de digestión gastrointestinal *in vitro* empleado se resume en la Figura IV.3.

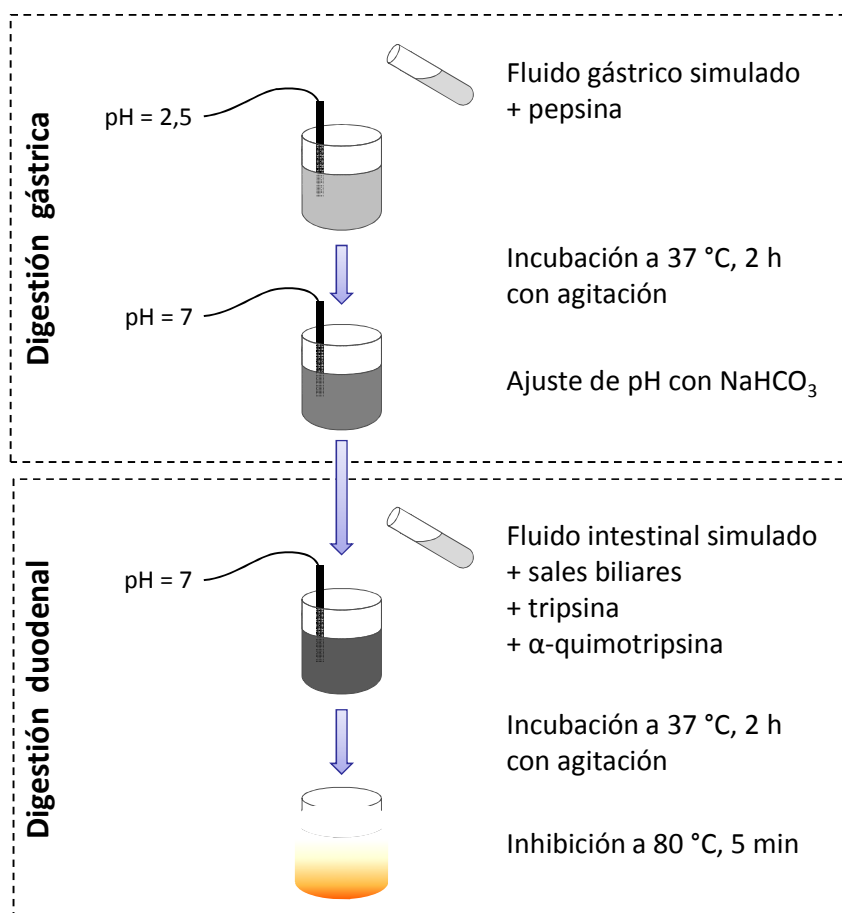


Figura IV.3: Esquema de la digestión gastrointestinal *in vitro* empleada.

Para el ensayo microbiológico se realizó una curva de calibración de crecimiento microbiano en función de la concentración de AF agregado al medio de cultivo (Figura IV.4). Luego, a partir de los datos de DO medidos de los cultivos a los que se le agregaron las distintas muestras digeridas, se calcularon los valores correspondientes de concentración de AF empleando la curva de calibración. En todos los casos, las muestras digeridas contenían la misma concentración de AF, por lo tanto, las diferencias en el crecimiento microbiano se originarían por una actividad biológica

distinta en cada muestra, que daría lugar a concentraciones de AF aparentemente diferentes. Es por eso que los resultados del ensayo microbiológico se expresan como concentraciones de AF aparente ($[AF]_{ap}$) y estos valores representan las diferencias en el crecimiento microbiano debidas a una mayor o menor actividad biológica del AF en cada muestra.

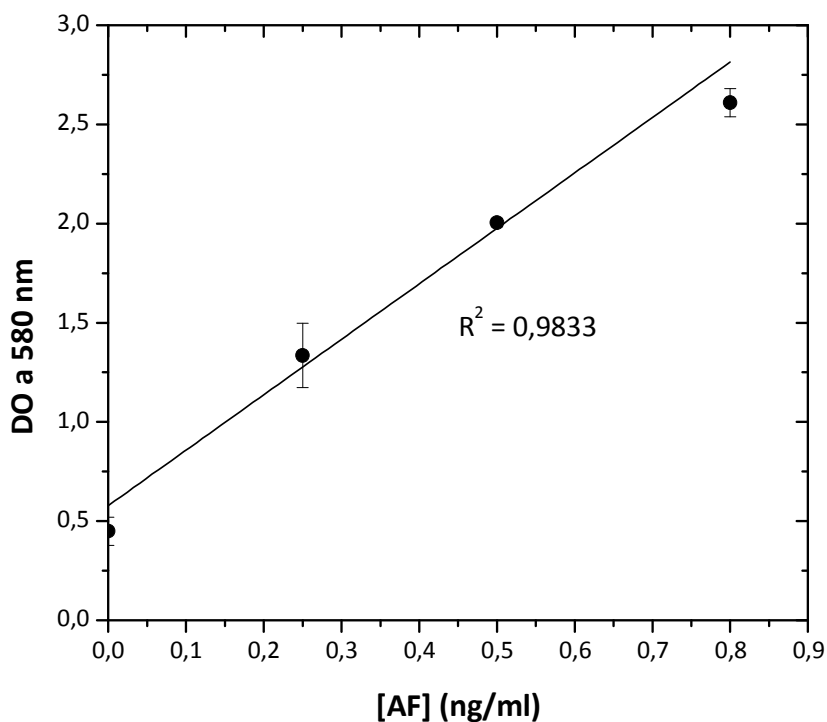


Figura IV.4: Curva de calibración de crecimiento microbiano (medido por la DO a 580nm) en función de la concentración de AF.

Cuando se proporcionó AF digerido al medio de cultivo el crecimiento fue el equivalente a tener una $[AF]_{ap}$ de $64 \pm 10 \mu\text{g/ml}$. Sin embargo, al agregarlo como nanocomplejos USF o TSF digeridos, el crecimiento fue el equivalente a una $[AF]_{ap}$ de 179 ± 3 y $211 \pm 7 \mu\text{g/ml}$, respectivamente. Esto indicaría un efecto sinérgico entre la proteína y el AF visualizado como un incremento en la biodisponibilidad de la vitamina para *L. rhamnosus*.

Otros autores han informado efectos sinérgicos en la biodisponibilidad de AF unido a proteínas. Swiatlo, O'Connor, Andrews, y Picciano (1990) encontraron que la incorporación de leche humana o bovina en la dieta de ratas mejoraba la biodisponibilidad de AF y, por el contrario, la leche de cabra la reducía. Por su parte, de

Jong y col (2005) reportaron que la leche es una matriz adecuada para la fortificación y la mejora en el nivel de AF en humanos. Existen muchos estudios sobre la interacción entre el AF y la proteína ligante de folato (FBP, sus siglas en inglés). Algunos de ellos respaldan el concepto de que la FBP afecta la absorción y/o retención de folato de la leche *in vivo*, especialmente durante el período neonatal (Colman, Hettiarachchy, y Herbert, 1981; Ford, 1974; Ford, Knaggs, Salter, y Scott, 1972; Mason y Selhub, 1988; Said, Horne, y Wagner, 1986; Salter y Blakeborough, 1988; Swiatlo y col, 1990; Tani, Fushiki, y Iwai, 1983; Tani y Iwai, 1984). Sin embargo, algunos resultados son contradictorios, ya que se ha encontrado una mejora en la absorción de folato en estudios realizados en células de la mucosa intestinal de ratas (Colman y col, 1981) y en vesículas de la membrana del borde de la vellosidad intestinal (Salter y col, 1988). Sin embargo, Tani y col (1983) y Said y col (1986) informaron un transporte en ratas menor en el yeyuno e igual en el íleo de folato unido a FBP en comparación con el folato no unido. Mason y col (1988) mostraron que el folato unido a FBP se absorbía en el intestino delgado por un mecanismo diferente al de la absorción del folato no unido. La absorción del folato unido a FBP ocurre más gradual y lentamente. Se ha sugerido que la velocidad de absorción menor impide que haya niveles de folato altos en el plasma, lo que podría promover su rápida excreción mediante los riñones (Tani y col, 1983).

IV.4. Conclusiones

La interacción de las nanopartículas de EW con AF ha demostrado ser beneficiosa para el transporte y la liberación de AF luego de la digestión. La actividad biológica del AF permanece intacta y se observó una mejora en la biodisponibilidad de la vitamina para *Lactobacillus rhamnosus*. Sin embargo, deberán realizarse otro tipo de ensayos para evaluar la biodisponibilidad del AF en los nanocarriers para el metabolismo de seres humanos.

Estos hallazgos resultan promisorios para la incorporación de las nanopartículas adicionadas con AF en alimentos fortificados.

IV.5. Referencias

- Arcot, J., & Shrestha, A. (2005). Folate: methods of analysis. . *Trends in Food Science & Technology*, 16, 253-266.
- Colman, N., Hettiarachchy, N., & Herbert, V. (1981). Detection of a milk factor that facilitates folate uptake by intestinal cells. *Science*, 211, 1427-1429.
- de Jong, R. J., Verwei, M., West, C. E., van Vliet, T., Siebelink, E., van den Berg, H., & Castenmiller, J. J. M. (2005). Bioavailability of folic acid from fortified pasteurised and UHT-treated milk in humans. *European Journal of Clinical Nutrition*, 59(8), 906-913.
- Eitenmiller, R. R., Landen, W. O., & Ye, L. (2007). Folate and folic acid. En *Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences* (2da ed., pp. 443-505): CRC Press.
- Etcheverry, P., Grusak, M. A., & Fleige, L. E. (2012). Application of in vitro bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc and vitamins B6, B12, D, and E. *Frontiers in Physiology*, 3.
- Ford, J. E. (1974). Some observations on the possible nutritional significance of vitamin B12- and folate binding proteins in milk. *British Journal of Nutrition*, 31, 243-257.
- Ford, J. E., Knaggs, G. S., Salter, D. N., & Scott, K. (1972). Folate nutrition in the kid. *British Journal of Nutrition*, 27, 571-583.
- Grajek, W., & Olejnik, A. (2004). Epithelial cell cultures *in vitro* as a model to study functional properties of food. *Polish Journal of food and nutrition sciences*, 13(54), 5-24.
- Martin, C. A. (1995). Folate analysis in foods - how accurate is it? *BNF Nutrition Bulletin*, 20(73), 8-15.
- Mason, J. B., & Selhub, J. (1988). Folate-binding protein and the absorption of folic acid in the small intestine of the suckling rat. *American Journal of Clinical Nutrition*, 48, 620-625.
- Said, H. M., Horne, D. W., & Wagner, C. (1986). Effect of human folate binding protein on folate intestinal transport. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 251(114-120).
- Salter, D., & Blakeborough, P. (1988). Influence of goat's-milk folate binding protein on transport of 5-methyltetrahydrofolate in neonatal-goat small intestinal brush-border-membrane vesicles. *British Journal of Nutrition*, 59, 497-507.
- Sandberg, A.-S. (2005). Methods and options for in vitro dialyzability; Benefits and limitations. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 75(6), 395-404.
- Shane, B. (2011). Folate status assessment history: implications for measurement of biomarkers in NHANES. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 94(1), 337S-342S.
- Shane, B., & Stokstad, E. L. R. (1977). Rate limiting steps in folate metabolism by *Lactobacillus casei*. . *Journal of Genetic Microbiology*, 103, 261-270.
- Swiatlo, N., O'Connor, D. L., Andrews, J., & Picciano, M. F. (1990). Relative folate bioavailability from diets containing human, bovine and goat milk. *Journal of Nutrition*, 120(2), 172-177.

- Tani, M., Fushiki, T., & Iwai, K. (1983). Influence of folate binding protein from bovine milk on the absorption of folate in gastrointestinal tract of rat. *Biochemical and Biophysical Acta*, 757, 274-281.
- Tani, M., & Iwai, K. (1984). Some nutritional effects of folate binding protein in bovine milk on the bioavailability of folate to rats. *Journal of Nutrition*, 114, 778-785.
- Zhao, D., Zhao, X., Zu, Y., Li, J., Zhang, Y., Jiang, R., & Zhang, Z. (2010). Preparation, characterization, and *in vitro* targeted delivery of folate-decorated paclitaxel-loaded bovine serum albumin nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 5, 669-677.

Conclusiones generales

1. Conclusiones generales

En el presente trabajo se ha mostrado que los USAI constituyen una tecnología emergente, también denominada “tecnología verde”, eficaz para ser aplicada tanto en la preservación de EW como en su modificación para obtener nanopartículas de tamaño controlado que puedan servir como *carrier* de AF para la fortificación de alimentos. Si bien aquí no se ha estudiado el impacto de USAI en la supervivencia microbiana, en la literatura se encuentran numerosas evidencias de su efectividad para minimizar el procesado y maximizar la calidad de los productos y su estabilidad microbiológica (Huang, Mittal, y Griffiths, 2006; Mañas, Pagán, Alvarez, y Condón Usón, 2003; Mañas, Pagan, Raso, Sala, y Condon, 2000; Wrigley y Llorca, 1992).

Los resultados obtenidos en el Capítulo I muestran que, en las condiciones de potencia acústica utilizadas, los USAI producen algunas modificaciones fisicoquímicas en las proteínas de EW. Principalmente se incrementa la hidrofobicidad superficial, lo cual impacta en una mayor velocidad de agregación térmica y en mejores propiedades de emulsificación. Los USAI también producen una reducción en el tamaño de partícula del aislado comercial de EW, que se manifiesta en una disminución de la viscosidad y, en consecuencia, en una reducción considerable de las propiedades de espumado. En cambio, las propiedades de gelificación de la EW no se vieron afectadas por los USAI. Por lo tanto, controlando la potencia acústica aplicada y de acuerdo al uso requerido de la EW (gelificante, agente de batido o de emulsificación, etc.) será posible emplear esta tecnología para la preservación de EW, manteniendo su funcionalidad.

En los Capítulos II y III se ha mostrado que los USAI y la TS permiten desarrollar nanopartículas de EW de tamaño controlado y que estas pueden unir eficientemente AF para transformarse en nanocarriers de esta vitamina. Los nanocarriers también podrían mejorar la biodisponibilidad de otros compuestos bioactivos. Finalmente, en el Capítulo IV, los estudios de digestión gastroduodenal *in vitro* de los nanocarriers de AF y su incorporación al medio de crecimiento de *L. rhamnosus* permitieron concluir que el AF transportado en nanocarriers de EW presenta una mayor biodisponibilidad para este microorganismo en comparación con el AF libre. Estos resultados deberán ser corroborados en el futuro en otros modelos experimentales para evaluar la biodisponibilidad del AF en seres humanos.

2. Referencias

- Huang, E., Mittal, G. S., & Griffiths, M. W. (2006). Inactivation of *Salmonella enteritidis* in liquid whole egg using combination treatments of pulsed electric field, high pressure and ultrasound. *Biosystems Engineering*, 94(3), 403-413.
- Mañas, P., Pagán, R., Alvarez, I., & Condón Usón, S. (2003). Survival of *Salmonella senftenberg* 775 W to current liquid whole egg pasteurization treatments. *Food Microbiology*, 20(5), 593-600.
- Mañas, P., Pagan, R., Raso, J., Sala, F. J., & Condon, S. (2000). Inactivation of *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, and *Salmonella senftenberg* by ultrasonic waves under pressure. *Journal of Food Protection*, 63(4), 451-456.
- Wrigley, D. M., & Llorca, N. G. (1992). Decrease of *Salmonella typhimurium* in skim milk and egg by heat and ultrasonic wave treatment. *Journal of Food Protection*, 55(9), 678-680.

