



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y  
FARMACÉUTICAS**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO**

Tesis de Doctorado

***FORMACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE  
GELES FORMADOS POR CASEINATO DE  
SODIO Y POLISACÁRIDOS: PROPIEDADES  
FISICOQUÍMICAS, REOLÓGICAS Y  
ESTRUCTURALES***

Presentada por María Eugenia Hidalgo

Rosario, Argentina

2012

*FORMACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GELES FORMADOS  
POR CASEINATO DE SODIO Y POLISACÁRIDOS:  
PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS, REOLÓGICAS Y  
ESTRUCTURALES*

María Eugenia Hidalgo

Licenciada en Biotecnología, Universidad Nacional de Rosario.

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Área Físicoquímica, Departamento Química-Física dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 1 de abril de 2008 y el 15 de noviembre de 2012, bajo la dirección de la Dra. Patricia H. Risso y la codirección del Dr. Jorge R. Wagner.

Nombres y firmas del Director y de los integrantes del Jurado de Tesis:

Director: Dra. Patricia H. Risso.....

Jurado.....

Jurado.....

Jurado.....

Defendida: .....

**Esta tesis fue realizada con el aporte de los siguientes subsidios:**

- Innovación de la elaboración de productos lácteos utilizando endopeptidasas de origen microbiano durante la coagulación enzimática. Programa de Cooperación Científico-Tecnológico entre el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la República Argentina (MINCYT) y la Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) de la República Federativa de Brasil - Convocatoria 2011, Modalidad Grupos de Investigación Asociados en Red (2012 - 2014).
- Hidrólisis enzimática de proteínas alimentarias con endopeptidasas de origen bacteriano. Proyectos de Investigación UNR - Convocatoria 2011 (2011-2014).
- Optimización de la gelación ácida y/o enzimática de proteínas lácteas de origen bovino en presencia de ión calcio y azúcares. Influencia del valor agregado en la textura del producto final. COFECYT, MINCYT. Proyectos Federales de Innovación Productiva (PFIP 2007) - Convocatoria 2007 (2009-2012).
- Modificación enzimática de proteínas de leche bovina y ovina: propiedades estructurales funcionales y biológicas. Programa de Cooperación Científico-Tecnológico entre el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la República Argentina (MINCYT) y la Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) de la República Federativa de Brasil - Convocatoria 2008 (2009-2011)
- Caracterización de sistemas formados por proteínas lácteas y polisacáridos: propiedades fisicoquímicas, reológicas y estructurales. Proyectos de Investigación UNR - Convocatoria 2007 (2007-2010).

**Parte de los resultados presentados en esta tesis fueron publicados en:**

**Capítulos de Libros**

1. María Eugenia Hidalgo, Bibiana D. Riquelme, Estela M. Alvarez, Jorge R. Wagner, Patricia H. Risso. *“Acid-Induced Aggregation and Gelation of Bovine Sodium Caseinate-Carboxymethylcellulose Mixtures”*. Capítulo 6 del Libro: Food Industrial Processes - Methods and Equipment, pp. 75-88, 2012. Ed.: Benjamin Valdez. InTech Publisher, Rijeka, Croatia. ISBN 978-953-307-905-9.
2. María Eugenia Hidalgo, Manuel A. Mancilla Canales, Cássia R. Nespolo, Anselmo D. Reggiardo, Estela M. Alvarez, Jorge R. Wagner and Patricia H. Risso. *“Comparative study of bovine and ovine caseinate aggregation processes: Calcium-induced aggregation and acid aggregation”*. Capítulo 9 del Libro: Protein Aggregation, Series: Protein Science and Engineering Microbiology Research Advances, pp. 199-222, 2011. Ed. Douglas A. Stein. Nova Publishers, Hauppauge, New York, USA. ISBN: 978-1-61761-815-4.

**Artículos publicados en Revistas Nacionales y Extranjeras con referato**

1. Daniel Joner Daroit, Ana Paula Folmer Corrêa, Manuel Mancilla Canales, Julise Gonzalez Coelho, María Eugenia Hidalgo, Deise Michele Tichota, Patricia Hilda Risso, Adriano Brandelli. *Physicochemical properties and biological activities of ovine caseinate hydrolysates*. Dairy Science and Technology (Print ISSN: 1958-5586; Electronic ISSN: 1958-5594) (2012).
2. Hidalgo, M.E.; Daroit, D.J.; Correa, A.P.F.; Pieniz, S.; Brandelli, A.; Risso, P.H. *“Physicochemical and Antioxidant Properties of Bovine Caseinate Hydrolysates Obtained through Microbial Protease Treatment”*. International Journal of Dairy Technology (Print ISSN: 1364-727X; Online ISSN: 1471-0307) (2011).
3. Manuel Mancilla Canales, María Eugenia Hidalgo, Patricia Risso, Estela Alvarez. *“Colloidal stability of bovine calcium caseinate suspensions. Effect of protein concentration and presence of sucrose and lactose”*. Journal of



Chemical and Engineering Data, ACS Publishers (ISSN: 0021-9568) 55, 2550-2557 (2010).

4. María Eugenia Hidalgo, Miryam S. Pires, Patricia H. Risso “*A study on bovine kappa-casein aggregation after the enzymatic action of chymosin*”. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Elsevier (ISSN: 0927-7765) 76, (2), 556-563 (2010).

5. Hidalgo, María Eugenia; Nespolo, Cássia y Risso, Patricia. “*Study of the sodium caseinate agregation induced for glucono-delta-lactone*”. Revista Online e-universitas, UNR Journal (ISSN: 1852-0707), 2, 355-356, (2009).

6. P. H. Risso, M. Borraccetti, C. Araujo, M. E. Hidalgo and C. A. Gatti. “*Effect of temperature and pH on the aggregation and the surface hydrophobicity of bovine  $\kappa$ -casein*”. Colloid Polymer Science, Springer-Verlag (ISSN: 0303-402X) 286, (12), 1369-1378 (2008).

### **Artículos Inéditos**

1. María Eugenia Hidalgo, Manuel Fontana, Mirta Armendariz, Jorge R. Wagner, Patricia Risso. “*Sodium Caseinate-Guar Gum Mixtures: Acid-Induced Aggregation and Gelation*”.

En proceso de redacción

2. Cássia R. Nespolo, María E. Hidalgo, Jorge R. Wagner, Adriano Brandelli, Patricia H. Risso. “*Acid Aggregation and Gelation of Ovine Caseinate. Effect of Sucrose and Lactose*”.

En proceso de redacción

3. Ingrassia, Romina; Costa, Juan P.; Hidalgo, María E.; Mancilla Canales, Manuel; Castellini, Horacio; Riquelme, Bibiana; Risso, Patricia. “*Evaluation of protein acid gels microstructure by textural analysis of digital images*”.

Enviado a LWT - Food Science and Technology, Junio de 2012.

**Trabajos Completos (Proceedings) presentados en Reuniones Científicas  
Publicados en Actas de Reuniones Científicas Internacionales:**

1. Corrêa, A. P.; Hidalgo, M. E.; Mancilla Canales, M.; Risso, P. y Brandelli, A. *“Hidrolizados de caseinato bovino bioactivos obtenidos por acción de una enzima extracelular producida por Bacillus sp. P7”*. VI Jornadas Internacionales de Proteínas y Coloides Alimentarios (JIPCA VI), Buenos Aires, 2011.
2. María Eugenia Hidalgo, Patricia Risso, Jorge R. Wagner. *“Sodium caseinate-carboxymethylcellulose interaction in solution. Effect on acid aggregation and gelation”*. Actas International Conference on Food Innovation “Food Innova 2010”. International Society of Food Engineering. Valencia, España, 2010.
3. María Eugenia Hidalgo y Patricia H. Risso. *“Factores que influyen sobre la gelación enzimática de la kappa-caseína bovina. Optimización del proceso base de la manufactura de quesos y yogures”*. XVI Jornadas de Jóvenes Investigadores. Asociación de Universidades Grupo Montevideo (AUGM). Montevideo, Uruguay, 2008.

**Publicados en Actas de Reuniones Científicas Nacionales:**

1. Manuel Fontana; María Eugenia Hidalgo, Bibiana Riquelme, Mirta Armendariz y Patricia Risso. *“Evaluación de la gelación ácida de mezclas de caseinato de sodio y goma guar”*. I Congreso Argentino de Biorreología y V Jornada Dr. Rodolfo J. Rasia de Física aplicada a la Biomedicina (I CAB 2012), Rosario, 2012.
2. Hidalgo, María E.; Daroit, Daniel J.; Corrêa, Ana P.; Brandelli, Adriano; Risso, Patricia H. *“Efecto de la hidrólisis enzimática sobre las propiedades reológicas y la microestructura de geles ácidos de caseinato de sodio bovino (NaCAS)”*. XIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (XIII CYTAL), Buenos Aires, 2011.
3. Marrone, Julieta; Hidalgo, María E.; Risso, Patricia H. *“Estudio de la agregación ácida de aislados proteicos de lactosuero bovino en presencia de*

*carboximetilcelulosa*". XIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (XIII CYTAL), Buenos Aires, 2011.

4. María E. Hidalgo, Cássia Nespolo, Jorge Wagner, Adriano Brandelli, Patricia Risso. "*Estudio comparativo de la gelación ácida del caseinato de sodio de origen bovino y ovino*". Actas XVI Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica Asociación Argentina de Investigación Fisicoquímica. ISBN 978-987-633-025-1, C27. Salta, 2009. **Premio a los mejores trabajos presentados por jóvenes investigadores, Mención Especial.**
5. María Eugenia Hidalgo, Cássia R. Nespolo y Patricia H. Risso. "*Estudio de la agregación del caseinato de sodio inducida por la glucono- $\delta$ -lactona*". Actas XXVII Congreso Argentino de Química Asociación Química Argentina, Tucumán, 2008.

#### **Comunicaciones presentadas en Reuniones Científicas**

##### **Publicadas en Actas de Reuniones Científicas Internacionales:**

1. María Eugenia Hidalgo, Mirta Armendariz, Bibiana Riquelme, Jorge R. Wagner, Patricia Risso. "*Evaluación de la formación de geles ácidos de caseinato de sodio bovino y goma guar mediante ensayos reológicos*". IV Congreso Internacional Ciencia y Tecnología de los Alimentos (IV CICYTAC 2012). Córdoba, 2012.
2. Manuel Fontana, Patricia Risso, María Eugenia Hidalgo. "*Análisis fisicoquímico y funcional de mezclas de caseinato bovino y goma guar*". XXXIV Reunión Anual del Capítulo Argentino de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición. (XXXIV CASLAN), III Jornadas Internacionales de Actualización en Nutrición y Tecnología de Alimentos. Rosario, 2011.
3. María Eugenia Hidalgo, Patricia Risso, Ana Paula Folmer Correa, Daniel Joner Daroit, Adriano Brandelli. "*Enzymic modification of bovine sodium caseinate to obtain functional hydrolysates*". Actas XXII CBCTA. Salvador, Bahía, Brasil, 2010.

4. Voltaire Sant'Anna, Adriano Brandelli, Daniel Joner Daroit, María Eugenia Hidalgo, Patricia Risso. "*Acid aggregation of whey protein isolates in the presence of enzymic hydrolysates*". Actas XXII CBCTA. Salvador, Bahía, Brasil, 2010.
5. María Eugenia Hidalgo, Patricia Risso. "*Relación entre la estructura de la kappa-caseína bovina y su gelificación mediada por hidrólisis enzimática*" Actas 2° CINTA. Mendoza, 2010.
6. Hidalgo, M. E.; Ercoli, M. F.; Lipicar, V.; Wagner, J. R.; Risso P. H. "*Efecto de disacáridos y del glicerol sobre el proceso de disociación-agregación del caseinato de sodio bovino (CAS) durante su acidificación*". Actas III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (III CICyTAC 2009). Córdoba, 2009.

#### **Publicadas en Actas de Reuniones Científicas Nacionales:**

1. Hidalgo, María Eugenia; Armendariz, Mirta; Risso, Patricia. "*Mezclas caseinato de sodio/goma xantana: Evaluación fisicoquímica y del proceso de agregación ácida*". XIV Congreso y XXXII Reunión Anual 2012 Sociedad de Biología de Rosario. Casilda, 2012.
2. Hidalgo, María E.; Corrêa, Ana P. F.; Mancilla Canales, Manuel; Daroit, Daniel J.; Brandelli, Adriano y Risso, Patricia H. "*Estudio comparativo de las capacidades antioxidante y de agregación de hidrolizados de caseinatos de origen bovino y ovino*". II Simposio Argentino de Lactología (II SAL). Santa Fe, Agosto 2012.
3. Ingrassia, Romina; Costa, Juan P.; Hidalgo, María E.; Mancilla Canales, Manuel; Castellini, Horacio; Riquelme, Bibiana. "*Evaluación de la microestructura de geles proteicos por análisis textural de imágenes digitales*". XIII Congreso y XXXI Reunión Anual 2011 Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, 2011. **Premio "Sociedad de Biología de Rosario" al mejor trabajo de investigación en el Área Agropecuaria.**

4. Hidalgo, María Eugenia; Nespolo, Cássia; Armendariz, Mirta; Risso, Patricia. *“Análisis del efecto de distintas variables sobre la agregación ácida de caseinato bovino y ovino”*. XIII Congreso y XXXI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, 2011.
5. Cássia Nespolo, María E. Hidalgo, Florencia Ercoli, Vanesa Lipicar, Estela Alvarez, Patricia Risso. *“Efecto de la lactosa y la sacarosa sobre el proceso de gelación ácida del caseinato: influencia de la especie de origen”*. Actas XVI Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica. Salta, 2009.

### **Cursos de Perfeccionamiento Científico (Cursos de Postgrado) realizados durante el Doctorado**

1. “Bioinformática”, Rosario (2009). Aprobado: 10 (Diez). Escuela de Graduados, FCBF, UNR. 30 horas.
2. “Tópicos de Biofisicoquímica”, Rosario (2009). Aprobado: 10 (Diez). Escuela de Graduados, FCBF, UNR. 60 horas.
3. “Relación estructura-función de proteínas”, Rosario (2009). Aprobado: 10 (Diez). Escuela de Graduados, FCBF, UNR. 60 horas.
4. “Fisicoquímica de los Alimentos”, Rosario (2008). Aprobado: 10 (Diez). Escuela de Graduados, FCBF, UNR. 60 horas.
5. “Espectroscopia de Biomoléculas”, Rosario (2008). Aprobado: 10 (Diez). Escuela de Graduados, FCBF, UNR. 75 horas.
6. “Funcionalidad y utilización de Proteínas en Alimentos”, Capital Federal, Ciudad Universitaria Pabellón II (2008). Aprobado: 6 (Seis). Departamento Industrias - Fac. Cs. Exactas y Naturales (FCEN) - Universidad Nacional de Buenos Aires (UBA). 50 horas.
7. “Epistemología”, Rosario (2008). Aprobado: 10 (Diez). Escuela de Graduados, FCBF, UNR. 30 horas.
8. “Óptica aplicada a la Biología”, Rosario (2008). Aprobado: 10 (Diez). Escuela de Graduados, FCBF, UNR. 60 horas.

**Totalidad de horas cursadas y aprobadas: 425 horas**

**Totalidad de horas obligatorias para el Doctorado: 300 horas**

*“En el fondo, los científicos somos gente con suerte: podemos jugar a lo que queramos durante toda la vida”.*

Lee Smolin (Físico teórico y cosmólogo)

A mi familia  
A mis amigos  
A Dani, mi amor

## Agradecimientos

Culminando esta etapa de mi vida y habiendo recorrido 4 largos años, llega un momento de reflexión donde te das cuenta que no sólo has crecido desde el punto de vista profesional y laboral sino también como ser humano, como persona. Este crecimiento es propio y profundo pero soy consciente que no lo logré sola, sino gracias a muchas personas que se cruzaron en mi vida durante este maravilloso camino recorrido. Es por eso, que llegó el momento de los agradecimientos a toda esa gente que, de una manera u otra, colaboró para que hoy sea lo que soy...

✓ En primer lugar quiero agradecerle profundamente a la Dra. Patricia Risso, mi directora, mi "mamá profesional" (como le digo yo) por haber confiado en mí desde el primer momento, no solo desde lo laboral sino también en lo personal. Tantas horas de trabajo compartido hacen que las personas se conozcan más allá de lo profesional y yo en vos encontré a un ser maravilloso, único... Patri sos y serás mi ejemplo de honestidad, lucha, esfuerzo, voluntad y trabajo. No sólo me formaste académicamente sino también desde lo humano, transmitiéndome valores y principios que estarán conmigo para siempre. No tengo palabras hacia vos... simplemente GRACIAS.

✓ Por su enorme generosidad, GRACIAS al Dr. Jorge Wagner... por tantas horas de trabajo dedicadas a mi, cada vez que viajé a Quilmes; gracias por transmitirme cada uno de tus conocimientos y por tu calidez humana. Al igual que Patri, agradezco tu confianza y el haberte conocido, más allá de lo profesional.

✓ Hay una persona muy especial a la que también le quiero agradecer... la Dra. Estela Alvarez... GRACIAS Estelita por ser como sos!!! Gracias por transmitirme toda tu experiencia y sabiduría, sos gran artífice de la persona que soy hoy... Gracias por tu aliento y ganas incansables... Gracias por tus consejos, siempre acertados. Gracias por tus pizzas, inigualables y por tantas "caipirinhas" compartidas. Te quiero mucho.

✓ Quiero agradecer a todos y cada uno de los docentes y compañeros (tesistas, tesinistas y pasantes) del Área Fisicoquímica... por hacer que cada día de trabajo sea placentero y un disfrute.

✓ Un GRACIAS enorme a Ana, Vale, Lu y Chechi... gracias amigas por recorrer este camino junto a mi... por tantas horas de estudio y mates compartidos (Chechi sabes a lo que me refiero, gracias por tu amistad, tu aguante y tantas horas de charlas inolvidables), cursos, cumpleaños, nacimientos y alegrías. Todas ocupan un lugar más que especial en mi corazón y las quiero con el alma.

✓ GRACIAS a todos y cada uno de los integrantes del PROFEP: Romi, Seba, Ani, Manuel, Milly, Mechi, Juli... la verdad que trabajar con amigos hace que todo sea más fácil... Los quiero muchísimo.

✓ GRACIAS a mis amigas de la facu, por el apoyo incansable, los consejos, por el estar incondicional y por mis 2 hermosas sobrinas que me llenan el alma de felicidad... Ustedes también son parte de lo que hoy soy... Lulu, Cori y Milly las amo.

✓ Quiero agradecerle especialmente a la Dra. Bibiana Riquelme y a Mirta Armendariz, por su gran generosidad siempre que necesite de su ayuda. Parte del trabajo de esta Tesis se lo debo a ustedes dos... muchas GRACIAS.

- ✓ Muchísimas GRACIAS a Luis Martínez y Valeria Fernández (UNQ)... sin ustedes el reómetro y yo nunca hubiésemos congeniado. Gracias Luis por tu dedicación y calidez...
- ✓ GRACIAS al Dr. Adriano Brandelli y la Dra. Nadya Pesce da Silveira por abrirme las puertas de sus Laboratorios en Porto Alegre, Brasil y permitirme ser uno más del grupo de trabajo. GRACIAS Ana Paula, Daniel, Voltaire y Carol por la buena energía...
- ✓ GRACIAS Cássia... por tantos momentos compartidos y por haber sido mi "hermana mayor" durante mi estadía en Brasil... Te quiero muchísimo.
- ✓ GRACIAS a mis amigos de toda la vida, Flor y Bruno, por ser parte de mí y estar siempre conmigo a pesar de las distancias. Gracias por acompañarme en los momentos dolorosos y en los alegres de manera incondicional y por demostrarme que nuestra amistad forma parte esencial de mi vida...los adoro.
- ✓ Por último quiero agradecerle a mi familia... A mis viejos, Mónica y Alberto, por ser ejemplo y por educarme con tanto amor, dedicación y comprensión. Gracias por estar siempre junto a mí y permitir que todo sea más fácil... los amo con todo mi corazón. A mi hermana, Luli, por ser esa persona única e irremplazable, gracias por tantos consejos y momentos compartidos y por ser mi complemento perfecto a pesar de que seamos tan distintas...te adoro con toda el alma. Y a mis abuelos: Nana, Nono, Tata y Mary.
- ✓ A Dani, mi amor, mi compañero, el hombre de mi vida... GRACIAS por tu infinita paciencia y eterna comprensión, por ser parte fundamental de mi vida, por tu dulzura y por tu alegría de todos los días. Gracias por creer en mí y en todo lo que emprendo. GRACIAS por compartir tu vida conmigo...Te amo con todo mi corazón.



# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS</b>	<b>VI</b>
<b>LENGUAJE ESPECIAL</b>	<b>VIII</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>IX</b>
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN</b>	
1.1. Importancia del tema en estudio	1
1.2. Antecedentes del tema	2
1.3. La leche	4
1.3.1. Estructura y funcionalidad de las proteínas de la leche	5
1.3.1.1. Las caseínas (CN)	5
1.3.1.2. Los caseinatos (CAS): características generales y propiedades funcionales	7
1.4. Agregación de las partículas de CN Y CAS	8
1.4.1. Agregación y/o gelación de las partículas de NaCAS por acidificación	9
1.4.2. Agregación y/o gelación de las partículas de NaCAS por acidificación en presencia de pequeños cosolutos (sacarosa, lactosa, glicerol e iones calcio)	10
1.5. Polisacáridos evaluados	11
1.5.1. Carboximetilcelulosa (CMC)	12
1.5.2. Goma Guar (GG)	13
1.5.3. Goma Xantana (GX)	14
1.6. Incompatibilidad termodinámica entre los biopolímeros	15
1.7. Técnicas de uso frecuente para el estudio de sistemas modelo formados por biopolímeros	16
1.7.1. Hidrofobicidad superficial. Uso de sondas fluorescentes para su determinación	16
1.7.2. Distribución de tamaño de partículas	18
1.7.3. Reología	18
1.7.4. Microscopia y análisis digital de imágenes	19
1.7.4.1. Procesamiento digital de imágenes	19
1.7.5. Superficie de respuesta. Métodos y diseños experimentales	20
1.7.5.1. Superficies de respuesta polinómicas. Modelos de primer y segundo orden	21
1.7.5.2. Diseños de superficies de respuesta	23
1.8. Obtención de péptidos bioactivos a partir de la hidrólisis enzimática del NaCAS. Utilización de proteasas neutras. Incorporación de valor agregado a productos lácteos	26
<b>OBJETIVOS</b>	<b>28</b>
<b>CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
2.1. MATERIALES Y PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	29
2.1.1. Soluciones de NaCAS	29
2.1.2. Soluciones de ANS	29
2.1.3. Soluciones de polisacáridos	29
2.1.4. <i>Buffers</i> o soluciones reguladoras	29
2.1.5. Muestras, soluciones y geles para electroforesis	30
2.1.6. Reactivos químicos utilizados	31

2.2. EQUIPOS UTILIZADOS	31
2.2.1. Medidas espectroscópicas	31
2.2.2. Medidas potenciométricas	32
2.2.3. Medidas reológicas	33
2.2.4. Microscopía óptica convencional	33
2.2.5. Equipos de apoyo	33
2.3. MÉTODOS	34
2.3.1. Determinación de la concentración de CN utilizando el método de Kuaye	34
2.3.2. Determinación de la viscosidad del medio ( $\eta$ )	34
2.3.3. Estudios espectrofluorimétricos	36
2.3.3.1. Evaluación de los cambios estructurales del NaCAS en ausencia y presencia de cosolutos, polisacáridos e hidrolizados	36
2.3.3.2. Determinación de la hidrofobicidad superficial ( $S_0$ )	37
2.3.4. Ensayo de solubilidad del NaCAS en ausencia y presencia de polisacáridos	37
2.3.5. Estudio de la estabilidad térmica del NaCAS en ausencia y presencia de polisacáridos	38
2.3.6. Curva de incompatibilidad termodinámica: diagrama de fases	38
2.3.7. Estado de las partículas de NaCAS en ausencia y presencia de pequeños cosolutos (Sac, Lac, Gli, $Ca^{2+}$ ), polisacáridos (CMC, GG, GX) e hidrolizados: tamaño, estructura y composición	40
2.3.7.1. Evaluación del tamaño medio de las partículas mediante turbidimetría	40
2.3.7.2. Distribución de tamaño de las partículas de NaCAS	43
2.3.7.3. Caracterización de las muestras de NaCAS y los hidrolizados proteicos mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)	48
2.3.8. Estudio de la agregación de las partículas de NaCAS por acidificación inducida por GDL. Efecto de la presencia de pequeños cosolutos, polisacáridos e hidrolizados	49
2.3.8.1. Determinación de la dimensión fractal ( $D_f$ ) de los agregados de NaCAS	50
2.3.8.2. Diseño experimental	50
2.3.9. Estudio de las propiedades reológicas de geles ácidos de NaCAS. Efecto de la presencia de pequeños cosolutos, polisacáridos e hidrolizados proteicos	51
2.3.10. Microscopía óptica convencional (OCM)	52
2.3.11. Obtención de las enzimas proteolíticas P45 y P7	53
2.3.11.1. Método de la azocaseína	54
2.3.12. Obtención de los hidrolizados proteicos de NaCAS. Determinación del grado de hidrólisis alcanzado	54
2.3.13. Evaluación de la bioactividad <i>in vitro</i> de los péptidos obtenidos	55
2.3.13.1. Actividad antioxidante	55
2.3.13.1.1. Método TBARS	55
2.3.13.1.2. Método de captura del radical ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolona-6-ácido sulfónico) o ABTS	57
2.3.13.1.3. Método de actividad secuestradora de radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH <sup>*</sup> )	57
2.3.13.2. Actividad antibacteriana	58
2.3.13.3. Actividad quelante del hierro ( $Fe^{2+}$ )	59
2.3.13.4. Poder reductor	59
2.3.14. Análisis estadístico	60

<b>CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN: Parte I</b>	
<b>FORMACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AGREGADOS Y GELES ÁCIDOS DE NaCAS: PROPIEDADES ESTRUCTURALES, FUNCIONALES Y REOLÓGICAS</b>	
3.1. Estudio de los cambios estructurales del NaCAS por espectrofluorimetría	61
3.2. Caracterización de las muestras de NaCAS mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)	62
3.3. Estudio de la agregación de las partículas de NaCAS por acidificación inducida por GDL	63
3.4. Evaluación de los parámetros reológicos durante la gelación ácida del NaCAS	69
3.5. Efecto de la velocidad de gelación sobre la microestructura de los geles de NaCAS	71
<b>FORMACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AGREGADOS Y GELES ÁCIDOS DE NaCAS EN PRESENCIA DE PEQUEÑOS COSOLUTOS: SACAROSA, LACTOSA, GLICEROL Y CALCIO</b>	
3.6. Efecto de la presencia de Sac, Lac o Gli sobre la agregación ácida del NaCAS	73
3.6.1. Evaluación del tamaño medio de las partículas por turbidimetría	73
3.6.2. Cambios estructurales del NaCAS en ausencia y presencia de los cosolutos Sac, Lac y Gli	76
3.6.3. Efecto de los cosolutos sobre la $S_0$ del NaCAS	77
3.6.4. Efecto de la presencia de Sac y Lac sobre las propiedades reológicas de los geles ácidos de NaCAS	77
3.6.5. Efecto de la presencia de $Ca^{2+}$ sobre la agregación ácida de las partículas de NaCAS	79
3.6.5.1. Evaluación del tamaño medio de las partículas por turbidimetría	79
3.6.6. Cambios estructurales del NaCAS en ausencia y presencia de $Ca^{2+}$	81
3.6.7. Estudio de las propiedades reológicas de los geles ácidos de NaCAS en presencia de $Ca^{2+}$	81
<b>CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN: Parte II</b>	
<b>FORMACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GELES ÁCIDOS DE NaCAS Y POLISACÁRIDOS: PROPIEDADES ESTRUCTURALES, FUNCIONALES Y REOLÓGICAS</b>	
4.1. Efecto de la presencia de carboximetilcelulosa (CMC)	84
4.1.1. Ensayo de solubilidad del NaCAS en ausencia y presencia de CMC	84
4.1.2. Evaluación de la estabilidad térmica del NaCAS en ausencia y presencia de CMC	85
4.1.3. Estudio de la compatibilidad termodinámica NaCAS/CMC	85
4.1.4. Estudio de los cambios estructurales del NaCAS en presencia de CMC	86
4.1.5. Estudio de la agregación ácida de las partículas de NaCAS mediante técnicas turbidimétricas. Efecto de la presencia de CMC	88
4.1.6. Estudio de las propiedades reológicas de geles ácidos de NaCAS en presencia de CMC	90
4.1.7. Análisis de la microestructura de los geles en presencia de CMC	91
4.2. Efecto de la presencia de goma guar (GG)	93
4.2.1. Ensayo de solubilidad del NaCAS en ausencia y presencia de GG	93
4.2.2. Evaluación de la estabilidad térmica del NaCAS en ausencia y	93

presencia de GG	
4.2.3. Estudio de la compatibilidad termodinámica NaCAS/GG	94
4.2.4. Estudio de los cambios estructurales del NaCAS en presencia de GG	95
4.2.5. Estudio de la agregación ácida de las partículas de NaCAS mediante técnicas turbidimétricas. Efecto de la presencia de GG	97
4.2.6. Estudio de las propiedades reológicas de geles ácidos de NaCAS en presencia de GG	103
4.2.7. Análisis de la microestructura de los geles en presencia de GG	119
4.3. Efecto de la presencia de goma xantana (GX)	121
4.3.1. Ensayo de solubilidad del NaCAS en ausencia y presencia de GX	121
4.3.2. Evaluación de la estabilidad térmica del NaCAS en ausencia y presencia de GX	122
4.3.3. Estudio de la compatibilidad termodinámica de las mezclas NaCAS/GX	122
4.3.4. Estudio de los cambios estructurales del NaCAS en presencia de GX	123
4.3.5. Efecto de la GX sobre la viscosidad del medio ( $\eta$ )	125
4.3.6. Estudio de la agregación ácida de las partículas de NaCAS mediante técnicas turbidimétricas. Efecto de la presencia de GX	125
4.3.7. Estudio de las propiedades reológicas de geles ácidos de NaCAS en presencia de GX	130
4.3.8. Análisis de la microestructura de los geles en presencia de GX	131
<b>CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN: Parte III</b>	
<b>FORMACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AGREGADOS Y GELES ÁCIDOS DE NaCAS Y SUS HIDROLIZADOS: PROPIEDADES ESTRUCTURALES, FUNCIONALES Y REOLÓGICAS</b>	
5.1. Caracterización fisicoquímica de la enzima proteolítica P45	133
5.2. Obtención de los hidrolizados proteicos de NaCAS. Determinación del grado de hidrólisis alcanzado y los péptidos resultantes	134
5.3. Estudio conformacional de los hidrolizados a través de espectrofluorimetría	135
5.4. Evaluación de la bioactividad <i>in vitro</i> de los péptidos obtenidos	136
5.4.1. Actividad antioxidante	136
5.4.2. Actividad antibacteriana	138
5.5. Evaluación del proceso de agregación ácida de los hidrolizados de NaCAS obtenidos con la enzima P45	139
5.6. Efecto de la adición de los hidrolizados sobre la agregación ácida del NaCAS	140
5.7. Estudio de las propiedades reológicas de geles ácidos de los hidrolizados y su mezcla con NaCAS	141
5.8. Análisis de la microestructura de los geles ácidos de hidrolizados y de la mezcla NaCAS:hidrolizado $t_1$	142
5.9. Caracterización fisicoquímica de la enzima proteolítica P7	144
5.10. Obtención de los hidrolizados proteicos de NaCAS. Determinación del grado de hidrólisis alcanzado y los péptidos resultantes	144
5.11. Estudio conformacional de los hidrolizados a través de espectrofluorimetría	145
5.12. Evaluación de la bioactividad <i>in vitro</i> de los péptidos obtenidos	146
5.12.1. Actividad antibacteriana	146
5.12.2. Actividad antioxidante, quelante de hierro (Fe) y poder reductor	147
5.13. Evaluación del proceso de agregación ácida de los hidrolizados de NaCAS obtenidos con la enzima P7	148
5.14. Efecto de la adición de los hidrolizados obtenidos sobre la agregación ácida del NaCAS	149
5.15. Estudio de las propiedades reológicas de geles ácidos de NaCAS. Efecto	150

de la presencia de los hidrolizados obtenidos por acción de la proteasa P7	
5.16. Análisis de la microestructura de los geles en presencia de los péptidos biactivos	151
<b>CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES</b>	
	153
6.1. Evaluación de la formación de agregados y/o geles de NaCAS por acidificación inducida por GDL	153
6.2. Estudio de los cambios conformacionales del NaCAS en solución frente a la presencia de pequeños cosolutos: iones calcio, sacarosa, lactosa, glicerol. Efecto sobre la formación de agregados y/o geles ácidos	154
6.3. Estudio de la interacción entre el NaCAS y polisacáridos (CMC, GG y GX). Efecto de los mismos sobre la agregación y/o gelación ácidas	155
6.4. Evaluación del efecto de la hidrólisis enzimática sobre los procesos de agregación y gelación ácidas del NaCAS	158
<b>CAPÍTULO 7: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	
	160

## Abreviaturas y Símbolos

A	Absorbancia
$A_{650\text{nm}}$	Absorbancia medida a 650nm
ANS	8-anilino-1-naftalénsulfonato
$\text{Ca}^{2+}$	Calcio
CAS	Caseinato
$C_{\text{CMC}}$	Concentración de carboximetilcelulosa
$C_{\text{cosolutos}}$	Concentración de cosolutos
$C_{\text{GG}}$	Concentración de goma guar
$C_{\text{GX}}$	Concentración de goma xantana
$C_{\text{Lac}}$	Concentración de lactosa
CLSM	Microscopía confocal láser
CMC	Carboximetilcelulosa
CN	Caseínas
$C_{\text{NaCAS}}$	Concentración de caseinato de sodio
Coef	Coeficiente
$C_{\text{polisacáridos}}$	Concentración de polisacáridos
$C_{\text{Sac}}$	Concentración de sacarosa
D	Duplicado
$D_f$	Dimensión fractal
DLS	Dispersión dinámica de la luz
$G'$	Módulo de elasticidad o elástico
$G''$	Módulo de almacenamiento o viscoso
$G'_{\text{máx}}$	Máximo valor de módulo elástico alcanzado
GDL	Glucono-delta-lactona
GG	Goma guar
GH	Grado de hidrólisis
Gli	Glicerol
GX	Goma xantana
hs	Horas
IF	Intensidad relativa de la fluorescencia
Lac	Lactosa
LALLS	Difracción láser
min	Minutos
NaCAS	Caseinato de sodio
O	Original

OCM	Microscopía óptica convencional
$\rho$	Coeficiente de Pearson
$\text{pH}_{\text{ag}}$	pH en que comienza la agregación
$\text{pH}_{\text{gel}}$	pH en que comienza la gelación
pI	Punto isoeléctrico
p- $\kappa$ -CN	Para-kappa-caseína
R	Relación proteína/GDL
RSM	Metodología de superficie de respuesta
s	Segundos
$S_0$	Hidrofobicidad superficial
Sac	Sacarosa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
T	Temperatura
t	Tiempo
$t_{\text{ag}}$	Tiempo en que comienza la agregación
$t_{\text{gel}}$	Tiempo en que comienza la gelación
UV	Espectro ultravioleta
V	Espectro visible
WP	Proteínas de suero lácteo
$\Delta H$	Variación de Entalpía
$\beta$	Parámetro beta
$\beta\text{ME}$	$\beta$ -mercaptoetanol
$\epsilon$	Coeficiente de absortividad molar
$\eta$	Viscosidad
$\eta_r$	Viscosidad relativa
$\lambda$	Longitud de onda
$\lambda_{\text{em}}$	Longitud de onda de emisión
$\lambda_{\text{exc}}$	Longitud de onda de excitación
$\tau$	Turbidez

## Lenguaje Especial

<i>Buffer</i>	Solución reguladora o tampón
<i>Oscillation stress</i>	Tensión de oscilación
<i>Píxel</i>	Elemento de imagen
<i>Pool</i>	Conjunto/ Mezcla
<i>Sample buffer</i>	Solución tampón donde se prepara la muestra para electroforesis
<i>Scattering</i>	Dispersión
<i>Screening</i>	Muestreo
<i>Software</i>	Programa



## RESUMEN

La comprensión del efecto de la composición y formas de procesamiento sobre el comportamiento micro y macroscópico de los alimentos es de gran importancia para el desarrollo de nuevos productos. Esto se puede conseguir a través del conocimiento de la estructura del alimento, de las interacciones entre sus componentes y de las fuerzas que determinan la consistencia y la estabilidad física de los productos.

En particular, los alimentos lácteos pertenecen a un importante sector de la industria alimenticia, además de abarcar gran parte de los productos dietéticos del mercado. En nuestra región, el estudio de los componentes de la leche bovina, entre ellos las proteínas, es de suma importancia por hallarnos en una cuenca lechera. Las caseínas (CN) que constituyen el 80 % de las proteínas en la leche bovina, y sus derivados, los caseinatos (CAS), son utilizados como aditivos en diversos alimentos debido a su potencialidad de gelificar, formar espumas y emulsiones y también estabilizarlas. La gelificación o gelación de las CN puede realizarse por coagulación enzimática, acidificación o modificación de la fuerza iónica del medio. Las diferentes maneras de promover la gelación afectan la velocidad del proceso de agregación y, por tanto, las propiedades físicas del gel formado, como la textura y la capacidad de retención de agua del producto.

La cinética de agregación de las proteínas y, por lo tanto, la textura final del producto, puede verse afectada por la modificación de las condiciones de procesamiento (tratamiento térmico, cizallamiento, pH), así como por la presencia de otros componentes como pequeños cosolutos o polisacáridos. Tales factores también afectan el grado de compatibilidad de las proteínas con los otros componentes del sistema. En particular, el uso de polisacáridos en alimentos es una práctica común en la industria, debido a sus propiedades funcionales como espesantes y gelificantes, pudiendo proporcionar características reológicas y de textura únicas. En una mezcla proteína/polisacárido, las situaciones más comunes son la separación de fases segregativa y asociativa que pueden llevar a la organización de los sistemas biopoliméricos en nano o micropartículas, a la formación de emulsiones agua-

agua que son utilizadas en la industria alimenticia como sustitutos de la grasa y a la producción de geles con características reológicas particulares.

La construcción de nano y micropartículas abre un amplio espectro de aplicaciones, no sólo en la industria alimenticia, sino también en la farmacéutica y cosmética, por la posibilidad de incluir principios activos en los productos elaborados.

Las proteínas de la dieta aportan los aminoácidos necesarios para el desarrollo y mantenimiento de células y tejidos de nuestro organismo. Como consecuencia de la digestión proteica, además de aminoácidos libres, se liberan péptidos. En estos últimos años existe un creciente interés por determinados fragmentos específicos de las proteínas que, además de su alto valor nutricional, posean actividad biológica que regule diferentes procesos fisiológicos. La literatura evidencia que estos péptidos bioactivos pueden atravesar el epitelio intestinal y llegar a tejidos periféricos vía circulación sistémica, pudiendo ejercer funciones específicas a nivel local, tracto gastrointestinal, y a nivel sistémico. Los péptidos bioactivos podrían alterar el metabolismo celular y actuar como vasorreguladores, factores de crecimiento, inductores hormonales y neurotransmisores.

En este sentido, la hidrólisis de proteínas lácteas ofrece grandes posibilidades. Durante la misma, las proteínas son clivadas en péptidos de diferentes tamaños y aminoácidos libres, a través de hidrólisis química o enzimática. La última, bajo condiciones suaves de pH y temperatura, puede llevar al desarrollo de componentes nutricionales bioactivos y con propiedades funcionales optimizadas. La hidrólisis tiene como objetivos mejorar la estabilidad térmica, reducir alergenicidad, producir péptidos bioactivos, modelar cantidad y tamaño de los péptidos para dietas especiales, alterar propiedades funcionales de gelificación, emulsificación y formación de espumas. Enzimas proteolíticas producidas por *Bacillus* pueden ser utilizadas para hidrolizar proteínas en sistemas alimentarios. Estas proteasas son neutras y generan menos amargor en hidrolizados de proteínas alimentarias que las proteasas ácidas, por lo tanto, son de interés para la industria de alimentos. Además, su baja termotolerancia resulta ventajosa para el control de su reactividad durante la producción de hidrolizados.

El objetivo de este trabajo de Tesis fue estudiar la formación de geles de caseinato de sodio (NaCAS) por acidificación inducida por la adición de glucono- $\delta$ -lactona (GDL) y evaluar las modificaciones que dichos geles sufren en presencia de pequeños cosolutos (sacarosa, lactosa, glicerol, ión calcio), polisacáridos (carboximetilcelulosa, goma guar y goma xantana) o hidrolizados proteicos (obtenidos por acción de las proteasas neutras P45 y P7) a través de ensayos funcionales y estructurales, variando la composición del sistema y las condiciones de proceso.

Las muestras obtenidas en los distintos tratamientos son heterogéneas (monómeros, agregados homogéneos y heterogéneos de distintos tamaños) y las mismas se caracterizaron de acuerdo a los pesos moleculares de las especies presentes mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en medio desnaturizante (SDS-PAGE), en medio no reductor y reductor, y en condiciones nativas (sin SDS ni reducción) y en algunos casos, en presencia de urea (urea-PAGE). El estudio conformacional de las muestras obtenidas con los distintos tratamientos se llevó a cabo a través del análisis de los espectros de emisión de la fluorescencia intrínseca del aminoácido triptófano (Trp), que indicarían posible pérdida de estructura nativa y/o cambios en la polaridad del entorno proteico. Además, se determinó la hidrofobicidad superficial de la proteína por fijación del ligando hidrofóbico fluorescente 1-anilino-8-naftalén sulfonato (ANS) y la variación de la misma en presencia de diferentes cosolutos, polisacáridos y/o hidrolizados.

En el caso de las mezclas NaCAS/polisacáridos se estudió la compatibilidad termodinámica. La curva binodial para cada sistema estudiado se obtuvo por un ajuste matemático exponencial decreciente. Además se realizaron curvas de solubilidad y estabilidad térmica de las mezclas.

Los agregados y/o geles (según la concentración de NaCAS) fueron obtenidos por acidificación lenta del NaCAS hasta pH próximo a su punto isoeléctrico adicionando GDL. La cinética de la agregación inicial de las partículas se evaluó por medidas turbidimétricas, interpretando los resultados según deducciones desarrolladas por nuestro grupo de trabajo. Los posibles cambios de tamaño y/o grado de compactación fueron estudiados basándose en la dependencia de la turbidez con la longitud de onda en el rango de 450-650nm, rango en donde no hay absorción de los grupos cromóforos de la

proteína. A partir de estos resultados se pudieron analizar las variaciones en la velocidad inicial del proceso de agregación y del grado de compactación de los agregados formados a la luz de la teoría de los fractales. Utilizando viscosímetros capilares y/o rotatorio se determinó la viscosidad de los distintos medios con el objetivo de analizar su efecto sobre la velocidad de difusión de las partículas durante la agregación.

Se realizaron ensayos reológicos para estudiar las propiedades mecánicas de los geles ácidos obtenidos. Estos ensayos fueron realizados bajo cizallamiento para determinar las propiedades viscoelásticas de los sistemas, a bajas deformaciones y para evaluar los sistemas durante la formación de los geles y en el equilibrio. Para ello se utilizó un reómetro de tensión controlada y se estudió la cinética de la gelación, evaluando las variaciones de los módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) con el tiempo.

La microestructura de los geles ácidos obtenidos bajo las diferentes condiciones de procesamiento se estudió a partir de ensayos de microscopía óptica convencional y el posterior análisis de las imágenes digitales obtenidas. Para cada sistema se estimó el tamaño de poro promedio obtenido.

El tamaño medio de las partículas y la distribución de tamaños se determinó en muestras representativas a fin de corroborar las determinaciones realizadas por microscopía y espectrofotometría, utilizando equipos de difracción láser adecuados para nano y micropartículas.

Se aplicaron diseños de experimentos (completos y/o fraccionados) que permitieron evaluar la significancia de los distintos factores independientes estudiados (concentración proteica, concentración de polisacáridos, temperatura, cantidad de GDL adicionada) sobre las variables dependientes o respuestas analizadas (tiempo y pH al cual comienza la agregación y/o gelación, dimensión fractal de los agregados formados y grado máximo de elasticidad alcanzado por los geles). Se obtuvieron gráficos de contorno, de superficie y ecuaciones modelo que permitieron evaluar y predecir el comportamiento de los sistemas bajo las diferentes condiciones ensayadas.

Las enzimas proteolíticas P45 y P7 fueron producidas a partir de los cultivos bacterianos de *Bacillus* sp. P45 y *Bacillus* sp. P7, aislados de peces de la cuenca Amazónica. A todas las fracciones de enzimas obtenidas se les midió su actividad proteolítica por el método de la azocaseína. Las proteasas fueron

caracterizadas fisicoquímicamente por ensayos espectrofotométricos y espectrofluorométricos. Se obtuvieron los hidrolizados proteicos, se determinó el grado de hidrólisis alcanzado en cada caso y se analizaron los pesos moleculares de los péptidos resultantes por PAGE. Se evaluó la bioactividad *in vitro* de los péptidos obtenidos a diferentes tiempos de hidrólisis. Se estudió la actividad antimicrobiana frente a diferentes microorganismos patógenos, la actividad antioxidante (mediante los métodos TBARS, ABTS y DPPH), el poder reductor y la capacidad quelante de hierro. El estado conformacional de los hidrolizados se evaluó mediante ensayos de espectrofluorimetría.

Por otro lado, se estudió la capacidad de agregación de cada hidrolizado ante la adición de GDL y el efecto que produjo la incorporación de los mismos sobre la cinética de agregación, las características reológicas de geles de NaCAS y la microestructura de los mismos.

Según los resultados obtenidos, el proceso de agregación/gelación del NaCAS presentó dos etapas bien definidas. En la primera, más lenta y, por lo tanto, la que determina la velocidad total del proceso, se detectó una disminución del tamaño medio de las partículas, debido a la existencia de un proceso de disociación de las partículas de NaCAS. En la segunda etapa, ocurre la agregación espontánea de las partículas coloidales que han perdido su estabilidad electrostática por el descenso del pH, etapa donde se reveló el aumento brusco del tamaño particular hasta que el agregado llega a su crecimiento y grado de compactación máximo caracterizado por la dimensión fractal. Se comprobó que los sitios que participan en las interacciones interparticulares se encontrarían cercanos a los grupos cromóforos del NaCAS. Este proceso resultó dependiente de la concentración proteica, la cantidad de GDL adicionada y la temperatura de trabajo, de modo tal que una variación de cualquiera de estos parámetros, llevó a una modificación principalmente de la primera etapa y, por ende de la estructura de los agregados finales. Se observó que la elasticidad de los geles formados durante la gelación proteica dependió tanto de la concentración proteica como de la cantidad de GDL adicionada. Además, los geles formados a menor velocidad de gelación (menor cantidad de GDL adicionada), muestran una mayor estructuración, presentando un aspecto más compacto y poros de menor tamaño. Esto se debe a que, si el proceso se realiza lentamente, la malla de gel puede reestructurarse por ruptura de

algunas interacciones y formación de otras nuevas, obteniéndose una malla más apretada y, por lo tanto, con poros cada vez más pequeños. Por lo tanto, el grado de compactación y el tamaño de los poros del gel dependieron de la velocidad de gelación, la cual está relacionada en forma directa con la cantidad de GDL adicionada.

La adición de sacarosa, lactosa y glicerol aumentaron la viscosidad del medio y afectaron la hidrofobicidad superficial del NaCAS dependiendo de la naturaleza y concentración de los mismos. Esta variación estaría vinculada con la exclusión preferencial de cada cosoluto de la superficie proteica. Además los cosolutos afectaron la cinética de agregación del NaCAS como también la elasticidad de los geles ácidos formados. En presencia de sacarosa los geles presentaron una malla más fina y homogénea, con un tamaño de poros promedio menor, lo que implicaría un aumento de la interconectividad de la red de gel que incrementa la rigidez o elasticidad del mismo. Por su parte, la lactosa presentó un efecto opuesto, comportamiento que estaría vinculado, por un lado con la naturaleza química del disacárido que generaría un impedimento estérico para las interacciones CN-CN, y por otro con el aumento de la viscosidad del medio, dificultando la difusión de las partículas unas a otras y, por lo tanto, disminuyendo la probabilidad de interactuar entre ellas.

La presencia del ión calcio produjo un significativo cambio en el estado inicial de las partículas de NaCAS, vinculado a la fijación del mismo a los residuos fosfoseril y/o carboxilatos de la proteína. La estabilidad electrostática de las partículas coloidales disminuyó como consecuencia de una reducción en la carga neta, favoreciendo las fuerzas intermoleculares durante el proceso de gelación. El grado de compactación de los agregados y la elasticidad de los geles formados dependieron de la concentración de calcio empleada. Esta diferencia en la elasticidad final de los geles ácidos formados en presencia de distintas concentraciones de calcio puede ser atribuida a cambios conformacionales de las partículas coloidales y a modificaciones cinéticas durante el proceso de gelación.

La adición de polisacáridos al NaCAS generó cambios en la solubilidad de los sistemas, en la conformación proteica y en las propiedades funcionales dependiendo del tipo y concentración del polisacárido.

La carboximetilcelulosa (CMC) provocó un efecto estabilizante sobre el NaCAS en solución, debido a la adsorción de la misma en la superficie proteica, incrementando así la carga neta negativa. La cinética de agregación del NaCAS en presencia de CMC también se vio afectada. Se observó un aumento del tiempo en que se forman los agregados y una disminución del pH al cual comienza la agregación a medida que aumenta la proporción de CMC en la mezcla. Esto afectó la dimensión fractal de los agregados formados, disminuyendo el grado de compactación de los mismos a medida que aumentó la cantidad de polisacárido adicionada. Por otra parte, las características reológicas de los geles dependieron de la composición relativa de las mezclas NaCAS:CMC; se pueden obtener geles de diferente textura variando la relación proteína:polisacárido, debido a que se parte de un estado inicial diferente con formación de micropartículas inducido por la presencia del polisacárido. Además, los geles de mezclas NaCAS:CMC se formaron a muy bajos valores de pH lo cual podría aprovecharse para su utilización como vehículo de principios activos que se deseen incorporar por vía digestiva.

La adición de goma guar (GG) a soluciones acuosas de NaCAS produjo un cambio conformacional con exposición al medio de los fluoróforos intrínsecos proteicos. Las mezclas NaCAS:GG no mostraron cambios significativos en la estabilidad térmica pero se observó incompatibilidad termodinámica a concentraciones de NaCAS mayores a 3% y/o de GG mayores a 0,2%. El tamaño medio inicial de las partículas de las diferentes mezclas fue mayor a medida que aumentó la proporción de GG, lo que indicaría una formación inicial de micropartículas. Se comprobó que el tiempo al que comienza la agregación dependió de la cantidad de GDL adicionada y de la temperatura, siendo el efecto de la primera variable mucho más significativo. El valor de pH que hay que alcanzar para desestabilizar al NaCAS varió según la temperatura y la concentración de GG; vinculándose esta última dependencia al grado de compatibilidad termodinámica entre el polisacárido y la proteína. El grado de compactación de los agregados, estimado a través de la dimensión fractal, resultó independiente de todos los factores evaluados. A partir de los ensayos reológicos se comprobó que la elasticidad final de los geles obtenidos dependió de todas las variables ensayadas. La microestructura de los geles resultó afectada por la temperatura y por la cantidad de GDL adicionada. Este

resultado tiene estrecha relación con la velocidad de formación de la malla de gel. Por lo expuesto, la GG podría utilizarse para la obtención de micropartículas de NaCAS como posible vehículo de principios activos, con diferentes texturas de acuerdo a la concentración relativa de los biopolímeros y a las condiciones del proceso.

La adición de goma xantana (GX) a las soluciones de NaCAS, originó incompatibilidad termodinámica en todo el rango de concentraciones de la proteína y el polisacárido. La GX es un polisacárido aniónico y el NaCAS tiene, al pH isoiónico carga neta negativa, por lo tanto, la repulsión electrostática generada por cargas de igual signo conduciría a la separación de fases. También se observó desestabilización térmica de las mezclas NaCAS:GX, la cual se incrementó con el aumento de proporción de GX. Estos resultados indican que el aumento de temperatura induciría la separación de fases en presencia de GX. Por otra parte, la presencia del polisacárido produjo cambios conformacionales del NaCAS vinculados a una modificación del entorno de los fluoróforos intrínsecos proteicos hacia un medio más polar a medida que aumenta la proporción de GX.

Se comprobó que la cinética de agregación ácida del NaCAS en presencia de GX dependió de la cantidad de GDL adicionada y de la temperatura, siendo ambos factores igualmente significativos, aunque resultó independiente de la concentración de GX empleada. La dimensión fractal de los agregados formados dependió levemente tanto de la temperatura como de la concentración del polisacárido. Sin embargo, al evaluar las propiedades reológicas y la microestructura de los geles obtenidos en presencia y ausencia de GX, se observó que un aumento de la concentración del polisacárido conduce a geles más elásticos y compactos.

El grado de hidrólisis proteica con la enzima P45 aumentó hasta las dos horas de incubación, alcanzándose péptidos con pesos moleculares menores a 6,5 kD. La hidrofobicidad superficial de los mismos disminuyó a medida que aumentó el tiempo de hidrólisis. La actividad antioxidante de estos péptidos se evaluó por los métodos DPPH y TBARS. Se observó que sólo el hidrolizado obtenido luego de una hora de incubación ( $t_1$ ) y el control ( $t_0$ ) presentaron bioactividad. Además, solo el hidrolizado  $t_1$  presentó actividad antimicrobiana contra *Salmonella enteritidis*.



Cuando se evaluó la capacidad de agregación de los hidrolizados frente a la acidificación, se observó que sólo los hidrolizados  $t_1$  mantuvieron la capacidad para agregar luego de adicionada la GDL. Esto coincidió con la brusca disminución de la hidrofobicidad superficial, lo que demuestra la participación de las interacciones hidrofóbicas durante el proceso de agregación. Los geles finales obtenidos fueron menos compactos y estructurados.

Por otro lado, la incorporación de los hidrolizados bioactivos a soluciones de NaCAS modificó la cinética de agregación ácida pero no alteró significativamente el grado de compactación de los agregados formados; los geles obtenidos a partir de la mezcla NaCAS:hidrolizado  $t_1$  presentaron una elasticidad y microestructura similar a las de los geles de NaCAS.

La hidrólisis enzimática del NaCAS con la enzima P7 produjo péptidos de pesos moleculares menores a 6,0 kD que presentaron diversas bioactividades (antimicrobiana, antioxidante, quelante y poder reductor), cuya magnitud dependió del tiempo de hidrólisis. Estos hidrolizados perdieron la capacidad de gelificar por adición de GDL, y su incorporación a soluciones concentradas de NaCAS no modificó la cinética de gelación pero si la elasticidad de los geles formados, sin variación significativa del tamaño promedio de sus poros.

Estos resultados son prometedores con respecto a la incorporación de péptidos bioactivos como aditivos en la elaboración de diferentes productos lácteos, donde la agregación y gelación ácida constituya la base para su producción. Sin embargo, se debe tener en cuenta su efecto sobre las propiedades reológicas y de textura de los geles formados, ya que las mismas pueden modificar las características organolépticas del producto final.

# INTRODUCCIÓN



## **CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Importancia del tema en estudio**

Las proteínas lácteas, especialmente las caseínas, poseen un alto valor nutritivo y, al mismo tiempo, sus propiedades funcionales (gelación, emulsificación, poder espumante, viscosidad, solubilidad) son de gran utilidad para la obtención de un producto terminado con las características organolépticas y de estabilidad deseables. En la manufactura de productos lácteos uno de los procesos más frecuentemente utilizados es la gelación o coagulación de dichas proteínas, ya sea por el agregado de enzimas y/o por la adición de sustancias o de cultivos bacterianos que modifican la acidez del medio.

Por otra parte, es común suplementar dichas fórmulas con iones para conferir determinada fuerza iónica, pequeños azúcares como endulzantes y polisacáridos como espesantes o gelificantes. El estudio de la adición de tales cosolutos a estas soluciones proteicas intenta optimizar la calidad del producto final y otorgarle características especiales. El conocimiento de las interacciones y características estructurales de estas mezclas frente a cambios de composición, fisicoquímicos o de procesamiento, permitirá vincularlas con sus propiedades funcionales, en particular la gelación, con miras a una transferencia a la industria alimenticia. La adecuada formulación de dichas mezclas favorecerá la elaboración de productos con características reológicas y de textura especiales. La optimización de técnicas que determinen en forma precisa los parámetros vinculados al proceso de gelación, contribuirá a desarrollar una mejor calidad comercial de estos productos por parte de la industria de alimentos.

Además, estas proteínas y los péptidos derivados de las mismas tienen importante actividad biológica. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo contribuirán a la formulación de productos con valor agregado de interés para la salud.

Esto es de gran importancia para nuestra región, que es una cuenca lechera por excelencia. Por otra parte, si bien los estudios son planteados sobre proteínas de leche bovina, podrían ser extrapolados a proteínas lácteas de diferente origen.

## 1.2. Antecedentes del tema

Las proteínas y los polisacáridos son los principales componentes de alimentos y de otros biomateriales, y son los responsables de conferir propiedades de hidratación (viscosidad, solubilidad), estructuración (agregación, gelación) y superficie (formación de espumas y emulsiones). De la mezcla de proteínas y polisacáridos en solución acuosa resultan tres sistemas diferentes: a) separación de fases segregativa debido a una limitada compatibilidad termodinámica; b) separación de fases asociativa debido a la formación de un complejo por medio de interacciones débiles y no específicas; y c) soluciones homogéneas estables (1). Los dos primeros se observan principalmente a un pH mayor que el punto isoeléctrico (pI) de la proteína.

Las propiedades de los sistemas formados por proteínas y polisacáridos pueden ser alteradas por factores fisicoquímicos: adición de pequeños azúcares (2) y modificaciones de la fuerza iónica y/o el pH (3). Las condiciones de procesamiento, como el tratamiento térmico (4) y las fuerzas mecánicas (presión y cizallamiento) (5) influyen sobre la estabilidad y pueden provocar la separación de fases.

En general, los alimentos contienen ambas clases de biopolímeros, proteínas y polisacáridos, en forma de complejas mezclas multicomponentes, siendo difícil identificar el papel individual de los mismos en términos de sus propiedades funcionales (6).

Las mezclas proteínas-polisacáridos son ampliamente utilizadas en la industria alimenticia debido a que juegan un rol esencial en la estructura, textura y estabilidad de muchos productos elaborados. Estas características no solo dependen de las propiedades de los biopolímeros involucrados sino también de la naturaleza y la fuerza de las interacciones entre ellos (6). Los polisacáridos suelen adicionarse a los alimentos como estabilizantes, gelificantes, emulsificantes y espesantes. Éstos pueden ser neutros (goma guar), cargados (goma xantana) o con características hidrofóbicas (carboximetilcelulosa), lo que lleva a diferentes formas de interacción con las proteínas. Una limitada compatibilidad termodinámica entre biopolímeros puede ser explotada para la construcción de nano o micropartículas, controlando el tamaño de los agregados mediante la selección del polisacárido, la temperatura y las concentraciones relativas de ambos polímeros (7, 8). Por lo tanto, el

conocimiento de los mecanismos de interacción en los sistemas proteína-polisacárido simples (sistemas modelo) permite prever el comportamiento de sistemas más complejos y facilitar el desarrollo y la formulación de nuevos productos con las características deseadas.

Muchas veces estos procesos vienen acompañados de gelación, tornando aún más compleja la descripción de la red heterogénea formada por proteínas y polisacáridos. Durante la formación de un gel alimenticio, la composición del sistema, las interacciones entre sus componentes y las condiciones del proceso afectan las propiedades mecánicas de dicho gel y, por lo tanto, su textura (9).

Los mecanismos de interacción entre ingredientes y el comportamiento de los geles formados pueden ser caracterizados a través de análisis espectrofotométricos y/o reológicos (10, 11). El comportamiento reológico a bajas deformaciones es una técnica utilizada para obtener información sobre la estructura y viscoelasticidad del producto formado (12). Las propiedades mecánicas pueden explicarse considerando la estructura de los geles coloidales como una red de agregados fractales empaquetados o en forma de racimos (13). Por lo tanto, la relación entre las propiedades elásticas y la estructura fractal puede ser confirmada por análisis espectrofotométricos.

Para interpretar la interacción entre la composición de los alimentos, la textura, la aromatización y las características sensoriales es necesario tomar en cuenta la distribución de una fase en un sistema multifase (14). La distribución real de la fase se puede investigar por medio de técnicas microscópicas (15).

En estos últimos años, se ha privilegiado el consumo de alimentos naturalmente procesados en lugar del uso de componentes sintéticos y aditivos químicos. Además, la conexión entre dieta y salud ha incrementado la demanda de ingredientes alimenticios naturales y funcionales. Las proteínas alimentarias, además de su importante rol nutritivo, contienen, dentro de su estructura primaria, secuencias peptídicas capaces de modular funciones fisiológicas específicas. Estos fragmentos peptídicos, llamados péptidos bioactivos, permanecen inactivos dentro de la estructura proteica nativa pero pueden activarse por hidrólisis enzimática (*in vivo* o *in vitro*) de la cadena polipeptídica. Luego de la hidrólisis, estos biopéptidos pueden presentar

actividades antihipertensiva, inmunomoduladora, antibacteriana y/o antioxidante, entre otras (16, 17, 18).

Las proteínas lácteas son consideradas una fuente importante de péptidos bioactivos que pueden ser liberados luego de hidrólisis enzimática. La misma puede ser a través del uso de enzimas digestivas (gastrointestinales), por fermentación o por proteólisis empleando enzimas derivadas de microorganismos o plantas (19). El interés de los biopéptidos de origen lácteo ha aumentado debido a que las proteínas lácteas son aisladas en gran cantidad, con un alto grado de pureza y a bajo costo, lo cual desde el punto de vista tecnológico, las convierte en sustratos sumamente atractivos para obtener péptidos con actividad biológica. Se han reportado varios trabajos sobre la producción de péptidos bioactivos derivados de la hidrólisis de proteínas lácteas, sin embargo, los diferentes orígenes de la leche y la alta variabilidad genética en las proteínas podría originar biopéptidos diferenciales (20).

Enzimas proteolíticas de diferentes orígenes (animal, vegetal, microbiano) se han utilizado exitosamente en la producción de péptidos bioactivos (21, 22). En particular, las proteasas microbianas son producidas en gran cantidad por métodos de cultivo bien establecidos, produciendo altas cantidades de enzima. En este sentido, el estudio de nuevas proteasas permitiría el desarrollo de hidrolizados proteicos con características deseables.

En particular, las bacterias queratinolíticas *Bacillus* sp. P45 y P7 producen proteasas extracelulares con elevado potencial biotecnológico (23, 24).

### **1.3. La leche**

El papel de la leche en la naturaleza es el de alimentar y proporcionar protección inmunológica para los jóvenes mamíferos. Junto con la miel son los únicos ingredientes de la dieta cuya única función es servir como alimento. No sorprende, por lo tanto, que el valor alimenticio de la misma sea alto, ya que está constituida por una gran cantidad de componentes: proteínas, minerales, grasas, etc.

La leche bovina contiene todos los nutrientes que requieren el hombre y otros animales, aunque no todos se encuentran en cantidades suficientes. Posee muchos componentes capaces de reaccionar y sufrir cambios químicos por lo que se modifica fácilmente. Puede experimentar transformaciones

enzimáticas y la mayoría de los microorganismos pueden crecer exitosamente en ella, de aquí que la leche pueda fermentarse de diversas formas. Sus fases pueden separarse por centrifugación originando leche descremada y crema, o por coagulación produciendo suero y coágulo. Además se le pueden aplicar los procesos de separación molecular frecuentemente utilizados en la industria alimenticia, como concentración, desecación, procesos de membrana y cristalización. Con ellos y ciertas transformaciones físicas, como el batido, se elaboran diversos productos que se incorporan a la dieta.

Las caseínas (CN) de la leche son el principal factor determinante de la producción del queso ya que contribuyen a absorber el agua y los minerales. Los distintos componentes de la leche y en particular las CN, sufren modificaciones debido a variaciones estacionales y alimenticias del ganado vacuno, a tratamientos previos y al procesamiento industrial (25).

Los caseinatos (CAS), derivados de las CN, presentan diferentes propiedades funcionales que permiten una extensa aplicación en la industria alimenticia y otras áreas tecnológicas (26).

### **1.3.1. Estructura y funcionalidad de las proteínas de la leche**

Las proteínas lácteas son sintetizadas por la glándula mamaria y existen en diferentes formas conocidas como variantes genéticas, las cuales tienen pequeñas variaciones en la secuencia de aminoácidos y son heredables de un modo Mendeliano no-dominante (27).

La leche de vaca contiene unos 5,3g de nitrógeno por kg con aproximadamente un 95% en forma de proteínas ( $\sim 32 \text{ g/kg}$ ) y el 5% restante correspondiente a moléculas pequeñas (nitrógeno no proteico).

Las proteínas que permanecen en solución a pH 4,6 se llaman proteínas del suero de queso o proteínas del suero lácteo (WP). Están compuestas por  $\sim 0,3\% \text{ P/P}$  de  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ LG),  $\sim 0,1\% \text{ P/P}$  de  $\alpha$ -lactoalbúmina ( $\alpha$ LA), albúmina sérica (BSA), inmunoglobulinas y péptidos de bajo peso molecular procedentes de la proteólisis de las CN (28).

#### **1.3.1.1. Las caseínas (CN)**

Las CN ( $\sim 26 \text{ g/kg}$ ), fosfoproteínas específicas de la leche que precipitan a pH 4,6, representan alrededor del 80% del total de las proteínas lácteas e

incluyen cuatro tipos de cadenas polipeptídicas principales llamadas caseínas  $\alpha_{S1}$  ( $\alpha_{S1}$ -CN),  $\alpha_{S2}$  ( $\alpha_{S2}$ -CN),  $\beta$  ( $\beta$ -CN) y  $\kappa$  ( $\kappa$ -CN), además de algunos derivados formados por proteólisis de estas cadenas, como la  $\gamma$ -caseína ( $\gamma$ -CN). Todas estas cadenas tienen en común ser proteínas conjugadas con al menos un grupo fosfato por molécula esterificado a residuos de serina y ocasionalmente a treonina (enlaces éster-fosfato); propiedad que ninguna de las proteínas del suero posee (29).

Una característica distintiva que presentan las CN es su sensibilidad al calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) siendo la unión a este catión un proceso completamente reversible. Esta capacidad crece con el incremento del pH y la disminución de la fuerza iónica y disminuye en el orden  $\alpha_{S1}$ -CN >  $\beta$ -CN >  $\kappa$ -CN. Debido a estas diferencias en la capacidad ligante de  $\text{Ca}^{2+}$  de las distintas CN, la  $\kappa$ -CN tiene un manifiesto poder de estabilización de las  $\alpha_{S1}$ -CN y  $\beta$ -CN frente a la precipitación por dicho catión, el cual se pierde cuando es escindida por la quimosina (30).

Todas las CN tienen una pronunciada tendencia a asociarse, en general tienden a autoasociarse en las condiciones de pH y fuerza iónica de la leche, aunque presentan ciertas diferencias frente a los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  y a la temperatura del medio. Forman complejos tanto en presencia como en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (31, 32).

Ninguno de los cuatro tipos de CN tiene una estructura secundaria muy organizada, sólo  $\alpha$ -hélices y láminas  $\beta$  de longitudes cortas. El gran número y la distribución uniforme de los restos de prolina ayudan a evitar una conformación secundaria empaquetada y ordenada; están compuestas por distintos dominios funcionales. Estas proteínas poseen naturaleza reomórfica, es decir son estructuras completamente dinámicas, pudiendo pasar de estructura secundaria a cuaternaria sin formar complejos intermedios terciarios (33, 34, 35).

Las CN son notablemente estables ya que soportan altas velocidades de centrifugación (homogenización), altas temperaturas (pasteurización) y tienen facilidad para redispersarse después de la deshidratación de la leche a polvo o gránulos. Su estabilidad está relacionada con la repulsión electrostática que tiene lugar entre las cargas iguales de las CN y se ve reflejada en el hecho de



que pueden ser agregadas al pH del punto isoeléctrico ( $pI = 4,6$ ) y de que la velocidad de agregación a pH neutro es sensible a la concentración de  $Ca^{2+}$  (36).

### **1.3.1.2. Los caseinatos (CAS): características generales y propiedades funcionales**

Las CN precipitadas a pH 4,6 pueden ser resolubilizadas por incremento del pH, adicionando hidróxidos, obteniéndose CAS. Por ejemplo, con la adición de NaOH se obtiene caseinato de sodio (NaCAS) (37). El NaCAS es un ingrediente muy utilizado por la industria alimenticia debido a sus propiedades nutricionales y funcionales. Las partículas de NaCAS se encuentran en solución acuosa como moléculas proteicas individuales, oligómeros proteicos (nanopartículas de CAS) y hasta como submicelas de CN (38). Los CAS pueden estar asociados a iones sodio, calcio, potasio, amonio y magnesio, dando lugar a propiedades funcionales diferentes.

En general los CAS poseen:

- ✓ Carga neta negativa.
- ✓ Estructura flexible, dando lugar a la formación de soluciones viscosas.
- ✓ Alta solubilidad en agua.
- ✓ Zonas hidrofóbicas, que favorecen la disposición de agua estructurada como así también la interacción con lípidos.
- ✓ Estabilidad al calor, lo que los convierte en excelentes nutrientes.

Los CAS son ampliamente utilizados en tecnología de los alimentos como ingredientes alimentarios o aditivos, presentando las siguientes propiedades funcionales:

- ✓ Estabilizan emulsiones por su propiedad de interaccionar con el agua y las grasas (estabilizantes, emulsificantes).
- ✓ Favorecen la aireación y/o el batido, mejorando la calidad de las espumas que forman (espumantes).
- ✓ Favorecen la formación de geles (gelificantes).
- ✓ Interaccionan con lípidos (bloquean grasas): En general mejoran la retención de agua, haciendo que los productos que deben freírse retengan

menor cantidad de aceite. Permiten obtener margarinas bajas en calorías al emulsionar mayor cantidad de agua en la grasa, base de este producto.

✓ Estabilizan espumas en alimentos con alto contenido graso (estabilizante, espumante).

✓ Colaboran en la texturización: Los CAS se utilizan en la industria de derivados cárnicos, embutidos y fiambres, debido a su resistencia al calor, adhesividad y capacidad para conferir jugosidad al producto.

Tanto las CN como los CAS tienen amplia aplicación en la industria alimentaria. Entre ellas se destacan la industria panadera, láctea, cárnica y de bebidas. Además suelen utilizarse como aditivos en aplicaciones medicinales y dietarias como así también en la formación de films y coberturas, de productos texturados en general (snacks), en la elaboración de comidas rápidas o preelaboradas y en la industria de golosinas y dulces (39).

#### 1.4. Agregación de las partículas de CN Y CAS

Aunque las partículas de CN y CAS son bastante estables, hay diversas formas de inducir la agregación de las mismas, entre las más importantes se utilizan:

a) Quimosina u otras enzimas proteolíticas: La quimosina contenida en el cuajo bovino es la enzima utilizada con mayor frecuencia en la fabricación de quesos, ya que escinde específicamente a la  $\kappa$ -CN (40, 41).

b) Ácidos: Desestabilizan a las proteínas por disminución de su carga eléctrica hasta alcanzar el pl. Las proteínas precipitan y la agregación ocurre como resultado de interacciones hidrofóbicas entrópicamente conducidas (42).

c) Calor: A temperaturas por encima del punto de ebullición ( $T > 140^{\circ}\text{C}$ ) las CN y los CAS pueden ser precipitados con liberación de protones y agregarse irreversiblemente (43).

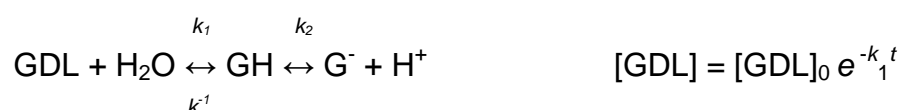
d) Gelación al envejecer: Éste fenómeno de agregación afecta productos lácteos estables al almacenamiento y esterilizados, tales como alimentos concentrados y sometidos a tratamientos a altas temperaturas. Luego de un tiempo de estacionamiento, estos productos sufren un incremento repentino de viscosidad acompañado por una visible gelificación e irreversible agregación. No se conoce exactamente la causa ni el mecanismo de este proceso, pero se

supone que podría deberse a proteólisis de las CN por enzimas bacterianas o nativas resistentes a los tratamientos térmicos o a la formación de complejos entre las CN y las proteínas del suero (44).

#### 1.4.1. Agregación y/o gelación de las partículas de NaCAS por acidificación

Durante la acidificación de la leche y/o el NaCAS se forma una estructura de gel como resultado de la disociación y agregación de las fracciones caseínicas ( $\alpha_{S1-}$ ,  $\alpha_{S2-}$ ,  $\beta$ - y  $\kappa$ -) (45). A bajas concentraciones proteicas, se obtienen agregados de pequeño tamaño. Sin embargo, cuando la concentración proteica es lo suficientemente alta, los agregados tienen un tamaño lo suficientemente grande como para formar una malla o red de gel. Los geles proteicos pueden clasificarse en dos tipos: los formados a partir de la agregación desordenada, y los formados por la asociación más ordenada de las moléculas (estructura fina). Los geles proteicos transparentes con estructura fina se forman bajo condiciones de alta repulsión electrostática entre las proteínas, en sistemas de baja fuerza iónica o lejos del pl. Los geles turbios de estructura particulada, con valores bajos de módulo elástico ( $G'$ ), se forman en condiciones de alta fuerza iónica o en las proximidades del pl de la proteína (46).

La formación de estos agregados y/o geles proteicos por reducción del pH puede realizarse lentamente (uso de cultivos lácticos) o rápidamente (acidificación directa). En el proceso tradicional, la leche es acidificada por bacterias, las cuales fermentan la lactosa a ácido láctico. El otro proceso, que ha ganado la atención de la industria alimenticia, es la acidificación directa por la adición de una lactona, la glucono- $\delta$ -lactona (GDL). La GDL es un éster interno que se hidroliza espontáneamente para formar ácido glucónico a través de una cinética de hidrólisis de primer orden:



donde GH es ácido glucónico,  $\text{G}^-$  gluconato,  $k_1$  y  $k_2$  las constantes de velocidad directa y  $k_{-1}$  corresponde a la constante de velocidad inversa.

Dependiendo de la concentración y temperatura, la hidrólisis de la GDL también puede promover una reducción lenta del pH (42). Esta diferencia en la velocidad del proceso puede afectar el grado de dureza y la elasticidad del gel formado (47).

Además, el uso de GDL resulta beneficioso ya que evita algunas de las dificultades asociadas a la utilización de bacterias, tales como la actividad y variabilidad en función del tipo de microorganismo empleado. Además, durante la agregación y/o gelación con GDL el pH final del sistema es función de la cantidad de lactona adicionada, mientras que las bacterias producen ácido hasta que se autoinhiben o mueren por el bajo pH del medio (48).

#### **1.4.2. Agregación y/o gelación de las partículas de NaCAS por acidificación en presencia de pequeños cosolutos (sacarosa, lactosa, glicerol e iones calcio)**

La adición de determinados iones o azúcares puede provocar cambios significativos en la estructura del NaCAS que se reflejan en modificaciones de sus propiedades funcionales (49, 50). Por ello, resulta de interés evaluar las posibles modificaciones en el proceso de agregación y gelación debido a la presencia de diferentes cosolutos usualmente presentes o adicionados en un producto lácteo.

La lactosa (Lac) [O-β-D-galactopiranosil-(1→4)-β-D-piranósido] se encuentra en la leche, pero no existe en ninguna otra fuente natural (4,6% en la leche bovina). Produce D-galactosa y D-glucosa por hidrólisis. Puesto que posee un carbono anomérico libre en el resto de glucosa, la Lac es un disacárido reductor. Este azúcar representa una fuente energética de fácil utilización y favorece la absorción de calcio y magnesio. La cantidad de Lac presente en la leche bovina puede variar debido a factores estacionales, genéticos o dietarios.

La sacarosa (Sac) es un disacárido de la glucosa y de la fructosa [O-β-D-fructofuranosil-(2→1)-α-D-glucopiranósido]. Abunda en el reino vegetal y es conocida como azúcar de mesa. A diferencia de muchos disacáridos y oligosacáridos, la Sac no contiene átomo de carbono anomérico libre; los de ambas hexosas se hallan unidos entre sí. La Sac, por lo tanto, no es un azúcar reductor. Además se hidroliza con más facilidad que los otros

disacáridos (51). El sabor de la Sac es el sabor estándar por medio del cual todos los otros edulcorantes son medidos. Mientras que en algunos alimentos el azúcar es usada para endulzarlos; en otros, es utilizada sólo en pequeñas cantidades con el fin de incrementar o mejorar su sabor, sin que la cantidad añadida sea la suficiente para endulzarlos totalmente. No obstante, este ingrediente es parte esencial de la estructura y de la receta de algunos alimentos; como por ejemplo los productos lácteos (52).

En los últimos años ha cobrado importancia la elaboración de películas o coberturas proteicas, con intención de reemplazar a las fabricadas con derivados de petróleo. El glicerol (Gli) es utilizado en estas preparaciones como un buen agente plastificante (53).

Ya ha sido observado que la presencia de los pequeños cosolutos enumerados, capaces de producir incrementos en la viscosidad del medio, influye sobre la velocidad de la etapa de agregación de las micelas de para- $\kappa$ -CN ( $p$ - $\kappa$ -CN) durante su coagulación enzimática (54). Esto podría deberse al rol limitante de la difusión sobre la velocidad de agregación de las partículas (55).

La adición de minerales, como el ión  $\text{Ca}^{2+}$ , a fórmulas alimenticias, involucra el problema de la reducción de su concentración debido a su precipitación durante el tratamiento tecnológico. Este efecto puede ser amortiguado por la incorporación de proteínas lácteas que tengan la capacidad de unir al  $\text{Ca}^{2+}$  y combinarse con él, contribuyendo con el  $\text{Ca}^{2+}$  soluble a niveles que no alteren la estabilidad del conjunto. La estabilidad de las proteínas lácteas y la disponibilidad del  $\text{Ca}^{2+}$  están condicionadas por los equilibrios minerales entre las CN y la fase soluble. Por lo tanto, el análisis de los diferentes equilibrios que participan en la estabilidad de los sistemas proteínas-cosolutos es de esencial importancia debido a que de sus interacciones depende la posibilidad de un enriquecimiento exitoso del alimento. Los cambios en la relación de concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y CAS pueden modificar las propiedades funcionales, tales como viscosidad, solubilidad y estabilidad (36, 49).

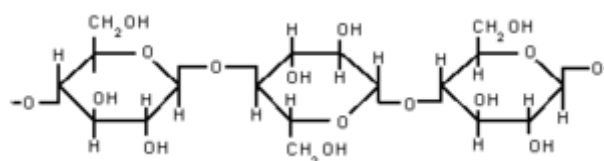
### **1.5. Polisacáridos evaluados**

Los polisacáridos suelen adicionarse a los productos alimenticios como estabilizantes, gelificantes, emulsificantes y espesantes (56, 57).

### 1.5.1. Carboximetilcelulosa (CMC)

La celulosa y sus derivados forman geles termo reversibles y actúan como agentes dispersantes, para conferir volumen al alimento y para retener la humedad (58). La celulosa es un polisacárido compuesto exclusivamente de moléculas de glucosa (homopolisacárido); es rígido, insoluble en agua y contiene desde cientos hasta miles de unidades de  $\beta$ -glucosa unidas mediante enlaces  $\beta$ -1,4-O-glucosídico. Es una larga cadena polimérica de peso molecular variable, con fórmula empírica  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , con un valor mínimo de  $n = 200$ .

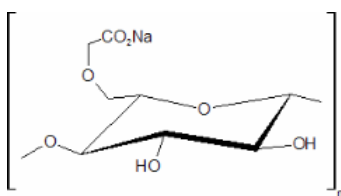
La celulosa tiene una estructura lineal o fibrosa, en la que se establecen múltiples puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de distintas cadenas yuxtapuestas de glucosa, haciéndolas impenetrables al agua, lo que hace que sea insoluble en agua, originando fibras compactas que constituyen la pared celular de las células vegetales (Figura 1.1).



**Figura 1.1.** Estructura molecular simplificada de la celulosa

La celulosa utilizada en alimentación se obtiene rompiendo las fibras de la celulosa natural, despolimerizando por hidrólisis en medio ácido la pulpa de madera. Sus derivados obtienen químicamente por un proceso en dos etapas: en la primera, la celulosa obtenida de la madera o de restos de algodón se trata con soda cáustica; en la segunda, esta celulosa alcalinizada se hace reaccionar con distintos compuestos orgánicos según el derivado que se quiera obtener. Como ya se mencionó, no es soluble en agua, pero sí dispersable (59).

Un derivado soluble de la celulosa es la CMC sódica, producida en grandes cantidades en grados comerciales crudos sin ningún refinamiento para ser empleada en detergentes, fluidos de perforación y en la industria papelera, y en grados de pureza más altos, como aditivo alimenticio (Figura 1.2).



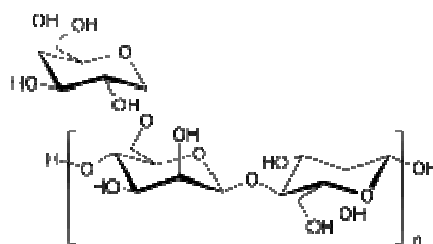
**Figura 1.2.** Estructura molecular simplificada de la CMC sódica

Su carácter hidrofílico, buenas propiedades para formar películas, alta viscosidad y comportamiento adhesivo, entre algunas otras características, hacen que la CMC presente una amplia variedad de aplicaciones. Es utilizada en alimentos como agente auxiliar en el batido de helados, cremas y natas, como auxiliar para formar geles en gelatinas, como espesante en aderezos y rellenos, como agente suspensor en jugos de frutas, como coloide protector en emulsiones y mayonesas, como agente protector para cubrir la superficie de las frutas y estabilizador en productos listos para hornear.

Una ventaja importante del uso de este polisacárido es que no resulta afectado por las enzimas digestivas del organismo humano, no absorbiéndose en absoluto. Se utiliza como componente de dietas bajas en calorías, ya que no aporta nutrientes, y se comporta igual que la fibra natural, no teniendo efectos nocivos sobre el organismo, sin embargo, una cantidad muy grande puede disminuir en algún grado la asimilación de ciertos componentes de la dieta (60).

### 1.5.2. Goma Guar (GG)

La GG, muy usada en la industria alimenticia como espesante y estabilizante debido a su elevada viscosidad en soluciones acuosas, es un galactomanano con una razón manosa:galactosa de 2:1 que muestra un comportamiento de solución macromolecular cuyas propiedades son gobernadas por enlaces topológicos (6). Este galactomanano es un heteropolisacárido que consiste en una cadena lineal de residuos de (1,4)- $\beta$ -D-manopiranosil asociado a grupos (1,6)- $\alpha$ -D-galactopiranosil (61). La Figura 1.3 ilustra la estructura molecular simplificada de la GG.



**Figura 1.3.** Estructura molecular simplificada de la GG

Este polisacárido funciona como reserva nutricional de las semillas de *Cyamopsis tetragonoloba*, una planta de la familia de las leguminosas. La fibra purificada de GG es un polvo blanco e insípido que forma un gel viscoso cuando se mezcla con agua. La viscosidad de la solución depende de la longitud de la cadena de galactomanano que contiene. Al igual que otras fibras, no puede ser digerida en el intestino delgado de los mamíferos, donde tiende a formar soluciones viscosas con el agua ingerida y las secreciones digestivas, pero es rápidamente metabolizada a ácidos grasos de cadena corta por las bacterias del colon.

Se utiliza principalmente para dar textura a los alimentos y se emplea como estabilizante de helados y espumas y en productos que deben someterse a tratamientos de esterilización a alta temperatura. No se conocen efectos adversos en su utilización como aditivo. Además, suele emplearse en la industria del papel, textil, cerámica, pinturas, cosmética, farmacéutica y explosiva.

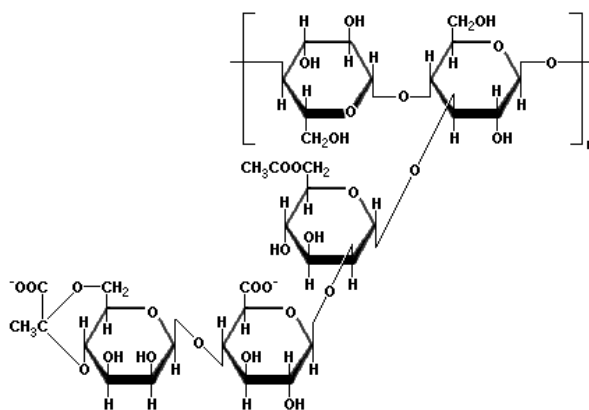
### 1.5.3. Goma Xantana (GX)

La GX es un polisacárido extracelular producido por la bacteria *Xanthomonas campestris* B-1459. Su disolución en agua da origen a soluciones altamente viscosas, estables en un amplio rango de pH, concentración de sales y temperaturas, características favorables para la economía de operaciones tecnológicas donde se emplea como espesante. El heteropolímero pasa por transiciones conformacionales (ordenada-desordenada) que dependen de la fuerza iónica y/o temperatura (62).

La molécula de GX consta de una cadena principal de D-glucopiranosilo con enlace  $\beta$  1-4, como en la celulosa. A la cadena principal se anexan cadenas laterales de trisacárido compuestas por residuos de D-manopiranosilo



y de ácido D-glucopiranosilurónico. Los residuos de manosilo con enlace a 1-2 tienen sustitutos 6-O-acetilo. Un promedio de aproximadamente la mitad de los grupos terminales del  $\alpha$ -D-manosilo tienen sustitutos 4,6-O-(1-carboxietilideno) (63). La Figura 1.4 ilustra la estructura simplificada de la GX.



**Figura 1.4.** Estructura molecular simplificada de la GX

La GX se agrega a los alimentos para controlar la reología del producto final ya que el polímero produce un gran efecto sobre propiedades como la textura, liberación de aroma y apariencia, que contribuyen a la aceptabilidad del producto para su consumo. En solución presenta carácter pseudoplástico generando una sensación menos gomosa en la boca que las gomas con comportamiento newtoniano.

Este polisacárido es ampliamente utilizado en diferentes industrias: alimenticia, farmacéutica, cosmética, agrícola y petrolera, entre otras, por sus propiedades espesantes y estabilizantes, y por sus características reológicas.

### 1.6. Incompatibilidad termodinámica entre los biopolímeros

En emulsiones lácteas, la fase no grasa, compuesta por polisacáridos, proteínas y otros azúcares, es crítica para la formación de la microestructura del producto final (64). Estos sistemas acuosos de proteína/polisacárido son termodinámicamente inestables y, bajo ciertas condiciones, tienden a separarse en dos fases inmiscibles en equilibrio, fenómeno que da lugar a la morfología propia de la emulsión (65). Es esa morfología la que finalmente gobierna el comportamiento reológico, la estabilidad, palatabilidad y la textura del producto final (66, 67, 68).

A concentraciones elevadas de proteína y polisacárido, la mezcla de los biopolímeros puede conducir a la separación en dos fases como resultado de incompatibilidad termodinámica o coacervación. La primera ocurre cuando la interacción entre dos biopolímeros diferentes es energéticamente menos favorable que la interacción entre biopolímeros similares. Como resultado cada una de las fases en que se separa el sistema se enriquece con uno de los biopolímeros. Por otra parte, la coacervación ocurre cuando las fuerzas atractivas entre dos biopolímeros diferentes son lo suficientemente fuertes para formar un complejo estable entre ellos. Debido a que este complejo tiene diferente densidad que el medio que lo rodea y por los efectos de la gravedad, forma una fase separada en la zona superior o inferior del sistema (69).

Es por ello que en una mezcla de proteínas y polisacáridos, la limitada compatibilidad termodinámica puede ser explotada para la construcción de nano o micropartículas mediante la selección del polisacárido, la temperatura y las concentraciones relativas de ambos biopolímeros (8).

## **1.7. Técnicas de uso frecuente para el estudio de sistemas modelo formados por biopolímeros**

### **1.7.1. Hidrofobicidad superficial. Uso de sondas fluorescentes para su determinación**

El término “hidrofóbico” describe a un soluto que tiene poca o ninguna afinidad por el medio acuoso en donde se encuentra disuelto. La hidrofobicidad de una proteína comúnmente se define como el promedio de la hidrofobicidad de sus aminoácidos constituyentes expresada como la energía libre de transferencia desde el agua al etanol, la que se calcula como la diferencia de solubilidad de estos aminoácidos en los dos solventes. Esta hidrofobicidad proteica contribuye a la estabilización de la estructura molecular de las proteínas nativas y con el mecanismo de plegado molecular.

Para alcanzar el mínimo de energía libre en la conformación en solución de una macromolécula los grupos no polares o hidrofóbicos tienden a restringirse al interior de la estructura para evitar la exposición al solvente acuoso, y los restos polares procuran ubicarse en o cerca de la superficie. Sin embargo, el estudio cristalográfico de la estructura tridimensional de las proteínas revela que algunos de los grupos hidrofóbicos están al menos

parcialmente expuestos sobre la superficie proteica. Estos segmentos hidrofóbicos superficiales resultantes tienen un rol clave en las interacciones intermoleculares tales como la fijación de pequeños ligandos o la asociación con otras macromoléculas (70, 71). Esto resulta particularmente relevante en el caso de las proteínas en estudio debido a que las mismas presentan una conformación poco empaquetada y con un alto grado de exposición de diferentes grupos reactivos al medio.

La hidrofobicidad superficial o efectiva ( $S_0$ ) representa la exposición de las cadenas laterales de tipo hidrofóbico de los residuos aminoacídicos de las moléculas proteicas y juega un papel importante en la funcionalidad de las proteínas alimenticias.

Las propiedades funcionales de las proteínas dependen de la interacción de las moléculas proteicas con otros componentes del sistema alimenticio: agua, macromoléculas (proteínas, carbohidratos complejos, lípidos) y pequeñas moléculas (sales, azúcares simples). Estas interacciones suelen localizarse en la superficie o interfase. Se ha demostrado la correlación entre la  $S_0$  y tales propiedades funcionales, como son el poder de estabilizar espumas y emulsiones de algunas proteínas lácteas y la capacidad de formar geles de otras (72, 73).

Existen diferentes métodos para estimar la  $S_0$ , entre ellos se encuentra el uso de marcadores fluorescentes hidrofóbicos. Éstos son compuestos para los que el rendimiento cuántico de fluorescencia y la longitud de onda máxima de emisión dependen de la polaridad de su entorno, lo que permite su utilización para caracterizar cambios conformacionales que puedan sufrir las proteínas frente a distintos tratamientos (térmicos, enzimáticos, presencia de agentes desnaturalizantes) o cuando interaccionan con otros componentes alimenticios (74, 75). Entre los marcadores fluorescentes hidrofóbicos se incluyen las sondas aniónicas con grupo ácido sulfónico aromático, tales como el anfifílico 8-anilino-1-naftalénsulfonato (ANS). Este marcador tiene alto rendimiento cuántico de fluorescencia en solventes orgánicos pero no en agua, por lo tanto se incrementa su intensidad de fluorescencia cuando se fija a cavidades hidrofóbicas de algunas proteínas (76, 77). Las limitaciones en el uso de este fluoróforo para la determinación de la  $S_0$  incluye la posibilidad de que tanto las

interacciones electroestáticas como las hidrofóbicas pueden contribuir en su interacción con las proteínas (75).

### **1.7.2. Distribución de tamaño de partículas**

Los métodos de dispersión dinámica de la luz (DLS, de su traducción al inglés *dynamic light scattering*), como el de difracción láser (LALLS, de su traducción al inglés *low angle light scattering*), empleados para estudiar la distribución de tamaño de las partículas, han alcanzado amplia difusión en la actualidad merced a la posibilidad de utilizar fuentes luminosas láser, monocromáticas, coherentes y de gran energía (espectroscopia de correlación de fotones), lo que aumenta en grado notable la posibilidad de detectar la radiación dispersada. Además, la medición es absoluta (no se requieren estándares), no invasiva (se puede recuperar la muestra), rápida y permite trabajar con partículas solvatadas (78).

### **1.7.3. Reología**

Literalmente, la palabra reología significa “estudio del fluir”, ya que proviene de las palabras griegas reo (fluir), y logos (ciencia), pero el campo de acción de la reología es mucho más amplio de lo que parece significar su nombre ya que la misma estudia cómo un material deformable reacciona bajo la influencia de las fuerzas aplicadas. Actualmente las técnicas reológicas son muy importantes para analizar los diferentes pasos involucrados en el proceso de formación de los geles, así como para evaluar la textura y las características sensoriales de los productos finales. El beneficio de usar métodos reológicos para evaluar los componentes mecánicos de la textura es que ellos pueden ser relacionados con teorías que explican los mecanismos moleculares involucrados. Estas teorías pueden describir al alimento y predecir la influencia de varios de sus ingredientes o de las condiciones de procesamiento sobre el producto final. Sin embargo, los modelos para predecir sistemas complejos, tales como los productos lácteos, necesitan ser modificados continuamente con el fin de relacionarlos con la textura del alimento más estrechamente. En este caso, la utilización de sistemas modelo es muy importante para proveer un marco científico adecuado (79). Los factores principales que afectan las propiedades reológicas de los geles proteicos inducidos por acidez son el

contenido proteico, el pH, la fuerza iónica y la presencia de otros componentes (58).

Los geles de CN y CAS son responsables de la mayoría de las propiedades reológicas/texturales (elasticidad, resistencia, dureza) de los quesos y otros productos alimenticios. Estas propiedades son evaluadas como un método de control de calidad en la industria alimenticia para mejorar la estructura/textura de los alimentos (80).

#### **1.7.4. Microscopia y análisis digital de imágenes**

El efecto del pH en la microestructuración del gel ha sido caracterizado por medio de diferentes técnicas microscópicas (81). Entre ellas se encuentra la microscopia óptica convencional (OCM), la cual tiene la ventaja de tener una preparación de las muestras más sencilla, un menor costo de mantenimiento del equipo y no se requiere personal especializado para su manipulación en comparación con otras técnicas microscópicas más avanzadas como es el caso de la microscopia confocal láser (CLSM) (82).

##### **1.7.4.1. Procesamiento digital de imágenes**

Una imagen en escala de grises se puede asociar a una función bidimensional inyectiva, donde  $x$  e  $y$  son las coordenadas del plano de la imagen y  $z$  es el nivel de gris o intensidad. Cuando se requiere digitalizar la imagen, dicha función se restringe al campo de los números naturales, las coordenadas del plano de la imagen ahora se llaman *píxel* (acrónimo del inglés *picture element*: "elemento de imagen") y los niveles de grises están codificados por números enteros. Una imagen digital en escala de grises no es más que una dupla de números enteros donde el valor máximo que toma cada índice se conoce como resolución en *píxeles* (83). Una imagen color se puede formar por la unión de duplas de grises donde ahora cada nivel de gris es reemplazado por un nivel de color.

Las cámaras digitales modernas usan una electrónica fotosensible (CCD), que graban niveles de brillo en una base por *píxel*. En la mayoría de las cámaras digitales, el CCD está cubierto con un filtro coloreado, teniendo regiones color rojo, verde y azul organizadas en un mosaico. De esta forma, cada *píxel* sensor puede grabar el brillo de un solo color primario. La cámara

interpola la información de color de los *píxeles* vecinos para crear la imagen final.

Langton y Hermansson demostraron que el análisis de imágenes proporciona una herramienta para la caracterización de los geles proteicos y la información brindada por este estudio permite comprender cómo se construye el entramado del gel y como este entramado se ve afectado por las condiciones de elaboración empleadas (84). El análisis textural de imágenes se ha aplicado en gran medida en la industria alimenticia para la evaluación de la calidad e inspección del producto obtenido (85, 86).

#### **1.7.5. Superficie de respuesta. Métodos y diseños experimentales**

La metodología de superficies de respuesta (RSM) es un conjunto de técnicas matemáticas utilizadas en el tratamiento de problemas en los que una respuesta de interés está influida por varios factores de carácter cuantitativo. El propósito inicial de estas técnicas es diseñar un experimento que proporcione valores razonables de la variable respuesta y, a continuación, determinar el modelo matemático que mejor se ajusta a los datos obtenidos. El objetivo final es establecer los valores de los factores que optimizan el valor de la variable respuesta.

Cuando decimos que el valor real esperado,  $\eta$ , que toma la variable de interés considerada está influido por los niveles de  $k$  factores cuantitativos,  $X_1, X_2, \dots, X_k$ , esto significa que existe alguna función de  $X_1, X_2, \dots, X_k$  (que se supone continua en  $X_i, \forall i = 1, \dots, k$ ) que proporciona el correspondiente valor de  $\eta$  para alguna combinación dada de niveles:

$$\eta = f(X_1, X_2, \dots, X_k)$$

de tal forma que la variable respuesta puede expresarse como:

$$Y = \eta + \varepsilon = f(X_1, X_2, \dots, X_k) + \varepsilon$$

donde  $\varepsilon$  es el error observado en la respuesta.

La relación  $\eta = f(X_1, X_2, \dots, X_k)$  existente entre  $\eta$  y los niveles de los  $k$  factores puede representarse a través de una hipersuperficie (subconjunto de un espacio euclídeo  $(k+1)$  dimensional) a la que llamaremos “superficie de respuesta”.

Una técnica utilizada para ayudar a visualizar la forma que puede tener una superficie de respuesta tridimensional consiste en representar la gráfica de

contornos de la superficie, en la que se trazan las denominadas líneas de contorno, que son curvas correspondientes a valores constantes de la respuesta sobre el plano  $X_1X_2$  (plano cuyos ejes coordenados vienen dados por los niveles  $X_1$  y  $X_2$  de los factores). Geométricamente, cada línea de contorno es una proyección sobre el plano  $X_1X_2$  de una sección de la superficie de respuesta al intersecar con un plano paralelo al  $X_1X_2$ . La gráfica de contornos resulta útil para estudiar los niveles de los factores en los que se da un cambio en la forma o altura de la superficie de respuesta.

La existencia de gráficas de contorno no está limitada a 3 dimensiones a pesar de que en el caso en que haya más de 3 factores de influencia no es posible la representación geométrica. No obstante, el hecho de poder representar gráficas de contorno para problemas en que haya 2 o 3 factores permite visualizar más fácilmente la situación general.

A la hora de planificar el programa de experimentación que nos va a permitir llevar a cabo el estudio acerca del efecto de los factores sobre la variable respuesta, el primer paso que debemos dar es la elección de los factores que usaremos en el experimento. Una vez determinados, el siguiente paso es seleccionar los rangos de valores de cada factor que se considerará, pues aunque en el experimento es posible explorar la región correspondiente al espacio completo de los factores de influencia o región operativa, lo más frecuente consiste en explorar únicamente una región de interés limitada, la región experimental, contenida en la región general. De este modo, durante la ejecución del experimento, sólo se utilizarán niveles de los factores correspondientes a valores que caigan en esta región, a menos que se descubra, durante el conjunto inicial de experimentos, que pueda ser necesario explorar niveles que estén más allá de los límites de la región considerada.

#### **1.7.5.1. Superficies de respuesta polinómicas. Modelos de primer y segundo orden**

La forma de la función  $f$  que determina la relación entre los factores y la variable respuesta es, en general, desconocida, por lo que el primer objetivo de la RSM consiste en establecer experimentalmente una aproximación apropiada de la función  $f$ . Para ello, se propone un modelo de ecuación, generalmente polinómico, en los  $k$  factores  $X_1, X_2, \dots, X_k$  y se selecciona un conjunto de

tratamientos sobre los que realizar las observaciones experimentales, que se utilizarán tanto para obtener estimaciones de los coeficientes en el modelo propuesto como para obtener una estimación de la variación del error experimental (para lo que es necesario tener al menos 2 observaciones por cada tratamiento). Se realizan, entonces, contrastes sobre las estimaciones de los parámetros y sobre el ajuste del modelo y si el modelo se considera adecuado, puede utilizarse como función de aproximación. En tal caso, el estudio de la superficie de respuesta se hace en términos de la superficie ajustada, pues su análisis será aproximadamente equivalente al del sistema real. Los polinomios usados más frecuentemente como funciones de aproximación son los de órdenes uno y dos.

En la construcción de modelos de superficies de respuesta, es muy común la codificación de los valores reales de los niveles de los factores, pues las distancias medidas sobre los ejes de las variables codificadas en el espacio  $k$ -dimensional se convierten en estándar, lo que facilita considerablemente los cálculos que deben llevarse a cabo para obtener el modelo de aproximación e incrementa el ajuste en la estimación de los coeficientes. Las fórmulas empleadas para la codificación dan lugar a transformaciones biyectivas entre variables reales y codificadas, de manera que cualquier ecuación polinómica en los valores de  $x_i$  se puede expresar equivalentemente como una ecuación polinómica del mismo grado en los valores de  $X_i$ . Por tanto, a partir de ahora se trabajará con las variables codificadas, pues las conclusiones que se obtengan sobre éstas pueden extrapolarse a las variables reales.

**a) Modelos de primer orden:** Cuando no se tiene suficiente información acerca de la forma que presenta la superficie de respuesta, el primer intento de ajuste se hace, generalmente, aproximando a través de un modelo de primer orden.

**b) Modelos de segundo orden:** Cuando existe curvatura en la superficie de respuesta, el modelo de primer orden no es una aproximación adecuada y es necesario utilizar un modelo que ajuste mejor. Se emplea entonces un modelo de segundo orden.



### 1.7.5.2. Diseños de superficies de respuesta

La elección de un adecuado diseño del experimento es fundamental para modelar y explorar la superficie de respuesta usada para ajustar un modelo polinómico al conjunto de datos recogidos en los puntos de dicho diseño. Así pues, conviene que el diseño tuviese las características que se enumeran a continuación, y dado que algunas de ellas resultan conflictivas entre sí, las que más sirvan al interés del experimento. Estas características son:

1. Generar una distribución razonable de puntos y, por tanto, de información, en toda la región de interés, pero utilizando el menor número posible de puntos experimentales.
2. Asegurar que, para cada punto  $x$ , el valor ajustado,  $\hat{Y}(x)$ , está tan cerca como sea posible del valor real,  $Y(x)$ .
3. Permitir la detección de falta de ajuste en el modelo.
4. Permitir la ejecución de los experimentos en bloques.
5. Permitir la construcción secuencial de diseños de orden creciente.
6. Proporcionar una estimación interna de la varianza del error.
7. Asegurar simplicidad en los cálculos de las estimaciones de los parámetros del modelo.

Además de las propiedades mencionadas, sería muy conveniente que el diseño elegido fuera ortogonal y/o invariante por rotación. Un diseño ortogonal es aquel en el que los términos del modelo ajustado son incorrelados y, por tanto, también las estimaciones de los parámetros lo son, en cuyo caso, la varianza de la respuesta esperada en cualquier punto de la región experimental se puede expresar como la suma ponderada de las varianzas de los parámetros estimados del modelo. Por otro lado, en un diseño invariante por rotación, la varianza de  $\hat{Y}(x)$ , que depende de la situación del punto  $x$ , es función únicamente de la distancia del punto al centro del diseño, lo que significa que es la misma en todos los puntos equidistantes del centro del diseño. Teniendo en cuenta que el objetivo de la RSM es la optimización de la respuesta y que se desconoce la localización del óptimo antes de ejecutar el experimento, esta propiedad resulta muy interesante, puesto que garantiza que el diseño proporciona estimaciones igualmente precisas en todas las direcciones.

Los diseños considerados con el propósito de recoger datos para ajustar un modelo de primer orden se conocen como “diseños de primer orden”. Consideraremos únicamente aquellos diseños de primer orden que son ortogonales y, en particular, los diseños factoriales  $2^k$  y las fracciones de diseños factoriales  $2^k$ .

**a) Diseños factoriales  $2^k$ :** para cada factor se consideran dos niveles, que pueden codificarse en los valores +1 (para el más alto) y -1 (para el más bajo). Considerando todas las posibles combinaciones de los niveles de los  $k$  factores, se obtiene una matriz de diseño de  $2^k$  filas, cada una de las cuales representa un tratamiento. Los diseños factoriales  $2^k$  presentan el inconveniente de que, salvo que se repitan algunas observaciones, no permiten la estimación del error experimental. Una técnica habitual para incluir repeticiones consiste en aumentar el diseño con algunas observaciones en el centro, pues esto no influye sobre las estimaciones de los parámetros y no altera la ortogonalidad del diseño, aunque como resultado, la estimación del error experimental es la media de todas las observaciones.

**b) Fracciones de diseños factoriales  $2^k$ :** Estamos considerando los diseños factoriales  $2^k$  para ajustar los modelos de primer orden, pero si se recogen datos en todos los puntos es posible estimar todos los coeficientes de un modelo en el que los términos adicionales de mayor orden están asociados con las interacciones entre los factores. De esta manera, el número de puntos del diseño, y por tanto, el número de observaciones, junto con el número de posibles términos del modelo con parámetros estimables, se incrementan rápidamente a medida que aumenta el número  $k$  de factores. Así pues, hay que valorar, en función del coste del experimento, si para ajustar un modelo de primer orden es necesario llevar a cabo las  $2^k$  combinaciones, o si es más conveniente omitir algunas utilizando únicamente un subconjunto de los puntos de un diseño factorial  $2^k$ . Se puede considerar en este último caso una fracción  $2^{-m}$  de un diseño  $2^k$  que consiste en  $2^{k-m}$  tratamientos ( $k \geq m$ ), siempre y cuando el diseño resultante tenga, al menos,  $k+1$  puntos, que es el número de parámetros que han de estimarse y mantenga las mismas propiedades que las del factorial completo, en particular, sea ortogonal.

Los diseños utilizados para recoger observaciones que permitan estimar los parámetros de los modelos de segundo orden se denominan “diseños de

segundo orden". Éstos deben tener, al menos,  $(k+1)(k+2)/2$  puntos, que es precisamente el número de coeficientes del modelo que se necesita estimar y deben involucrar, como mínimo 3 factores, dado que el modelo contiene términos cuadráticos puros. Por otro lado, sería conveniente que fueran ortogonales y/o invariantes por rotación. Así pues, se van a considerar los diseños factoriales  $3^k$ , que son ortogonales, pero no invariantes por rotación, y los diseños compuestos centrales, que verifican ambas propiedades.

**a) Diseños factoriales  $3^k$ :** cada uno de los  $k$  factores presenta 3 niveles, de manera que el número de observaciones experimentales es  $N = 3^k$ . Este número puede hacerse excesivamente grande, especialmente cuando se están estudiando muchos factores, de manera que en ocasiones conviene más considerar diseños fraccionales  $3^{k-m}$  de los diseños factoriales  $3^k$ . Estos diseños presentan el inconveniente de que, aunque son ortogonales, no son invariantes por rotación, lo que hace que no sean muy buena elección como diseños de superficies de respuesta de segundo orden.

**b) Diseños compuestos centrales:** se presentan como una alternativa a los diseños factoriales  $3^k$ . Consisten en:

- \* Una parte factorial: un diseño factorial  $2^k$ , completo o fraccional, en el que los niveles están codificados en la forma habitual como  $\pm 1$ ,
- \*  $n_0$  ( $\geq 1$ ) puntos centrales,
- \* Una parte axial: dos puntos axiales en los ejes correspondientes a cada uno de los factores, situados a una distancia  $\alpha$  del centro del diseño.

De manera que el número total de puntos del diseño es  $N = 2^k + 2k + n_0$ .

Una propiedad muy interesante de los diseños centrales compuestos es que se pueden construir a partir de un diseño de primer orden (el  $2^k$ ) sin más que agregar los puntos axiales y quizá algunos puntos centrales. Por todas las propiedades que verifican, los diseños compuestos centrales son posiblemente los más utilizados para ajustar superficies de respuesta de segundo orden (87, 88, 89).

### **1.8. Obtención de péptidos bioactivos a partir de la hidrólisis enzimática del NaCAS. Utilización de proteasas neutras. Incorporación de valor agregado a productos lácteos**

Las proteínas de la dieta aportan los aminoácidos necesarios para el desarrollo y mantenimiento de células y tejidos de nuestro organismo. Como consecuencia de la digestión proteica, además de aminoácidos libres, se liberan péptidos, que son cadenas lineales con distinto número de aminoácidos. En los últimos años existe un creciente interés por determinados fragmentos específicos de las proteínas que tienen una actividad biológica que regula diferentes procesos fisiológicos, además de su alto valor nutricional. La literatura científica evidencia que estos péptidos bioactivos pueden atravesar el epitelio intestinal y llegar a tejidos periféricos vía circulación sistémica, pudiendo ejercer funciones específicas a nivel local, tracto gastrointestinal, y a nivel sistémico. Dentro de estas actividades, los péptidos bioactivos podrían alterar el metabolismo celular y actuar como vaso-reguladores, factores de crecimiento, inductores hormonales y neurotransmisores (90, 91).

La hidrólisis de proteínas lácteas ofrece grandes posibilidades. Durante la misma, las proteínas son clivadas en péptidos de diferentes tamaños y aminoácidos libres, a través de hidrólisis química o enzimática. La última, bajo condiciones suaves de pH (6-8) y temperatura (40-60°C), puede llevar al desarrollo de componentes nutricionales bioactivos y con propiedades funcionales optimizadas. La hidrólisis tiene como objetivos mejorar la estabilidad térmica, reducir la alergenicidad, producir péptidos bioactivos, modelar cantidad y tamaño de los péptidos para dietas especiales, alterar propiedades funcionales de gelación, emulsificación y formación de espumas (19, 92).

La sustitución de antioxidantes sintéticos por naturales está ganando interés no solo por las preferencias de los consumidores sino también por los efectos sobre la salud asociados con el uso de aditivos artificiales a los alimentos. El empleo de hidrolizados proteicos en productos alimentarios presenta ventajas sobre otros antioxidantes, porque además de conferir propiedades nutricionales y funcionales, al ser péptidos de pequeño tamaño pueden ser mejor absorbidos en el tracto intestinal que moléculas de mayor tamaño (93, 94). Particularmente, los hidrolizados de proteínas lácteas pueden ser empleados

como antioxidantes naturales ya que, por un lado previenen reacciones de oxidación que generan deterioro en la calidad del alimento, y por otro mejoran las propiedades antioxidantes de alimentos funcionales, limitando la liberación de radicales libres que dañan el cuerpo (95, 96, 97).

Existe, por tanto un enorme potencial para el uso de hidrolizados de proteínas lácteas, apuntando al desarrollo de nuevos productos o ingredientes alimentarios (98).

Actualmente, el concepto de alimento funcional ha adquirido gran importancia. El mismo expresa implícitamente que los alimentos y los componentes alimentarios pueden ejercer una influencia beneficiosa sobre las funciones fisiológicas al mejorar el estado de bienestar y salud, y reducir el riesgo de enfermedad. Para ser considerado funcional, el alimento debe cumplir alguna de las siguientes condiciones: que se le haya añadido un componente beneficioso, con un efecto terapéutico probado, que se le haya potenciado algún ingrediente para hacerlo más saludable o que se le haya quitado total o parcialmente algún elemento nocivo o tóxico. Al mismo tiempo, los productos obtenidos deben conservar el sabor y la consistencia del alimento tradicional (99).

Enzimas proteolíticas producidas por especies del género *Bacillus* pueden ser utilizadas para hidrolizar proteínas en sistemas alimentarios. Estas proteasas neutras generan menos amargor en hidrolizados de proteínas alimentarias que las proteasas ácidas, por lo tanto, son de interés para la industria de alimentos. Su baja termotolerancia es ventajosa para el control de su reactividad durante la producción de hidrolizados (100).

Hoy en día, existen diferentes fórmulas nutricionales que contienen péptidos, pero el tipo y cantidad de los mismos varía de unas a otras dependiendo de la fuente proteica utilizada (CN, lactoalbúmina, soja, carne) y del grado y tipo de hidrólisis enzimática empleada.

## **OBJETIVOS**

**Objetivo General:** Estudiar la formación de geles de caseinato de sodio (NaCAS) por acidificación y evaluar las modificaciones que dichos geles sufren en presencia de pequeños cosolutos, polisacáridos y/o hidrolizados proteicos a través de ensayos funcionales y estructurales, variando la composición del sistema y las condiciones de proceso.

### **Objetivos Específicos:**

- Estudiar los cambios conformacionales del NaCAS en solución frente a la presencia de pequeños cosolutos de interés para la industria alimentaria: iones calcio, sacarosa, lactosa, glicerol. Evaluar la formación de agregados y/o geles de NaCAS por acidificación, en ausencia o en presencia de dichos cosolutos.
- Analizar la interacción entre NaCAS y diferentes polisacáridos (CMC, GG y GX) y evaluar las modificaciones que dichos carbohidratos introducen en la cinética de formación de agregados y/o geles ácidos y en las propiedades reológicas y de microestructura de los mismos.
- Investigar las características fisicoquímicas, capacidad de agregación y/o gelación y bioactividad de hidrolizados de NaCAS obtenidos por acción enzimática de proteasas neutras de origen bacteriano. Evaluar cambios en el proceso de agregación y gelación ácida del NaCAS en presencia de dichos hidrolizados.

# MATERIALES Y MÉTODOS



## CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. MATERIALES Y PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

#### 2.1.1. Soluciones de NaCAS

Las soluciones madre de NaCAS se prepararon a partir de la muestra sólida comercial (Sigma Co.) en agua o *buffer*, a temperatura (T) ambiente. A todas las soluciones, luego de medir su concentración proteica, se les agregó azida sódica ( $\text{NaN}_3$ ), como preservante microbiano, en una concentración 0,01-0,02%  $\text{P}/\text{V}$  y se almacenaron en la oscuridad a 4°C.

#### 2.1.2. Soluciones de ANS

El ANS, como sal de amonio (Sigma Co.), fue usado sin más purificación. Para las experiencias espectrofluorimétricas se preparó una solución acuosa madre 6mM que se almacenó en la oscuridad a 4°C. Su concentración fue determinada por medidas de absorbancia (A) utilizando un coeficiente de absortividad molar ( $\epsilon$ ) de  $4950\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  a 350nm y se realizaron espectros de emisión del marcador excitando a 350nm en ausencia y presencia de la proteína.

#### 2.1.3. Soluciones de polisacáridos

Las soluciones madre de los polisacáridos (CMC, GG, GX) se prepararon a partir de la muestra sólida comercial (Sigma Co.) en agua o *buffer*, a T ambiente y se almacenaron en la oscuridad a 4°C (solución de CMC) o a T ambiente (soluciones de GG y GX).

#### 2.1.4. Buffers o soluciones reguladoras

La composición de las soluciones reguladoras o tampón (*buffers*) dependió de la experiencia a realizar. A continuación se detalla la composición de los principales *buffers* utilizados en el presente trabajo de Tesis:

- *Buffer* para preparación de muestras para electroforesis (*Sample buffer*): Tris-HCl 0,06M pH 6,80; dodecil sulfato de sodio (SDS) 2%  $\text{V}/\text{V}$ , glicerol 20%  $\text{V}/\text{V}$  y azul de Bromofenol o Coomassie brillant blue R250 0,01%  $\text{V}/\text{V}$ , con o sin  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ ME) al 1%  $\text{V}/\text{V}$ , con o sin urea 6M.



- *Buffer* para la obtención de las enzimas proteolíticas y preparación de los hidrolizados proteicos: Tris-HCl 20mM pH 8,00.
- *Buffer* empleado en los ensayos de estabilidad térmica e incompatibilidad termodinámica: Tris-HCl 10mM pH 6,80.
- *Buffers* empleados en los ensayos de solubilidad: Tris 500mM pH 8,00; fosfato 500mM pH 6,00; Imidazol 500mM pH 7,00 y ácido acético/acetato (Hac/Ac<sup>-</sup>) 500mM pH 4,00.

El pH en todos los casos se ajustó con agregados convenientes de soluciones de NaOH 0,1M y/o HCl 0,1M. La calibración del electrodo se efectuó con soluciones reguladoras comerciales (EM Science) de pH 4,00 y 7,00, teniendo en cuenta la T de trabajo.

### 2.1.5. Muestras, soluciones y geles para electroforesis

Se prepararon soluciones acuosas madre de acrilamida conteniendo 30% <sup>P</sup>/<sub>V</sub> de acrilamida y 0,8% <sup>P</sup>/<sub>V</sub> de N,N'-metilén-bisacrilamida (bisacrilamida), de *buffers* Tris-HCl 1,5M pH 8,80 y 0,5M pH 6,80, de *buffer* de corrida con Tris 0,025M, glicina 0,192M, SDS 0,100% <sup>P</sup>/<sub>V</sub> y pH 8,30, del colorante conteniendo 0,1% <sup>P</sup>/<sub>V</sub> de azul brillante de Coomassie R250, 45% <sup>V</sup>/<sub>V</sub> de metanol y 10% <sup>V</sup>/<sub>V</sub> de HAc. En algunos casos se agregó urea sólida hasta una concentración final de 6M.

Las muestras conteniendo una concentración de proteína entre 0,25 y 1 <sup>µg</sup>/<sub>µL</sub> se disolvieron en 1mL de *Sample buffer*. En algunos casos se les adicionó 10% <sup>V</sup>/<sub>V</sub> de βME como agente reductor. Las muestras permanecieron en baño a ebullición durante 2min.

El gel de corrida estuvo compuesto de acrilamida al 11,68% <sup>V</sup>/<sub>V</sub> y bisacrilamida 0,32% <sup>V</sup>/<sub>V</sub> solubilizadas ambas en *buffer* Tris-HCl 1,5M pH 8,80, conteniendo SDS 0,1% <sup>V</sup>/<sub>V</sub>. El gel de concentración contenía acrilamida al 3,8% <sup>V</sup>/<sub>V</sub>, bisacrilamida 0,2% <sup>V</sup>/<sub>V</sub> solubilizadas ambas en *buffer* Tris-HCl 0,5M pH 6,80, conteniendo SDS 0,1% <sup>V</sup>/<sub>V</sub>. La reacción de polimerización fue iniciada por el agregado de 50µL de persulfato de amonio (preparado en el momento) y 5µL de N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED).

### 2.1.6. Reactivos químicos utilizados

Las drogas utilizadas en este trabajo fueron, en la mayoría de los casos, de calidad pro-análisis. Las más utilizadas fueron: cloruro de calcio y azida sódica (Mallinckrodt Chemical); sulfato de amonio, persulfato de amonio, persulfato de potasio, urea, ácido clorhídrico (HCl), hidróxido de sodio (NaOH), ácido acético (HAc) glacial, alcohol metílico, EDTA, sacarosa y lactosa monohidrato (Ceccarelli); glucono- $\delta$ -lactona (GDL), glicina, carboximetilcelulosa, goma guar, goma xantana, ácido tricloroacético, acrilamida, bisacrilamida, 2,4,6-trinitrobenceno sulfónico (TNBS) (Sigma Co.); etanol y metanol (Biopak); TRIS, SDS, imidazol y glicerol (Merck); azul de bromofenol (Anedra),  $\beta$ -mercaptoetanol y TEMED (BDH Chemicals); azul brillante de Coomassie R250 (Fluka). Además de utilizaron ácido 2,2'-azino-bis-(3-etil-benzotiazolona-6-ácido sulfónico) o ABTS, Trolox, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil o DPPH<sup>\*</sup>, 1,1,3,3-tetrametoxipropano, ferricianato de potasio, cloruro férrico (FeCl<sub>3</sub>), sulfato ferroso (FeSO<sub>4</sub>), 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazina (ferrozina), agar, ácido tiobarbitúrico (TBA) y Butil-hidroxitolueno (BHT) en los ensayos de bioactividad. En general, se prepararon soluciones madre de cada una de las drogas y, cuando fue necesario, se las valoró antes de utilizarlas.

Las proteínas que se utilizaron para la preparación de soluciones testigo fueron NaCAS,  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha_{S1}$ -CN,  $\beta$ -CN,  $\kappa$ -CN, albúmina sérica de origen bovino, pepsina porcina, y marcador de bajos pesos moleculares, adquiridos en Sigma Co.

## 2.2. EQUIPOS UTILIZADOS

### 2.2.1. Medidas espectroscópicas

Las medidas espectrofotométricas, en el espectro ultravioleta (UV) y visible (V), se realizaron en los espectrofotómetros Spekol 1200 y Jasco V-550, ambos equipados con portacubetas termostatizables. Las medidas consistieron en la obtención de espectros de absorción, lecturas de A a una longitud de onda ( $\lambda$ ) fija, y curvas cinéticas a  $\lambda$  fija y variable. Las medidas de turbidez ( $\tau$ ) se efectuaron como medidas de A en un rango de 450 a 650nm, en donde no se produce absorción por parte de cromóforos proteicos, sin necesidad de

corregir dichas mediciones por el efecto de la luz dispersada a pequeños ángulos, debido a que las partículas estudiadas son comparables en tamaño con la  $\lambda$ , lo que implica diferencias mínimas entre las medidas de  $\tau$  y  $A$  (101). Además se realizaron ensayos de estabilidad y solubilidad de las mezclas NaCAS/CMC, NaCAS/GG y NaCAS/GX, mediante la realización de espectros de absorción a diferentes pH y temperaturas.

Las medidas espectrofluorimétricas se hicieron en un espectrofluorómetro Aminco-Bowman Series 2 equipado con portacelda termostatizable. Las medidas consistieron en la obtención de espectros de excitación y emisión de la fluorescencia y lecturas de intensidad relativa de la fluorescencia (IF) a una dada longitud de onda de excitación ( $\lambda_{exc}$ ).

Las medidas del tamaño medio de partículas y la distribución de tamaño de las mismas fueron realizadas a través de medidas de dispersión dinámica de la luz (DLS) y de difracción láser (LALLS). Los ensayos de DLS fueron realizados en un equipo Brookhaven Modelo 9863 con láser He-Ne como fuente de luz coherente a una  $\lambda$  de 632,8nm y poder máximo de 15mV, termostatizable (Experiencia realizada durante una estadía en el Instituto de Química, Universidade Federal do Río Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil); la intensidad de la luz dispersada fue medida a un ángulo de 90°. Los diámetros hidrodinámicos fueron calculados utilizando el software BI9000AT. Para los estudios de difracción láser se utilizó un Mastersizer 2000 Modelo HYDRO 2000 MU, con un láser He-Ne como fuente de luz coherente a una  $\lambda$  de 630nm (Experiencia realizada durante una pasantía en el Laboratorio de Investigación en Funcionalidad y Tecnología de Alimentos, LIFTA, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, UNQ, Bernal, Buenos Aires, Argentina).

### **2.2.2. Medidas potenciométricas**

Las medidas de pH se realizaron utilizando un pHmetro digital Horiba D24, equipado con un electrodo de membrana de vidrio selectivo a protones combinado con un electrodo de referencia de calomel saturado.

### **2.2.3. Medidas reológicas**

Las determinaciones de los módulos de elasticidad o elástico ( $G'$ ) y de almacenamiento o viscoso ( $G''$ ) se efectuaron en un Reómetro de Tensión Controlada AR-G2, de Texas Instruments (Brookfield Engineering Laboratories), usando una geometría de cono (diámetro: 40mm, ángulo de cono:  $2^\circ$ , cono de truncación: 55mm) y un sistema de control de temperatura con un baño de recirculación (Julabo modelo ACW 100) conectado a un plato Peltier (Experiencia realizada durante varias pasantías en el Laboratorio de Investigación en Funcionalidad y Tecnología de Alimentos, LIFTA, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, UNQ, Bernal, Buenos Aires, Argentina).

Las mediciones de viscosidad dinámica fueron realizadas en un viscosímetro Brookfield LV Master (LVDV-III) termostatzado y con geometría cónica (CP-42).

Algunas medidas de viscosidad dinámica se obtuvieron basándose en la ley de Poiseuille y utilizando un viscosímetro de Ostwald para medir los tiempos de escurrimiento y un densímetro digital Anton Paar GmbH para determinar las densidades de las soluciones.

### **2.2.4. Microscopía óptica convencional**

Para la obtención de las imágenes digitales de los geles ácidos se utilizó un microscopio invertido (Union Optical) al cual se le acopló una cámara fotográfica digital (Canon Powershot A640). Todas las imágenes digitales obtenidas fueron almacenadas para su posterior análisis.

### **2.2.5. Equipos de apoyo**

Se utilizaron baños termostáticos, baños de circulación de agua, bombas de vacío, centrífugas, agitadores magnéticos (Jonomex y Hanna HI 190 M), cronómetros digitales, equipo para electroforesis (Mini-PROTEAN 3 Cell, BIO-RAD), rectificador y fuente de poder estabilizada (Chemar S.A.C.I.F. CHF 1.4.), micropipetas (Oxford, BOECO 921, V3-series High Tech. Lab., Wheaton 851303 y Hamilton 171 ORN), ultracentrífuga refrigerada Sigma 3-18K.

## 2.3. MÉTODOS

### 2.3.1. Determinación de la concentración de CN utilizando el método de Kuaye

La concentración de CN en las distintas soluciones de NaCAS fue determinada por el método espectrofotométrico propuesto por Kuaye (102), el cual se basa en la modificación del espectro del aminoácido tirosina a altas  $\lambda$  de la región UV en un medio alcalino fuerte (pH = 13).

En la región entre 248 y 256nm, la A es una función lineal de la  $\lambda$  y la pendiente es directamente proporcional a la concentración proteica según:

$$[\text{CN}] \left( \frac{\text{g}}{\text{L}} \right) = \frac{(A_M^{248} - A_M^{256})(\text{factor diluc.})_M}{(A_T^{248} - A_T^{256})(\text{factor diluc.})_T} \quad (2.1)$$

donde los supraíndices representan las  $\lambda$  a las cuales se mide la A y los subíndices señalan si se trata de la muestra (M) o del testigo (T). Esta formulación es válida para los casos donde la relación lípidos/proteínas  $\leq 0,05$ .

El testigo empleado debe contener 1  $\text{g/L}$  de proteínas en total y respetar las proporciones de los constituyentes de la muestra a medir.

#### **Técnica operatoria:**

Se realizaron diluciones de las soluciones de NaCAS o hidrolizados en NaOH 0,25M: 1/2,5  $\text{V/V}$ , 1/10  $\text{V/V}$ , 1/20  $\text{V/V}$  y 1/50  $\text{V/V}$  para el NaCAS o los hidrolizados y 1/5  $\text{V/V}$  para el testigo. Se registró la A de dichas diluciones a 248 y 256nm y luego se aplicó la relación 2.1.

### 2.3.2. Determinación de la viscosidad del medio ( $\eta$ )

Debido a que el proceso de agregación está limitado por difusión, y que esta última depende de la  $\eta$  es importante determinar como se verá afectada la misma por la presencia de los cosolutos y los polisacáridos empleados. Para la determinación de la  $\eta$  de las soluciones acuosas de polisacáridos (CMC, GG, GX) se utilizó un viscosímetro rotatorio Brookfield LV Master (LVDV-III) con geometría cono/plato, termostatizado.

Para el caso de las soluciones acuosas de pequeños cosolutos (Sac, Lac, Gli) se empleó un viscosímetro capilar de Ostwald. Según la ley de Poiseuille:

$$\eta = \frac{\pi h g \rho r^4 t_e}{8 L V} \quad (2.2)$$

donde  $h$  es la altura media de la columna de líquido,  $\rho$  es la densidad de la solución,  $r$  es el radio del capilar,  $t_e$  es el tiempo que tarda en pasar el líquido desde un enrasedo a otro (tiempo de escurrimiento),  $L$  es la longitud del capilar y  $V$  es el volumen del líquido.

Para el solvente puro, en nuestro caso agua, se cumplirá:

$$\eta_0 = \frac{\pi h g \rho_0 r^4 t_0}{8 L V} \quad (2.3)$$

siendo  $\rho_0$  y  $t_0$  la densidad y el tiempo de escurrimiento del agua respectivamente.

Definiendo a la viscosidad relativa ( $\eta_r$ ) como el cociente entre  $\eta$  y  $\eta_0$ , y teniendo en cuenta las relaciones 2.2 y 2.3, se puede expresar:

$$\eta_r = \frac{t_e \rho_e}{t_0 \rho_0} \quad (2.4)$$

### **Técnica operatoria:**

Se midió la  $\eta$  de cada una de las soluciones de polisacárido colocando 1 mL de la muestra en el viscosímetro rotatorio, termostatzado a la T de trabajo (35°C) y a una velocidad de corte de 3rpm. Se determinó la  $\eta_r$  producida por el agregado del polisacárido CMC (0 - 0,75% P/P), GG (0 - 0,45% P/P) o GX (0 - 0,30% P/P). Por otro lado, se midieron  $t_0$  y  $t_e$  colocando 10 mL de la muestra en un viscosímetro de Ostwald de 75 mm de diámetro de capilar, sumergido en un baño de agua termostatzado. Se determinó la variación de  $\eta_r$  producida por el agregado de Sac, Lac o Gli (0 - 2,0% P/V). Las medidas de densidad se realizaron con un densímetro digital.

### 2.3.3. Estudios espectrofluorimétricos

#### 2.3.3.1. Evaluación de los cambios estructurales del NaCAS en ausencia y presencia de cosolutos, polisacáridos e hidrolizados

Con el objeto de detectar corrimientos de las bandas espectrales y/o cambios en la IF del NaCAS durante la agregación ácida inducida por GDL, se realizaron espectros de excitación y de emisión de la fluorescencia intrínseca proteica, antes y en los primeros instantes de adicionada la GDL. Además, para detectar posibles cambios estructurales de la proteína en presencia de pequeños cosolutos (Sac, Lac, Gli, Ca<sup>2+</sup>) y/o polisacáridos (CMC, GG, GX), se realizaron espectros de excitación y de emisión de la fluorescencia intrínseca proteica en ausencia y presencia de los mismos. Por otra parte, se evaluó el comportamiento espectral de las endopeptidasas P45 y P7, así como de los hidrolizados de NaCAS obtenidos por la acción proteolítica de dichas enzimas.

Las  $\lambda_{exc}$  y  $\lambda_{em}$ , y el rango de concentración en el cual el efecto de filtro interno resultó despreciable, fueron determinadas para los sistemas en estudio.

Debido al efecto de filtro interno presente en las suspensiones a causa de la turbidez de las mismas, todos los valores de IF fueron corregidos aplicando la siguiente relación (103):

$$IF_{corr} = IF_{obs} 10^{0,5(A_{exc} + A_{em})} \quad (2.5)$$

donde  $IF_{corr}$  es el valor corregido de la IF y  $IF_{obs}$  es la correspondiente a la IF medida experimentalmente,  $A_{exc}$  y  $A_{em}$  se corresponden con las  $\lambda_{exc}$  y  $\lambda_{em}$  respectivamente.

#### **Técnica operatoria:**

Las muestras (3mL) para las determinaciones espectrales o las medidas de IF fueron transferidas a cubetas de fluorescencia de cuarzo de 1cm de paso óptico y éstas colocadas en un portacubetas termostatizable capaz de mantener la T de trabajo deseada. Las concentraciones empleadas variaron según la muestra a ensayar.

### 2.3.3.2. Determinación de la hidrofobicidad superficial ( $S_0$ )

La  $S_0$  de las diferentes muestras estudiadas fue estimada de acuerdo al método de Kato y Nakai, utilizando ANS como marcador fluorescente hidrofóbico (70, 75).

#### **Técnica operatoria:**

Previamente, se realizaron espectros de excitación y emisión de fluorescencia del ANS, el NaCAS (sólo y en presencia de pequeños cosolutos y/o polisacáridos) y de la mezcla de los anteriores, para determinar las  $\lambda_{exc}$  y  $\lambda_{em}$ .

La IF de las muestras conteniendo 3mL de ANS 0,04 mM y agregados consecutivos de NaCAS 0,1%  $P/P$  o de la mezcla NaCAS/cosolutos ( $IF_b$ ), como también la IF en ausencia del marcador a la misma concentración proteica ( $IF_p$ ), fueron medidos, usando las  $\lambda_{exc}$  y  $\lambda_{em}$  determinadas en el paso anterior, a T constante.

Aplicando el mismo protocolo de trabajo, se determinó la  $S_0$  de los hidrolizados proteicos obtenidos por acción de las dos enzimas proteolíticas (P45 y P7).

La IF neta ( $\Delta F$ ) fue calculada como la diferencia entre  $IF_b$  e  $IF_p$ , y la  $S_0$  fue determinada como la pendiente inicial de la curva obtenida al graficar  $\Delta F$  versus concentración de NaCAS en %  $P/P$ .

### 2.3.4. Ensayo de solubilidad del NaCAS en ausencia y presencia de polisacáridos

Con el objetivo de evaluar la solubilidad del NaCAS frente a cambios de pH y estudiar el efecto que los polisacáridos (CMC, GG y GX) ejercen sobre la misma, se realizaron titulaciones potenciométricas por adición de alícuotas de 20-50 $\mu$ L de HCl 1M sobre la solución proteica, en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de polisacárido.

#### **Técnica operatoria:**

Se midió la A a 650nm de los sistemas cada vez que variaba el pH. El pH inicial de las diferentes mezclas fue siempre 6,00; lo cual se consiguió por



disolución en una mezcla *buffer* Tris, fosfato, Imidazol y HAc/Ac<sup>-</sup> 25mM. La concentración proteica en todos los casos fue 0,02% <sup>P/P</sup> y la de los polisacáridos varió en relación proteína:polisacárido según: 8:1, 6:1, 4:1, 2:1, 1:1 y 1:1,5. Además se evaluó la solubilidad de los polisacáridos (0,02% <sup>P/P</sup>), en ausencia de la proteína. La T de trabajo se mantuvo constante a 25°C.

### **2.3.5. Estudio de la estabilidad térmica del NaCAS en ausencia y presencia de polisacáridos**

Para poder evaluar la estabilidad térmica de la proteína, de los polisacáridos y de sus mezclas, se realizó el seguimiento de la variación de A a medida que se aumentó paulatinamente la T, utilizando un espectrofotómetro equipado con portacubetas termostatzable y sistema Peltier.

#### **Técnica operatoria:**

Las muestras fueron preparadas en *buffer* Tris-HCl 10mM pH 6,80 y sometidas a calentamiento durante una hora desde 10 hasta 100°C a una velocidad de 0,5°C por minuto. A diferentes tiempos, se midió la A del sistema a 650nm. La concentración proteica fue 0,02% <sup>P/P</sup> y la de los polisacáridos varió en proporción proteína:polisacárido según: 8:1, 6:1, 4:1, 2:1, 1:1 y 1:1,5. Además se evaluó la estabilidad térmica de los polisacáridos (0,02% <sup>P/P</sup>) en ausencia de la proteína.

### **2.3.6. Curva de incompatibilidad termodinámica: diagrama de fases**

El estudio de compatibilidad termodinámica se llevó a cabo mediante el método propuesto por Spyropoulos et al. que consiste en preparar mezclas acuosas de proteína y polisacárido e incubarlas un determinado tiempo a una dada T para evaluar luego la formación de sistemas monofásicos o bifásicos (104).

Aún cuando un sistema de dos biopolímeros es termodinámicamente inestable, la separación de fases puede no ser observada en el período de tiempo experimental debido a la existencia de una barrera de energía cinética asociada con la restricción del movimiento de las moléculas. Si uno o los dos biopolímeros son altamente viscosos o forman geles, la velocidad y extensión de la separación de fases puede ser severamente retardada. Es por eso que es

fundamental que las mezclas biopoliméricas se incuben un periodo de tiempo relativamente mayor que el experimental para asegurarse si hay o no separación de fases.

**Técnica operatoria:**

En primera instancia, se trabajó a una concentración fija de polisacárido y se varió la concentración proteica en un rango entre 0 y 4,0% P/P; en una segunda instancia, se colocó una determinada concentración de proteína y se varió la concentración del polisacárido en un rango entre 0 y 0,45% P/P. Se tomaron un total de dos muestras a partir de cada una de estas soluciones binarias, y se colocaron en un baño termostatzado a 35°C o 25°C (según el polisacárido empleado), durante 24 o 48 hs., en condiciones de humedad y T controlados. Luego de transcurrido este tiempo, se verificó la existencia o no de separación de fases y/o aparición de turbidez mediante una inspección visual.

Las concentraciones de proteína y polisacárido en cada una de las soluciones binarias preparadas se corresponden con un único punto en el diagrama de fases obtenido. En general, se representó mediante un símbolo vacío a las muestras que presentaron una sola fase (miscibles) y se asignó un símbolo lleno a las muestras que presentaron turbidez o separación de fases.

Este método proporciona un mapa de la transición de la región de una fase a la de dos fases y la curva de compatibilidad puede obtenerse a partir de un ajuste matemático. La ecuación utilizada corresponde a una función de decaimiento exponencial de primer orden:

$$[\text{polisacárido}] = a e^{-b[\text{NaCAS}]} \quad (2.6)$$

donde [polisacárido] y [NaCAS] son, respectivamente, las concentraciones de polisacárido y proteína.

### 2.3.7. Estado de las partículas de NaCAS en ausencia y presencia de pequeños cosolutos (Sac, Lac, Gli, Ca<sup>2+</sup>), polisacáridos (CMC, GG, GX) e hidrolizados: tamaño, estructura y composición

#### 2.3.7.1. Evaluación del tamaño medio de las partículas mediante turbidimetría

Los posibles cambios de tamaño y/o grado de compactación de las partículas de NaCAS en ausencia o presencia de pequeños cosolutos, polisacáridos e hidrolizados fueron estudiados basándose en la dependencia de la  $\tau$  con la  $\lambda$  en el rango de 450-650nm.

La relación entre el tamaño de una partícula y su habilidad para dispersar la luz es compleja y sólo se conoce para partículas de forma simple (105). Para partículas esféricas monodispersas de peso molecular M, concentración c y con índice de refracción cercano al del solvente, la  $\tau$  está dada por:

$$\tau = HcMQ \quad \text{siendo } H = \frac{32\pi^2 n_0^2 \left(\frac{\partial n_1}{\partial c}\right)^2}{3N\lambda^4} \quad (2.7)$$

donde  $n_0$  y  $n_1$  son los índices de refracción del solvente puro y la solución respectivamente, N es el número de Avogadro,  $\partial n_1/\partial c$  es el incremento específico del índice de refracción y la función de disipación Q resulta de las interferencias internas de la luz dispersada por las partículas a todos los ángulos  $\theta$  y se incorpora a la expresión cuando las partículas poseen un tamaño mayor que la  $\lambda$  incidente. Esta función Q, que depende de la forma de las partículas, se puede definir como:

$$Q = \frac{3}{8} \int_0^\pi P(q, R)(1 + \cos^2\theta) \sin\theta d\theta \quad (2.8)$$

en la que  $\theta$  es el ángulo de dispersión de la luz y P (q, R) es un factor de forma donde q es el vector de onda y R el radio de la partícula (106).

Los resultados de estudios de simulación por computadoras utilizando diferentes modelos de agregación han promovido el definir la estructura de los

agregados coloidales en términos del concepto de dimensión fractal (107). Para un objeto fractal, Q se ve modificada como sigue:

$$Q = \frac{3}{8} \int_0^\pi P(q, R) S(q) (1 + \cos^2 \theta) \sin \theta d\theta \quad (2.9)$$

siendo S(q) un factor de estructura que describe el arreglo espacial de los elementos de dispersión o monómeros dentro del agregado (108).

De la ecuación 2.7 se puede obtener la derivada:

$$\frac{\partial \log \tau}{\partial \log \lambda} = \frac{\partial \log Q}{\partial \log \lambda} + 2 \frac{\partial \log \left( n \frac{\partial n}{\partial c} \right)}{\partial \log \lambda} - 4 = \beta + \gamma - 4 \quad (2.10)$$

$\beta$ , por lo tanto, es un parámetro relacionado con el tamaño y grado de compactación de las partículas y puede ser utilizado para evaluar el estado de los agregados de NaCAS formados durante la gelación ácida inducida por el agregado de GDL.

Teniendo en cuenta que las mezclas de NaCAS/cosolutos a estudiar no son muestras monodispersas, la  $\tau$  será función del peso molecular promedio en peso ( $\overline{M}_p$ ) y del factor de disipación promedio en z ( $Q_z$ ) que dependen de la distribución de tamaños promedio:

$$\tau = H \overline{M}_p Q_z \quad (2.11)$$

A partir de esta ecuación se puede demostrar la relación directa entre  $\beta$  y el tamaño promedio en peso de las partículas de NaCAS (109).

Aceptando un valor de -0,2 para  $\gamma$ , que es el estimado para proteínas en un rango de  $\lambda$  de 400 a 800nm, se puede calcular el valor de  $\beta$  a partir de la pendiente de gráficos lineales de  $\log \tau$  vs.  $\log \lambda$  midiendo la  $\tau$  en el citado rango de  $\lambda$  a intervalos frecuentes durante el tiempo necesario para alcanzar un máximo de  $\tau$  durante la agregación del sistema (106):

$$\beta = 4,2 + \frac{\partial \log \tau}{\partial \log \lambda} \quad (2.12)$$

**Técnica operatoria:**

El valor de  $\beta$  se obtuvo teniendo en cuenta que (110):

$$\tau = b^{-1} \ln \frac{I_0}{I} \quad (2.13)$$

donde  $I_0$  e  $I$  son las intensidades de luz incidente y transmitida respectivamente y  $b$  es el camino óptico; y dado que la  $A$  se define:

$$A = \log \frac{I_0}{I} \quad (2.14)$$

la  $\tau$  queda expresada como:

$$\tau = 2,303 A b^{-1} \quad (2.15)$$

Aplicando log:

$$\log \tau = \log 2,303 + \log A - \log b \quad (2.16)$$

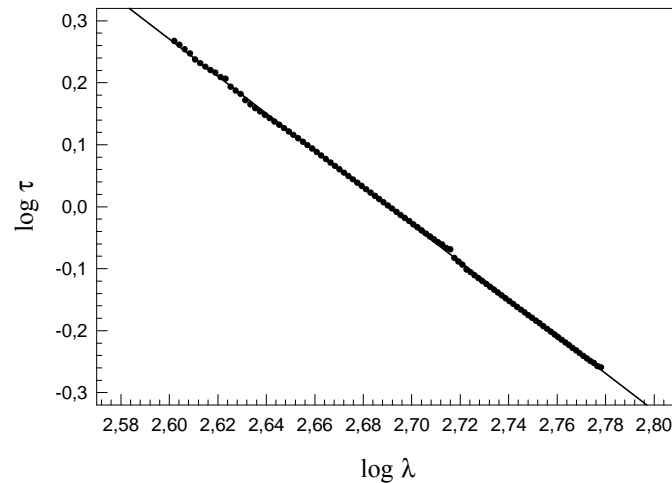
y si se deriva con respecto a  $\lambda$ :

$$\frac{\partial \log \tau}{\partial \log \lambda} = \frac{\partial \log A}{\partial \log \lambda} \quad (2.17)$$

De esta manera, el valor de  $\partial \log \tau / \partial \log \lambda$  es la pendiente de un gráfico lineal de  $\log A$  vs.  $\log \lambda$  y a partir de él se obtiene  $\beta$  según la ecuación 2.12.

Para obtener dichas medidas se colocaron 3mL de las distintas muestras de NaCAS en ausencia y presencia de los cosolutos en cubetas rectangulares de 1cm de paso óptico y se midió la  $A$  entre 450 y 650nm en un espectrofotómetro con portaceldas termostatizable. Con los valores de  $\beta$  y de  $\tau$  a 650nm ( $A_{650nm}$ ) se evaluó el estado de los agregados formados por la floculación de las partículas durante el proceso de gelación ácida inducida por GDL y los posibles cambios de los mismos frente a las distintas condiciones de trabajo.

A modo de ejemplo, la Figura 2.1 presenta un gráfico lineal de  $\log \tau$  vs.  $\log \lambda$  de los realizados en el presente trabajo.



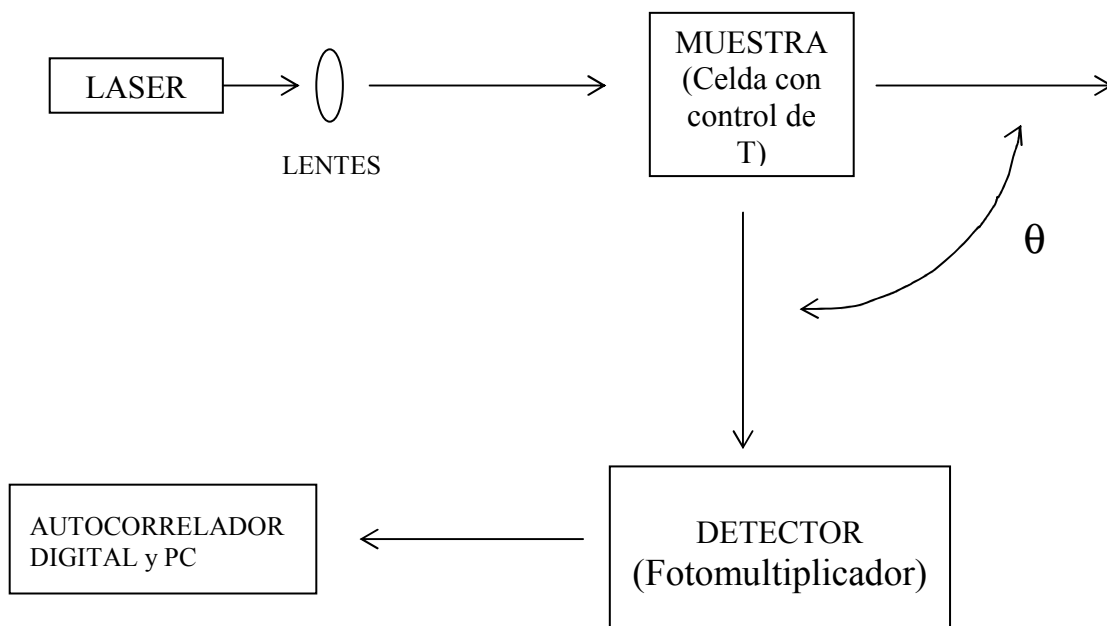
**Figura 2.1.** Ejemplo de la obtención de  $\beta$ .  $\partial \log \tau / \partial \log \lambda = -2,997 \pm 1 \times 10^{-3}$ ,  $r^2 = 0,999$ ,  $\beta = 1,203 \pm 1 \times 10^{-3}$ .

### 2.3.7.2. Distribución de tamaño de las partículas de NaCAS

Para corroborar la relación entre  $\beta$  y el tamaño medio de las partículas, se realizaron medidas de DLS. Las medidas del diámetro hidrodinámico medio y de la distribución de tamaño de las partículas (a través de medidas de LALLS) fueron realizadas tal como se detalla en la sección 2.2.1.

Los métodos de DLS o cuasielástica han alcanzado amplia difusión en la actualidad merced a la posibilidad de utilizar fuentes luminosas láser, monocromáticas, coherentes y de gran energía (espectroscopia de correlación de fotones), lo que aumenta en grado notable la posibilidad de detectar la radiación dispersada. Además, la medición es absoluta (no se requieren estándares), no invasiva (se puede recuperar la muestra), rápida y permite trabajar con partículas solvatadas (78). En la Figura 2.2 se muestra un esquema del equipo utilizado.

La interpretación de los resultados de las mediciones se apoya en las teorías clásicas de la dispersión (*scattering*), tales como las de Rayleigh o Mie, útiles según la relación tamaño de partícula / longitud de onda, y en el análisis de las fluctuaciones de intensidad de la luz dispersada provocadas por el movimiento browniano de las partículas en suspensión (111, 112, 113). Estas fluctuaciones contienen información del coeficiente de difusión traslacional ( $D_T$ ), y son más rápidas y de mayor frecuencia para partículas más pequeñas, que se mueven rápidamente, que para las más grandes (78).

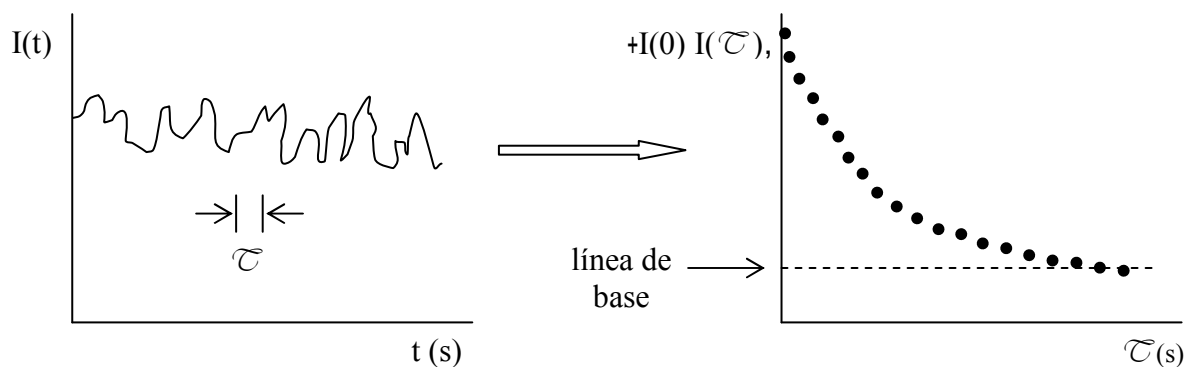


**Figura 2.2.** Esquema del equipo utilizado en la medición de tamaños de partículas mediante DLS.

Las fluctuaciones de intensidad de la luz dispersada se analizan a través de funciones de autocorrelación, las que indican como está correlacionada una variable consigo misma a dos tiempos diferentes. En este caso, la función de autocorrelación  $\langle I(0) I(\mathcal{T}) \rangle$ , se define según:

$$\langle I(0) I(\mathcal{T}) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T I(t) I(t - \mathcal{T}) dt \quad (2.18)$$

donde  $I(0)$ ,  $I(t)$  e  $I(\mathcal{T})$  son las intensidades de la luz dispersada a los tiempos 0,  $t$  y de retardo respectivamente,  $I(t - \mathcal{T})$  es la intensidad que llega al detector desplazada un espacio de tiempo ( $t$ ),  $T$  la duración del experimento e  $I$  tiene, en general, diferentes valores a  $t$  y  $t - \mathcal{T}$ . En la Figura 2.3 se puede observar como la señal recibida por el detector es transformada por dicha función.



**Figura 2.3.** Función de autocorrelación de la luz dispersada. La intensidad promedio que llega al detector elevada al cuadrado es la línea de base.

La ecuación anterior define la función de autocorrelación de una señal analógica. En la práctica, la integral se aproxima por una suma tomada sobre valores discretos de  $\mathcal{T}$ . Siendo la intensidad de la luz dispersada el número de fotones o pulsos por unidad de tiempo y definiendo  $n(t)$  como el número de pulsos entre  $t - \mathcal{T}$  y  $t$ , la función de autocorrelación de fotones (discreta)  $C_m$  es:

$$C_m = C(\mathcal{T}) = \langle n(0)n(\mathcal{T}) \rangle = \lim_{N \rightarrow \infty} \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N n_j n_{j-m} \quad m = 1, 2, 3, \dots, M' \quad (2.19)$$

$$T = N\Delta t; \quad t = j\Delta t; \quad \mathcal{T} = m\Delta t$$

donde  $N$  es el número total de muestras,  $m$  es el número de canales del autocorrelador,  $\Delta t$  es el tiempo de muestreo (del orden de los nanosegundos) y  $M'$  es proporcional al máximo retardo posible respecto a la medición  $j$ .

Para un sistema de partículas rígidas monodispersas, sin interacción entre ellas (baja concentración), Jakeman y Pike demostraron que (114, 115):

$$C(\mathcal{T}) = \langle n \rangle^2 \{1 + b \exp(-2\Gamma \mathcal{T})\} = G^{(2)}(\mathcal{T}) = G^{(2)}(\infty) \left\{1 + b |g^{(1)}(\mathcal{T})|^2\right\} \quad (2.20)$$

en la que  $G^{(2)}(\mathcal{T})$  es la función de autocorrelación discreta de la intensidad de la luz dispersada,  $\mathcal{T}$  representa el tiempo de decaimiento,  $G^{(2)}(\infty)$  es la línea de base,  $g^{(1)}(\mathcal{T})$  es la función de autocorrelación de primer orden experimental o función de autocorrelación del campo eléctrico,  $b$  es una constante asociada al área del detector y  $\Gamma$  es la constante de decaimiento del movimiento Browniano de las partículas que se expresa como:

$$\Gamma = D_T q^2 \quad ; \quad q = \frac{4\pi n_m}{\lambda_0} \sin \frac{\theta}{2} \quad (2.21)$$

siendo  $n_m$  el índice de refracción del medio y  $\lambda_0$  la longitud de onda en el vacío.

La línea de base se puede determinar experimentalmente como la intensidad promedio que llega al detector elevada al cuadrado,  $b$  y  $\Gamma$  se obtienen de la ecuación 2.20 ajustando a una exponencial la  $G^{(2)}(\mathcal{T})$  medida y  $D_T$  se calcula a partir de la ecuación 2.21. Finalmente, suponiendo partículas



esféricas, fluido Newtoniano y aplicando la ecuación de Stokes–Einstein se puede obtener el diámetro hidrodinámico  $D_T$ :

$$D_T = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (2.22)$$

en la que  $k$  es la constante de Boltzmann,  $T$  la temperatura absoluta y  $\eta$  la viscosidad del medio.

Para muestras polidispersas la interpretación de los datos es más complicada. La información sobre la distribución de tamaños promedio (DTP) debe obtenerse resolviendo un problema de deconvolución ya que la función de autocorrelación es la suma de las exponenciales de decaimiento ponderadas por la intensidad de la luz dispersada por las partículas de cada tamaño característico. Por tanto  $g^{(1)}(\mathcal{T})$  será:

$$g^{(1)}(\mathcal{T}) = \int_0^\infty G(\Gamma) \exp(-\Gamma \mathcal{T}) d\Gamma \quad (2.23)$$

donde  $G(\Gamma)$  es una distribución normalizada de los anchos de banda correspondientes a la DTP en base a la intensidad y corresponde a la fracción de intensidad dispersada por las partículas que tienen constantes de decaimiento entre  $\Gamma$  y  $d\Gamma$ .

Para obtener  $G(\Gamma)$  se utilizan algoritmos de inversión, como el método de los cumulantes (116), mediante el cual la función de correlación del campo eléctrico de primer orden pueden escribirse como la suma o distribución de exponenciales con velocidades de decaimiento proporcionales a los coeficientes de difusión de las moléculas de soluto. Para ésto  $g^{(1)}(\mathcal{T})$  se expande alrededor de un ancho de banda promedio  $\bar{\Gamma}$ :

$$\bar{\Gamma} = \frac{\sum G(\Gamma)\Gamma}{\sum G(\Gamma)} \quad (2.24)$$

A partir de la Ecuación 2.20,

$$\left\{ \frac{G^{(2)}(\mathcal{T})}{G^{(2)}(\infty)} - 1 \right\}^{1/2} = b^{1/2} g^{(1)}(\mathcal{T}) \quad (2.25)$$

se propone desarrollar en serie  $g^{(1)}(\mathcal{T})$  según:

$$\ln\left\{b^{1/2}\left|g^{(1)}(\mathcal{T})\right|\right\} = \ln(b^{1/2}) - \bar{\Gamma}\mathcal{T} + \frac{\mu_2\mathcal{T}^2}{2} - \frac{\mu_3\mathcal{T}^3}{6} + \dots \quad (2.26)$$

en la que  $\mu_2, \mu_3, \mu_i$  son los momentos o cumulantes de la distribución de anchos de banda y se expresan como:

$$\mu_i = \frac{\sum G(\Gamma)(\Gamma - \bar{\Gamma})^i}{\sum G(\Gamma)} \quad (2.27)$$

y  $\bar{\Gamma}$ , valor medio de  $G_i(\Gamma)$ , se define como:

$$\bar{\Gamma} = \bar{D}_T q^2 \quad (2.28)$$

siendo  $\bar{D}_T$  el coeficiente de difusión traslacional medio. Tanto  $\bar{\Gamma}$  como los distintos  $\mu_i$  se estiman mediante el ajuste del polinomio de la ecuación 2.26 (116).

Siendo  $S$  un tamaño característico,  $G(\Gamma)d\Gamma=X(S)dS$  y por tanto:

$$g^{(1)}(\mathcal{T}) = \int_a^b X(S)e^{-\Gamma(S)\mathcal{T}} dS \quad (2.29)$$

donde  $a$  y  $b$  son los límites inferior y superior de la DTP y  $X(S)$  es una DTP en base a intensidades que indica la proporción relativa de intensidad dispersada por partículas de tamaño  $S$ .

Es importante transformar la distribución en base a la intensidad dispersada en una en base al número de partículas. Para ello se utiliza, teniendo en cuenta que  $X(S)$  puede variar con el ángulo de dispersión, un factor de conversión  $C_1(S,\theta)$  que representa la intensidad dispersada por una partícula de tamaño  $S$  a un ángulo  $\theta$ :

$$X(S,\theta) = N(S) C_1(S,\theta) \quad (2.30)$$

expresión en la que  $N(S)$  es el número de partículas de un tamaño  $S$  característico y  $X(S,\theta)$  es la intensidad dispersada por el total de partículas de tamaño  $S$  a un ángulo  $\theta$ .

Para partículas esféricas en el régimen de Rayleigh:

$$C_1(S, \theta) = S^6 \quad (2.31)$$

y por lo tanto independiente de  $\theta$ .

Para partículas grandes  $C_1$  es mucho mayor a  $\theta$  menores, por lo tanto las mediciones a ángulos bajos resaltan la presencia de dichas partículas. En este caso se utiliza la teoría de Mie según la cual  $C_1(S, \theta)$  es función de  $\theta$ ,  $S/\lambda_0$  y  $n_m/n_p$ , siendo  $n_p$  el índice de refracción de la partícula (117).

#### **Técnica operatoria:**

Se colocaron 8mL de la muestra de NaCAS 0,5%  $P/P$  en un vaso de precipitados y se adicionó la cantidad de GDL a ensayar. Se realizaron mediciones a diferentes tiempos hasta alcanzar el valor máximo de  $\tau$  permitido por el equipo. En simultáneo, se efectuaron medidas del pH de la muestra.

#### **2.3.7.3. Caracterización de las muestras de NaCAS y los hidrolizados proteicos mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)**

El estado de las diferentes muestras de NaCAS y sus hidrolizados fue analizado por PAGE, en ausencia o en presencia de SDS (SDS-PAGE) o urea (urea-PAGE), usando un sistema de gel vertical, de acuerdo al método de Laemmli (118).

Se sembraron cantidades adecuadas de proteína disueltas en *Sample buffer*, con o sin  $\beta$ ME 1%  $V/V$  y/o con o sin urea 6M, de modo de obtener 10-20 $\mu$ g de proteína por cada 20 $\mu$ L de muestra. El tiempo de corrida fue de aproximadamente 45 min, a 25°C y con intensidad de 12mA para el gel de separación y de 25mA para el gel de corrida. Las proteínas fueron teñidas con una solución colorante compuesta por Coomassie brillant blue R250 0,1%  $P/V$ , metanol 45%  $V/V$  y HAc 10%  $V/V$ ; y decoloradas con metanol al 10%  $V/V$  y HAc al 10%  $V/V$ . Las bandas proteicas fueron identificadas usando un patrón de pesos moleculares.

### 2.3.8. Estudio de la agregación de las partículas de NaCAS por acidificación inducida por GDL. Efecto de la presencia de pequeños cosolutos, polisacáridos e hidrolizados

La reducción del pH de soluciones proteicas puede realizarse rápidamente (acidificación directa) o lentamente (uso de cultivos lácticos). Dependiendo de la concentración y T, la hidrólisis de la GDL en ácido glucónico también puede promover una reducción lenta del pH (42). Cuando el pH disminuye se produce un aumento de las interacciones proteína-proteína, debido al descenso de la carga neta en las cercanías del pI de las mismas.

#### **Técnica operatoria:**

Se estudió la cinética de la agregación del NaCAS luego de la adición GDL, en ausencia y presencia de pequeños cosolutos, polisacáridos e hidrolizados, por medidas turbidimétricas, que permitieron monitorear el cambio de tamaño de las partículas en suspensión, basándose en la dependencia de la  $\tau$  con la  $\lambda$  de acuerdo a lo explicado en la sección 2.3.7.1, midiendo simultáneamente el pH de las muestras.

La cantidad de GDL utilizada fue la necesaria para obtener una determinada relación proteína:GDL (R) según la siguiente ecuación:

$$R = \frac{\% \text{ P/P GDL}}{\% \text{ P/P NaCAS}} \quad (2.32)$$

Las muestras a estudiar (3mL) fueron transferidas a cubetas de 1cm de camino óptico y colocadas en un portacubetas termostatzado. Luego de realizarse el espectro de absorción de la muestra, la agregación se inició por la adición de la cantidad necesaria de GDL sólida, la mezcla se agitó suavemente durante 5s con un agitador de Teflón y se midió la A de la suspensión dentro del rango 450-650nm hasta que se alcanzó un valor máximo y constante de A. Simultáneamente se midió el descenso de pH.

### 2.3.8.1. Determinación de la dimensión fractal ( $D_f$ ) de los agregados de NaCAS

La  $D_f$  es una medida del grado de compactación de la malla del gel que se forma al final del proceso de agregación y antes de la sinéresis. Se ha demostrado que el parámetro  $\beta$ , definido en la sección 2.3.7.1, para un sistema de agregación de partículas de las características de las CN, tiende durante el proceso de floculación hacia un valor asintótico que puede ser considerado como la  $D_f$  de los agregados (106).

#### **Técnica operatoria:**

Se calcularon los valores de  $\beta$  en función del tiempo ( $t$ ) hasta que las lecturas de  $\tau$  alcanzaron un valor constante luego del agregado de GDL y se estimó la  $D_f$  de los agregados a partir de gráficos de  $\beta$  vs.  $t$  como el máximo valor de  $\beta$  alcanzado.

### 2.3.8.2. Diseño experimental

Con el objetivo de analizar los resultados obtenidos durante el estudio de la agregación ácida del NaCAS, se realizaron diseños experimentales factoriales considerando como factores o variables independientes a  $R$ ,  $T$ , concentración de NaCAS ( $C_{\text{NaCAS}}$ ) y concentración de cosolutos y/o polisacáridos ( $C_{\text{cosolutos}}$  y/o  $C_{\text{polisacáridos}}$ ) y como variables dependientes o respuestas al tiempo en que comienza la agregación y/o gelación ( $t_{\text{ag}}$  y/o  $t_{\text{gel}}$ ), pH en que comienza la agregación y/o gelación ( $\text{pH}_{\text{ag}}$  y/o  $\text{pH}_{\text{gel}}$ ) y la  $D_f$  de los agregados o el  $G'_{\text{máx}}$  alcanzado. A través de los parámetros estadísticos obtenidos del t-test ANOVA se determinaron los factores e interacciones que resultaron significativos para cada caso. Una vez determinados los mismos, se ajustaron las respuestas mediante el modelo correspondiente y se analizaron residuos comprobándose normalidad e independencia de los mismos. Para visualizar el comportamiento de las variables respuestas se graficaron superficies y contornos convenientes para cada situación. Se utilizó regresión múltiple con variables codificadas, para obtener modelos matemáticos descriptivos y predictivos del comportamiento del sistema.

### 2.3.9. Estudio de las propiedades reológicas de geles ácidos de NaCAS. Efecto de la presencia de pequeños cosolutos, polisacáridos e hidrolizados proteicos

Actualmente la reología representa una técnica muy importante para analizar los diferentes pasos involucrados en el proceso de formación de un gel, así como para evaluar la textura del producto final (119). En este trabajo, se estudiaron las propiedades mecánicas de los geles ácidos formados mediante ensayos reológicos con el objetivo de evaluar los sistemas en el equilibrio y durante su formación.

Los ensayos reológicos oscilatorios fueron utilizados para determinar las propiedades viscoelásticas de los sistemas. Se estimó el tiempo de gel ( $t_{gel}$ ) a partir del punto de cruce del módulo elástico  $G'$  y del módulo viscoso  $G''$  en función del tiempo. También se determinó el pH correspondiente al  $t_{gel}$  ( $pH_{gel}$ ) y el  $G'_{máx}$  obtenido.

Por otro lado, se siguió el proceso de gelación ácida del NaCAS en presencia de polisacáridos a través de mediciones de viscosidad dinámica. En este caso se estimó sólo el  $t_{gel}$  de manera gráfica tal como se muestra en la Figura 2.4.

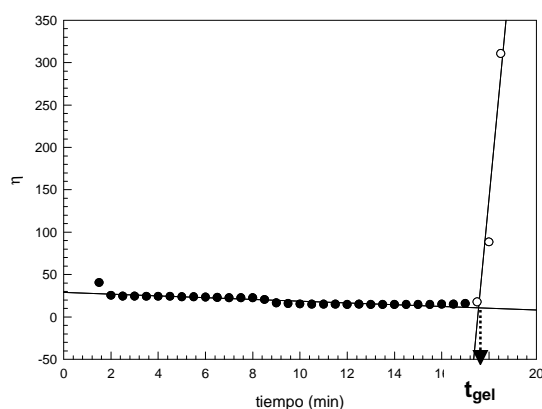


Figura 2.4. Determinación gráfica del  $t_{gel}$ .

#### Técnica operatoria:

Una muestra de 800-900 $\mu$ L fue introducida en el reómetro de tensión controlada. Se utilizó una geometría tipo cono. La T fue controlada con un baño con recirculador conectado al plato Peltier del instrumento. El reómetro dispone de un sistema de adquisición de datos y control de operación mediante el software Rheology Advantage v5.7 instalado en una computadora. Se configuró

un procedimiento de adquisición de datos durante 2-3hs. a intervalos de 20,8s, teniendo fijos los valores de tensión de oscilación (*oscillation stress*) en 0,1Pa y la frecuencia en 0,1Hz.

Para evaluar los cambios de  $\eta$  durante la gelación ácida, se colocó 1mL de la solución a estudiar, luego de adicionarse la GDL, en un viscosímetro rotatorio termostatzado, utilizando una geometría cónica y una velocidad de corte constante igual a 10rpm.

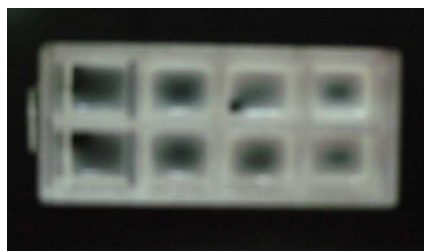
En algunos casos, se aplicaron diseños experimentales con el objeto de evaluar la significancia de las variables independientes estudiadas ( $R$ ,  $T$ ,  $C_{\text{NaCAS}}$ ,  $C_{\text{polisacárido}}$ ) sobre las variables dependientes  $t_{\text{gel}}$ ,  $\text{pH}_{\text{gel}}$  y  $G'_{\text{máx}}$  para las medidas en el reómetro de tensión controlada, y sobre el  $t_{\text{gel}}$  para las medidas en el viscosímetro rotacional.

### 2.3.10. Microscopía óptica convencional (OCM)

Mediante el análisis digital de las imágenes obtenidas por microscopia óptica se evaluó la microestructura de los geles ácidos proteicos. Se estimó el diámetro medio de los poros formados durante el proceso de gelación ácida utilizando el *software* Image J y se evaluó el efecto de la presencia de hidrolizados proteicos bioactivos y de los polisacáridos estudiados sobre dicha microestructura.

#### Técnica operatoria:

Se prepararon las soluciones madre de NaCAS, polisacáridos y de hidrolizados proteicos y posteriormente se realizaron las mezclas a ensayar. Se adicionó a cada tubo, conteniendo 5mL de muestra, GDL sólida de manera tal de mantener un  $R$  determinado. Se mezcló por inversión y rápidamente se colocaron 85-90 $\mu$ L de cada muestra en placas LAB-TEK II de ocho compartimientos como se muestra en la Figura 2.5. Las placas fueron incubadas a  $T$  constante y humedad controlada hasta finalizada la reacción de gelación.

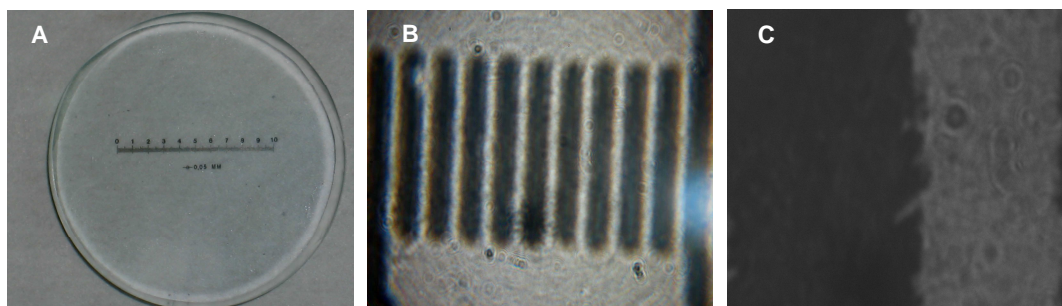


**Figura 2.5.** Placa LAB-TEK II conteniendo los distintos sistemas estudiados

Estos sistemas gelificados fueron observados por OCM con un objetivo de inmersión de 100x. La cámara digital se programó para la obtención de imágenes de los geles con un zoom de 7.1 o 9.1x y un adaptador de 52mm.

Para la determinación del diámetro medio de los intersticios o poros formados durante el proceso de gelación por medio del *software* Image J, se trazaron líneas rectas sobre las imágenes obtenidas y se midieron los valores en *píxeles* del tamaño de los poros formados. Estos valores fueron promediados, obteniéndose el valor del tamaño medio de los poros.

Para determinar a cuántos  $\mu\text{m}$  equivale un *píxel* de las imágenes obtenidas se tomaron fotografías de una regla de 1cm de longitud que poseía 100 divisiones. En la Figura 2.6 A se muestra la regla utilizada, en la Figura 2.6 B la imagen obtenida con un objetivo de 40x donde se observan las 10 divisiones que hay dentro de un mm, y en la Figura 2.6 C la imagen obtenida con un aumento de 100x. En esta última se puede visualizar la distancia entre cada división, la cual es de 0,1mm, permitiendo obtener la resolución de las imágenes de los geles proteicos.



**Figura 2.6.** En estas fotografías se observa: **(A)** Imagen de la regla utilizada. **(B)** Imagen tomada con un objetivo de 60x, zoom 9.1x y adaptador para microscopio de 52mm **(C)** Imagen tomada con un objetivo de 100x, zoom 9.1x y adaptador para microscopio de 52mm.

A partir de esta técnica se obtuvo que  $1 \text{ píxel} = (0,0645 \pm 0,0005) \mu\text{m}$ , es decir que la resolución es de  $15,5 \text{ píxel}/\mu\text{m}$ .

### 2.3.11. Obtención de las enzimas proteolíticas P45 y P7

Las enzimas proteolíticas P45 y P7 se produjeron a partir de los cultivos bacterianos *Bacillus* sp. P45 y *Bacillus* sp. P7, respectivamente, cepas aisladas del intestino de peces de la cuenca Amazónica (*Piaractus Mesopotamicus*).



Los microorganismos crecieron en un medio de cultivo nutritivo “pluma de gallina” (harina de pluma de gallina 10 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,3 g/L, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4 g/L, NaCl 0,5 g/L) durante 48hs. a 30°C y con agitación constante de 125 rpm. Luego se realizó la precipitación del sobrenadante de cultivo con sulfato de amonio (al 60% de saturación) y posteriormente una cromatografía líquida en Sephadex G-100. A todas las fracciones de enzimas obtenidas (*pool* enzimático P45 o P7) se les midió su actividad proteolítica utilizando el Método de la Azocaseína (120) (Experiencia realizada durante una estadía en el Instituto de Ciencia e Tecnología dos Alimentos, ICTA, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil).

#### **2.3.11.1. Método de la azocaseína**

El sustrato se preparó inmediatamente antes de ser usado, pesando 0,01g de azocaseína en 1mL de *buffer* Tris-HCl 20mM pH 8,00. Se incubaron 100μL del *buffer*, 100μL del *pool* enzimático y 100μL del sustrato a 37°C durante 30min. Pasado el tiempo de incubación, se detuvo la reacción con el agregado de 100μL de TCA 10%. Se centrifugó la muestra a 10000rpm durante 15min y se adicionaron 200μL de NaOH 1,8N al sobrenadante. La actividad proteolítica se midió como A a 420nm en espectrofotómetro contra un testigo que se preparó de la misma manera pero en ausencia del *pool* enzimático.

Una unidad de actividad enzimática fue considerada como la cantidad de enzima que causa un cambio de 0,01 unidades de A bajo las condiciones del ensayo especificadas previamente.

#### **2.3.12. Obtención de los hidrolizados proteicos de NaCAS. Determinación del grado de hidrólisis alcanzado**

Muestras de NaCAS fueron sometidas a hidrólisis enzimática en medio alcalino utilizando el *pool* enzimático P45 o P7. La hidrólisis fue interrumpida a distintos tiempos por desnaturalización térmica de la enzima y se determinó el grado de hidrólisis (GH) alcanzado para cada tiempo. El GH es el porcentaje de enlaces peptídicos clivados y puede ser determinado midiendo los grupos amino libres.

### **Técnica operatoria**

Se colocaron 0,5g de NaCAS en erlermeyers a los cuales se agregaron 50mL de *buffer* Tris-HCl 20mM pH 8,00 y se incubaron a 45°C durante 10min. Posteriormente, se adicionó a cada erlermeyer 1mL del *pool* enzimático P45 o P7 (relación enzima/substrato 1:50). A diferentes tiempos de incubación: inmediatamente después de adicionada la enzima ( $t_0$ ), y 0,5, 1, 2, 3, 4, 6 y 7 horas después ( $t_{0,5}$ ,  $t_1$ ,  $t_2$ ,  $t_3$ ,  $t_4$ ,  $t_6$  y  $t_7$ , respectivamente), se detuvo la reacción de hidrólisis por calentamiento de las muestras a 100°C durante 15min. Las muestras obtenidas fueron centrifugadas durante 15min a 10000rpm y los sobrenadantes fueron liofilizados y almacenados en freezer hasta su posterior utilización.

El GH se determinó a través de la reacción con el ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfónico (TNBS) (121). Muestras de 250 $\mu$ L fueron mezcladas con 2mL de *buffer* fosfato 0,212M pH 8,20 y 2mL de solución de TNBS 10 mg/mL, e incubados a 50°C durante 1h. Luego de este período, se adicionaron 4mL de HCl 0,1M, y las mezclas se incubaron a T ambiente durante 30min para luego medir su A a 340nm. El número total de grupos amino se determinó en una muestra proteica (10mg) que fue completamente hidrolizada en 4mL de HCl 6M a 110°C por 24 hs.

### **2.3.13. Evaluación de la bioactividad *in vitro* de los péptidos obtenidos**

Se evaluaron la actividad antioxidante, antimicrobiana, quelante del hierro y el poder reductor de los productos de hidrólisis obtenidos a diferentes tiempos por acción enzimática de la enzima P45 y/o P7 (Experiencia realizada durante una estadía en el Instituto de Ciencia e Tecnología dos Alimentos, ICTA, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil).

#### **2.3.13.1. Actividad antioxidante**

##### **2.3.13.1.1. Método TBARS**

La reacción del ácido Tiobarbitúrico (TBA) se determinó de acuerdo con la metodología de Ohkawa (122). Este método mide la cantidad de Malonaldeído (MDA) formado como consecuencia de la peroxidación lipídica.

Es un método inespecífico ya que no solo mide la cantidad de MDA formado, sino también la de otros oxo-compuestos (96).

**Técnica operatoria:**

En primer lugar, tubos de ensayo conteniendo agua Mili Q y aceite de Oliva Extra Virgen sometidos a oxidación por la adición de sulfato ferroso 100 $\mu$ M, fueron incubados en baño María a 80°C durante 10min. Posteriormente, se adicionó en cada tubo la muestra, SDS 8,1%, *buffer* HAc/Ac<sup>-</sup> pH 3,44 y TBA 0,6%, tal como se muestra en la Tabla I. Inmediatamente, se incubó nuevamente en baño María a 100°C por 1 h.

**Tabla I. Protocolo de trabajo llevado a cabo para la preparación de las muestras a ensayar**

TUBOS	H <sub>2</sub> O Mili Q	Sulfato ferroso (10 $\mu$ l)	Aceite de Oliva (EV)	Muestra	SDS (8,1%)	Buffer (pH 3,44)	TBA (0,6%)
Control	300 $\mu$ L	50 $\mu$ L	200 $\mu$ L	-	200 $\mu$ L	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L
Blanco	850 $\mu$ L	-	-	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L	500 $\mu$ L	-
Muestra	100 $\mu$ L	50 $\mu$ L	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L

Los productos de reacción fueron determinados por medidas de A a 532nm. La concentración de TBARS fue calculada a través de una curva patrón con concentraciones conocidas de 1,1,3,3-tetrametoxipropano, y los resultados se expresaron en nmol de MDA por mL de muestra (nmol MDA/mL). Las muestras para la curva patrón se componen de agua Mili Q, MDA 0,03mM, SDS 8,1%, *buffer* HAc/Ac<sup>-</sup> pH 3,44 y TBA 0,6%, como se indica en la Tabla II, y todos esos tubos fueron incubados en baño María a 100°C por 1h.

**Tabla II. Protocolo de trabajo para la realización de la Curva Patrón**

TUBOS	H <sub>2</sub> O Mili Q	MDA (0,03mM)	SDS (8,1%)	Buffer (pH 3,44)	TBA (0,6%)
1	300 $\mu$ L	-	200 $\mu$ L	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L
2	250 $\mu$ L	50 $\mu$ L	200 $\mu$ L	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L
3	200 $\mu$ L	100 $\mu$ L	200 $\mu$ L	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L
4	100 $\mu$ L	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L
5	-	300 $\mu$ L	200 $\mu$ L	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L

### 2.3.13.1.2. Método de captura del radical ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiasolina-6-ácido sulfónico) o ABTS

Se realizaron los experimentos mediante el ensayo de ABTS (123), en el cual se genera el cromóforo radical  $ABTS^+$  debido a la oxidación del ABTS con persulfato de potasio. El mismo es aplicable tanto para compuestos hidrofílicos como lipofílicos. La captura de radicales libres es el mecanismo principal por el cual los antioxidantes actúan en los alimentos. Este ensayo está basado en la donación de hidrógeno o la transferencia de electrones desde el compuesto con potencial antioxidante hacia radicales libres en sistemas lipídicos. La capacidad de captar radicales específicos podría estar dirigida, por ejemplo, por el radical hidroxilo, radical superóxido o el radical óxido nítrico. La capacidad antioxidante puede ser cuantificada por dos ensayos, la capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) y el poder antioxidante reductor del hierro (FRAP). El ensayo TEAC depende de la reducción de un catión coloreado  $ABTS^+$ . La capacidad antioxidante es cuantificada como la concentración de Trolox, que produce el mismo efecto en la muestra (124).

#### **Técnica operatoria:**

El catión radical ABTS ( $ABTS^+$ ) se produjo mediante la reacción de una solución madre de ABTS 7mM con persulfato de potasio 140mM (concentración final) y posterior conservación de la mezcla en la oscuridad por lo menos 12hs. a T ambiente antes de su uso. Para el ensayo, la solución del  $ABTS^+$  se diluyó con *buffer* fosfato 5mM pH 7,00 para alcanzar una A de  $0,70 \pm 0,02$  a 734nm. Se tomaron 10 $\mu$ L de la muestra (15  $mg/mL$ ) y se mezclaron con la solución diluida del  $ABTS^+$  y luego de 6min se midió la A a 734nm. El compuesto Trolox se usó como un estándar de referencia. Se calculó el porcentaje de inhibición de la A a 734nm y se lo graficó como una función de la concentración del Trolox.

### 2.3.13.1.3. Método de actividad secuestradora de radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH')

Este método se basa en la captura del radical DPPH (DPPH') por antioxidantes, lo cual produce un descenso de la A a 517nm (125). La captura

del radical cromógeno estable DPPH<sup>•</sup>, cuantificada espectrofotométricamente en un medio orgánico, es extensamente empleado para la comparación con antioxidantes homólogos. La disminución de color ha sido correlacionada con una curva dosis-respuesta con un antioxidante estándar como en el ensayo TEAC (126). Estos métodos pueden ser útiles para el “screening” de antioxidantes, pero la eficacia antioxidante en los alimentos debe ser estudiada por otros métodos, ya que su actividad en los alimentos depende de una variedad de factores incluyendo la polaridad, solubilidad y la actividad quelante de metal.

#### **Técnica operatoria:**

El DPPH<sup>•</sup> se usó a una concentración de 60µM disuelto en alcohol metílico. La solución se homogeneizó y se transfirió a frascos color caramelo y solo se pudo utilizar en el día de los análisis. En la oscuridad, alícuotas de 0,1mL de las muestras se transfirieron a tubos de ensayo con 3,9mL de solución de radical DPPH<sup>•</sup> 60µM y se homogeneizó por agitación. Después de 45min, la actividad secuestradora se determinó espectrofotométricamente por el descenso de la A a 517nm. De la misma forma, estas mismas proporciones (0,1mL de agua destilada y 3,9mL de radical DPPH<sup>•</sup>) fueron usadas como control, usando alcohol metílico como blanco. La curva patrón se confeccionó empleando concentraciones de DPPH<sup>•</sup> desde 0 a 60µM. Los resultados se expresaron como:

$$\text{porcentaje de captura (\%)} = \left(1 - \frac{A}{A_0}\right) 100 \quad (2.33)$$

donde  $A_0$  es la A del blanco y se informan como  $EC_{50}$  ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), que corresponde a la mínima concentración de antioxidante requerida para reducir al 50% la concentración inicial de DPPH.

#### **2.3.13.2. Actividad antibacteriana**

La actividad antibacteriana de las muestras se determinó de acuerdo a Motta & Brandelli (127). Las cepas patógenas empleadas fueron *Listeria monocytogenes* ATCC 15131, *Bacillus cereus* ATCC 9634, *Corynebacterium*

*fimi* NCTC 7547, *Staphylococcus aureus* ATCC 1901, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Corynebacterium fimi* NCTC 7547, *Staphylococcus aureus* ATCC 1901, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 y *Escherichia coli* ATCC 8739.

#### **Técnica operatoria:**

Los microorganismos indicadores, a concentraciones de  $10^8$  UFC/mL en solución salina (NaCl 0,85% P/V) fueron inoculados con un algodón sobre discos de agar cerebro y corazón (BHI). Sobre el “césped” de las cepas indicadoras preparadas frescas se colocaron alícuotas de 15µL de los hidrolizados y las placas fueron incubadas a la T óptima de crecimiento para cada microorganismo. Luego de 24hs., se midieron las zonas de inhibición, representadas por halos claros, y las mismas se expresaron en mm. En función del diámetro de dichos halos se pudo estimar cuál de las muestras presentó actividad antimicrobiana contra estos patógenos.

#### **2.3.13.3. Actividad quelante del hierro (Fe<sup>2+</sup>)**

Se midió la actividad quelante de Fe<sup>2+</sup> usando el método descrito por Chang, Wu, & Chiang con ligeras modificaciones (128).

#### **Técnica operatoria**

Se mezcló 1mL de muestra con 3,7mL de agua destilada y posteriormente se le agregó 0,1mL de FeSO<sub>4</sub> 2mM y 0,2mL de 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazina (ferrozina) 5mM. Se midió la A a 562nm después de 10min, usando como control 1mL de agua destilada en lugar de muestra. Se utilizó EDTA (20 mg/mL) como estándar de referencia. Los resultados se expresaron como:

$$actividad\ quelante\ (\%) = \left(1 - \frac{A}{A_0}\right) 100 \quad (2.34)$$

donde A<sub>0</sub> es la A del control.

#### **2.3.13.4. Poder reductor**

El poder reductor de los hidrolizados se determinó según Zhu, Zhou, & Qian (97).

### **Técnica operatoria**

Se mezclaron muestras de hidrolizados ( $15 \text{ mg/mL}$ ) obtenidas a cada tiempo de hidrólisis con 2,5mL de *buffer* fosfato 0,2M pH 6,60 y 2,5mL de ferricianuro de potasio 1%  $\text{P/V}$ . La mezcla se incubó a  $50^\circ\text{C}$  por 20min. Luego se agregó 2,5mL de TCA 10%  $\text{P/V}$  y se centrifugó a 3000g por 10min. Se mezcló el sobrenadante (1mL) con 2,5mL de agua destilada y 0,2mL de  $\text{FeCl}_3$  ( $1 \text{ mg/mL}$ ), y se midió la A a 700nm. Valores altos de A de la mezcla de reacción, indican mayor poder reductor. Se usó como control positivo Butil-hidroxitolueno (BHT) a las mismas concentraciones que las muestras.

### **2.3.14. Análisis estadístico**

Las determinaciones se realizaron al menos por duplicado o triplicado. Los valores reportados son los valores promedio  $\pm$  su desvío estándar. El análisis estadístico fue hecho con los *softwares* Sigma Plot 10.0 y Minitab 16. La relación entre variables fue estadísticamente evaluada por análisis de correlación utilizando el coeficiente de correlación de Pearson. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas a valores de  $p < 0,05$ .

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN Parte I





## CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN: Parte I

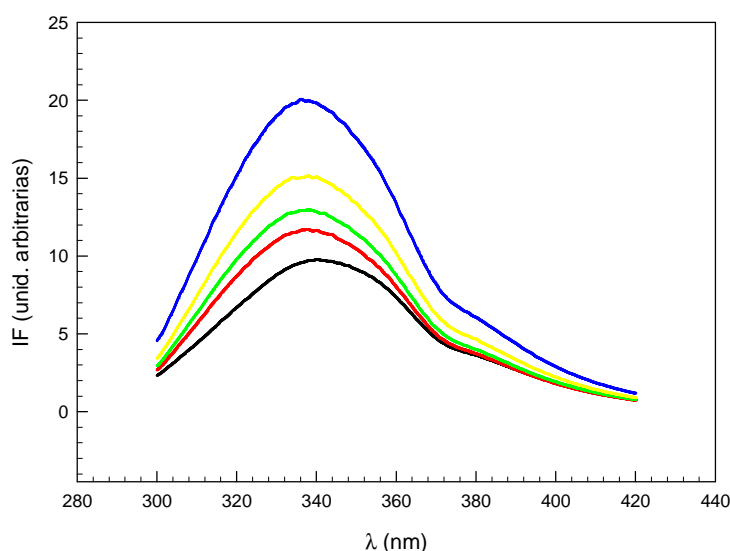
### FORMACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AGREGADOS Y GELES ÁCIDOS DE NaCAS: PROPIEDADES ESTRUCTURALES, FUNCIONALES Y REOLÓGICAS

#### 3.1. Estudio de los cambios estructurales del NaCAS por espectrofluorimetría

En primer lugar, se realizaron espectros de excitación y de emisión de fluorescencia de soluciones acuosas de NaCAS al pH isoiónico (~6,80) con el fin de obtener las  $\lambda_{em}$  y  $\lambda_{exc}$  máximas.

Luego se realizaron espectros de excitación y de emisión de la fluorescencia intrínseca proteica, antes y en los primeros instantes de adicionada la GDL, con el objeto de detectar corrimientos de las bandas espectrales y/o cambios en la IF, tal como se explicó en la sección 2.3.3.1 del Capítulo 2.

En la Figura 3.1 se observa como se modificaron los espectros de emisión de fluorescencia de la proteína en presencia de GDL a través del tiempo. Este comportamiento estaría indicando la existencia de un proceso de disociación de las CN y/o un cambio conformacional con apertura gradual de la estructura proteica durante el proceso de acidificación.

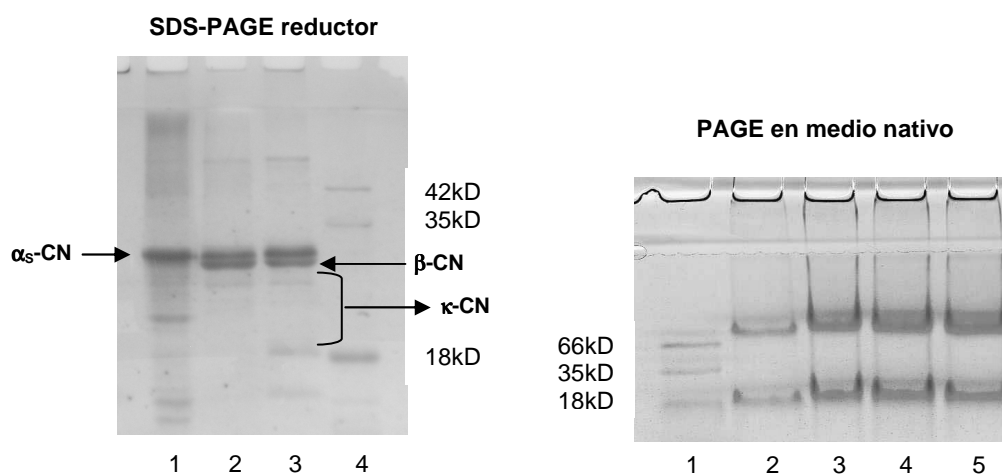


**Figura 3.1.** Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca del NaCAS luego de la adición de GDL. Rango de  $\lambda_{em}$  = 300-380nm;  $\lambda_{exc}$  = 286nm,  $\lambda_{em}$  = 342nm. Tiempos (min); pH: 0; 6,80 (—), 12; 6,17 (—), 18; 6,01 (—), 21; 5,93 (—), 24; 5,80 (—). T 25°C,  $C_{NaCAS}$  0,2% P/P.

El análisis de estos resultados revela que durante la agregación inducida por acidificación hay un aumento de exposición de los fluoróforos intrínsecos proteicos, indicando que los mismos se encontrarían cercanos a la zona de la molécula que participa en la interacción interparticular.

### 3.2. Caracterización de las muestras de NaCAS mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)

El estado inicial de las diferentes muestras de NaCAS fue analizado por PAGE, en ausencia (PAGE nativo) y en presencia de SDS y  $\beta$ ME (SDS-PAGE).



**Figura 3.2.** 1)  $\alpha_s$ -CN, 2) NaCAS 0,2%  $P/P$ , 3) leche bovina, 4) Patrón de peso molecular

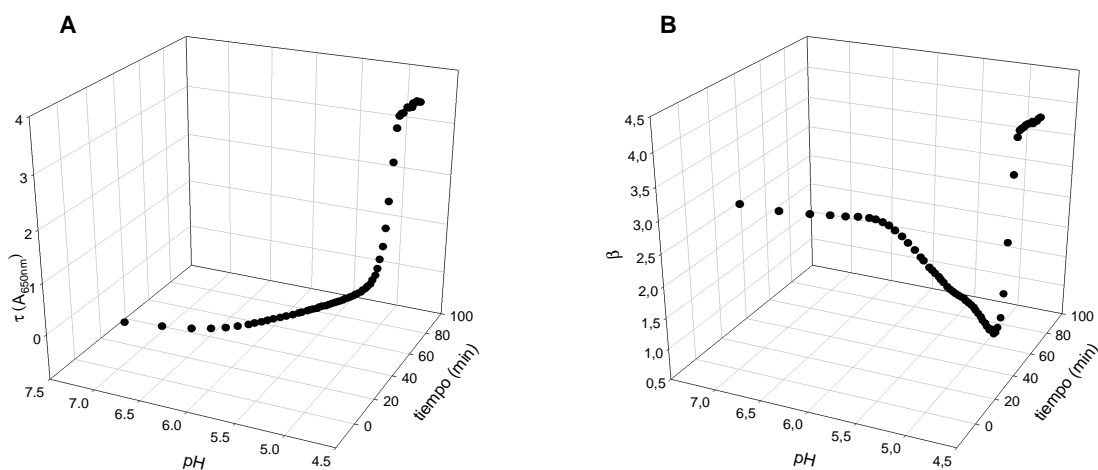
**Figura 3.3.** 1) Patrón de peso molecular, 2-5) NaCAS 0,04%, 0,10%, 0,20% y 0,50% ( $P/P$ ) respectivamente

En la Figura 3.2 se muestra el gel resultante de la corrida en medio desnaturante de SDS y reductor ( $\beta$ ME). En la calle 2, se observan las 3 fracciones mayoritarias caseínicas:  $\alpha_{s1}$ -CN, seguida inmediatamente por la  $\beta$ -CN, cuyos pesos moleculares son 26kD y 24kD, respectivamente. Por debajo de estas bandas aparece la  $\kappa$ -CN de aproximadamente 19kD. Por otro lado, la Figura 3.3 muestra el resultado de la electroforesis en condiciones nativas (sin SDS, sin  $\beta$ ME). Se observa que una parte de las CN se encuentra formando agregados de pesos moleculares mayores a los 66kD. Estos agregados aumentan en cantidad a medida que se incrementa la concentración de NaCAS. A las concentraciones de NaCAS empleadas, las distintas fracciones caseínicas que lo conforman estarían asociadas entre sí o autoasociadas. Por lo tanto, las partículas de NaCAS se encontrarían estables en suspensión

acuosa como agregados coloidales o submicelas al pH isoiónico. Estos resultados coinciden con lo informado por Pitkowski et al. (2008) (131).

### 3.3. Estudio de la agregación de las partículas de NaCAS por acidificación inducida por GDL

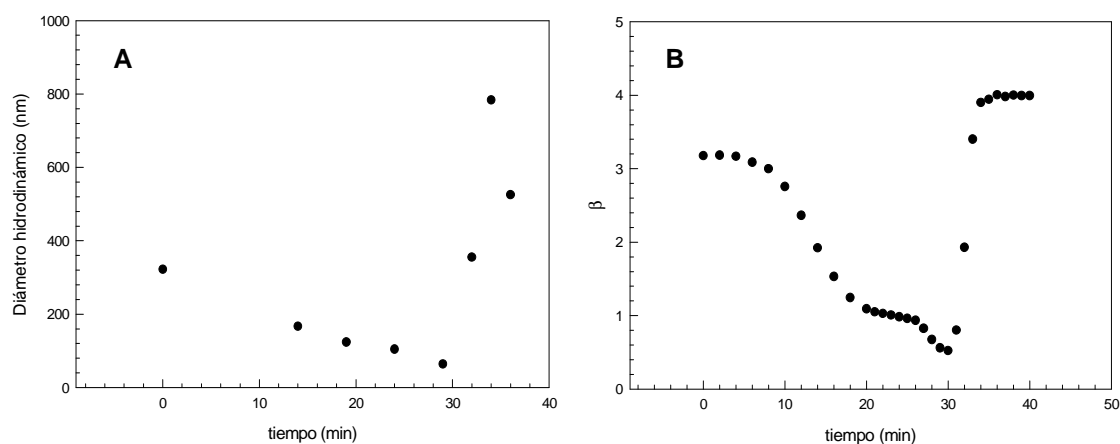
Se estudió el efecto de la concentración proteica ( $C_{\text{NaCAS}}$ ), la temperatura ( $T$ ) y la cantidad de GDL adicionada ( $R$ ), sobre la velocidad de descenso de pH, la cinética del proceso de agregación del NaCAS y el estado final de los agregados formados. Para ello se varió la  $C_{\text{NaCAS}}$  (0,2; 0,5 y 0,7% P/P), la  $T$  (25° y 35°C) y  $R$  (0,35; 0,5 y 0,7).



**Figura 3.4.** Variaciones de la  $\tau$  (como  $A_{650\text{nm}}$ ) (A) y del parámetro  $\beta$  (B) a lo largo del tiempo y en función del pH, luego de adicionada la GDL.  $C_{\text{NaCAS}}$  0,5% P/P,  $R$  0,5 y  $T$  35°C.

En todos los casos estudiados se observó la existencia de dos etapas bien definidas, como se muestra, a modo de ejemplo, para NaCAS 0,5% P/P,  $R$  0,5 y  $T$  35°C en las Figuras 3.4 A y B. En la primera etapa, que es mucho más lenta, se observó un aumento gradual de la  $\tau$  y un descenso del parámetro  $\beta$  a lo largo del tiempo y a medida que desciende exponencialmente el pH. Este comportamiento podría indicar la existencia de un proceso de disociación de las CN y/o un cambio conformacional, en concordancia con lo observado al evaluar los cambios de fluorescencia intrínseca durante la agregación (sección 3.1.1). La segunda etapa correspondería a la formación y crecimiento de los agregados coloidales, lo que se ve reflejado por un aumento brusco de la  $\tau$  y de  $\beta$ , momento a partir del cual ambos parámetros permanecen constantes.

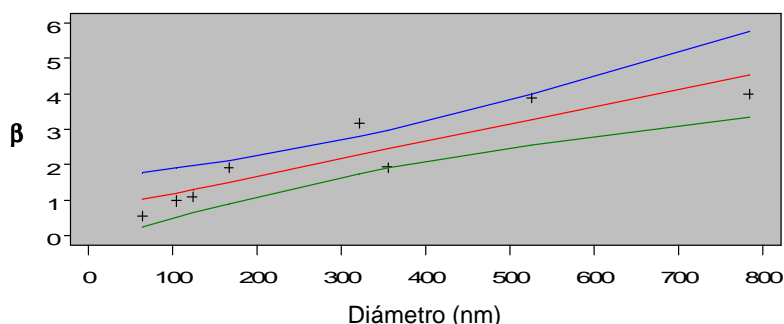
Con el objetivo de confirmar la correlación entre el tamaño medio de las partículas y el parámetro  $\beta$ , se determinó el diámetro hidrodinámico de las partículas de NaCAS a través de DLS. Los resultados comparativos para una solución de NaCAS 0,5%  $P/P$  se muestran en las Figuras 3.5 A y B.



**Figura 3.5.** Variación del diámetro promedio de las partículas determinado por DLS (A) y a través de la variación del parámetro  $\beta$  (B), con el tiempo luego de adicionada la GDL. T 35°C;  $C_{NaCAS}$  0,5%  $P/P$ ; R 0,5.

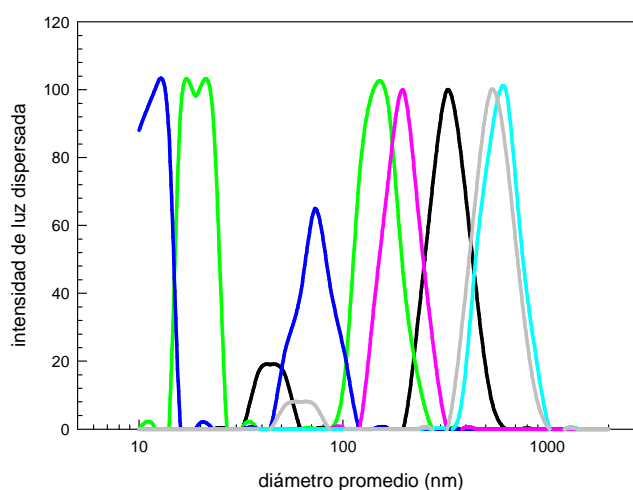
En ambos casos se evidencian las dos etapas descritas para el proceso de agregación, observándose la coincidencia en la cinética del proceso evaluada a través del cambio del diámetro hidrodinámico y del parámetro  $\beta$ .

Podemos inferir que las variaciones del parámetro  $\beta$  presentan una buena correlación con los cambios en el diámetro hidrodinámico ocurridos durante el proceso de agregación ( $r^2 = 0,9082$ ;  $p < 0,0018$ ) y, por lo tanto, puede utilizarse para estimar variaciones en el tamaño medio de las partículas de NaCAS. En la Figura 3.6 se muestra el estudio de correlación realizado para comparar ambos métodos.



**Figura 3.6.** Estudio de correlación realizado entre el parámetro  $\beta$  y el tamaño medio de las partículas de NaCAS durante el proceso de acidificación.

A modo de ejemplo, la Figura 3.7 muestra una de las distribuciones de tamaño realizadas en este trabajo (mediante LALLS) expresada como intensidad de luz dispersada vs. diámetro promedio. Al comienzo de la acidificación, se evidencia una distribución de diámetros de tipo bimodal, que confirma lo observado en los perfiles electroforéticos respecto de la existencia de agregados coloidales de NaCAS al pH isoiónico. Luego de adicionada la GDL, y a medida que avanza el proceso, en primer término hay una disminución de dicho diámetro que confirmaría la disociación de los agregados durante la primera etapa de acidificación, para luego aumentar cuando comienza la agregación transformándose entonces en una distribución del tipo monomodal.



**Figura 3.7.** Distribución de tamaño de partículas del NaCAS 0,5%  $P/P$ ; R 0,5; T 35°C luego de adicionada la GDL. Tiempos (min): (—) 9; (—) 19; (—) 29; (—) 32; (—) 34 y (—) 36.

En la literatura se cita que el NaCAS en solución acuosa presenta un considerable nivel de auto asociación, en forma de submicelas o micelas (129, 130). Otros autores han sugerido que el NaCAS se asocia formando pequeños agregados semejantes a “estrellas” con un número de agregación que depende de las condiciones del medio, tales como T, pH, o fuerza iónica. Estos agregados poseen un centro hidrofóbico y una corona hidrofílica cargada negativamente (131).

En síntesis, los perfiles observados en la Figura 3.4 sugieren una lenta disociación de los agregados o submicelas iniciales de NaCAS para formar un

gran número de pequeñas partículas, las cuales finalmente agregan originando partículas más grandes.

Para evaluar el efecto de los factores T, R y C<sub>NaCAS</sub> sobre el t<sub>ag</sub> y el pH<sub>ag</sub> durante la agregación ácida y sobre la D<sub>f</sub> de los agregados formados al final de la misma se aplicó un diseño experimental factorial de tres variables. Los efectos estimados de cada variable fueron determinados usando los parámetros estadísticos obtenidos del t-test ANOVA y los valores de p fueron utilizados para confirmar la significancia de dichos factores, asumiendo, en este caso, p < 0,1. Valores pequeños de p implican que los efectos (o coeficientes) son significativos (132).

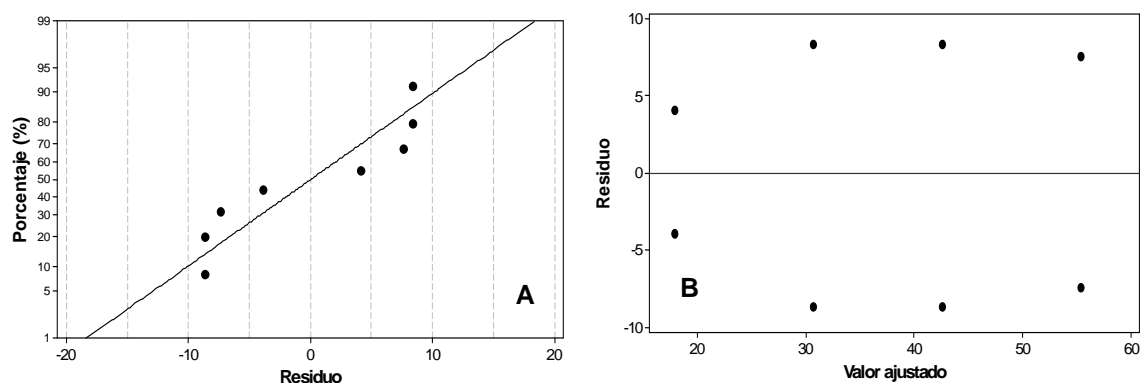
En la Tabla III se muestra la evaluación de los efectos, coeficientes y valores de p para t<sub>ag</sub>, pH<sub>ag</sub> y D<sub>f</sub>.

**Tabla III. Efectos, coeficientes y valores de p estimados para t<sub>ag</sub>, pH<sub>ag</sub> y D<sub>f</sub> (unidades codificadas)**

Factores	Respuestas								
	t <sub>ag</sub>			pH <sub>ag</sub>			D <sub>f</sub>		
	Efecto	Coef	p	Efecto	Coef	p	Efecto	Coef	p
Constante		36,63	0,000		4,9838	0,000		3,93375	0,000
C <sub>NaCAS</sub> (% P/P)	No significativo			No significativo			0,08250	0,04125	0,002
R	-24,75	-12,37	0,013	No significativo			No significativo		
T (°C)	-12,75	-6,38	0,100	0,3175	0,1587	0,093	0,03250	0,01625	0,063
	r <sup>2</sup> = 96,67%			r <sup>2</sup> = 96,67%			r <sup>2</sup> = 96,67%		

Se observó que sólo los términos lineales de R y T fueron estadística y negativamente significativos para t<sub>ag</sub>. La Ecuación 3.1 presenta el modelo para la variación de t<sub>ag</sub> en función de R y T, comprobándose la normalidad e independencia de los residuos (Figura 3.8 A y B).

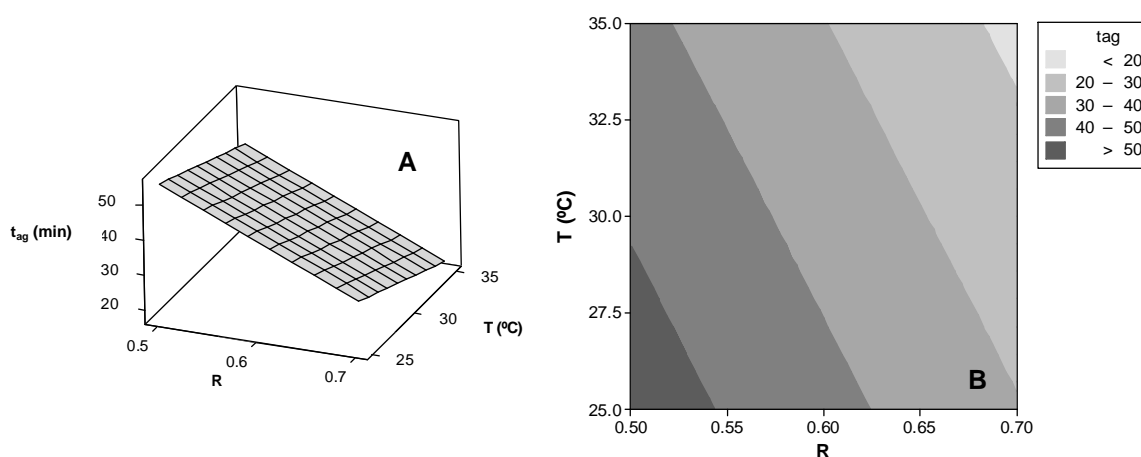
$$t_{ag} = 36,63 - 12,37R - 6,38T \tag{3.1}$$



**Figura 3.8.** Gráfica de probabilidad normal (A) y de independencia de los residuos (B) para t<sub>ag</sub>.

Como se deduce de la Ecuación 3.1 y de la Figura 3.9,  $t_{ag}$  disminuye al aumentar T o R. En el caso de R, un aumento del mismo implica un incremento de la velocidad de descenso de pH y, por lo tanto de la velocidad de la reacción de protonación de los restos aminoacídicos cargados negativamente al pH isoiónico inicial. Esto conduce a que la desestabilización electrostática y posterior agregación espontánea de las partículas coloidales de NaCAS ocurra a tiempos menores. Por otra parte, al aumentar T, se incrementa la velocidad de hidrólisis de la GDL y, como consecuencia, la concentración de protones generados, conduciendo al mismo efecto explicado anteriormente.

La Ecuación 3.1 es útil para predecir la cinética del proceso de agregación del NaCAS para distintos valores de T y R. Los valores de los coeficientes indican que el efecto del cambio de R es aproximadamente el doble que el correspondiente a T.



**Figura 3.9.** Gráficos de superficie de respuesta (A) y de contorno (B) para  $t_{ag}$  en función de las variables R y T.

Para  $pH_{ag}$  sólo el término lineal de T fue estadística y positivamente significativo. La Ecuación 3.2 presenta el modelo para la variación de  $pH_{ag}$  en función de T. Debido a que la relación es lineal, no se obtuvieron los gráficos de superficie y contorno correspondientes.

$$pH_{ag} = 4,9838 + 0,1587T \quad (3.2)$$

Al aumentar la T, se observó una disminución de la estabilidad electrostática del NaCAS y, como consecuencia, la agregación del mismo comienza a pH más altos.

A partir de la evaluación de los valores de p para  $D_f$ , se observó que sólo los términos lineales de  $C_{NaCAS}$  y T fueron estadística y positivamente significativos, siendo el efecto de la  $C_{NaCAS}$  de mayor magnitud, aunque las variaciones fueron leves en ambos casos. La Ecuación 3.3 presenta el modelo para la variación de  $D_f$  en función de  $C_{NaCAS}$  y T, comprobándose la normalidad e independencia de los residuos (Figura 3.10 A y B):

$$D_f = 3,93 + 0,04125C_{NaCAS} + 0,01625T \quad (3.3)$$

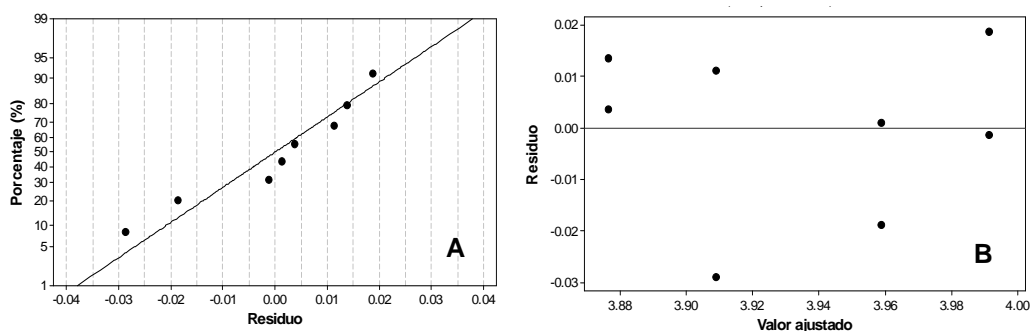


Figura 3.10. Gráfica de probabilidad normal (A) y de independencia de los residuos (B) para  $D_f$ .

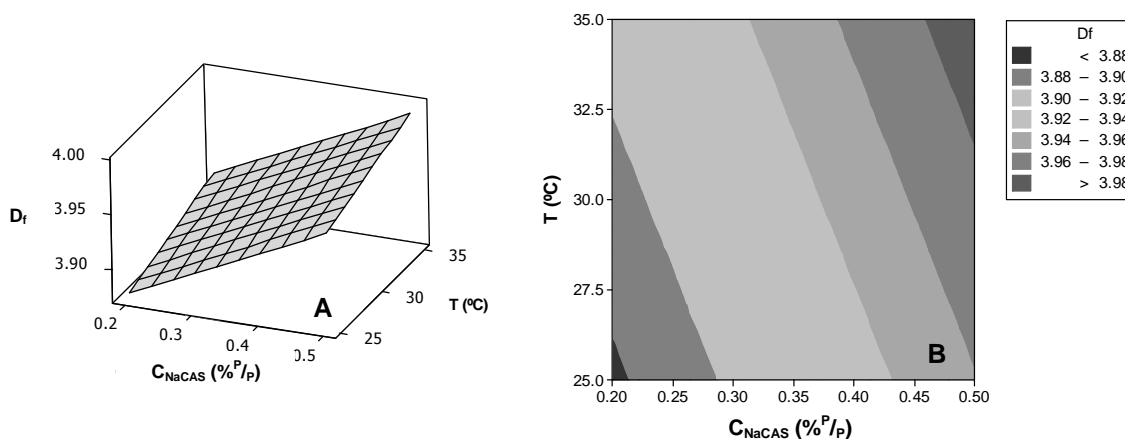


Figura 3.11. Gráficos de superficie de respuesta (A) y de contorno (B) para  $D_f$  en función de las variables  $C_{NaCAS}$  y T.

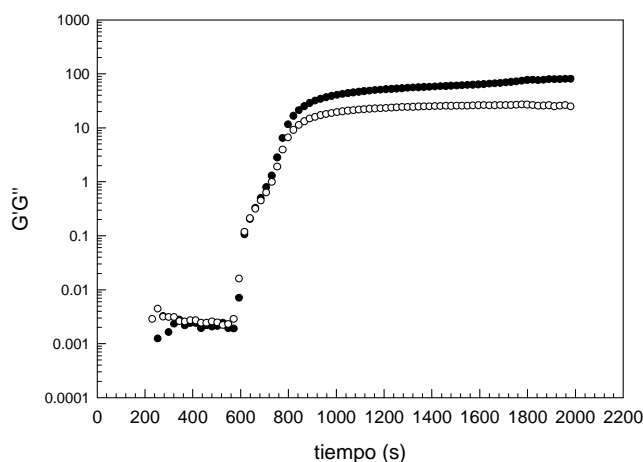


En la Figura 3.11 se muestran los gráficos de superficie de respuesta y de contorno para el parámetro  $D_f$  en función de las variables significativas  $C_{NaCAS}$  y  $T$ .

Al aumentar la concentración de NaCAS, aumenta la cantidad de partículas que forman parte de la red tridimensional formada al final del proceso de agregación ácida, y por lo tanto los agregados son más compactos (mayor  $D_f$ ). El incremento de  $T$  favorece las interacciones de tipo hidrofóbicas que participan en la reestructuración de los agregados favoreciendo su mayor compactación.

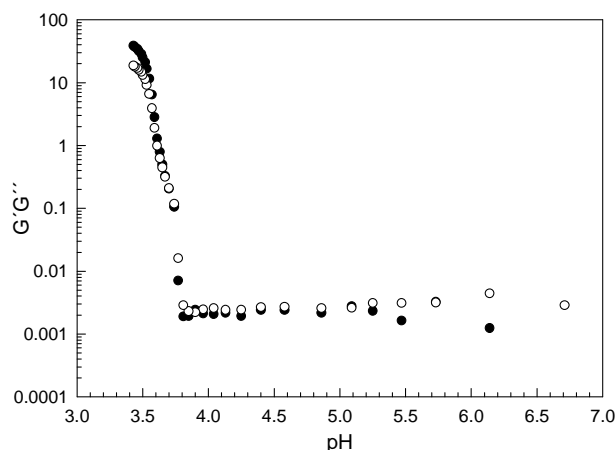
### 3.4. Evaluación de los parámetros reológicos durante la gelación ácida del NaCAS

A elevadas concentraciones de NaCAS, durante la acidificación, los agregados tienen un tamaño lo suficientemente grande como para formar un gel. Se realizaron ensayos reológicos oscilatorios para determinar las propiedades viscoelásticas de estos sistemas. Se estimó el tiempo de gel ( $t_{gel}$ ) y se determinó el pH correspondiente al mismo ( $pH_{gel}$ ). Se trabajó con NaCAS 3 y 5%  $P/P$  y se ensayaron tres  $R$  diferentes (0,5; 0,7 y 1), a una  $T$  constante de 35°C. A modo de ejemplo, la Figura 3.12 muestra uno de los gráficos obtenidos en este estudio.



**Figura 3.12.** Variación de  $G'$  y  $G''$  en función del tiempo una vez adicionada la GDL. (●)  $G'$ , (○)  $G''$ .  $C_{NaCAS}$  3%  $P/P$ ,  $R$  1 y  $T$  35°C.

En la Figura 3.13 se muestra la variación de los módulos  $G'$  y  $G''$  en función del pH, donde el punto de intersección de ambos parámetros corresponde al  $pH_{gel}$ .



**Figura 3.13.** Variación de  $G'$  y  $G''$  en función del pH una vez adicionada la GDL. (●)  $G'$ , (○)  $G''$ .  $C_{NaCAS}$  3%  $P/P$ , R 1 y T 35°C.

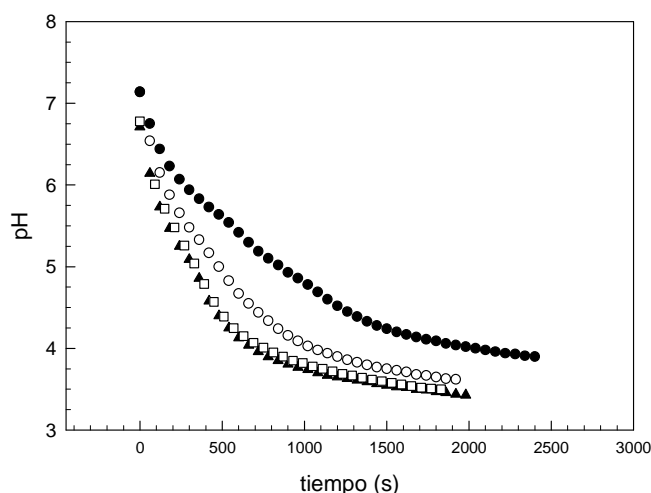
En la Tabla IV se resumen los resultados obtenidos de  $t_{gel}$ ,  $pH_{gel}$  y del máximo valor del módulo elástico alcanzado ( $G'_{m\acute{a}x}$ ).

**Tabla IV. Resultados de  $t_{gel}$ ,  $pH_{gel}$  y  $G'_{m\acute{a}x}$  para los geles de NaCAS formados. T 35°C**

Muestra	$t_{gel}$ (min $\pm$ 0,1)	$pH_{gel}$ ( $\pm$ 0,01)	$G'_{m\acute{a}x}$ (Pa $\pm$ 4)
NaCAS 3% $P/P$ - R 0,5	14,0	4,97	68
NaCAS 3% $P/P$ - R 0,7	13,1	4,32	70
NaCAS 3% $P/P$ - R 1	11,0	4,08	71
NaCAS 5% $P/P$ - R 1	6,6	4,74	145

Puede deducirse que, para una dada concentración de NaCAS, el  $t_{gel}$  y el  $pH_{gel}$  disminuyen a medida que aumenta R, es decir, la cantidad de GDL adicionada. Esto puede deberse, como se observa en la Figura 3.14, al incremento en la velocidad de descenso del pH cuando crece R. No se observaron diferencias significativas en los valores de  $G'_{m\acute{a}x}$  obtenidos.

Cuando se trabajó a R constante y se incrementó la concentración proteica, también disminuyó el  $t_{gel}$ , debido a que, aunque no se observaron modificaciones en la velocidad del descenso del pH, la formación del gel comienza a pH mayores. En este caso, el  $G'_{m\acute{a}x}$  fue mayor al aumentar la concentración proteica, es decir, que la elasticidad final del gel formado es mayor al incrementarse el número de partículas capaces de gelificar.



**Figura 3.14.** Variación del pH en función del tiempo, una vez adicionada la GDL, para NaCAS 3%  $P/P$  y R: (●) 0,5 (○) 0,7 y (▲) 1,0; y para NaCAS 5%  $P/P$  y R: (□) 1,0. T 35°C.

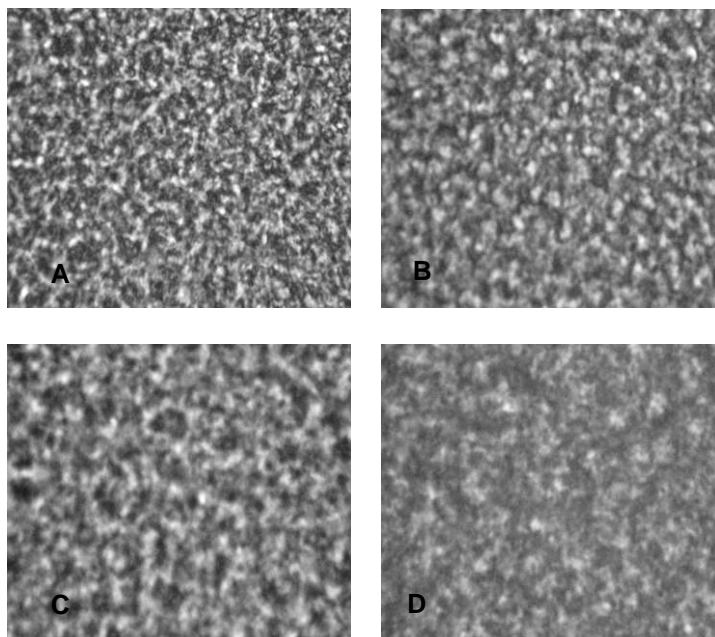
### 3.5. Efecto de la velocidad de gelación sobre la microestructura de los geles de NaCAS

Se ensayó el efecto de la velocidad de gelación sobre la microestructura de los geles ácidos de NaCAS. Para ello, se preparó una solución de NaCAS 3%  $P/P$  y se adicionó GDL sólida para lograr 4 sistemas con diferentes R (0,35, 0,5, 0,7 y 1).

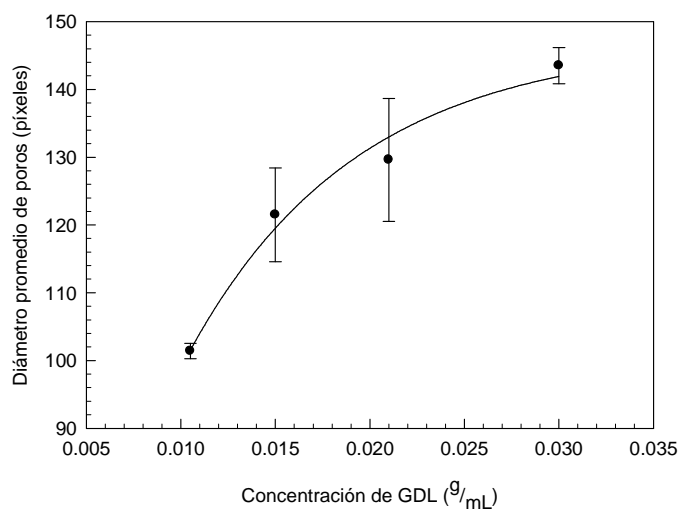
En la Figura 3.15 se muestran las imágenes de las microestructuras de los geles ácidos de NaCAS obtenidos con distintos R, donde se pudo observar que, a menor velocidad de gelación (menor R), los geles mostraron una mayor estructuración, presentando un aspecto más compacto y poros de menor tamaño. Esto se debe a que, si el proceso se realiza lentamente, la malla de gel puede reestructurarse por ruptura de algunas interacciones y formación de otras nuevas, obteniéndose una malla más apretada y, por lo tanto, con poros cada vez más pequeños.

En la Figura 3.16 se muestran los valores de diámetro medio de los poros (en *píxeles*) graficados en función de la concentración de GDL y el ajuste exponencial realizado, donde se observó un aumento en el diámetro medio de los poros con el aumento de la concentración de GDL. El ajuste exponencial permitiría predecir el tamaño medio de los intersticios para una dada concentración de GDL. Los resultados corroboraron que el grado de compactación y el tamaño de los poros del gel dependen de la velocidad de

gelación, la cual está relacionada en forma directa con la cantidad de GDL adicionada.



**Figura 3.15.** Imágenes de los geles de NaCAS obtenidas por OCM (9.1x) para distintos R: **(A)** 0,35; **(B)** 0,5; **(C)** 0,7 y **(D)** 1,0. T 35°C;  $C_{\text{NaCAS}}$  3%  $P/P$ .



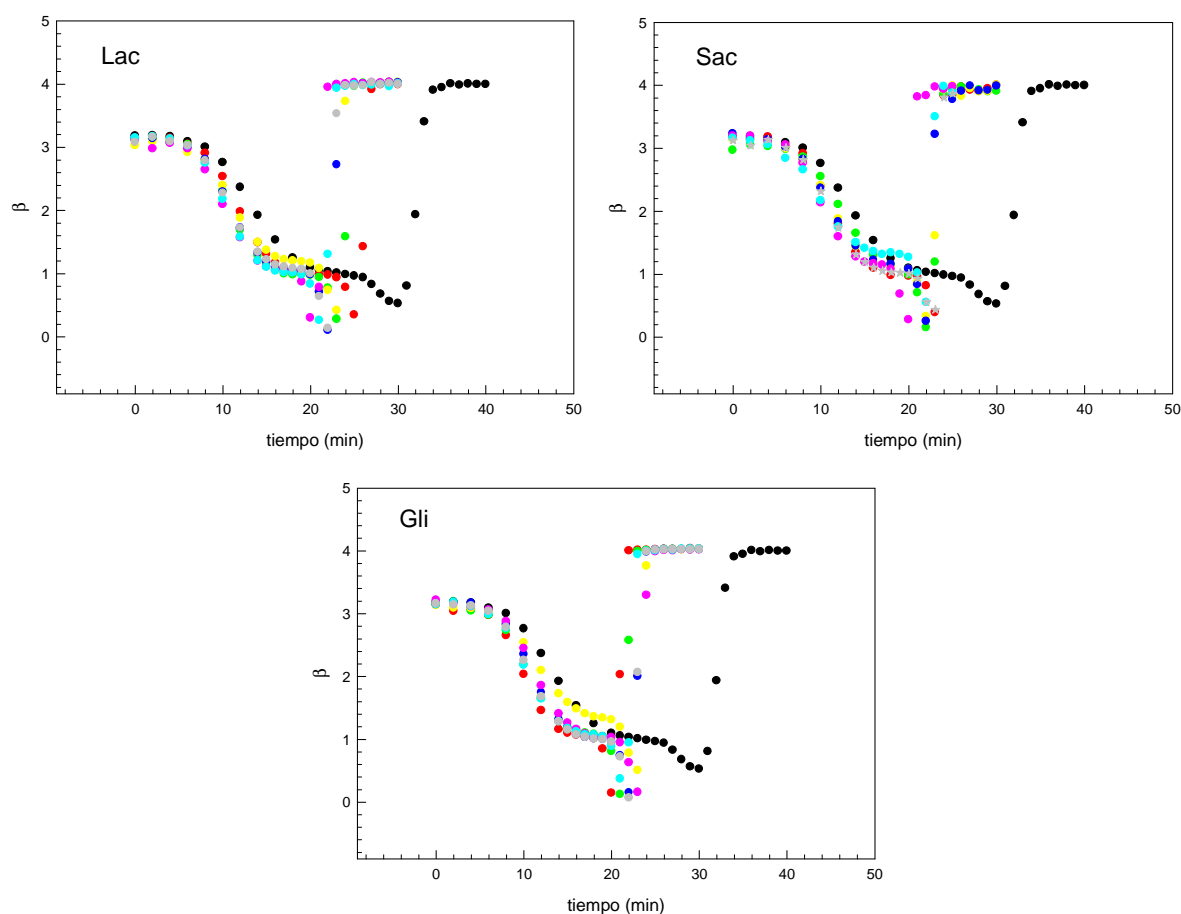
**Figura 3.16.** Diámetro medio de los poros de los geles ácidos de NaCAS 3%  $P/P$  en función de la concentración de GDL adicionada. Imágenes analizadas con el software Image J.

**FORMACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AGREGADOS Y GELES ÁCIDOS DE NaCAS EN PRESENCIA DE PEQUEÑOS COSOLUTOS: SACAROSA, LACTOSA, GLICEROL Y CALCIO**

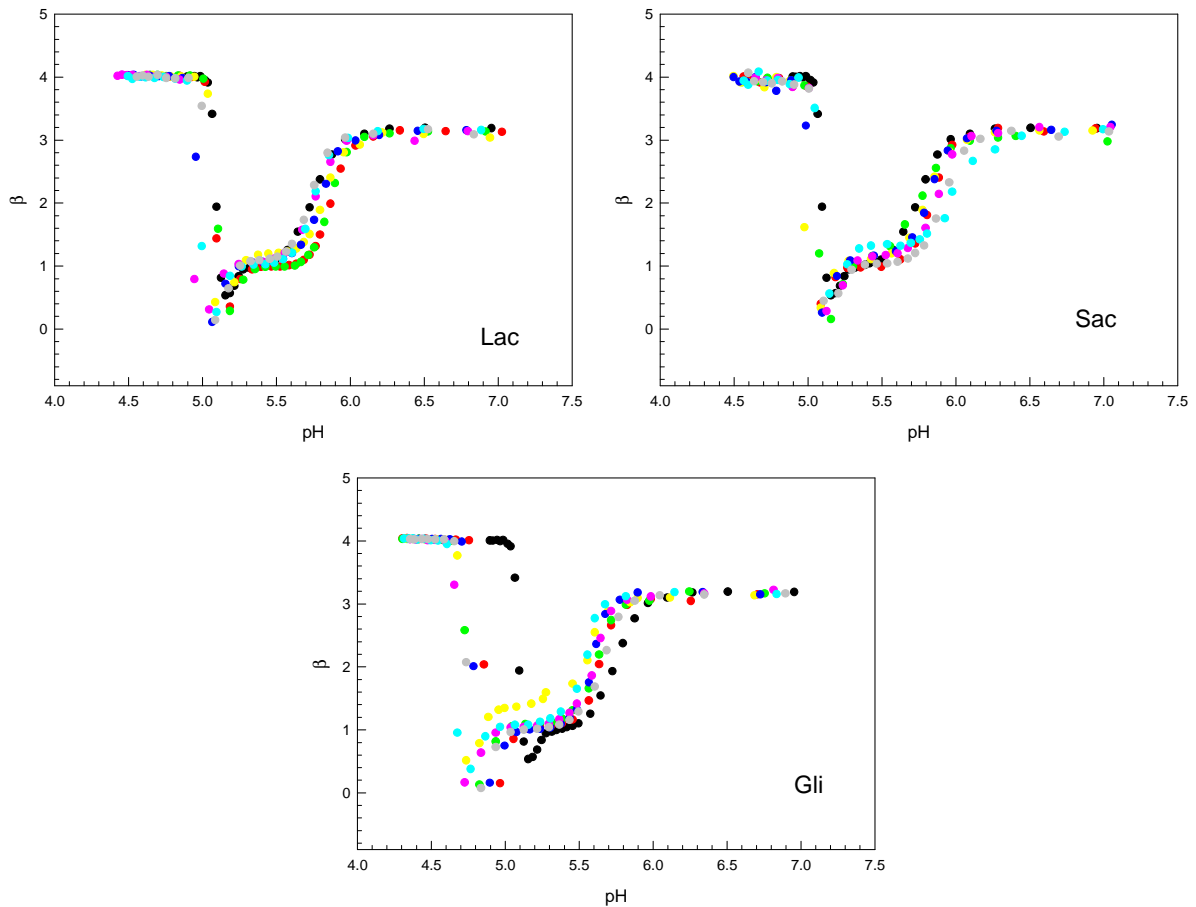
**3.6. Efecto de la presencia de Sac, Lac o Gli sobre la agregación ácida del NaCAS**

**3.6.1. Evaluación del tamaño medio de las partículas por turbidimetría**

Se evaluó el proceso de agregación del NaCAS en presencia de Sac, Lac o Gli por acidificación lenta inducida por la adición de una cantidad fija de GDL al sistema, tal como se explicó en la sección 2.3.7.1. Se estudió la variación del tamaño medio de las partículas durante la floculación y la estructura de los agregados formados mediante técnicas turbidimétricas. Como ya se mencionó previamente, se analizó la variación de los parámetros  $t_{ag}$ ,  $pH_{ag}$  y  $D_f$  (Figuras 3.17 y 3.18).



**Figura 3.17.** Variación de  $\beta$  con el tiempo luego de adicionada la GDL. (●) sin cosoluto, con cosoluto (%  $P/V$ ): (●) 0,1; (●) 0,3; (●) 0,5; (●) 0,7; (●) 1,0; (●) 1,5 y (●) 2,0.  $C_{NaCAS}$  0,5%  $P/P$ , R 0,5 y T 35°C.

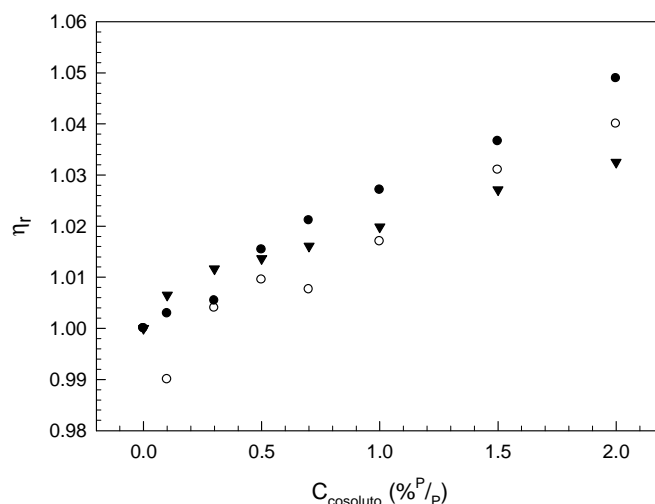


**Figura 3.18.** Variación de  $\beta$  con el pH luego de adicionada la GDL. (●) sin cosoluto, con cosoluto (%  $P/V$ ): (●) 0,1; (●) 0,3; (●) 0,5; (●) 0,7; (●) 1,0; (●) 1,5 y (●) 2,0.  $C_{NaCAS}$  0,5%  $P/P$ ,  $R$  0,5 y  $T$  35°C.

En la Figura 3.17 se observa que el  $t_{ag}$  disminuyó en un rango del 22 al 39% en presencia de los cosolutos, siendo la Lac la que produjo el mayor descenso del  $t_{ag}$ .

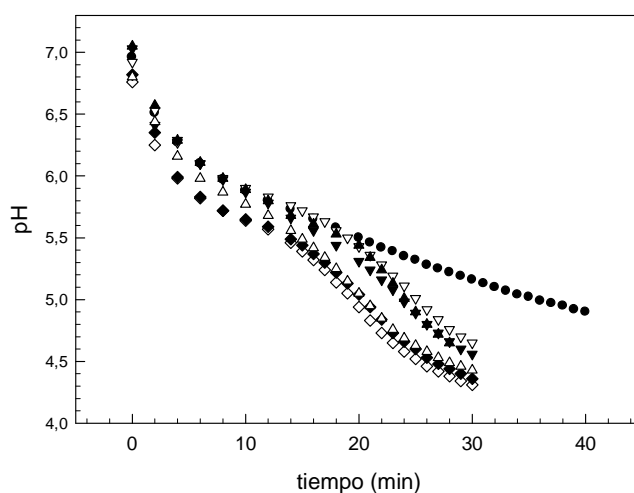
Por otra parte, en la Figura 3.18 se puede observar que, tanto en ausencia de cosolutos o en presencia de ambos disacáridos, el  $pH_{ag}$  presentó valores en el rango 4,9 - 5,0, pero descendió a 4,6 - 4,7 cuando se adicionó Gli.

Además, y debido a que el proceso de agregación está limitado por difusión, y que esta última depende de la viscosidad del medio ( $\eta$ ), se evaluó la variación de la misma en presencia de distintas concentraciones de los cosolutos ensayados ( $C_{cosolutos}$ ). Los resultados se muestran en la Figura 3.19. Todos los cosolutos aumentaron la  $\eta_r$ , siendo la Lac la que produjo el mayor incremento para una dada concentración.



**Figura 3.19.** Variación de  $\eta_r$  en presencia de los cosolutos.  $C_{NaCAS}$  0,5% P/P, R 0,5, T 35°C. (●) Lac, (○) Sac, (▼) Gli.

Respecto a la velocidad de descenso de pH se observó que todos los cosolutos la incrementaron, pero el Gli lo hizo en mayor proporción y a concentraciones más bajas que los azúcares, tal como se observa en la Figura 3.20 para dos de las concentraciones ensayadas.



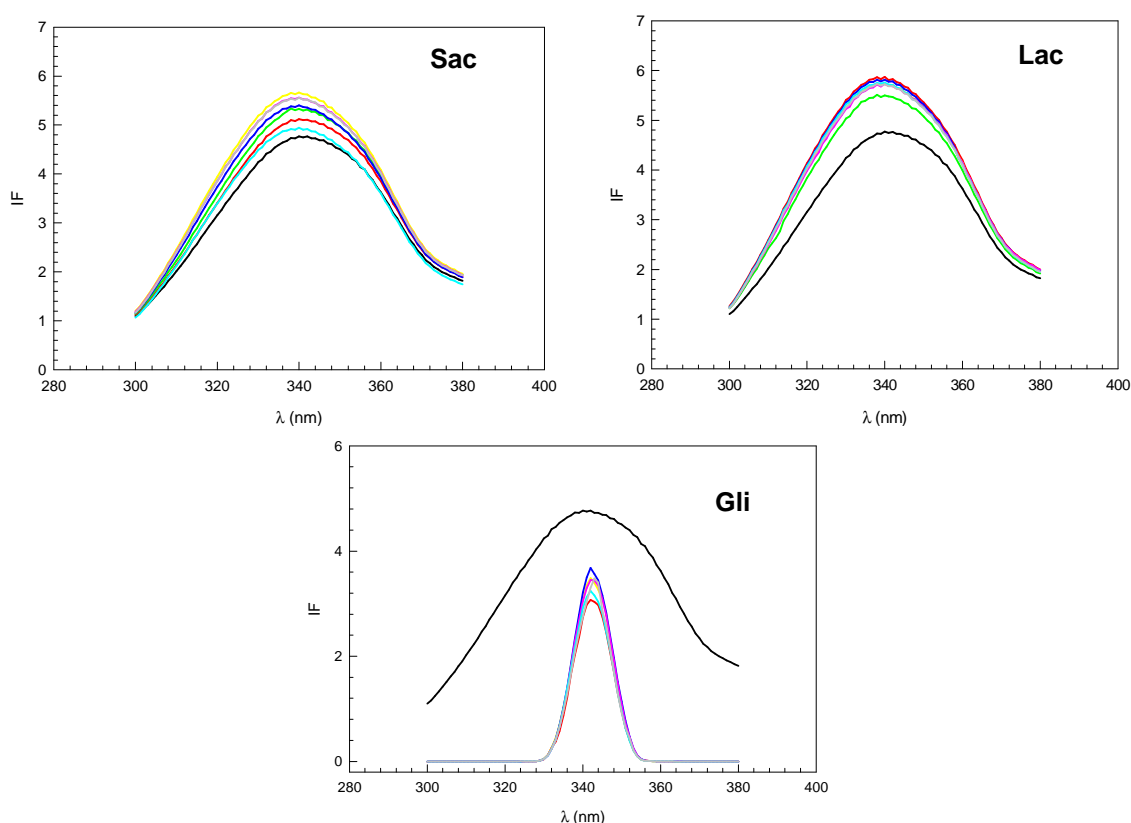
**Figura 3.20.** Velocidad de descenso de pH (●) sin cosoluto, (▽) Lac 0,3%, (▼) Sac 0,3%, (◇) Gli 0,3%, (Δ) Lac 1,0%, (▲) Sac 1,0%, (◆) Gli 1,0%.  $C_{NaCAS}$  0,5% P/P, R 0,5, T 35°C

En presencia de ambos azúcares, el descenso de  $t_{ag}$  se debería al aumento de velocidad para alcanzar el mismo  $pH_{ag}$  que en ausencia de los mismos. El Gli, nucleófilo más eficiente que el agua, incrementa la velocidad de hidrólisis de GDL, pero debido a que su presencia aumenta la estabilidad electroestática (menor  $pH_{ag}$ ) de las partículas, a altas concentraciones del mismo el sistema necesita más tiempo para formar la malla de gel.

Comparando los distintos cosolutos entre sí y para una dada concentración del mismo, la Lac tuvo el mayor  $t_{ag}$ , probablemente por la disminución de la difusión de las partículas durante la etapa de agregación debido a la mayor viscosidad del medio.

### 3.6.2. Cambios estructurales del NaCAS en ausencia y presencia de los cosolutos Sac, Lac y Gli

Se realizaron espectros de excitación y de emisión de la fluorescencia intrínseca proteica en ausencia y en presencia de los cosolutos, con el objeto de detectar corrimientos de las bandas espectrales y/o cambios en la IF.



**Figura 3.23.** Fluorescencia intrínseca del NaCAS en ausencia (—) y presencia de cosolutos (% $P/V$ ): (—) 0,1; (—) 0,3; (—) 0,5; (—) 0,7; (—) 1,0; (—) 1,5; (—) 2,0. Rango de  $\lambda_{em}$  = 300-380nm;  $\lambda_{exc}$  286nm;  $\lambda_{em}$  342nm;  $C_{NaCAS}$  0,1%  $P/P$ ; T 25°C.

En la Figura 3.23 se observa que se modificaron las IF de los espectros de emisión de fluorescencia de la proteína en presencia de los cosolutos, sin cambios significativos en la  $\lambda_{em}$  máxima. El incremento en la IF intrínseca de la proteína en presencia de los azúcares y el descenso de la misma en presencia del Gli, estaría indicando, en ambos casos, la existencia de un cambio de



distinta naturaleza en el entorno de los cromóforos proteicos. Los azúcares promoverían la inserción de dichos grupos en un entorno más hidrofóbico a medida que aumenta la concentración de los mismos. En cambio, el Gli produciría el efecto opuesto.

### 3.6.3. Efecto de los cosolutos sobre la $S_0$ del NaCAS

Se determinó la  $S_0$  de la proteína en ausencia y presencia de los cosolutos en todo el rango de concentraciones ensayado, tal como se explicó en la sección 2.3.3.2.

Como se observa en la Tabla V, el efecto sobre la  $S_0$  dependió de la naturaleza y concentración del cosoluto añadido. En general, la Sac produjo una disminución de la  $S_0$ , mientras que la Lac y el Gli la incrementaron. Esta variación estaría vinculada con el grado de exclusión preferencial de cada cosoluto de la superficie proteica.

**Tabla V: Resultados de  $S_0$  para el NaCAS en ausencia y presencia de pequeños cosolutos**

$C_{\text{cosolutos}} (\% \text{ P/V})$	Sac	Lac	Gli
0,0	454 ± 30	454 ± 30	454 ± 30
0,1	304 ± 21	536 ± 11	518 ± 16
0,3	366 ± 17	500 ± 27	507 ± 16
0,5	533 ± 25	476 ± 10	535 ± 26
0,7	415 ± 14	498 ± 13	497 ± 11
1,0	369 ± 19	478 ± 10	523 ± 18
1,5	374 ± 14	484 ± 17	550 ± 15
2,0	395 ± 25	479 ± 14	528 ± 22

### 3.6.4. Efecto de la presencia de Sac y Lac sobre las propiedades reológicas de los geles ácidos de NaCAS

Se realizaron ensayos reológicos oscilatorios para determinar las propiedades viscoelásticas de los sistemas formados por NaCAS 3%  $\text{P/P}$  en ausencia o presencia de Sac o Lac (0 - 12,0%  $\text{P/V}$ ), manteniendo el rango de relación  $C_{\text{cosoluto}}/C_{\text{NaCAS}}$  dentro del utilizado en el estudio de agregación ácida. Se estimaron el  $t_{\text{gel}}$ ,  $\text{pH}_{\text{gel}}$  y el  $G'_{\text{máx}}$  alcanzado. En todos los casos se trabajó con  $R$  0,5 y  $T$  constante de 35°C (Tabla VI).

**Tabla VI. Resultados de  $t_{gel}$ ,  $pH_{gel}$  y  $G'_{m\acute{a}x}$  para los sistemas formados por NaCAS 3% y los azúcares**

$C_{Sac}$ (% P/v)	$t_{gel}$ (min)	$pH_{gel}$	$G'_{m\acute{a}x}$ (Pa)
0	$14,0 \pm 0,1$	$5,02 \pm 0,01$	$68 \pm 4$
3,0	$13,0 \pm 0,1$	$4,96 \pm 0,01$	$79 \pm 3$
6,0	$9,6 \pm 0,2$	$4,92 \pm 0,01$	$77 \pm 5$
12,0	$10,9 \pm 0,2$	$4,85 \pm 0,01$	$92 \pm 4$

$C_{Lac}$ (% P/v)	$t_{gel}$ (min)	$pH_{gel}$	$G'_{m\acute{a}x}$ (Pa)
0	$14,0 \pm 0,1$	$5,02 \pm 0,01$	$68 \pm 4$
3,0	$15,3 \pm 0,3$	$4,92 \pm 0,01$	$63 \pm 3$
6,0	$15,7 \pm 0,1$	$4,84 \pm 0,01$	$58 \pm 4$
12,0	$16,7 \pm 0,2$	$4,95 \pm 0,01$	$45 \pm 5$

En presencia de Sac, las variaciones de  $t_{gel}$  presentaron una leve disminución con el aumento de la  $C_{Sac}$ , sin cambios apreciables en  $pH_{gel}$ . Los valores máximos de  $G'$  alcanzados fueron mayores que los obtenidos en ausencia del azúcar.

Pugnali y col. estudiaron geles de NaCAS en ausencia y en presencia de Sac por microscopía confocal y análisis de imagen. Ellos reportaron que los geles presentaron una malla cada vez más fina y homogénea a medida que se incrementó la  $C_{Sac}$  adicionada, trabajando a la misma  $C_{NaCAS}$  (3%) y  $R$  0,3. El tamaño de los poros disminuyó al aumentar  $C_{Sac}$ . La reducción del tamaño de poros implica un aumento de la interconectividad de la red de gel que incrementa la rigidez del mismo, como se evidencia con el incremento de  $G'_{m\acute{a}x}$  (133). Otros autores han reportado un aumento en la magnitud de las interacciones CN-CN en presencia de Sac (50, 134). Este cambio en las uniones moleculares proteicas también contribuiría al incremento de la compactación y, por lo tanto, de la elasticidad de la red de gel.

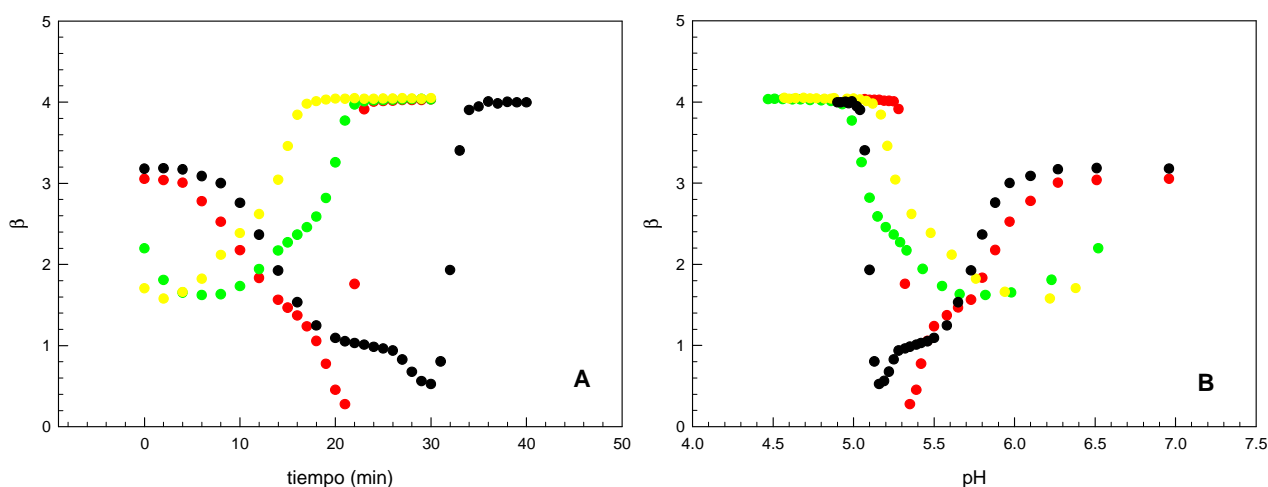
La Lac presentó un efecto opuesto a la Sac sobre la elasticidad de los geles. Este azúcar, el cual posee un carbono anomérico libre, puede abrir su estructura de anillo y generar un impedimento estérico para las interacciones CN-CN. Por otra parte, el incremento de la viscosidad del medio, inducido por la Lac, es más grande que en el caso de la Sac, dificultando la difusión de las partículas unas a otras y, por lo tanto, disminuyendo la probabilidad de interaccionar entre ellas. En presencia de este disacárido las variaciones de  $t_{gel}$  presentaron un leve aumento con el incremento de la  $C_{Lac}$ , sin cambios apreciables en  $pH_{gel}$ .

### 3.6.5. Efecto de la presencia de $\text{Ca}^{2+}$ sobre la agregación ácida de las partículas de NaCAS

#### 3.6.5.1. Evaluación del tamaño medio de las partículas por turbidimetría

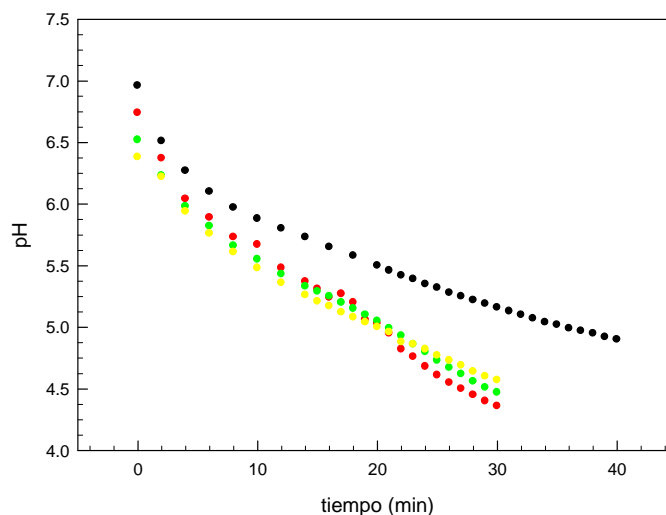
Ya ha sido demostrado que el  $\text{Ca}^{2+}$  se fija a los grupos fosfoserina y carboxilato de las CN, conduciendo a la asociación del CAS y a la formación de agregados coloidales que permanecen estables en suspensión a concentraciones del catión menores a 6mM. También se concluyó que la solubilidad, estabilidad y viscosidad de las suspensiones y la conformación proteica dependen de la relación  $\text{Ca}^{2+}$ : CAS (36, 49).

En este trabajo, se evaluó el efecto de la presencia de diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  (0 - 2,0mM) sobre el proceso de agregación del NaCAS inducido por acidificación lenta por la adición de una cantidad fija de GDL al sistema. Se estudió la variación del tamaño de las partículas durante la floculación y la estructura de los agregados formados y se analizó la variación de los parámetros  $t_{\text{ag}}$ ,  $\text{pH}_{\text{ag}}$  y  $D_f$  frente a la presencia del ión  $\text{Ca}^{2+}$  (Figuras 3.24 A y B).



**Figura 3.24.** Variación de  $\beta$  con el tiempo (A) y con el pH (B) luego de adicionada la GDL. (●) sin  $\text{Ca}^{2+}$ , con  $\text{Ca}^{2+}$  (mM): (●) 0,5; (●) 1,5; (●) 2,0.  $C_{\text{NaCAS}}$  0,5%  $P/P$ , R 0,5 T 35°C.

A medida que aumentó la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , el  $t_{ag}$  disminuyó, mientras que el  $\text{pH}_{ag}$  presentó el efecto opuesto. También se observó que el tamaño medio inicial de las partículas de NaCAS ( $\beta$  al  $t = 0$ ) fue menor cuanto mayor fue la concentración del catión. Por otro lado, la presencia del  $\text{Ca}^{2+}$  aumentó la velocidad de descenso del pH, como lo revela la Figura 3.25, si bien dicho catión no modificó la velocidad de hidrólisis de la GDL en ausencia de proteína.



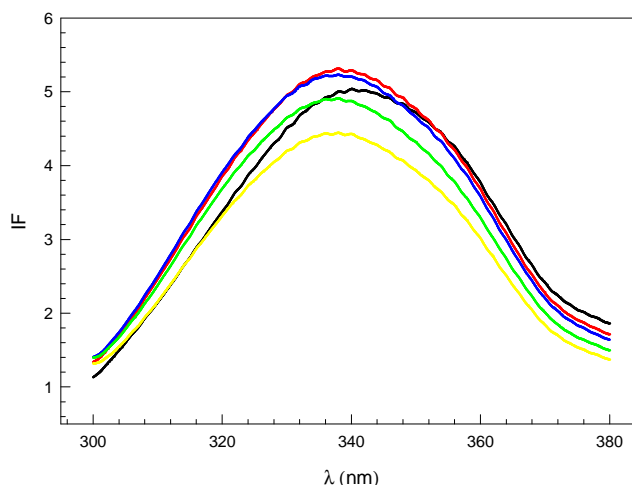
**Figura 3.25.** Variación del pH con el tiempo luego de adicionada la GDL. (●) sin  $\text{Ca}^{2+}$ , con  $\text{Ca}^{2+}$  (mM): (●) 0,5; (●) 1,5; (●) 2,0.  $C_{\text{NaCAS}}$  0,5%  $P/P$  R 0,5 T 35°C.

La disminución del  $t_{ag}$  puede deberse al aumento de la velocidad con que se alcanza el  $\text{pH}_{ag}$ . Además, como el proceso de agregación depende de la difusión de las partículas, dado que el  $\text{Ca}^{2+}$  indujo la formación de partículas iniciales de menor tamaño medio, éstas difundirían más rápidamente y, por ende, agregarían a menor tiempo.

El NaCAS posee carga neta negativa. Al unirse el catión calcio, disminuye dicha carga, lo que contribuiría a la desestabilización de las partículas en suspensión durante la acidificación, y como consecuencia, éstas agregarían a pH menos ácidos.

### 3.6.6. Cambios estructurales del NaCAS en ausencia y presencia de $\text{Ca}^{2+}$

Se realizaron espectros de excitación y de emisión de la fluorescencia intrínseca proteica en ausencia y en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , con el objeto de detectar corrimientos de las bandas espectrales y/o cambios en la IF.



**Figura 3.26.** Fluorescencia intrínseca del NaCAS en ausencia (—) y presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (mM): (—) 0,5; (—) 1; (—) 1,5; (—) 2. Rango de  $\lambda_{em}$  = 300-380nm;  $\lambda_{exc}$  286nm;  $\lambda_{em}$  342nm;  $C_{NaCAS}$  0,1% P/P; T 25°C.

En la Figura 3.26 se observa un corrimiento hacia la banda azul del espectro de la  $\lambda_{em}$  máxima en presencia del  $\text{Ca}^{2+}$ , aunque no hay una relación directa entre la concentración del catión y la IF. Estos resultados estarían reflejando la inserción de los grupos cromóforos proteicos en un entorno menos polar. Esto coincide con resultados previos en donde se comprobó que el aumento de la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  incrementa el grado de compactación de las partículas coloidales de CAS (49).

### 3.6.7. Estudio de las propiedades reológicas de los geles ácidos de NaCAS en presencia de $\text{Ca}^{2+}$

Se realizaron ensayos reológicos oscilatorios para determinar las propiedades viscoelásticas de los sistemas formados por NaCAS 3% P/P en ausencia o presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (0 - 2,0mM). Se estimaron el  $t_{gel}$ ,  $pH_{gel}$  y el  $G'_{máx}$  alcanzado. En todos los casos se trabajó con R 0,5 y T constante de 35°C (Tabla VII).

**Tabla VII. Resultados de  $t_{gel}$ ,  $pH_{gel}$  y  $G'_{m\acute{a}x}$  para los sistemas formados por NaCAS 3% y  $Ca^{2+}$**

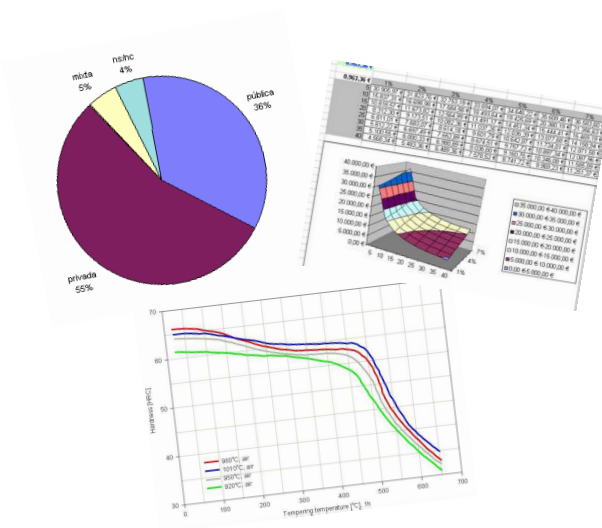
$Ca^{2+}$ (mM)	$t_{gel}$ (min) $\pm 0,1$	$pH_{gel} \pm 0,01$	$G'_{m\acute{a}x}$ (Pa) $\pm 4$
0	14,0	5,02	68
0,5	15,9	4,94	87
1,0	15,3	5,07	65
2,0	14,0	5,19	23

En general, a mayores concentraciones del catión el  $pH_{gel}$  aumentó y disminuyó el  $t_{gel}$ , probablemente por la pérdida de la carga neta de las partículas. Como consecuencia, se reduce la estabilidad electrostática y las partículas tienden a la floculación. A bajas concentraciones de  $Ca^{2+}$ , los geles alcanzaron valores de  $G'_{m\acute{a}x}$  mayores que los geles formados en ausencia de  $Ca^{2+}$  a la misma concentración proteica y R. Por lo tanto, el  $Ca^{2+}$  favorecería las fuerzas intermoleculares durante la formación de la malla de gel. Cuando la concentración de  $Ca^{2+}$  fue de 0,5mM, el proceso de gelación es lo suficientemente lento como para permitir el reordenamiento de la malla de gel, dando lugar a geles más elásticos. Por el contrario, a mayores concentraciones de  $Ca^{2+}$  ( $> 0,5mM$ ),  $G'_{m\acute{a}x}$  disminuyó. En trabajos previos se ha reportado que el volumen específico parcial ( $v_{sp}$ ) de las partículas de CAS aumenta a bajas relaciones  $Ca^{2+}/CAS$ , y luego decrece hasta valores bajos cuando la relación  $Ca^{2+}/CAS$  aumenta. El primer incremento en el  $v_{sp}$  indica un cierto grado de expansión por unidad de masa de  $Ca^{2+}$  adicionado, lo cual estaría relacionado con la incorporación del  $Ca^{2+}$  al NaCAS, sustituyendo de esta manera un catión monovalente. Esta sustitución aumentaría el grado de hidratación de las partículas. Cuando la relación  $Ca^{2+}/CAS$  aumenta, una mayor incorporación de  $Ca^{2+}$  produce estructuras más compactas (49). Se ha reportado que el  $Ca^{2+}$  se une secuencialmente a diferentes tipos de sitios de los CAS (36). Este cambio estructural podría atribuirse a la presencia de un segundo tipo de sitio de unión al  $Ca^{2+}$ , probablemente por formación de puentes de calcio intra o intermoleculares junto a un cierto grado de deshidratación, lo cual generaría una estructura más cerrada.

Por lo tanto, la diferencia de la elasticidad final de los geles ácidos formados en presencia de distintas concentraciones de  $Ca^{2+}$  puede ser

atribuida a cambios conformacionales de las partículas de CAS y a modificaciones cinéticas durante el proceso de gelación.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN Parte II





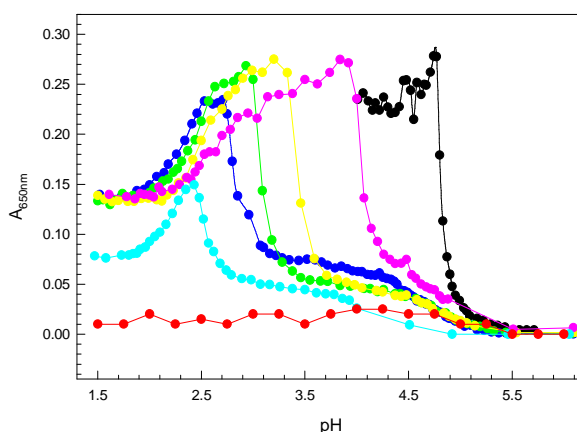
## CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN: Parte II

### FORMACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GELES ÁCIDOS DE NaCAS Y POLISACÁRIDOS: PROPIEDADES ESTRUCTURALES, FUNCIONALES Y REOLÓGICAS

#### 4.1. Efecto de la presencia de carboximetilcelulosa (CMC)

##### 4.1.1. Ensayo de solubilidad del NaCAS en ausencia y presencia de CMC

Se realizaron titulaciones potenciométricas por adición de HCl 1M a la proteína, en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de CMC para evaluar la solubilidad del NaCAS frente a cambios de pH y estudiar el efecto que este polisacárido ejerce sobre la misma. Se midió la A a 650nm ( $A_{650nm}$ ) de los sistemas cada vez que variaba el pH. En la Figura 4.1 se muestran las curvas de titulación obtenidas.

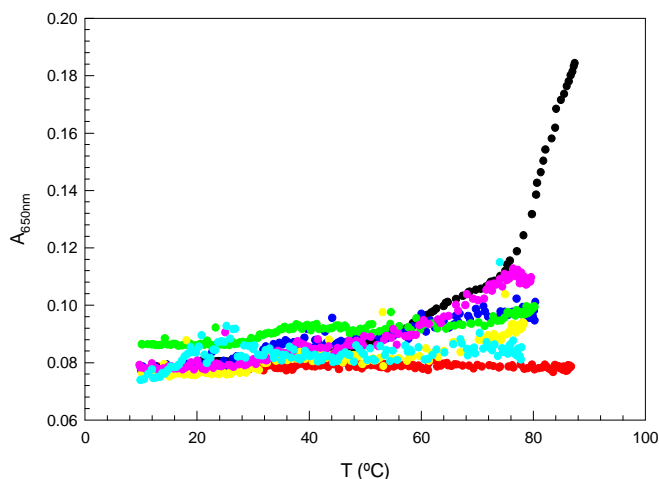


**Figura 4.1.** Curvas de titulación potenciométrica del polisacárido (●), de la proteína (●) y de las mezclas NaCAS:CMC: (●) 8:1; (●) 4:1; (●) 2:1; (●) 1:1; (●) 1:1,5.  $C_{NaCAS}$  0,02% P/P;  $C_{CMC}$  0,02% P/P; T 25°C.

El NaCAS comenzó a agregar a un pH cercano al pI de las CN, reflejado esto en un aumento de la  $A_{650nm}$ . Por otra parte, el polisacárido resultó soluble en todo el rango de pH estudiado. En presencia de CMC, el pH al cual comenzó la agregación proteica fue menor, es decir que a medida que aumenta la cantidad de CMC adicionada al sistema se necesita mayor concentración de protones para neutralizar la carga negativa del NaCAS y que comience la agregación. Estos resultados estarían indicando un efecto estabilizante del polisacárido sobre las partículas de NaCAS en suspensión.

#### 4.1.2. Evaluación de la estabilidad térmica del NaCAS en ausencia y presencia de CMC

Se realizaron medidas de la  $A_{650nm}$  durante el calentamiento continuo de los diferentes sistemas con el objetivo de evaluar la estabilidad térmica de la proteína en ausencia y/o presencia del polisacárido (Figuras 4.2).



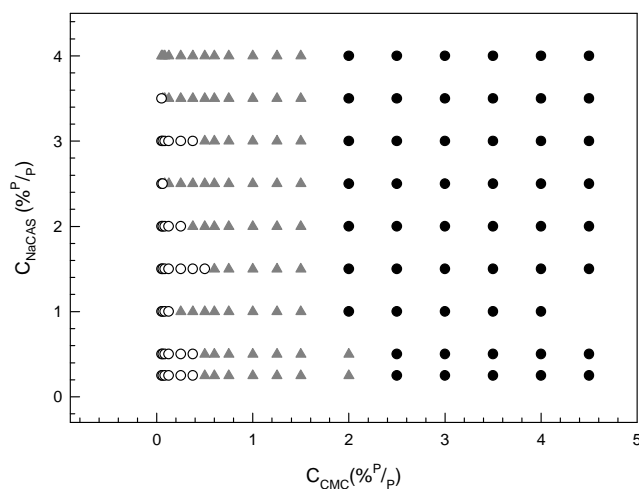
**Figura 4.2.** Curvas de estabilidad térmica del NaCAS (●), de CMC (●) y de las mezclas NaCAS:CMC: (●) 8:1; (●) 4:1; (●) 2:1; (●) 1:1; (●) 1:1,5.  $C_{NaCAS}$  0,02% P/P,  $C_{CMC}$  0,02% P/P, pH 6,80; Rango de T ensayado: 10-100°C.

Tanto la CMC sola como todas las mezclas NaCAS:CMC ensayadas en todas sus relaciones no se vieron mayormente afectadas por el aumento de T, dentro del rango de T estudiado (10-100°C). Esto estaría indicando que el polisacárido es estable térmicamente en el rango de T evaluado, y que su adición al NaCAS aumentaría la estabilidad térmica de este último, el cual comienza a agregar aproximadamente a una T de ~60-70°C en ausencia del polisacárido.

#### 4.1.3. Estudio de la compatibilidad termodinámica NaCAS/CMC

A fin de evaluar la existencia de incompatibilidad termodinámica ocasionada por las interacciones entre el NaCAS y la CMC, se realizaron las mezclas de los mismos, en distintas proporciones, en *buffer* Tris-HCl 10mM pH 6,80 a T ambiente, y se incubaron 24 hs. a 35°C, en condiciones de T y humedad controladas, de acuerdo al protocolo realizado por Spyropulos et al (104). Luego del período de incubación, se verificó la existencia o no de separación de fases y/o aparición de turbidez mediante una inspección visual.

La Figura 4.3 muestra los resultados obtenidos. Aún a bajas concentraciones de CMC ( $C_{CMC}$ ) se observó incompatibilidad termodinámica entre ambos polímeros.

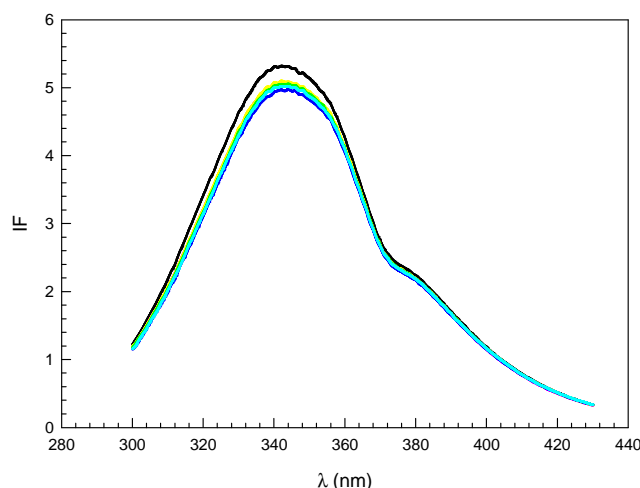


**Figura 4.3.** Curva de Incompatibilidad Termodinámica NaCAS/CMC. T 35°C; 24hs. de incubación: (○) una fase homogénea; (▲) turbio con alguna separación o dos fases; (●) dos fases tipo gel.

#### 4.1.4. Estudio de los cambios estructurales del NaCAS en presencia de CMC

Con el objetivo de detectar corrimientos de las bandas espectrales y/o cambios en la IF de la proteína, se realizaron espectros de excitación y de emisión de la fluorescencia intrínseca proteica en ausencia y presencia del polisacárido en estudio (Figura 4.4).

Se observó una leve disminución de las IF de la proteína en presencia de todas las concentraciones de CMC ensayadas, sin cambios significativos en la  $\lambda_{em}$  máxima. Esto estaría indicando que hay un leve aumento de la polaridad del entorno de los fluoróforos intrínsecos proteicos cuando la proteína se encuentra en presencia del polisacárido.



**Figura 4.4.** Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca del NaCAS en ausencia (—) y presencia de diferentes concentraciones de CMC: (—) 8:1; (—) 4:1; (—) 2:1; (—) 1:1 y (—) 1:1,5.  $C_{\text{NaCAS}} 0,1\% \text{ P/P}$ ;  $T 35^{\circ}\text{C}$ ; Rango de  $\lambda_{\text{em}} = 300\text{-}430\text{nm}$ ;  $\lambda_{\text{exc}} 286\text{nm}$ .

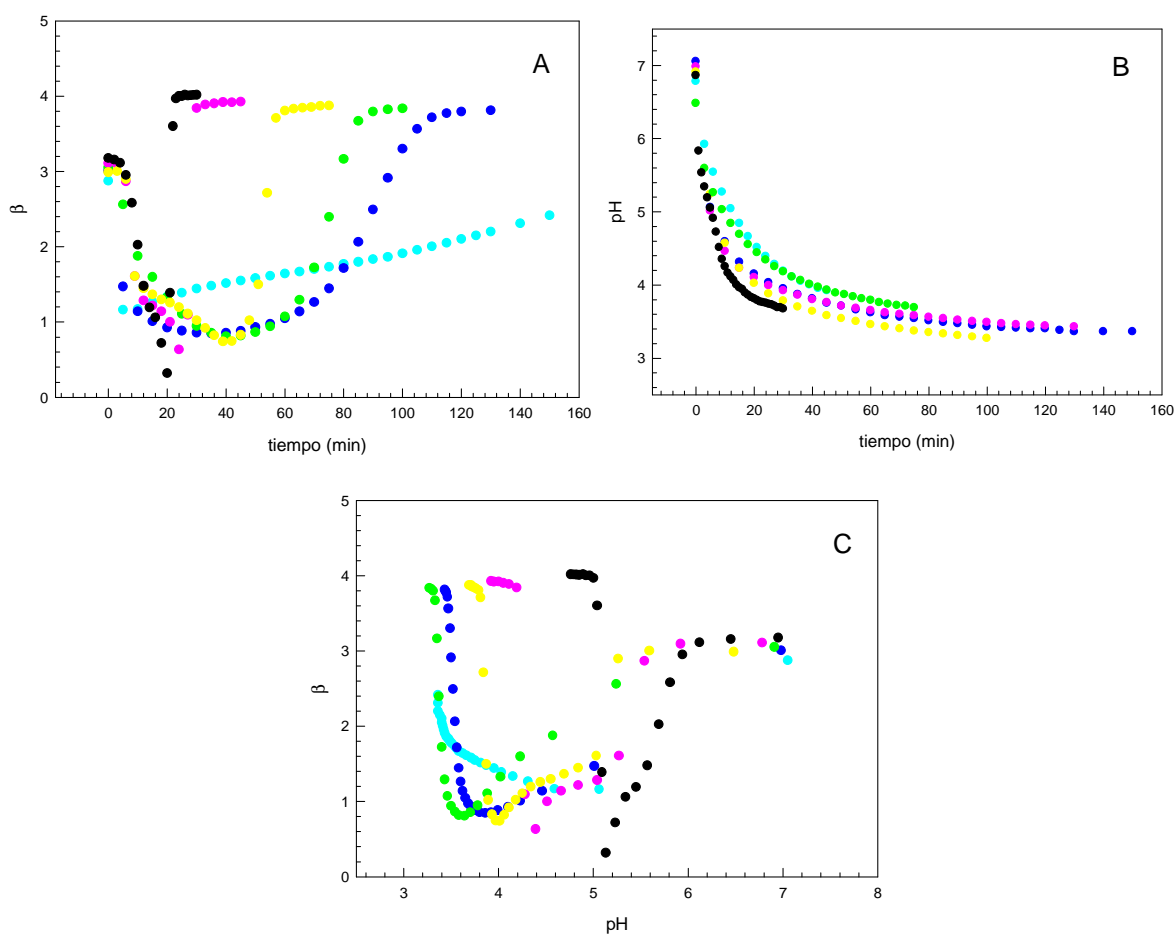
Por otra parte, se determinó la  $S_0$  del NaCAS en ausencia y presencia de CMC, tal como se explicó en la sección 2.3.3.2. Como se observa en la Tabla VIII, la presencia de CMC produce una disminución en la  $S_0$  del NaCAS a medida que se incrementa la concentración de polisacárido adicionado. Estos resultados están en concordancia con lo observado en la variación de la fluorescencia intrínseca proteica en el gráfico anterior e indican un aumento de la hidrofiliidad del entorno de los fluoróforos.

**Tabla VIII. Resultados de  $S_0$  para el NaCAS  $0,1\% \text{ P/P}$  en ausencia y presencia de CMC a  $35^{\circ}\text{C}$  ( $\lambda_{\text{exc}} 396\text{nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} 489\text{nm}$ )**

$C_{\text{CMC}} (\% \text{ P/P})$	$S_0 \pm 0,2$
0,0000	64,3
0,0625	59,1
0,1250	54,2
0,2500	45,8
0,5000	26,6
0,7500	16,1

#### 4.1.5. Estudio de la agregación ácida de las partículas de NaCAS mediante técnicas turbidimétricas. Efecto de la presencia de CMC

Se evaluó el proceso de agregación ácida del NaCAS inducida por GDL. Se estudió el efecto de la adición de diferentes cantidades de CMC sobre la velocidad de descenso de pH, la cinética del proceso de agregación de la mezcla NaCAS:CMC y el estado final de los agregados formados. Para ello se trabajó con una concentración de NaCAS 0,5%  $P/P$ , T 35°C y variando R, de manera tal que la velocidad de descenso de pH se mantuviera constante. Se analizó la variación de los parámetros  $t_{ag}$ ,  $pH_{ag}$  y  $D_f$  de los agregados obtenidos.

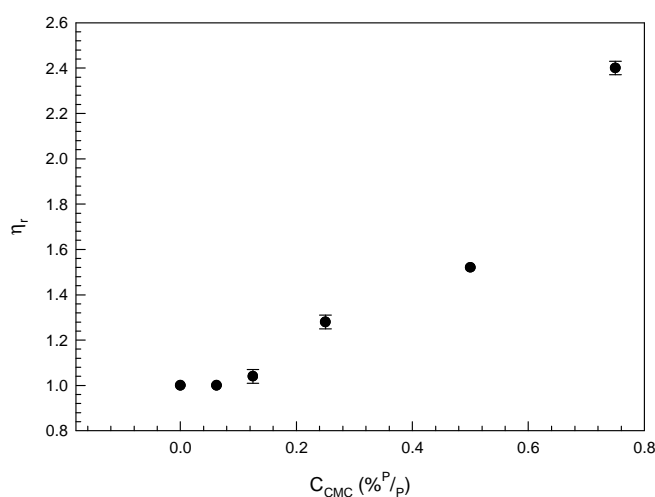


**Figura 4.5.** Variaciones del parámetro  $\beta$  (A) y descenso de pH (B) con el tiempo y variaciones de  $\beta$  con el pH (C) luego de adicionada GDL: (●) NaCAS R 0,7 y mezclas NaCAS:CMC: (●) 8:1 R 1; (●) 4:1 R 1; (●) 2:1 R 3; (●) 1:1 R 6; (●) 1:1,5 R 10.  $C_{NaCAS}$  0,5%  $P/P$  a T 35°C

En todos los casos estudiados pudo observarse la existencia de dos etapas bien definidas (Figura 4.5 A), tal como se explicó en la sección 3.1.3, para el NaCAS en ausencia del polisacárido. Se puede notar que, a medida que aumenta la proporción de CMC, hay un aumento en el  $t_{ag}$ , y debido a que la velocidad de descenso del pH fue prácticamente la misma (Figura 4.5 B),

esto probablemente estaría vinculado a la disminución del  $\text{pH}_{\text{ag}}$  (Figura 4.5 C). Debido a que las partículas de NaCAS en suspensión, al pH isoiónico, poseen carga neta negativa, la adición de CMC, con carga también negativa, incrementaría la estabilidad electrostática evitando la agregación de las partículas y, por lo tanto, disminuyendo el  $\text{pH}_{\text{ag}}$ .

Además, y debido a que el proceso de agregación está limitado por difusión, y que esta última depende de la viscosidad del medio ( $\eta$ ), se determinó la variación de la misma por la presencia de las diferentes concentraciones de CMC. En la Figura 4.6 se observa la variación de la  $\eta_r$  en presencia del polisacárido en todo el rango de concentraciones ensayadas.



**Figura 4.6.** Variación de  $\eta_r$  en presencia de las diferentes concentraciones de CMC. T 35°C

Se observó un aumento progresivo de la  $\eta_r$  del medio a medida que aumentó la  $C_{\text{CMC}}$  adicionada, lo cual afecta la velocidad de agregación de las partículas, contribuyendo al aumento del  $t_{\text{ag}}$ .

La  $D_f$  de los agregados formados disminuyó ligeramente con el aumento de la relación CMC:NaCAS (Tabla IX), es decir que la presencia del polisacárido condujo a la formación de agregados con menor grado de compactación. Esto estaría vinculado con el descenso de la  $S_0$ , que implica una disminución de las interacciones hidrofóbicas durante la formación de los agregados.

Tabla IX. Resultados obtenidos de  $D_f$  para los sistemas estudiados

Sistema	$D_f \pm 0,02$
NaCAS 0,5% $P/P$	4,01
NaCAS:CMC 8:1	3,93
NaCAS:CMC 4:1	3,87
NaCAS:CMC 2:1	3,84
NaCAS:CMC 1:1	3,81
NaCAS:CMC 1:1,5	2,42

#### 4.1.6. Estudio de las propiedades reológicas de geles ácidos de NaCAS en presencia de CMC

Se realizaron ensayos reológicos oscilatorios para determinar las propiedades viscoelásticas de los geles ácidos formados por NaCAS (3%  $P/P$ ), en ausencia y presencia de CMC (0 - 1,5%), R 1 y T 35°C. Se estimó el  $t_{gel}$ , el  $pH_{gel}$  y  $G'_{máx}$  alcanzado por cada uno de los sistemas estudiados. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla X.

Tabla X. Resultados de  $t_{gel}$ ,  $pH_{gel}$  y  $G'_{máx}$  para los sistemas formados por NaCAS 3%  $P/P$  y  $C_{CMC}$  variable, T 35°C y R 1

Sistema	$t_{gel}$ (min $\pm 0,01$ )	$pH_{gel}$ ( $\pm 0,01$ )	$G'_{máx}$ ( $\pm 0,1$ )
NaCAS 3%	7,54	4,72	71,0
NaCAS 3%-CMC 0,375% (8:1)	17,73	4,49	74,4
NaCAS 3%-CMC 0,50% (6:1)	21,50	3,90	51,4
NaCAS 3%-CMC 0,75% (4:1)	24,99	3,77	26,3
NaCAS 3%-CMC 1,5% (2:1)	81,36	3,79	4,8

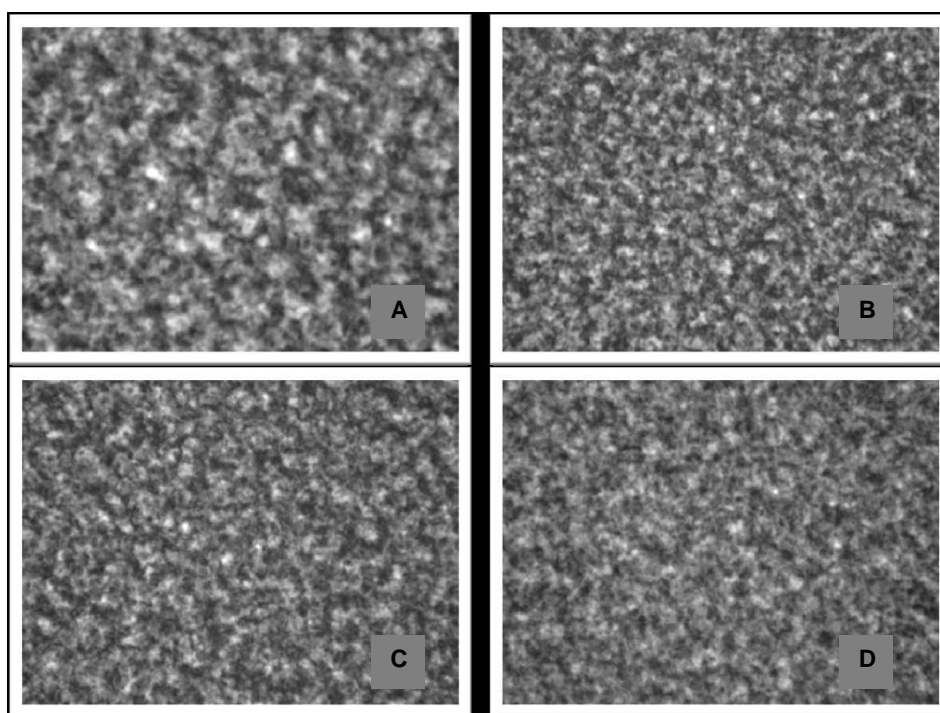
Se observó que a medida que se incrementó la concentración de CMC aumentó el  $t_{gel}$  y disminuyó el  $pH_{gel}$ . Por otra parte,  $G'_{máx}$  fue mayor al adicionar pequeñas cantidades de CMC, pero disminuyó a medida que aumentó la concentración del polisacárido. Por lo tanto, a altas relaciones CMC:NaCAS, los geles fueron menos elásticos, en coincidencia con lo observado en la sección anterior a bajas concentraciones de NaCAS (0,5%). Las mezclas NaCAS:CMC a relaciones 1:1 y 1:1,5 que presentaron dos fases tipo gel aún en ausencia de GDL, no pudieron ser ensayadas.

Se ha reportado que la CMC se adsorbe a la superficie de las micelas de CN formando una monocapa que genera, al igual que la  $\kappa$ -CN a pH neutro, repulsión electrostática entre las micelas a bajo pH (135). Algo semejante ocurriría en el caso de las mezclas NaCAS:CMC, aumentando así la estabilidad durante la agregación y gelación ácidas inducida por GDL. El grado de compactación y la elasticidad de los agregados y geles de NaCAS fueron

mayores cuando la proporción de CMC fue baja pero sufrió un fuerte descenso cuando la cantidad de polisacárido adicionado aumentó. Por otro lado, la incompatibilidad termodinámica afectó la elasticidad final de los geles. Según el diagrama de fases de NaCAS y CMC (Figura 4.3, sección 4.1.3), cuando la  $C_{CMC}$  es  $0,375\%^{P/P}$ , ambos biopolímeros permanecen en una única fase, pero al aumentar la proporción de CMC existe incompatibilidad termodinámica y ocurre la separación de fases. Esta incompatibilidad induciría la formación de geles menos elásticos.

#### 4.1.7. Análisis de la microestructura de los geles en presencia de CMC

Se evaluó la microestructura de los geles ácidos proteicos formados por mezclas de NaCAS y CMC mediante el análisis digital de las imágenes obtenidas por microscopía óptica invertida (Figura 4.7).



**Figura 4.7.** Imágenes de los geles obtenidos usando un microscopio óptico invertido con un objetivo 100x y una cámara digital acoplada con zoom 7.1x.  $C_{NaCAS}$  3%  $P/P$ ,  $T$  35°C y  $R$  1, para diferentes relaciones NaCAS:CMC: (A) sin CMC, (B) 8:1, (C) 6:1 y (D) 4:1.

A través del análisis cualitativo de las imágenes, se observaron diferentes grados de compactación de los geles formados en presencia de distintas proporciones de CMC. La Tabla XI muestra los valores de tamaño promedio de poro de los geles de NaCAS en ausencia y presencia de CMC. A



bajas concentraciones de CMC, a las cuales la velocidad de gelación fue menor (mayor  $t_{gel}$ ), se formaron geles más estructurados, más compactos y con poros más pequeños. Esto se debe a que, cuando el proceso es lento, la malla de gel puede reestructurarse por rotura de enlaces y formación de otros nuevos, generando una malla de gel más estructurada y, por lo tanto, con poros progresivamente más pequeños. Otros autores también han reportado que la velocidad de gelación puede afectar la dureza y la elasticidad del gel formado (47).

Pero con el incremento de la concentración de CMC, se observó un leve aumento en el tamaño medio de los poros. Las mezclas de NaCAS:CMC con mayores proporciones del polisacárido no pudieron ser analizadas por esta técnica.

**Tabla XI. Tamaño promedio de poro de los geles de NaCAS en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de CMC, a 35°C y R 1**

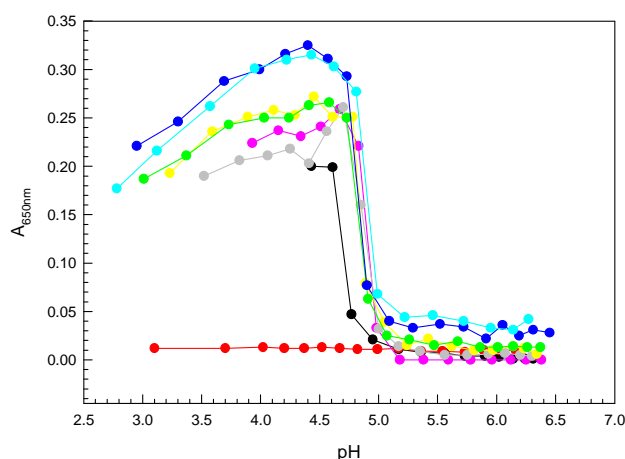
Sistema	Tamaño promedio de poro ( $\mu\text{m}$ )
NaCAS 3%	$3,1 \pm 0,4$
NaCAS 3%-CMC 0,375% (8:1)	$2,7 \pm 0,2$
NaCAS 3%-CMC 0,500% (6:1)	$3,0 \pm 0,2$
NaCAS 3%-CMC 0,750% (4:1)	$3,4 \pm 0,3$

Estos resultados coinciden con los valores de  $G'_{m\acute{a}x}$  obtenidos para las diferentes mezclas (Tabla X). Los geles con poros más grandes serán menos elásticos.

## 4.2. Efecto de la presencia de goma guar (GG)

### 4.2.1. Ensayo de solubilidad del NaCAS en ausencia y presencia de GG

Se realizaron titulaciones potenciométricas por adición de HCl 1M a la proteína, en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de GG para evaluar la solubilidad del NaCAS frente a cambios de pH y estudiar el efecto que éste polisacárido ejerce sobre la misma. Se midió la  $A_{650nm}$  de los sistemas cada vez que variaba el pH. En la Figura 4.8 se muestran las curvas de titulación obtenidas.

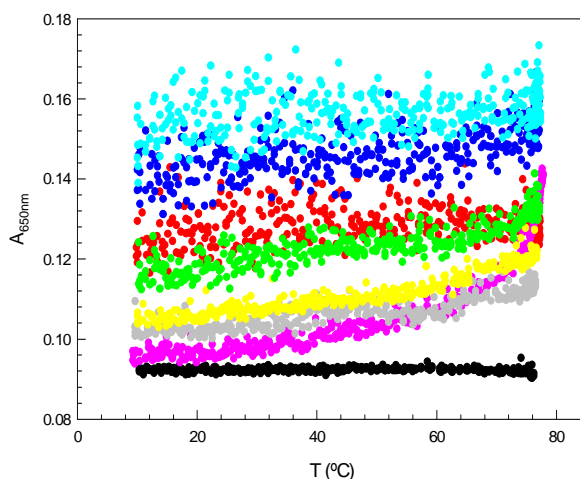


**Figura 4.8.** Curvas de titulación potenciométrica del polisacárido (●), la proteína (●) y las mezclas NaCAS:GG: (●) 8:1; (●) 6:1; (●) 4:1; (●) 2:1; (●) 1:1; (●) 1:1,5.  $C_{NaCAS}$  0,02%  $P/P$ ;  $C_{GG}$  0,02%  $P/P$ ; T 25°C.

Teniendo en cuenta que el polisacárido resultó soluble en todo el rango de pH estudiado, se observó que, en todos los casos en los que estuvo presente la GG, el pH al cual comienza la agregación proteica no cambia significativamente. Sin embargo, la A máxima obtenida aumentó a medida que se incrementó la cantidad de GG adicionada. Estos resultados estarían indicando la posible formación inicial de agregados y/o micropartículas de NaCAS en presencia de GG.

### 4.2.2. Evaluación de la estabilidad térmica del NaCAS en ausencia y presencia de GG

Se realizaron medidas de la A durante el calentamiento continuo de los diferentes sistemas con el objetivo de evaluar la estabilidad térmica de la proteína en ausencia y/o presencia del polisacárido (Figura 4.9).



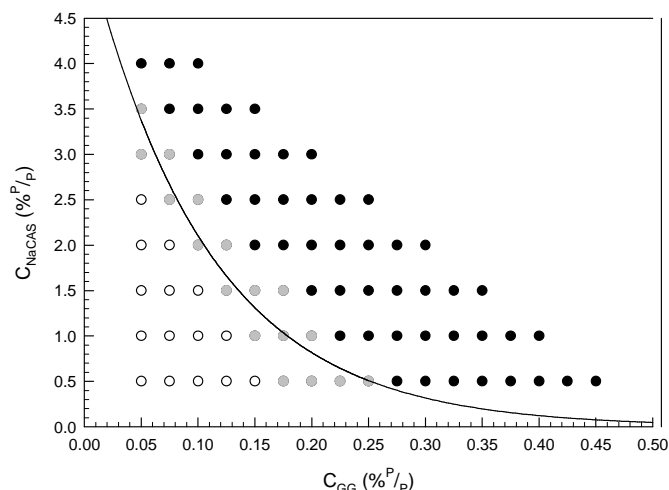
**Figura 4.9.** Curvas de estabilidad térmica del NaCAS (●), de GG (●) y de las mezclas NaCAS:GG: (●) 8:1; (●) 6:1; (●) 4:1; (●) 2:1; (●) 1:1; (●) 1:1,5.  $C_{GG}$  0,02% P/P,  $C_{NaCAS}$  0,02% P/P, pH 6,80, Rango de T ensayado: 10-80°C.

Tanto la GG como el NaCAS no se vieron afectados por el aumento de T, dentro del rango de T evaluado. Las mezclas NaCAS:GG no mostraron cambios significativos en la estabilidad térmica, sin embargo se observó un aumento en la A inicial del sistema a medida que aumentó la cantidad de GG presente, que podría estar indicando la formación de agregados o micropartículas entre la proteína y el polisacárido, resultado coincidente con lo observado en la sección anterior.

#### 4.2.3. Estudio de la compatibilidad termodinámica NaCAS/GG

A fin de evaluar la existencia de incompatibilidad termodinámica ocasionada por las interacciones entre el NaCAS y la GG, se realizaron los diagramas de fases correspondientes a las mezclas de los mismos en distintas proporciones, tal como se explicó en la sección 2.3.6. Luego del período de incubación, se verificó la existencia o no de separación de fases y/o aparición de turbidez mediante una inspección visual.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.10, en la cual se asignó un círculo vacío a las muestras translúcidas que presentaron una sola fase (miscibles) y se asignó un símbolo lleno a las muestras que presentaron claramente dos fases (círculo negro) o fueron turbias (círculo gris). Se trabajó a 35°C y las muestras se incubaron durante 24hs.



**Figura 4.10.** Curva de Incompatibilidad Termodinámica NaCAS/GG. T 35°C; 24hs. de incubación: (○) una sola fase; (●) turbidez y (●) dos fases.

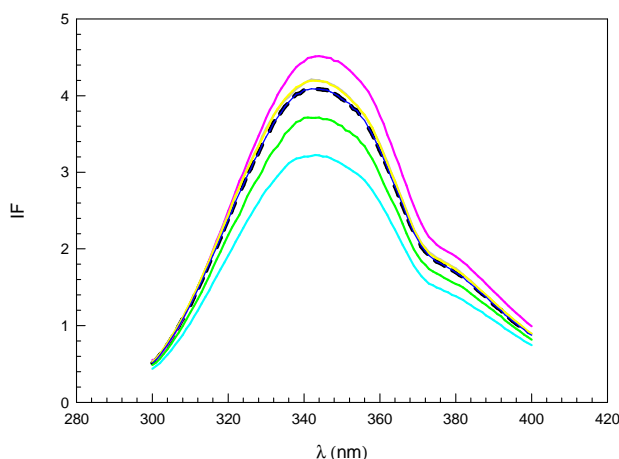
La curva de compatibilidad se obtuvo mediante un ajuste matemático utilizando una función de decaimiento exponencial simple de dos parámetros:

$$[GG] = 5,42 e^{-9,46[NaCAS]} \quad (4.1)$$

Se observó incompatibilidad termodinámica a concentraciones de NaCAS mayores a 3% y/o de GG mayores a 0,2%.

#### 4.2.4. Estudio de los cambios estructurales del NaCAS en presencia de GG

Se realizaron espectros de excitación y de emisión de la fluorescencia intrínseca proteica en ausencia y presencia de GG (Figuras 4.11). Se observó un aumento en la IF para las mezclas con menor proporción de GG (8:1) respecto de la IF del NaCAS, para luego disminuir a medida que aumentó la cantidad de GG adicionada. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en la  $\lambda_{em}$  máxima. Este comportamiento estaría vinculado a un cambio en el entorno de los fluoróforos intrínsecos proteicos hacia un medio más polar cuando la proteína se encuentra en presencia del polisacárido.



**Figura 4.11.** Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca del NaCAS en ausencia (- -) y presencia de diferentes concentraciones de GG: (—) 8:1; (—) 6:1; (—) 4:1; (—) 2:1; (—) 1:1 y (—) 1:1,5.  $C_{\text{NaCAS}}$  0,1%  $P/P$ ;  $T$  35°C; Rango de  $\lambda_{\text{em}}$  = 300-400nm;  $\lambda_{\text{exc}}$  286nm.

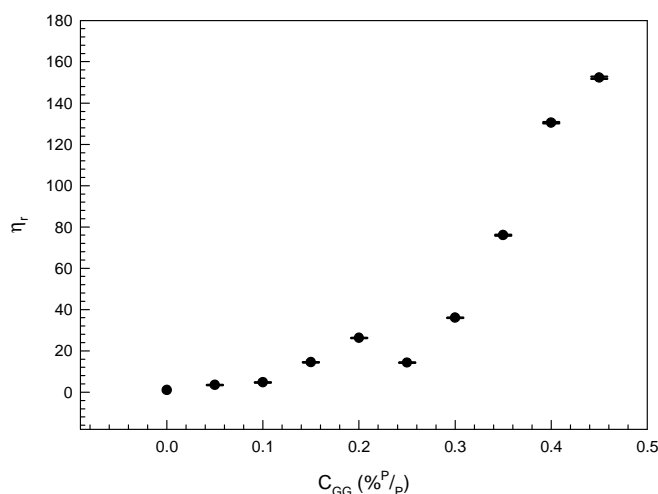
Por otra parte, se determinó la  $S_0$  del NaCAS en ausencia y presencia de GG, tal como se explicó en la sección 2.3.3.2. Como se observa en la Tabla XII, la presencia de GG produjo un aumento inicial de la  $S_0$  cuando la  $C_{\text{GG}}$  fue 0,0125% y luego disminuyó a medida que se incrementó la concentración de polisacárido adicionado. Estos resultados concuerdan con lo observado en la variación de la fluorescencia intrínseca proteica en la gráfica anterior. Habría entonces un aumento de la hidrofiliidad superficial, probablemente debido a un cambio conformacional inducido por la interacción proteína-polisacárido.

**Tabla XII. Resultados de  $S_0$  para el NaCAS 0,1%  $P/P$  en ausencia y presencia de GG a 35°C ( $\lambda_{\text{exc}}$  396nm;  $\lambda_{\text{em}}$  489nm)**

$C_{\text{GG}}$ (% $P/P$ )	$S_0 \pm 0,2$
0,0000	60,7
0,0125	144,2
0,0250	72,6
0,0500	50,6
0,1000	33,4
0,1500	51,2

#### 4.2.5. Estudio de la agregación ácida de las partículas de NaCAS mediante técnicas turbidimétricas. Efecto de la presencia de GG

En primer lugar se determinó la variación de la  $\eta$  por la presencia de las diferentes concentraciones de GG. En la Figura 4.12 se observa la variación de la  $\eta_r$  en presencia de GG en todo el rango de concentraciones ensayadas y a 35°C.

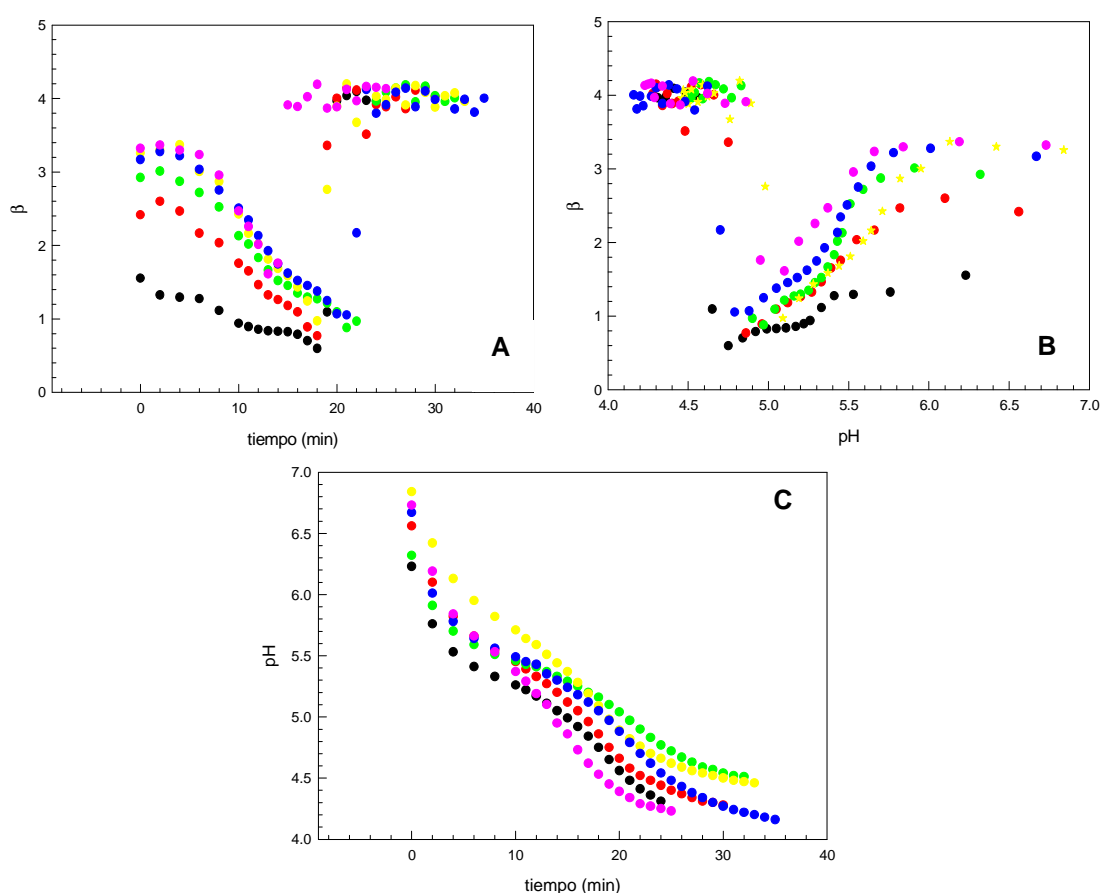


**Figura 4.12.** Variación de la viscosidad relativa ( $\eta_r$ ) de las soluciones de GG en todo el rango de concentraciones ensayado (0 - 0,45% P/P); Velocidad de corte: 3rpm; T 35°C.

Se observó un aumento exponencial de la  $\eta_r$  del medio a medida que aumentó la concentración de GG adicionada, siendo dicho aumento más significativo a partir de una  $C_{GG}$  de 0,30% P/P. Por estos resultados, sumado a la separación de fases observadas a partir de dicha  $C_{GG}$ , se decidió evaluar la agregación de mezclas NaCAS:GG hasta concentraciones de GG  $\leq 0,30\%$  P/P.

En primer lugar, se estudió el efecto de la adición de diferentes cantidades de GG sobre la velocidad de descenso de pH, la cinética del proceso de agregación de la mezcla NaCAS:GG y el estado final de los agregados formados. Para ello se trabajó con una  $C_{NaCAS}$  0,5% P/P, T 35°C, R 0,5, y concentraciones variables de GG ( $C_{GG}$ ). Se analizó la variación de los parámetros  $t_{ag}$ ,  $pH_{ag}$  y  $D_f$  de los agregados obtenidos. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.13.

El tamaño medio inicial ( $\beta$  a  $t = 0$ ) de las partículas de las diferentes mezclas fue mayor a medida que aumentó la proporción de GG, lo que confirmaría una formación inicial de micropartículas (Figura 4.13 A), tal como lo sugirieron los resultados precedentes. Durante la agregación ácida no se observaron cambios significativos en el  $t_{ag}$  ( $20,0 \pm 0,5\text{min}$ ) ni en el  $\text{pH}_{ag}$  ( $4,6 \pm 0,2$ ) al cual comienza dicho proceso, excepto en presencia de  $C_{GG}$  0,30%, donde el  $t_{ag}$  disminuyó a  $12,5 \pm 0,5\text{min}$  y el  $\text{pH}_{ag}$  aumentó a  $5,1 \pm 0,2$ . A esta  $C_{GG}$  comienza a observarse separación de fases entre ambos biopolímeros. En una próxima sección se evaluará el efecto de dicha incompatibilidad sobre las propiedades reológicas de la mezcla.



**Figura 4.13.** Estudio de la agregación ácida del NaCAS en presencia de GG: (A)  $\beta$  vs. tiempo; (B)  $\beta$  vs. pH y (C) velocidad de descenso de pH; (●) NaCAS y mezclas de NaCAS:GG con concentración de GG (% P/P): (●) 0,05; (●) 0,10; (●) 0,15; (●) 0,20; (●) 0,30.  $C_{\text{NaCAS}}$  0,5% P/P; R 0,5; T 35°C.

El grado de compactación de los agregados finales ( $D_f$ ) no varió considerablemente para las distintas mezclas ( $4,00 \pm 0,15$ ). La velocidad de

descenso de pH no presentó cambios con una tendencia significativa respecto de la proporción de GG en las muestras ensayadas (Figura 4.13 C).

El estudio se completó con la evaluación de la significancia de los efectos de los factores independientes T (15 y 35°C), R (0,35 y 1,0) y C<sub>GG</sub> (0,05 y 0,45% P/P) sobre las variables dependientes o respuestas t<sub>ag</sub> y pH<sub>ag</sub> durante la agregación ácida del NaCAS inducida por GDL y la D<sub>f</sub> de los agregados formados al final de la misma. Para ello, se aplicó un diseño factorial completo 2<sup>3</sup>. En la Tabla XIII se muestran los valores de las variables codificadas (+1, 0 y -1) y no codificadas independientes y dependientes, de los cuales en esta etapa sólo se analizaron los que corresponden al diseño mencionado (destacados en la tabla con negrita y subrayado). Los efectos estimados sobre las variables dependientes fueron determinados usando los parámetros estadísticos obtenidos del t-test ANOVA y los valores de p fueron utilizados para confirmar la significancia de dichos factores, asumiendo p < 0,05 (132).

**Tabla XIII. Diseño experimental para evaluar la agregación ácida del NaCAS (0,5% P/P) en presencia de GG**

Factores			Repuestas					
C <sub>GG</sub> (% P/P)	T (°C)	R	t <sub>ag</sub> (min) ± 0,2		pH <sub>ag</sub> ± 0,02		D <sub>f</sub> ± 0,020	
			Original (O)	Duplicado (D)	O	D	O	D
<b>0,05 (-1)</b>	<b>35 (+1)</b>	<b>1 (+1)</b>	7,0	8,0	4,62	5,00	4,062	4,005
0,25 (0)	35 (+1)	1 (+1)	10,5	10,5	4,73	4,84	3,433	4,063
<b>0,45 (+1)</b>	<b>35 (+1)</b>	<b>1 (+1)</b>	9,0	10,0	4,70	4,23	3,908	3,149
0,05 (-1)	35 (+1)	0,7 (0)	13,0	13,0	5,11	5,11	4,044	4,060
0,25 (0)	35 (+1)	0,7 (0)	12,5	12,5	5,16	5,10	3,946	3,976
0,45 (+1)	35 (+1)	0,7 (0)	13,0	12,5	4,66	4,83	3,932	4,083
<b>0,05 (-1)</b>	<b>35 (+1)</b>	<b>0,35 (-1)</b>	54,0	48,0	4,99	5,15	3,844	4,050
0,25 (0)	35 (+1)	0,35 (-1)	48,0	56,0	4,99	4,98	3,927	4,017
<b>0,45 (+1)</b>	<b>35 (+1)</b>	<b>0,35 (-1)</b>	38,5	36,0	4,27	4,94	4,003	4,113
0,05 (-1)	25 (0)	1 (+1)	13,5	14,0	4,87	4,91	3,957	4,105
0,25 (0)	25 (0)	1 (+1)	13,5	13,5	5,10	5,09	4,011	4,103
0,45 (+1)	25 (0)	1 (+1)	13,0	15,0	4,74	4,76	4,175	4,136
0,05 (-1)	25 (0)	0,7 (0)	19,0	20,5	5,06	5,11	4,055	4,070
0,25 (0)	25 (0)	0,7 (0)	30,0	23,0	4,58	5,02	4,020	4,045
0,45 (+1)	25 (0)	0,7 (0)	22,0	21,5	5,13	5,13	4,039	3,979
0,05 (-1)	25 (0)	0,35 (-1)	52,0	52,0	5,29	5,29	4,062	4,064
0,25 (0)	25 (0)	0,35 (-1)	58,5	54,0	5,17	5,29	3,950	4,023
0,45 (+1)	25 (0)	0,35 (-1)	92,0	90,0	5,18	5,20	3,783	3,886
<b>0,05 (-1)</b>	<b>15 (-1)</b>	<b>1 (+1)</b>	9,5	10,5	5,51	5,66	4,110	4,080
0,25 (0)	15 (-1)	1 (+1)	11,75	10,75	5,21	5,48	4,056	4,035
<b>0,45 (+1)</b>	<b>15 (-1)</b>	<b>1 (+1)</b>	10,75	13,50	5,48	5,63	4,035	4,025
0,05 (-1)	15 (-1)	0,7 (0)	17,0	18,0	5,74	5,39	4,055	4,091
0,25 (0)	15 (-1)	0,7 (0)	17,5	25,5	5,44	5,72	4,110	4,070
0,45 (+1)	15 (-1)	0,7 (0)	21,5	21,0	6,15	5,87	4,050	4,084
<b>0,05 (-1)</b>	<b>15 (-1)</b>	<b>0,35 (-1)</b>	59,5	54,0	5,70	5,79	4,070	4,019
0,25 (0)	15 (-1)	0,35 (-1)	61,4	60,0	5,68	5,80	3,916	3,979
<b>0,45 (+1)</b>	<b>15 (-1)</b>	<b>0,35 (-1)</b>	133,7	132,5	5,28	5,39	3,785	3,932



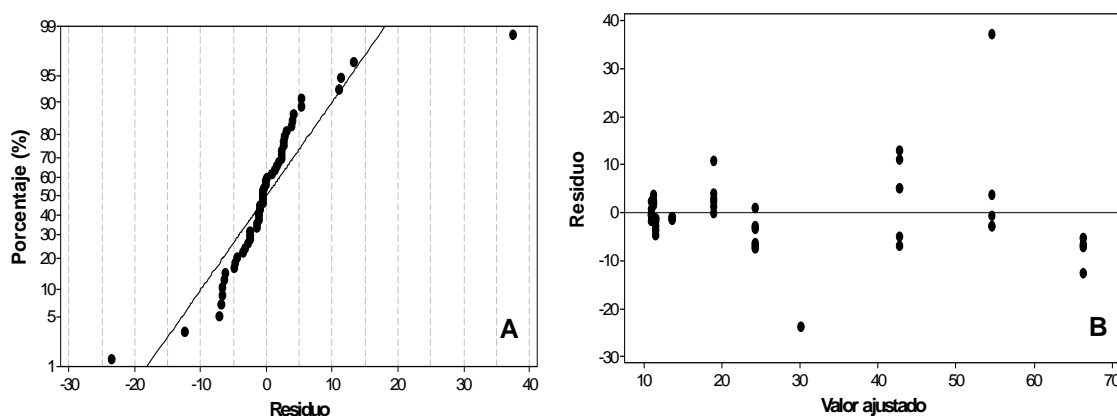
En la Tabla XIV se muestra la evaluación de los efectos, coeficientes y valores de p para las respuestas estudiadas ( $t_{ag}$ ,  $pH_{ag}$  y  $D_f$ ).

**Tabla XIV. Efectos, coeficientes estimados para  $t_{ag}$ ,  $pH_{ag}$  y  $D_f$  (unidades codificadas)**

Factores	Respuestas								
	$t_{ag}$			$pH_{ag}$			$D_f$		
	Efecto	Coef	p	Efecto	Coef	p	Efecto	Coef	p
Constante		39,65	<0,001		5,15	<0,001		3,98	0,010
R	-59,74	-29,87	<0,001	No significativo			No significativo		
$C_{GG}$ (% $P/P$ )	No significativo			-0,31	-0,16	0,023	No significativo		
T	-26,68	-13,34	0,006	-0,82	-0,41	<0,001	No significativo		
$R \cdot C_{GG}$	No significativo			No significativo			No significativo		
$R \cdot T$	24,11	12,06	0,011	No significativo			No significativo		
$C_{GG} \cdot T$	No significativo			No significativo			No significativo		
	$r^2 = 91,91\%$			$r^2 = 87,34\%$			$r^2 = 89\%$		

Sólo los términos lineales de R, T y su interacción fueron estadística y negativamente significativos para  $t_{ag}$ . Es importante destacar que debido a que la  $C_{GG}$  no resultó significativa para la variable estudiada, ninguna de las interacciones de este factor con los otros se pueden considerar. A partir del análisis anterior, y tomando la totalidad de los datos obtenidos (Tabla XIII completa), se ajustó mediante superficie de respuesta, obteniéndose la Ecuación 4.2, que presenta el modelo para la variación de  $t_{ag}$ , comprobándose la normalidad e independencia de los residuos (Figura 4.14).

$$t_{ag} = 20,479 - 7,902T - 27,106R + 17,974R^2 + 8,837RT \quad (4.2)$$



**Figura 4.14.** Gráfica de probabilidad normal (A) y de independencia de los residuos (B) para  $t_{ag}$ .

De acuerdo a la Ecuación 4.2 y a lo que se observa en los gráficos de contorno y de superficie de respuesta (Figura 4.15 A y B),  $t_{ag}$  aumentó al disminuir R y T, siendo el efecto de la primera variable mucho más significativo. Un incremento de R conduce a un aumento en la velocidad de descenso de pH y, por lo tanto, a una disminución del tiempo necesario para que se desestabilicen las partículas de NaCAS y comiencen a agregar. El ascenso de la T favorece las interacciones hidrofóbicas que participan en el proceso de agregación y, por otra parte, al incrementarse la T, aumenta la velocidad de hidrólisis de la GDL y con ello la velocidad de descenso de pH. Es decir, que controlando la T y la cantidad de GDL adicionada se puede regular la cinética del proceso de agregación ácida del NaCAS.

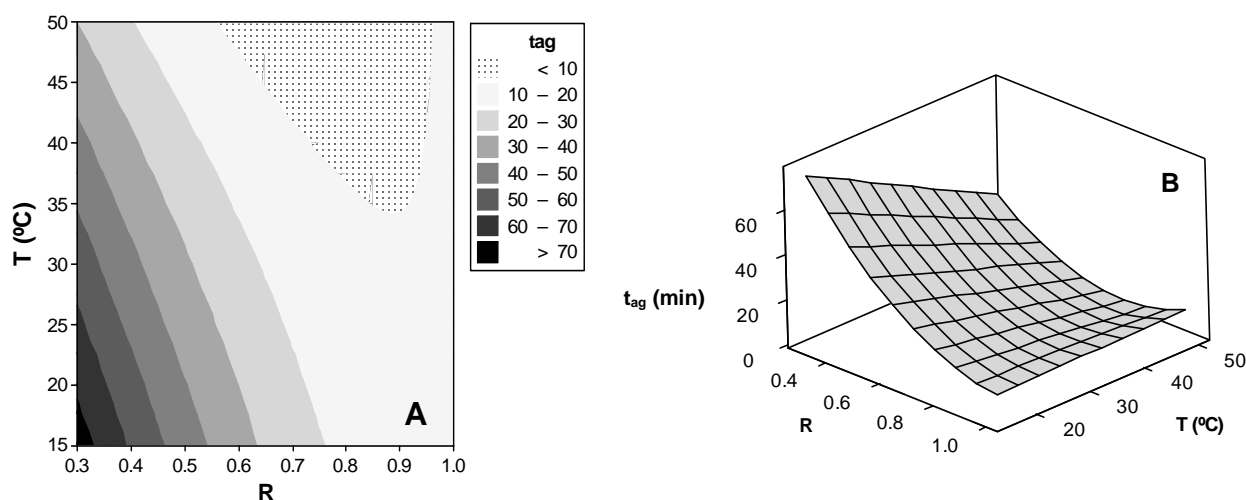


Figura 4.15. Gráficos de contorno (A) y de superficie de respuesta (B) de  $t_{ag}$  (en min) vs. R y T

En la Tabla XIV se observa que sólo los términos lineales de  $C_{GG}$  y T fueron estadísticamente significativos para  $pH_{ag}$ . A partir del análisis anterior, y tomando la totalidad de los datos obtenidos (Tabla XIII completa), se ajustó mediante superficie de respuesta, obteniéndose la Ecuación 4.3, que presenta el modelo para la variación de  $pH_{ag}$ , comprobándose la normalidad e independencia de los residuos (Figura 4.16):

$$pH_{ag} = 5,05 - 0,37T - 0,076C_{GG} + 0,179T^2 - 0,098TC_{GG} \quad (4.3)$$

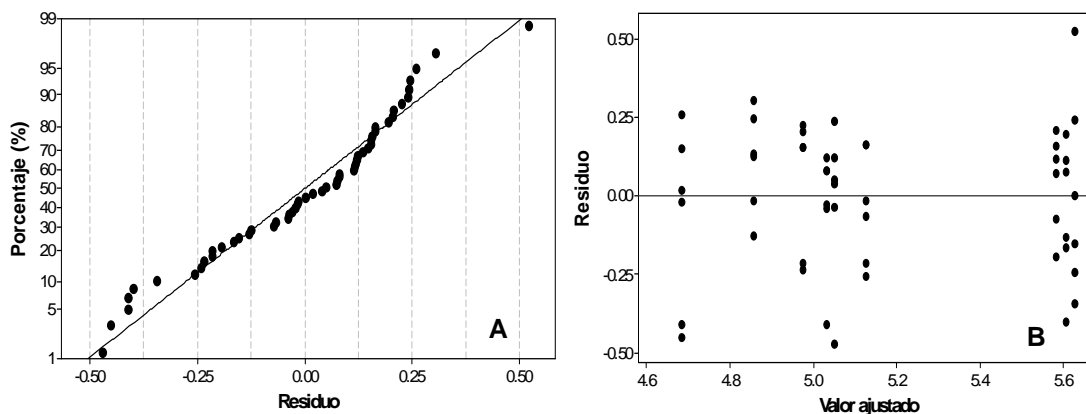


Figura 4.16. Gráfica de probabilidad normal (A) y de independencia de los residuos (B) para  $\text{pH}_{\text{ag}}$ .

Según la Ecuación 4.3 y como se observa en los gráficos de contorno y de superficie de respuesta (Figura 4.17 A y B), el  $\text{pH}_{\text{ag}}$  disminuyó con el aumento de la T y de la  $C_{\text{GG}}$ .

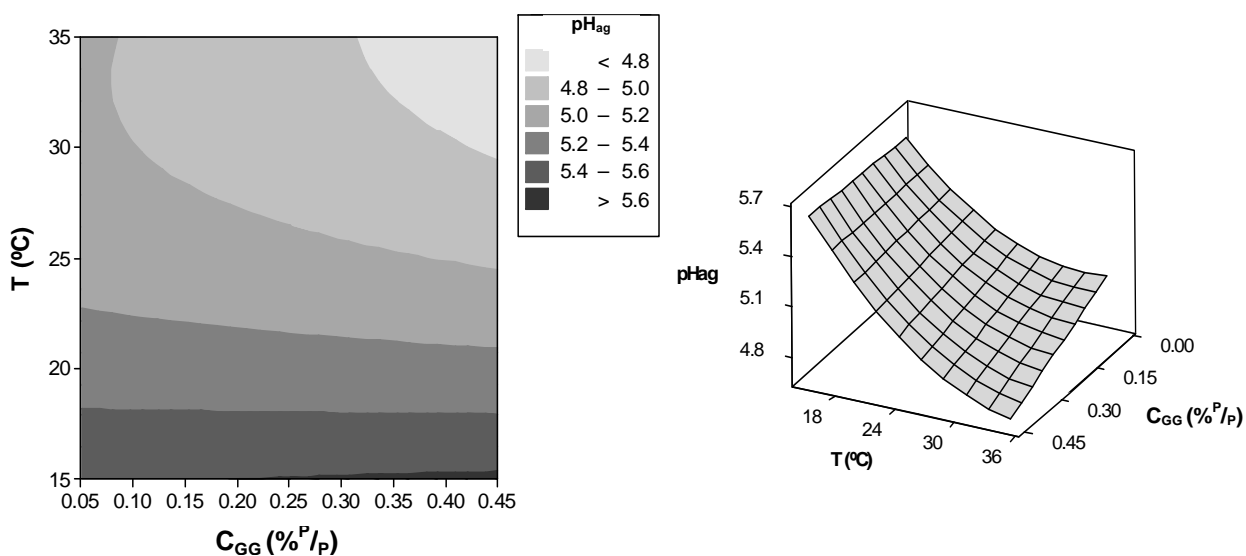


Figura 4.17. Gráficos de contorno (A) y de superficie de respuesta (B) de  $\text{pH}_{\text{ag}}$  vs.  $C_{\text{GG}}$  y T.

Para que comience la agregación es necesario eliminar la repulsión electrostática debida a las cargas superficiales negativas de las partículas de NaCAS y esto se consigue por fijación de los protones producto de la disociación del ácido glucónico. Los resultados indican que, a medida que aumenta T, se necesita una mayor concentración de protones para desestabilizar electrostáticamente al NaCAS, es decir menor pH. Se sabe que para un polielectrolito en solución acuosa:

$$\left( \frac{\partial \text{pH}}{\partial T} \right)_{\alpha, p} = - \text{cte} \frac{\Delta H_{d,i}}{R T^2} \quad (4.4)$$

siendo  $\alpha$  la fracción de moles de protones fijados,  $p$  la presión,  $R$  la constante de los gases y  $\Delta H_{d,i}$  la variación de entalpía de disociación de los protones de los residuos aminoacídicos (42). Dado que el pH disminuye al aumentar  $T$ , la derivada es negativa, en consecuencia  $\Delta H_{d,i}$  resulta positiva. Por lo tanto, la variación de entalpía de fijación de los protones a los residuos aminoacídicos es negativa, es decir, la reacción de protonación es exotérmica.

Se observó que el cambio de  $\text{pH}_{ag}$  generado por la variación de  $C_{GG}$  es leve en comparación al efecto que ejerce la  $T$ .

Por otra parte, la variación de  $R$  no resultó significativa y este resultado confirma que la cantidad de GDL adicionada sólo afecta la cinética del proceso de agregación (valor de  $t_{ag}$ ).

Los valores de  $p$  para  $D_f$  indicaron que ninguna de las variables independientes resultó significativa ( $p \gg 0,05$ ). Es decir que el grado de compactación de los agregados no fue significativamente modificado ante las variaciones de  $T$ ,  $C_{GG}$  y  $R$  en los rangos ensayados.

#### 4.2.6. Estudio de las propiedades reológicas de geles ácidos de NaCAS en presencia de GG

Se evaluaron los cambios de  $\eta$  de soluciones acuosas de NaCAS de concentración suficiente para que la acidificación, generada por adición de GDL, conduzca a la formación de un gel. Las variaciones de  $\eta$  en el tiempo se midieron en un viscosímetro rotacional cono/plato termostatizado, utilizando una geometría cónica y una velocidad de corte constante de 10 rpm.

Para este estudio se aplicó un diseño factorial fraccionado  $2^{4-1}$  que permitió evaluar la significancia de los efectos de las variables independientes  $T$  (19 y 50°C),  $R$  (0,5 y 1,0),  $C_{GG}$  (0,25 y 0,45 %<sup>P</sup>/P) y  $C_{NaCAS}$  (3 y 5 %<sup>P</sup>/P) sobre la variable dependiente  $t_{gel}$ , que corresponde al tiempo al cual comienza a formarse el gel. En la Tabla XV se muestran los valores de las variables codificadas (+1 y -1) y no codificadas independientes y de  $t_{gel}$  (respuesta) obtenidos.

**Tabla XV. Diseño experimental para evaluar la cinética de la gelación ácida del NaCAS por medidas de viscosidad**

Factores				Respuesta	
C <sub>NaCAS</sub> (% P/P)	C <sub>GG</sub> (% P/P)	R	T (°C)	t <sub>gel</sub> (min) ± 0,02	
				O	D
3 (-1)	0,45 (+1)	1 (+1)	19 (-1)	17,07	17,78
3 (-1)	0,25 (-1)	0,5 (-1)	19 (-1)	45,06	42,55
5 (+1)	0,45 (+1)	0,5 (-1)	19 (-1)	34,26	36,93
5 (+1)	0,25 (-1)	1 (+1)	19 (-1)	17,56	15,55
5 (+1)	0,45 (+1)	1 (+1)	50 (+1)	4,00	3,57
3 (-1)	0,25 (-1)	1 (+1)	50 (+1)	3,99	3,50
3 (-1)	0,45 (+1)	0,5 (-1)	50 (+1)	11,40	9,15
5 (+1)	0,25 (-1)	0,5 (-1)	50 (+1)	8,00	7,51

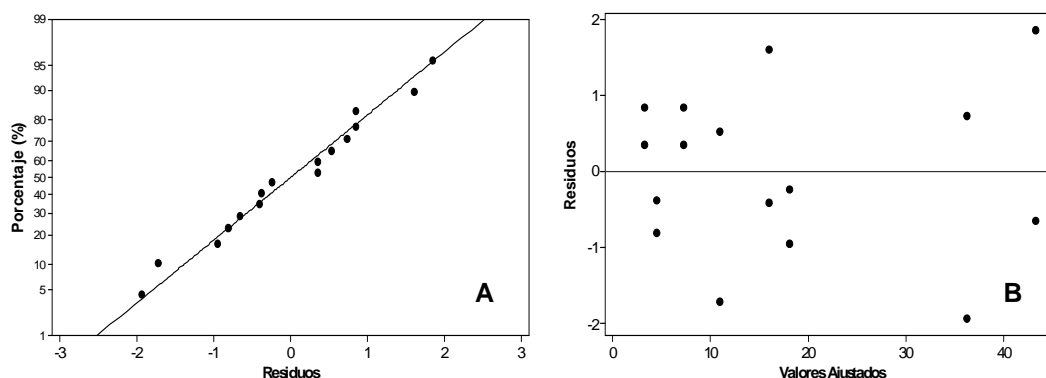
La Tabla XVI muestra los efectos, coeficientes y valores de p para t<sub>gel</sub>, donde se observó que C<sub>GG</sub> no fue un factor significativo (p > 0,05).

**Tabla XVI. Efectos, coeficientes y valores de p estimados para t<sub>gel</sub> (unidades codificadas)**

Factores	Respuesta		
	t <sub>gel</sub>		
	Efecto	Coef.	p
Constante		17,37	<0,001
C <sub>NaCAS</sub> (% P/P)	-2,89	-1,44	0,003
C <sub>GG</sub> (% P/P)	No significativo		
R	-13,98	-6,99	<0,001
T	-21,96	-10,98	<0,001
C <sub>NaCAS</sub> *R	2,48	1,24	0,006
C <sub>NaCAS</sub> *T	1,65	0,82	0,042
R*T	8,73	4,37	<0,001
r <sup>2</sup> = 99,06			

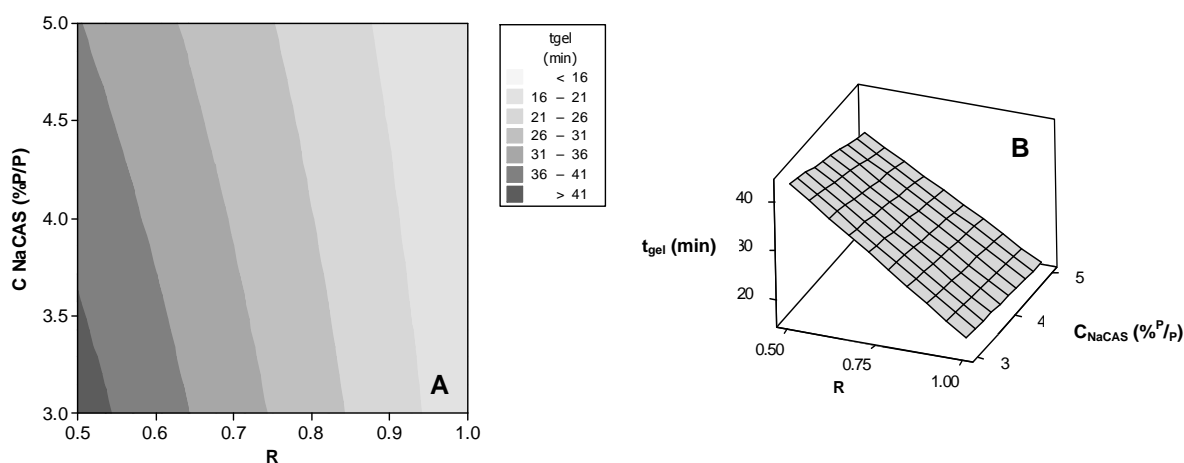
Teniendo en cuenta el ANOVA anterior, se analizó la totalidad de los datos mediante ajuste factorial sin considerar la C<sub>GG</sub> ni sus interacciones, obteniéndose la Ecuación 4.5, que presenta el modelo para la variación de t<sub>gel</sub>, comprobándose la normalidad e independencia de los residuos (Figura 4.18):

$$t_{gel} = 17,37 - 1,44C_{NaCAS} - 6,99R - 10,98T + 1,24C_{NaCAS}R + 0,82C_{NaCAS}T + 4,37RT \quad (4.5)$$



**Figura 4.18.** Gráfica de probabilidad normal (A) y de independencia de los residuos (B) para  $t_{gel}$ .

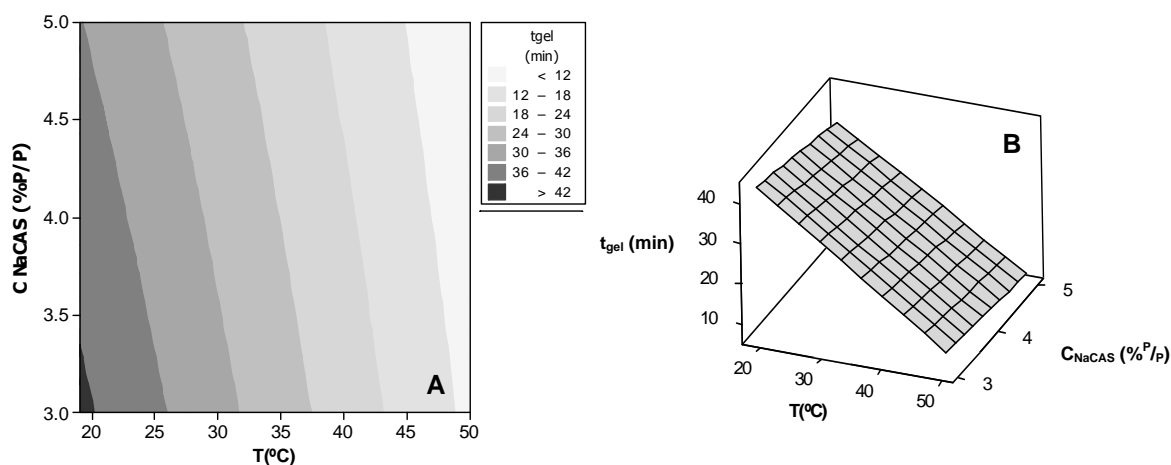
La Ecuación 4.5 muestra que, de los tres factores significativos ( $C_{NaCAS}$ , T y R), T es el que modifica más a  $t_{gel}$ , observándose además interacciones entre todas las variables mencionadas. Como los contornos y las superficies de respuesta se grafican en función de dos variables, se debe fijar un valor para el tercer factor. Según la Ecuación 4.5, los términos cuadráticos no se tienen en cuenta y por ello las superficies resultan planas.



**Figura 4.19.** Gráficos de contorno (A) y de superficie (B) de  $t_{gel}$  vs.  $C_{NaCAS}$  (%P/P) y R. T constante de 19°C.

Como se observa en los gráficos de  $t_{gel}$  vs. R y  $C_{NaCAS}$  (Figura 4.19 A y B), un aumento de ambas variables reduce el  $t_{gel}$  siendo el efecto de R más significativo. Al crecer R, aumenta la velocidad de descenso de pH, disminuyendo el tiempo necesario para que se desestabilicen las partículas de NaCAS. Además, el incremento de la viscosidad con la concentración proteica, reduce el movimiento de las partículas, aumentando la concentración local y la eficiencia de los choques.

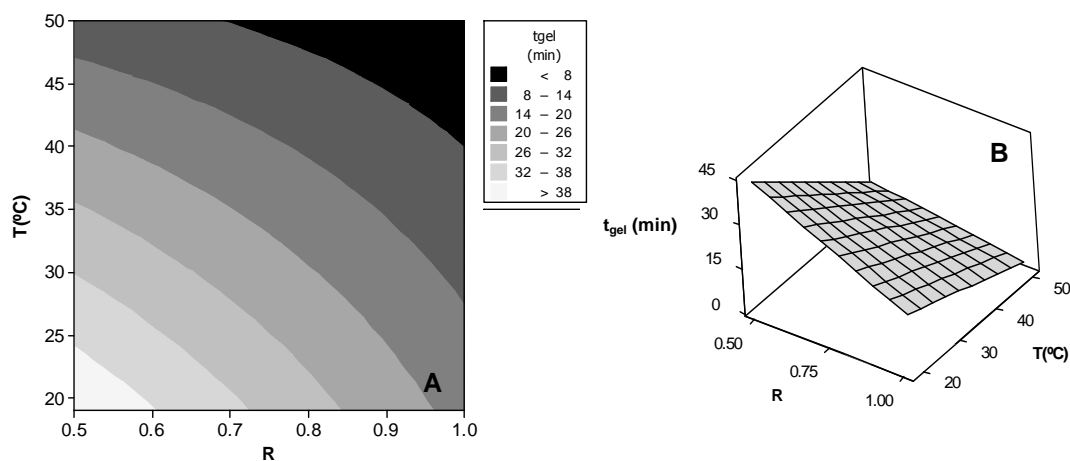
La Figura 4.20 muestra los gráficos de contorno y de superficie para  $t_{gel}$  vs.  $C_{NaCAS}$  y  $T$ , manteniendo  $R$  constante. Ambas variables influyen negativamente, siendo el efecto de la  $T$  de mayor significancia.



**Figura 4.20.** Gráficos de contorno (A) y de superficie (B) para  $t_{gel}$  vs.  $C_{NaCAS}$  (%<sup>P</sup>/P) y  $T$ .  $R$  constante de 0,5.

El aumento de  $T$  favorece las interacciones hidrofóbicas que participan en la formación de la malla de gel, que a su vez tendrán mayor probabilidad de ocurrir con el incremento de la concentración.

Los gráficos de contorno y de superficie para  $t_{gel}$  vs.  $R$  y  $T$ , manteniendo la  $C_{NaCAS}$  constante, se observan en la Figura 4.21. El crecimiento de las dos variables produce el descenso de  $t_{gel}$ .



**Figura 4.21.** Gráficos de contorno (A) y de superficie (B) para  $t_{gel}$  vs.  $R$  y  $T$ ;  $C_{NaCAS}$  constante de 3%<sup>P</sup>/P.

La marcada interacción entre  $R$  y  $T$  está vinculada al aumento de la velocidad de hidrólisis de la GDL con el incremento de  $T$ .

Para completar el estudio y debido a que la técnica empleada (viscosimetría) permitió evaluar el efecto de los factores R, T, C<sub>GG</sub> y C<sub>NaCAS</sub> sobre un única variable respuesta (t<sub>gel</sub>), se realizaron ensayos reológicos de los sistemas empleando un reómetro de tensión controlada, usando una geometría de cono y un sistema de control de temperatura.

Al igual que antes, para este estudio se aplicó un diseño factorial fraccionado 2<sup>4-1</sup> para evaluar la significancia de los efectos de las variables independientes, antes descritas, sobre las respuestas t<sub>gel</sub>, pH<sub>gel</sub> y G'<sub>máx</sub>. En la Tabla XVII se muestran los valores de las variables no codificadas (-1 y +1) independientes y las respuestas obtenidas.

**Tabla XVII. Diseño experimental para estudiar los parámetros reológicos de los geles ácidos de NaCAS en presencia de GG**

Factores				Respuestas					
				t <sub>gel</sub> (min) ± 0,02		pH <sub>gel</sub> ± 0,02		G' <sub>máx</sub> (Pa) ± 0,01	
C <sub>NaCAS</sub> (% <sup>P</sup> /P)	C <sub>GG</sub> (% <sup>P</sup> /P)	R	T (°C)	O	D	O	D	O	D
3 (-1)	0,45 (+1)	1 (+1)	19 (-1)	16,75	16,84	4,74	4,76	16,87	12,46
3 (-1)	0,25 (-1)	0,5 (-1)	19 (-1)	41,07	38,92	4,88	4,88	16,89	17,78
5 (+1)	0,45 (+1)	0,5 (-1)	19 (-1)	31,63	30,93	4,91	4,94	506,70	657,20
5 (+1)	0,25 (-1)	1 (+1)	19 (-1)	15,15	12,97	4,84	4,51	1603,00	1550,00
5 (+1)	0,45 (+1)	1 (+1)	50 (+1)	3,96	4,54	4,65	4,43	38,54	22,94
3 (-1)	0,25 (-1)	1 (+1)	50 (+1)	7,32	7,05	3,99	4,01	0,55	0,50
3 (-1)	0,45 (+1)	0,5 (-1)	50 (+1)	8,55	8,47	4,80	4,75	1,49	1,50
5 (+1)	0,25 (-1)	0,5 (-1)	50 (+1)	7,43	7,41	4,93	4,90	16,57	17,02

La Tabla XVIII muestra los efectos, coeficientes y valores de p estimados para t<sub>gel</sub>, pH<sub>gel</sub> y G'<sub>máx</sub>.

**Tabla XVIII. Efectos y coeficientes estimados para t<sub>gel</sub>, pH<sub>gel</sub> y G'<sub>máx</sub> (unidades codificadas)**

Factores	Respuestas								
	t <sub>gel</sub>			pH <sub>gel</sub>			G' <sub>máx</sub>		
	Efecto	Coef	p	Efecto	Coef	p	Efecto	Coef	p
Constante		16,22	0,000		4,69	0,000		280,3	0,000
C <sub>NaCAS</sub> (% <sup>P</sup> /P)	-3,92	-1,96	0,000	0,16	0,08	0,014	542,4	271,2	0,000
C <sub>GG</sub> (% <sup>P</sup> /P)	-1,97	-0,99	0,001	0,14	0,07	0,028	-245,0	-122,5	0,000
R	-11,20	-5,60	0,000	-0,40	-0,20	0,000	251,8	125,9	0,000
T	-18,66	-9,33	0,000	-0,25	-0,12	0,001	-535,8	-267,9	0,000
C <sub>NaCAS</sub> * C <sub>GG</sub>	8,99	4,50	0,000	-0,21	-0,10	0,003	-245,2	-122,6	0,000
C <sub>NaCAS</sub> * R	0,99	0,50	0,037	No significativo			252,5	126,3	0,000
C <sub>NaCAS</sub> * T	1,83	0,91	0,002	0,18	0,09	0,008	-519,7	-259,9	0,000
	r <sup>2</sup> = 99,59%			r <sup>2</sup> = 88,38%			r <sup>2</sup> = 99,45%		



Se observó que todos los factores independientes estudiados y las interacciones entre  $C_{NaCAS}$ ,  $C_{GG}$ ,  $R$  y  $T$  resultaron significativos para  $t_{gel}$  ( $p < 0,05$ ). Teniendo en cuenta el ANOVA anterior, se analizó la totalidad de los datos mediante ajuste factorial obteniéndose la Ecuación 4.6, que presenta el modelo para la variación de  $t_{gel}$ , comprobándose independencia de los residuos (Figura 4.22):

$$t_{gel} = 16,22 - 1,96C_{NaCAS} - 0,99C_{GG} - 5,60R - 9,33T + 4,50C_{NaCAS}C_{GG} + 0,50C_{NaCAS}R + 0,91C_{NaCAS}T \quad (4.6)$$

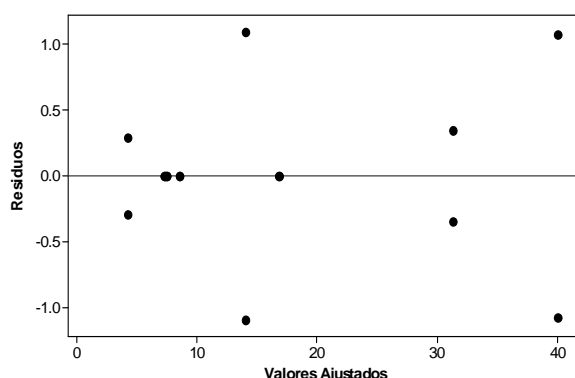


Figura 4.22. Gráfica de independencia de los residuos.

Los cuatro factores ( $C_{NaCAS}$ ,  $C_{GG}$ ,  $T$  y  $R$ ) afectaron en forma negativa y significativamente al  $t_{gel}$ . Como los contornos y las superficies de respuesta se hacen de a dos, se debió fijar un valor para el tercer y cuarto factor. Según la Ecuación 4.6, los términos cuadráticos no se tuvieron en cuenta. Las Figuras 4.23 a 4.28 muestran los gráficos de contorno y superficie de respuesta obtenidos.

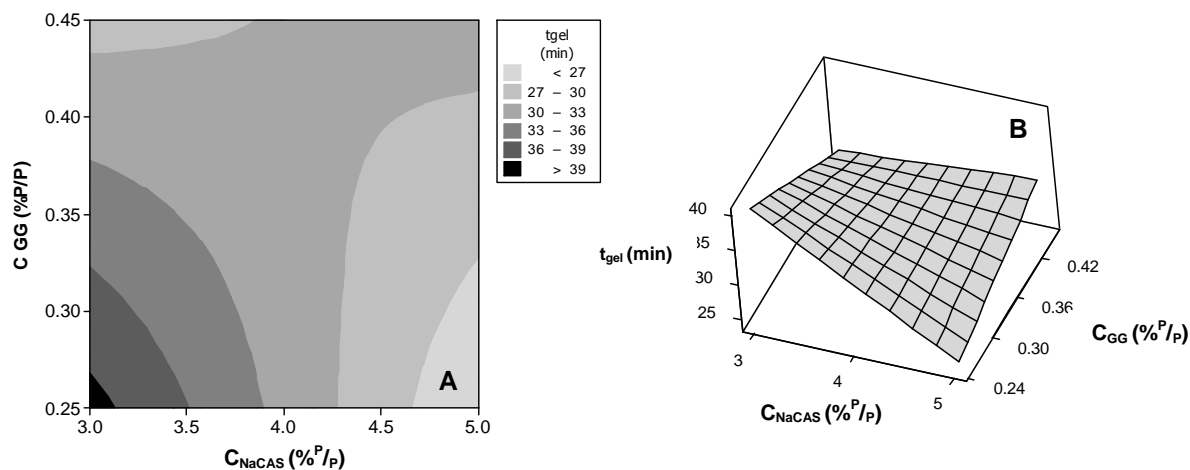


Figura 4.23. Gráficos de contorno (A) y de superficie (B) de  $t_{gel}$  vs.  $C_{NaCAS}$  (% P/P) y  $C_{GG}$  (% P/P). T constante de 19°C y R constante de 0,5.

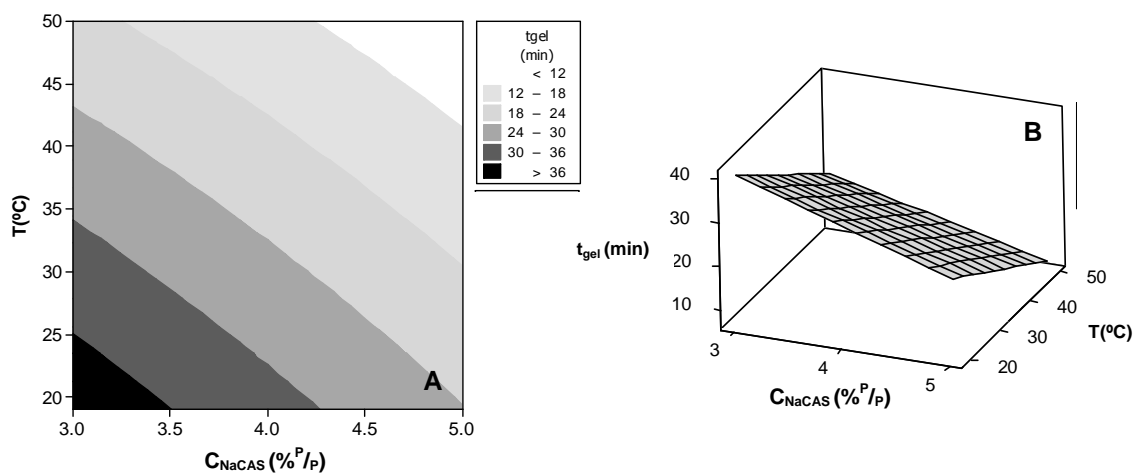


Figura 4.24. Gráficos de contorno (A) y de superficie (B) de  $t_{gel}$  vs.  $C_{NaCAS}$  (% P/P) y T. R constante de 0,5 y  $C_{GG}$  constante 0,25% P/P.

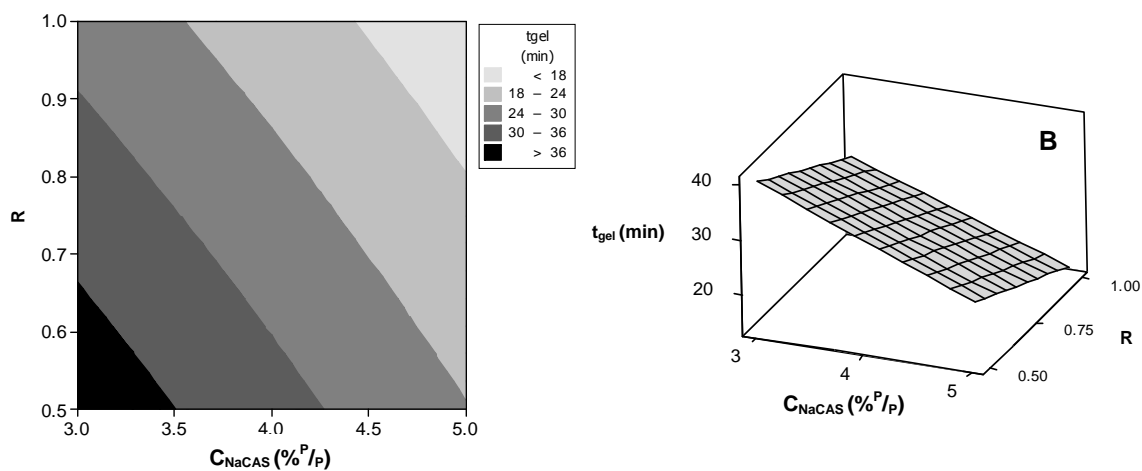


Figura 4.25. Gráficos de contorno (A) y de superficie (B) de  $t_{gel}$  vs.  $C_{NaCAS}$  (% P/P) y R. T constante de 19°C y  $C_{GG}$  constante 0,25% P/P.

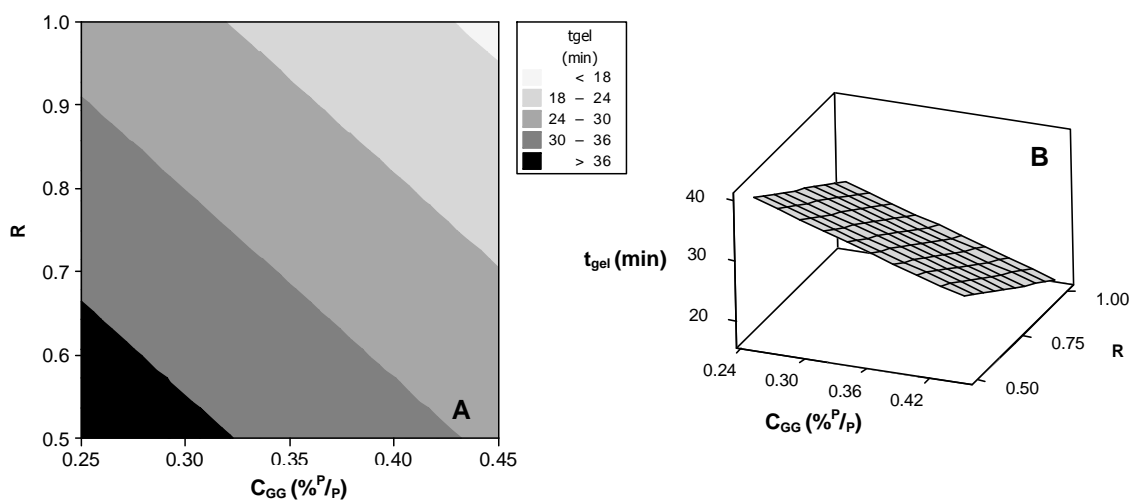


Figura 4.26. Gráficos de contorno (A) y de superficie (B) de  $t_{gel}$  vs.  $C_{GG}$  (%<sup>P</sup>/P) y  $R$ .  $T$  constante de 19°C y  $C_{NaCAS}$  constante 3%<sup>P</sup>/P.

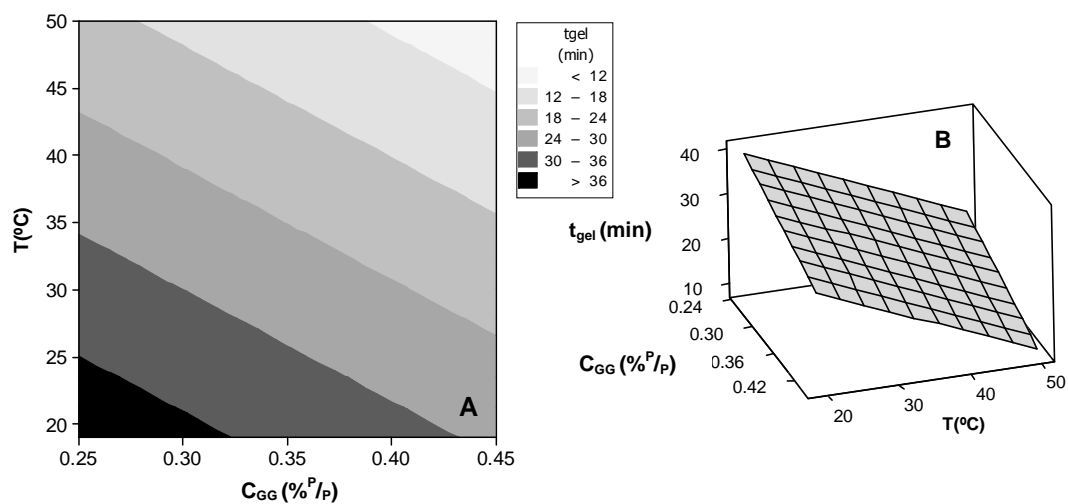


Figura 4.27. Gráficos de contorno (A) y de superficie (B) de  $t_{gel}$  vs.  $C_{GG}$  (%<sup>P</sup>/P) y  $T$ .  $R$  constante de 0,5 y  $C_{NaCAS}$  constante 3%<sup>P</sup>/P.

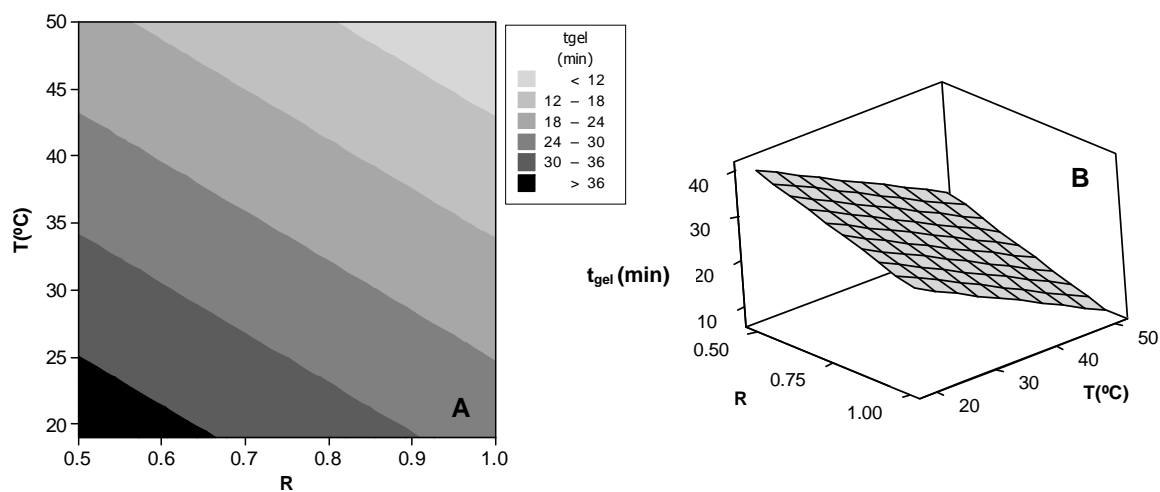


Figura 4.28. Gráficos de contorno (A) y de superficie (B) de  $t_{gel}$  vs.  $R$  y  $T$ .  $C_{GG}$  constante de 0,25%<sup>P</sup>/P y  $C_{NaCAS}$  constante 3%<sup>P</sup>/P.

El aumento de la  $C_{NaCAS}$  y de la  $C_{GG}$  disminuyeron el  $t_{gel}$ , siendo el efecto de la primera prácticamente el doble que el de la segunda. Esto es consecuencia del aumento de la probabilidad de choques efectivos durante la formación de los primeros agregados de NaCAS. La GG incrementa la viscosidad del medio lo que permite optimizar la orientación durante los choques. Esto explicaría la interacción entre estos dos factores.

Un aumento de R implica un incremento de la velocidad de hidrólisis de la GDL y, como consecuencia, de la velocidad con que se neutralizan los grupos protonables del NaCAS, disminuyendo así el tiempo necesario para que esto ocurra. Cuanto mayor sea la  $C_{NaCAS}$ , mayor será la cantidad de GDL (R) que se deberá adicionar para mantener la velocidad de protonación.

Al crecer T, aumenta la velocidad de los procesos que conducen a la gelación y además se intensifican las interacciones de tipo hidrofóbico ( $\Delta H > 0$ ) que participan en dicho proceso. T es el factor más significativo de todos los evaluados. Su efecto fue 9,4 veces más significativo que la  $C_{GG}$ , 4,7 veces más intenso que la  $C_{NaCAS}$  y 1,7 veces más relevante que R.

No se demostraron interacciones significativas entre R y T en el rango evaluado, resultado que llamó la atención debido a que un aumento de T contribuiría a incrementar la velocidad de hidrólisis de la GDL.

La GG es un polisacárido no cargado, por lo tanto es lógico que no exista interacción entre R y  $C_{GG}$ . Por otra parte, la ausencia de interacción entre T y  $C_{GG}$  podría estar vinculada a que ambos factores tienen efectos opuestos sobre la viscosidad del medio.

Para  $pH_{gel}$  todos los factores independientes estudiados y las interacciones entre  $C_{NaCAS}$ ,  $C_{GG}$  y T resultaron significativos. Teniendo en cuenta el ANOVA anterior (Tabla XVIII), se analizó la totalidad de los datos mediante ajuste factorial obteniéndose la Ecuación 4.7, que presenta el modelo para la variación de  $pH_{gel}$ , comprobándose independencia de los residuos (Figura 4.29):

$$pH_{gel} = 4,69 + 0,08C_{NaCAS} + 0,07C_{GG} - 0,20R - 0,12T - 0,10C_{NaCAS}C_{GG} + 0,09C_{NaCAS}T \quad (4.7)$$

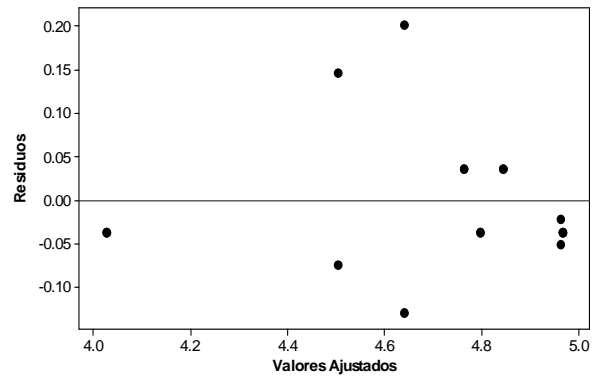


Figura 4.29. Gráfica de independencia de los residuos.

Los factores  $C_{\text{NaCAS}}$  y  $C_{\text{GG}}$  afectaron en forma positiva al  $\text{pH}_{\text{gel}}$ , mientras que T y R lo hicieron en forma negativa. Como los contornos y las superficies de respuesta se hacen de a dos, se debió fijar un valor para el tercer y cuarto factor. Según la Ecuación 4.7, los términos cuadráticos no se tuvieron en cuenta. Las Figuras 4.30 a 4.35 muestran los gráficos de contorno y superficie de respuesta obtenidos.

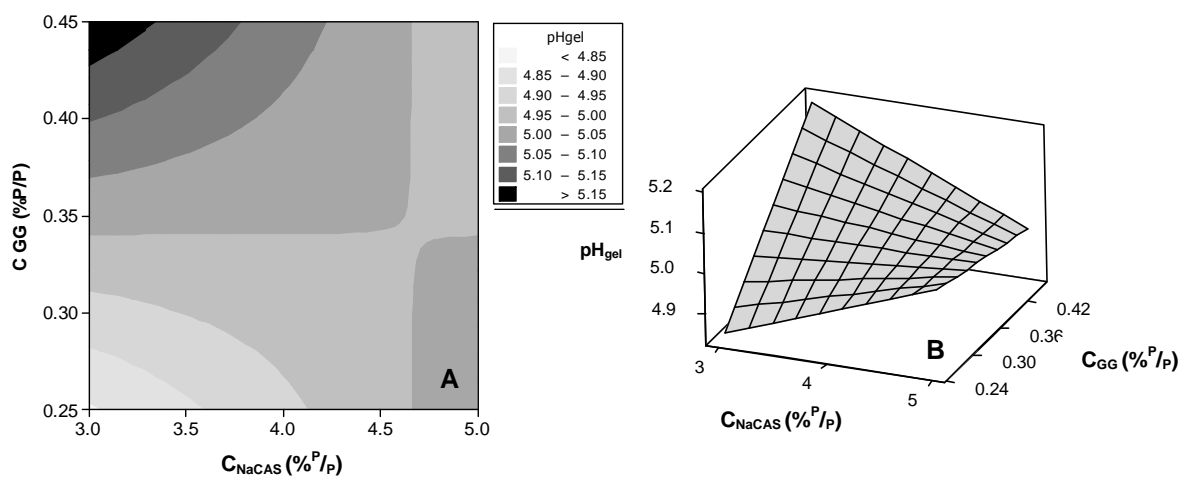


Figura 4.30. Gráficos de contorno (A) y de superficie (B) de  $pH_{gel}$  vs.  $C_{NaCAS}$  (%P/P) y  $C_{GG}$  (%P/P). T constante de 19°C y R constante de 0,5

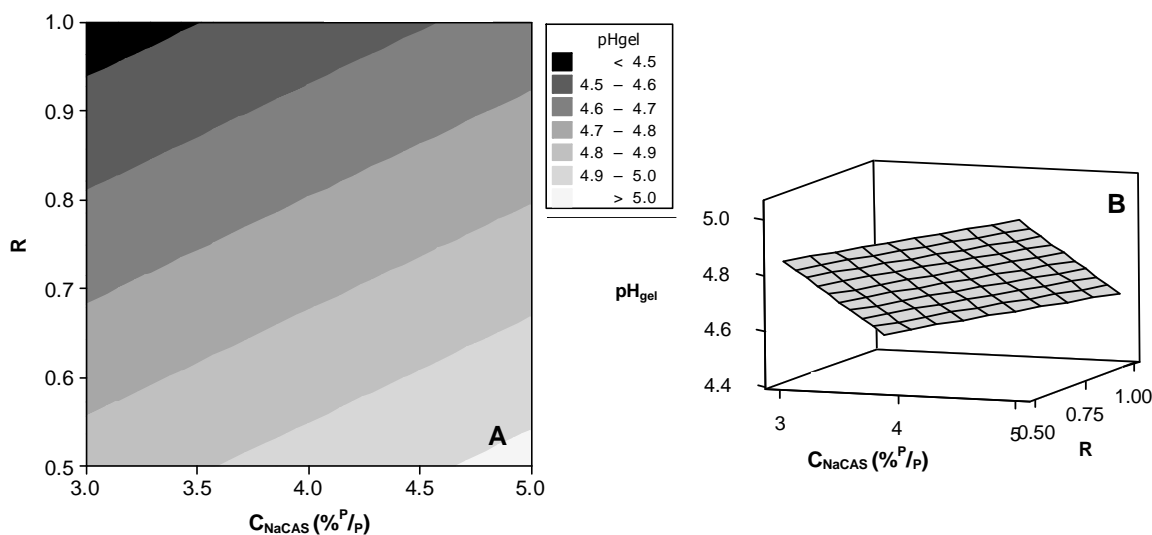


Figura 4.31. Gráficos de contorno (A) y de superficie (B) de  $pH_{gel}$  vs.  $C_{NaCAS}$  (%P/P) y R. T constante de 19°C y  $C_{GG}$  constante 0,25%P/P.

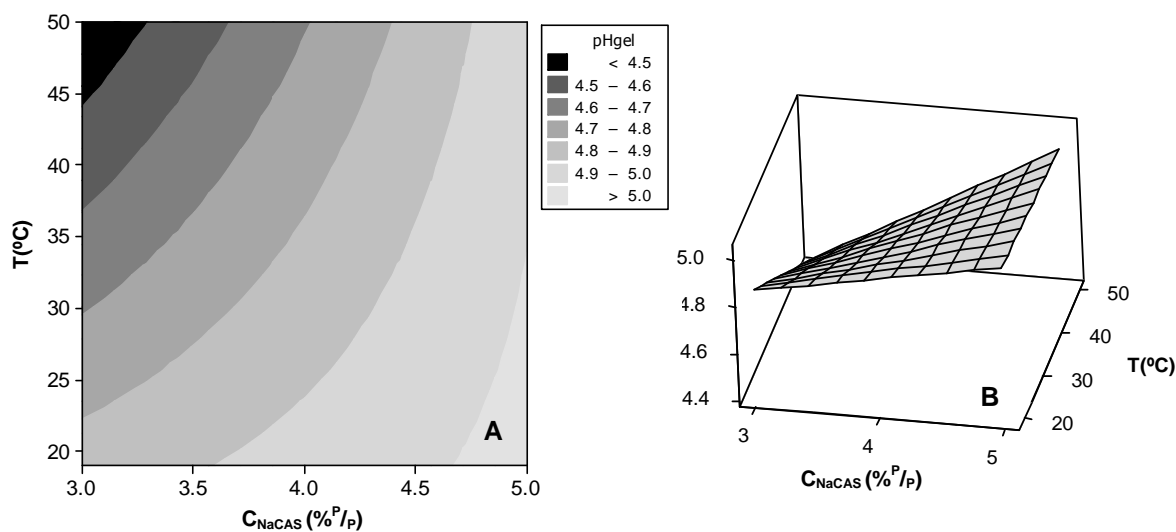


Figura 4.32. Gráficos de contorno (A) y de superficie (B) de  $pH_{gel}$  vs.  $C_{NaCAS}$  (%P/P) y T. R constante de 0,5 y  $C_{GG}$  constante 0,25%P/P.

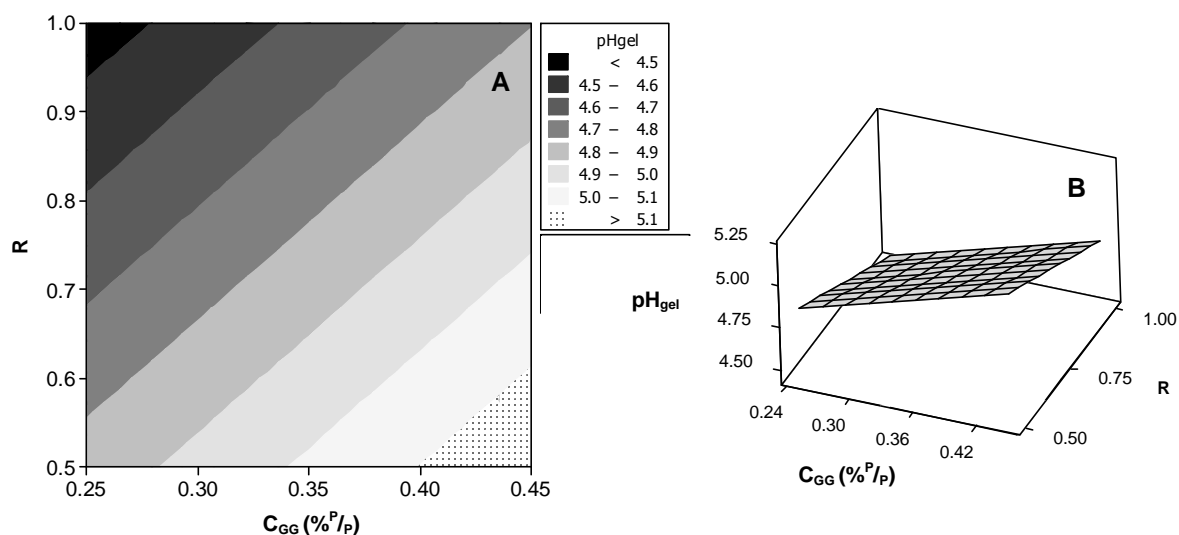


Figura 4.33. Gráficos de contorno (A) y de superficie (B) de  $pH_{gel}$  vs.  $C_{GG}$  (%P/P) y  $R$ .  $T$  constante de  $19^{\circ}C$  y  $C_{NaCAS}$  constante  $3\%P/P$ .

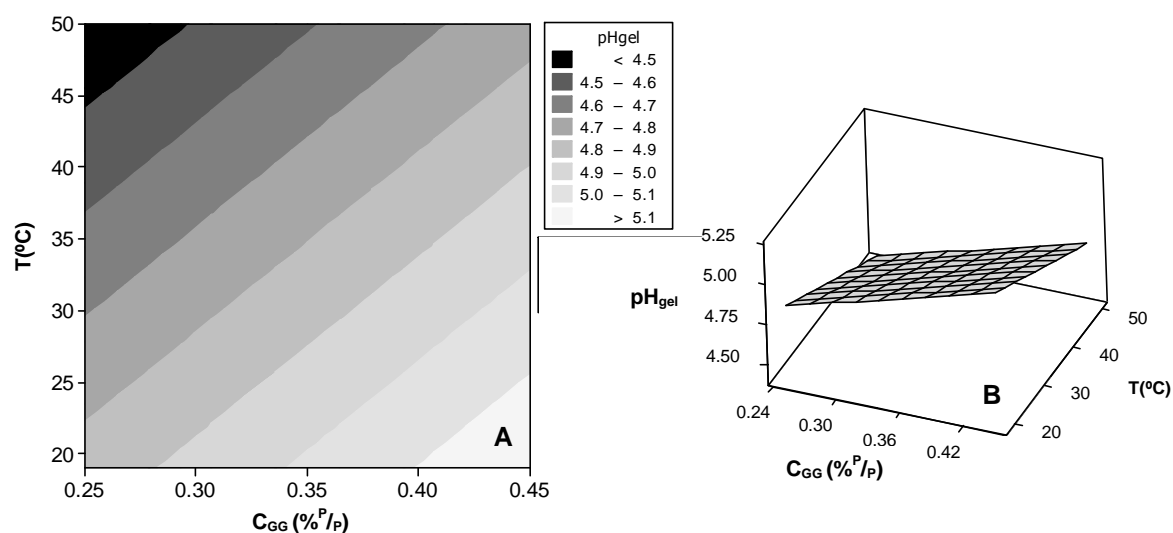


Figura 4.34. Gráficos de contorno (A) y de superficie (B) de  $pH_{gel}$  vs.  $C_{GG}$  (%P/P) y  $T$ .  $R$  constante de 0,5 y  $C_{NaCAS}$  constante  $3\%P/P$ .

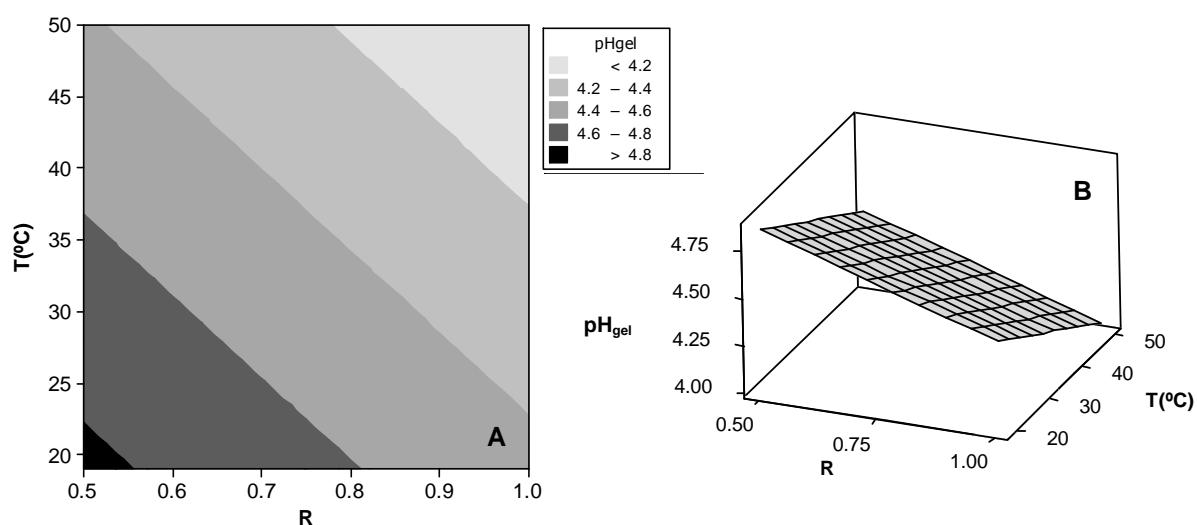


Figura 4.35. Gráficos de contorno (A) y de superficie (B) de  $pH_{gel}$  vs.  $R$  y  $T$ .  $C_{GG}$  constante de  $0,25\%P/P$  y  $C_{NaCAS}$  constante  $3\%P/P$ .

Un incremento de la  $C_{GG}$  por encima de 0,3% y de  $C_{NaCAS}$  superior a 3% genera separación de fases (Sección 4.2.3). En el caso de la mezcla NaCAS:GG esta separación es segregativa ya que la GG es un polímero sin carga superficial. El hecho de que cada macromolécula se sitúe en fases distintas conduce a un aumento de la concentración local proteica con la consiguiente formación de agregados. En esa situación, las partículas de NaCAS estarían previamente agregadas lo que tendría como consecuencia que la desestabilización ocurra a pH mayores.

Siendo la reacción de protonación exotérmica (Sección 4.2.5), un aumento de T implica un incremento de la constante de fijación y por consiguiente una mayor concentración de protones (menor pH) para alcanzar la desestabilización electrostática del NaCAS.

Altos valores de R conducen a un aumento de la concentración de protones generada por la hidrólisis de la GDL y, por lo tanto, se alcanza un menor  $pH_{gel}$ .

La Tabla XVIII muestra los valores de p para  $G'_{m\acute{a}x}$ , donde se observa que todos los factores independientes estudiados y las interacciones entre  $C_{NaCAS}$ ,  $C_{GG}$ , R y T resultaron significativos. Teniendo en cuenta el ANOVA anterior, se analizó la totalidad de los datos mediante ajuste factorial obteniéndose la Ecuación 4.8, que presenta el modelo para la variación de  $G'_{m\acute{a}x}$ , comprobándose independencia de los residuos (Figura 4.36):

$$G'_{m\acute{a}x} = 280,3 + 271,2C_{NaCAS} - 122,5C_{GG} + 125,9R - 267,9T - 122,6C_{NaCAS}C_{GG} + 126,3C_{NaCAS}R - 259,9C_{NaCAS}T \quad (4.8)$$

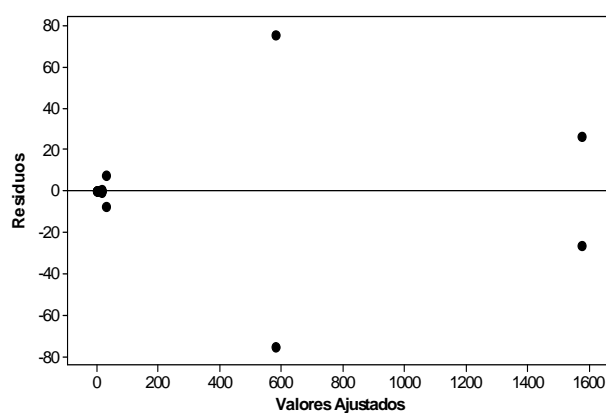


Figura 4.36. Gráfica de independencia de los residuos.



Los factores  $C_{NaCAS}$  y  $R$  afectaron en forma positiva al  $G'_{m\acute{a}x}$ , mientras que  $T$  y  $C_{GG}$  lo hicieron en forma negativa. Como los contornos y las superficies de respuesta se hacen de a dos, se debió fijar un valor para el tercer y cuarto factor. Según la Ecuación 4.8, los términos cuadráticos no se tuvieron en cuenta. Las Figuras 4.37 a 4.42 muestran los gráficos de contorno y superficie de respuesta obtenidos

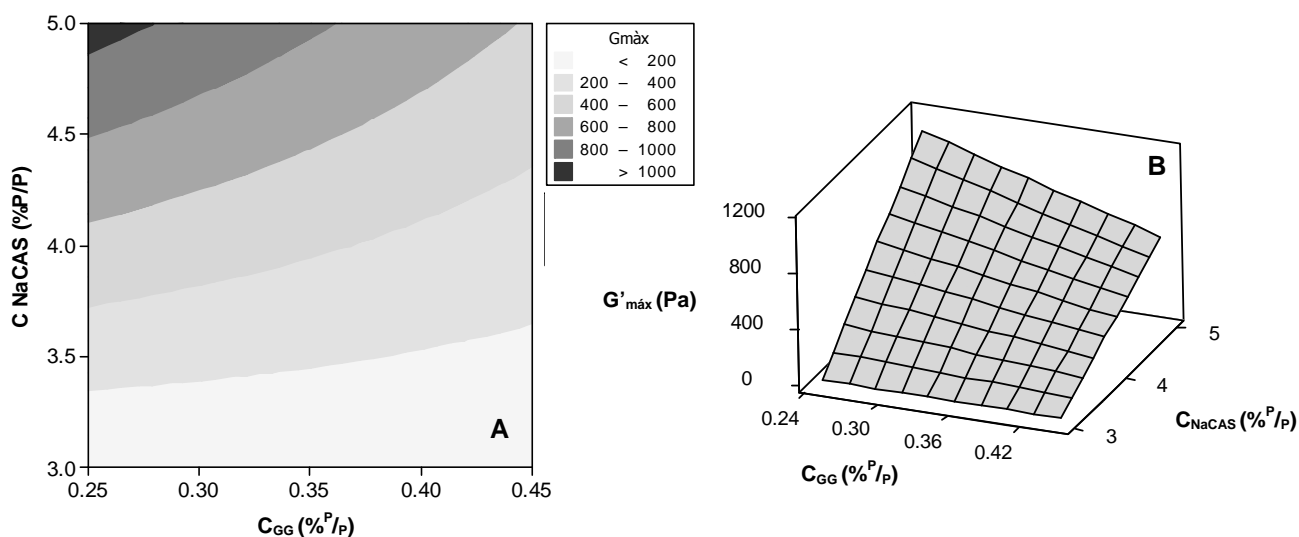


Figura 4.37. Gráficos de contorno (A) y de superficie (B) de  $G'_{m\acute{a}x}$  vs.  $C_{NaCAS}$  (%P/P) y  $C_{GG}$  (%P/P).  $T$  constante de 19°C y  $R$  constante de 0,5

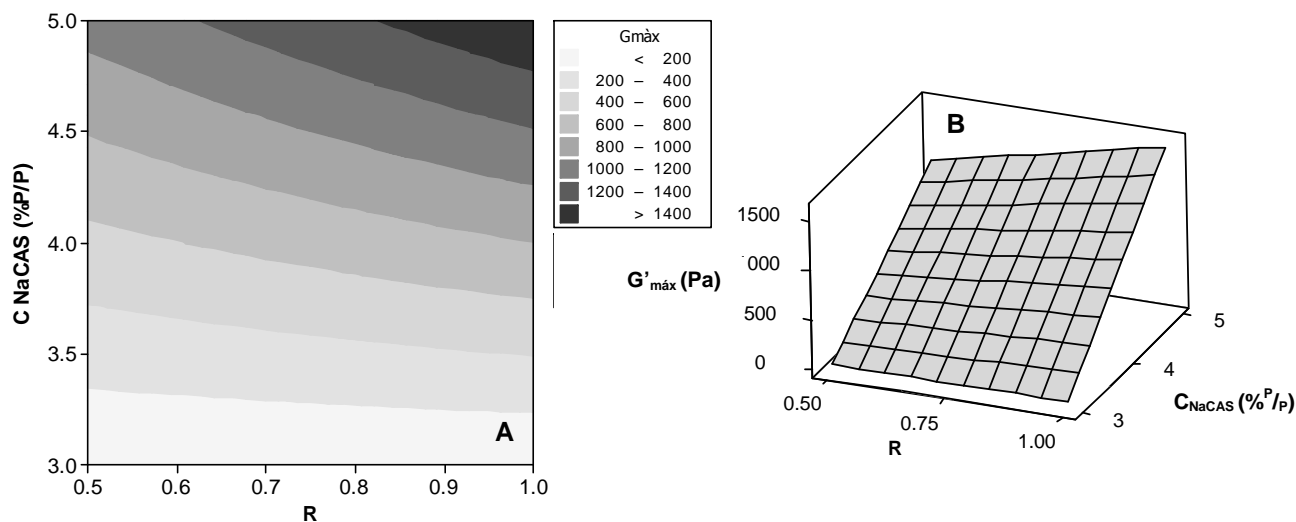
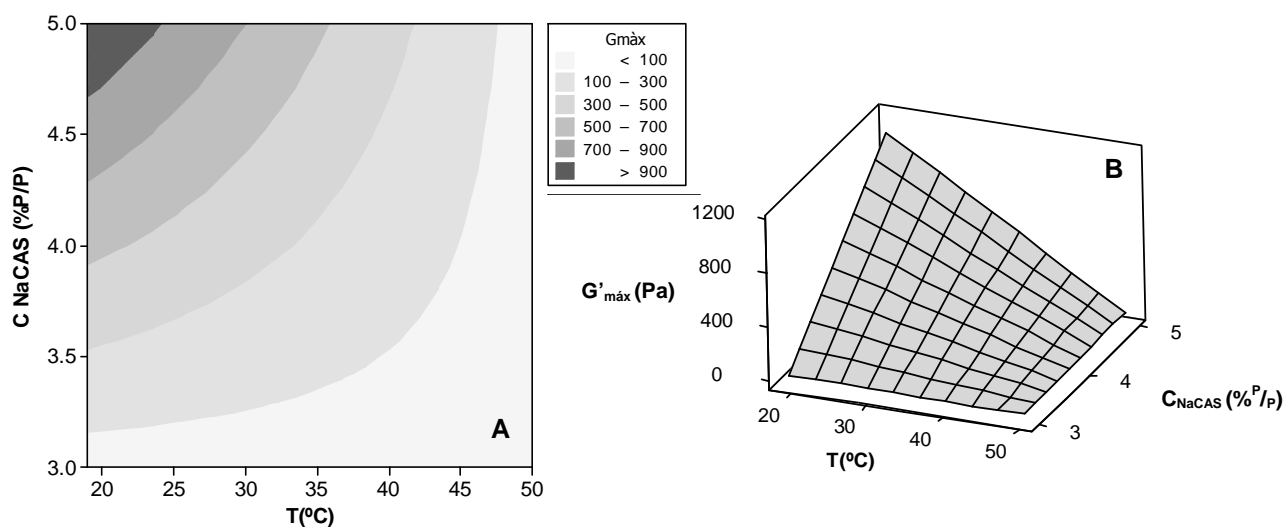


Figura 4.38. Gráficos de contorno (A) y de superficie (B) de  $G'_{m\acute{a}x}$  vs.  $C_{NaCAS}$  (%P/P) y  $R$ .  $T$  constante de 19°C y  $C_{GG}$  constante 0,25%P/P.



**Figura 4.39.** Gráficos de contorno (A) y de superficie (B) de  $G'_{\text{máx}}$  vs.  $C_{\text{NaCAS}}$  (%P/P) y  $T$ .  $R$  constante de 0,5 y  $C_{\text{GG}}$  constante 0,25%P/P.

Cuanto mayor sea la  $C_{\text{NaCAS}}$ , mayor es la elasticidad final ( $G'_{\text{máx}}$ ) de los geles formados debido a la mayor cantidad de partículas proteicas que intervienen en la formación de la malla de gel. En tanto que el efecto del aumento de  $G'_{\text{máx}}$  debido al incremento de  $R$ , que a su vez condujo a una disminución del  $\text{pH}_{\text{gel}}$ , estaría indicando que es posible que durante el proceso de gelación exista una estabilidad electrostática residual, es decir, grupos aminoacídicos que aún conservan su carga negativa. Si la gelación comienza a  $\text{pH}_{\text{gel}}$  mayores, esta carga remanente negativa dificultaría el establecimiento de las interacciones entre las partículas de NaCAS, conduciendo a la formación de geles menos compactos y, por lo tanto, menos elásticos.

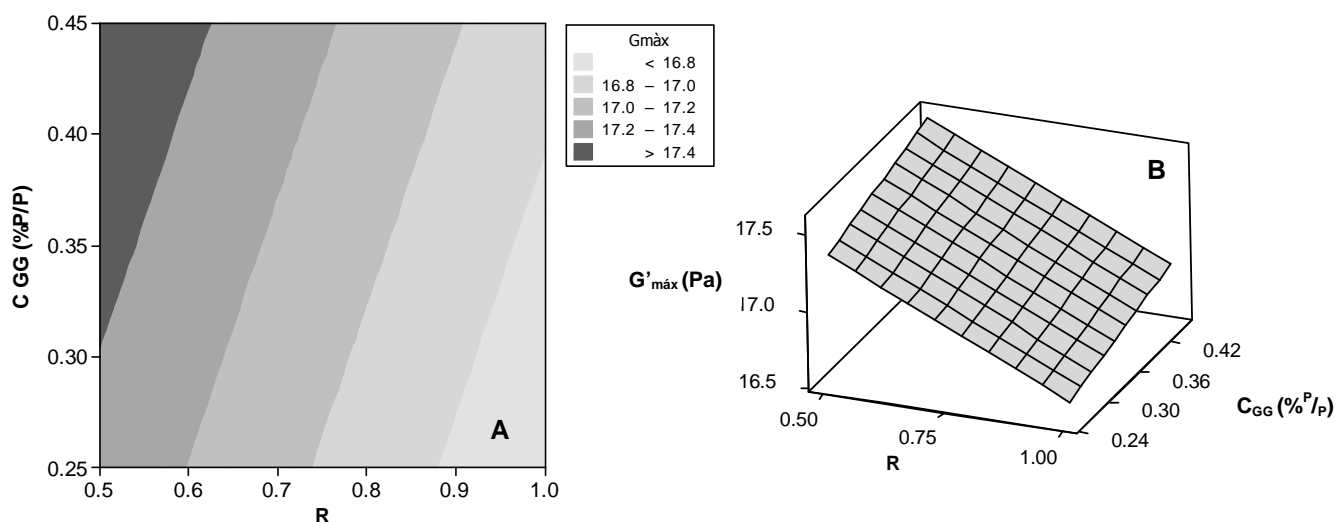


Figura 4.40. Gráficos de contorno (A) y de superficie (B) de  $G'_{\text{m}ax}$  vs.  $C_{GG}$  (%P/P) y  $R$ .  $T$  constante de  $19^{\circ}\text{C}$  y  $C_{\text{NaCAS}}$  constante  $3\%P/P$ .

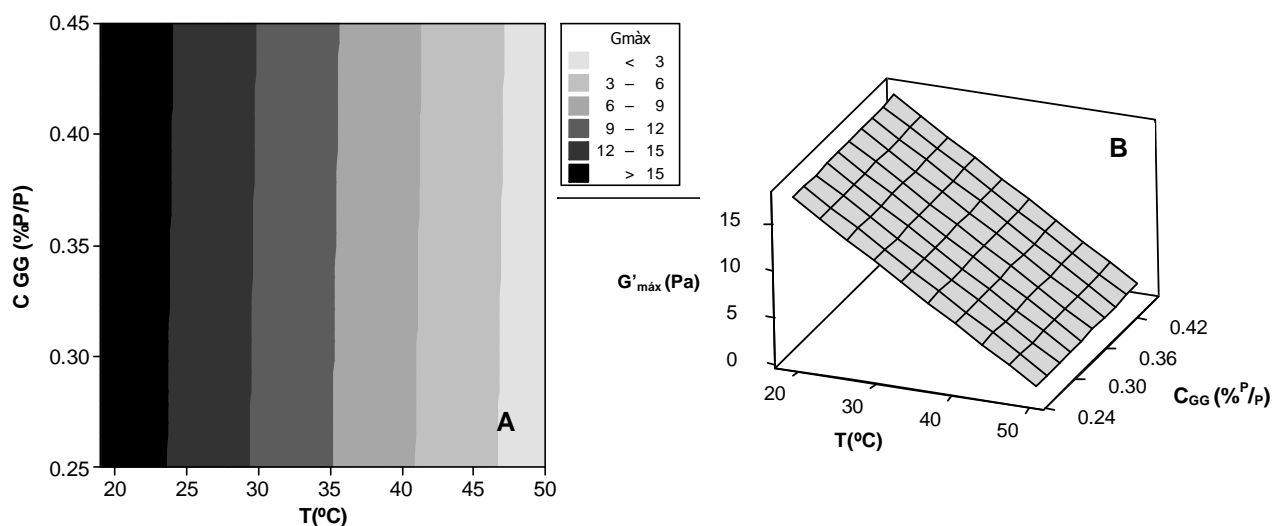


Figura 4.41. Gráficos de contorno (A) y de superficie (B) de  $G'_{\text{m}ax}$  vs.  $C_{GG}$  (%P/P) y  $T$ .  $R$  constante de 0,5 y  $C_{\text{NaCAS}}$  constante  $3\%P/P$ .

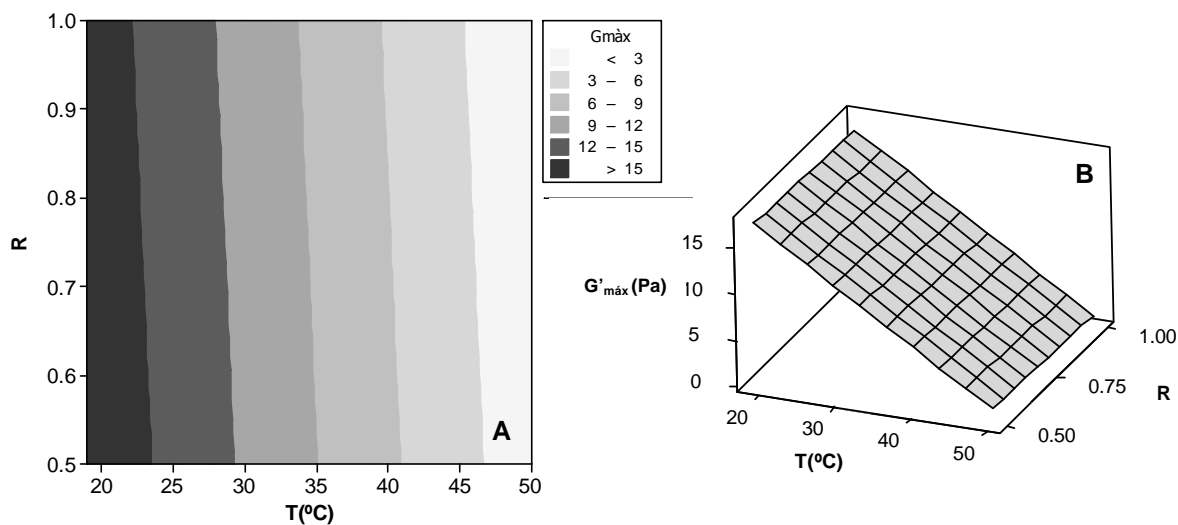


Figura 4.42. Gráficos de contorno (A) y de superficie (B) de  $G'_{\text{m}ax}$  vs.  $R$  y  $T$ .  $C_{GG}$  constante de  $0,25\%P/P$  y  $C_{\text{NaCAS}}$  constante  $3\%P/P$ .

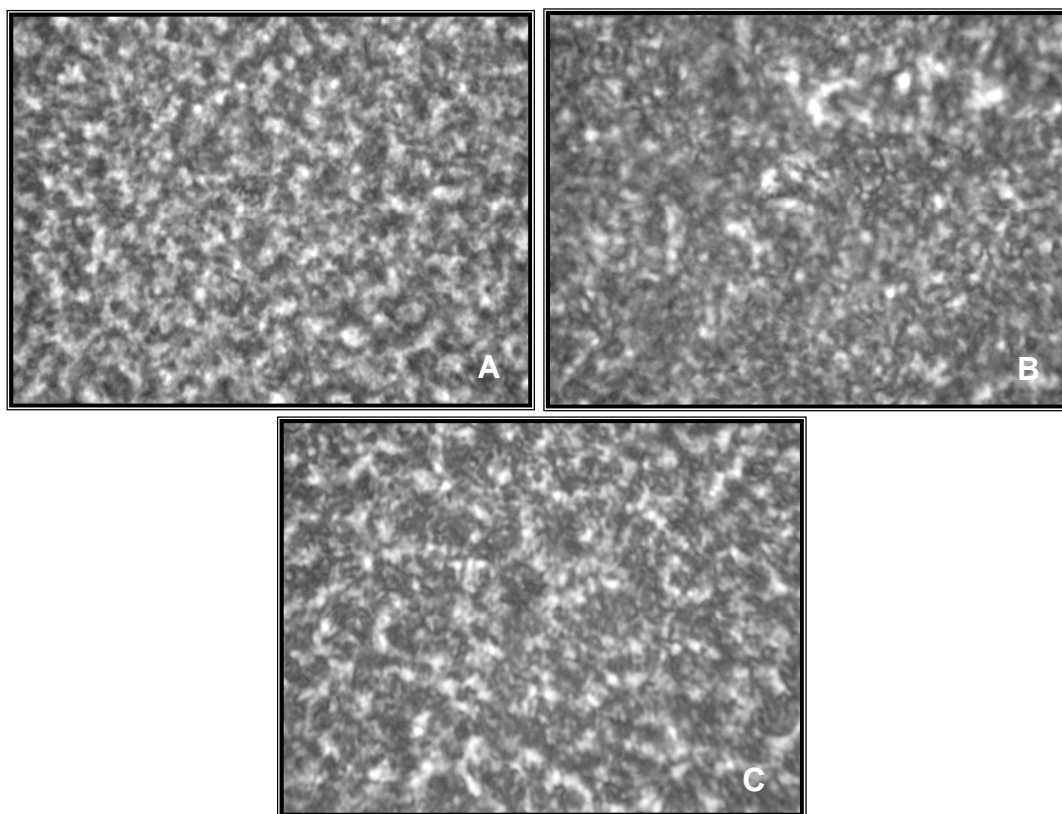
El cambio de la T de gelación produce dos efectos contrarios vinculados a la estructura de la malla de gel resultante. Por una parte, un aumento de T favorecería el establecimiento de las interacciones hidrofóbicas ( $\Delta H > 0$ ) que participan en la estructuración del gel. Sin embargo, el incremento de T disminuye el  $t_{gel}$  y, como consecuencia, se desfavorecen los reordenamientos de las interacciones dentro de la red de gel que conducen al aumento de la compactación de la misma. Los geles formados en menor tiempo resultarán menos compactos y, por tanto, menos elásticos. De acuerdo a la Ecuación 4.8, el efecto predominante sería este último.

Finalmente, altas concentraciones del polisacárido conducen a la desestabilización coloidal de las partículas de NaCAS y a la separación de fases por incompatibilidad termodinámica entre el NaCAS y la GG, lo que dificulta el proceso de gelación, formándose geles más débiles.

#### **4.2.7. Análisis de la microestructura de los geles en presencia de GG**

Mediante el análisis digital de las imágenes obtenidas por OCM se evaluó la microestructura de los geles ácidos proteicos formados por mezclas de NaCAS y GG, evaluando el efecto de la T y de la cantidad de GDL adicionada sobre dicha microestructura.

En la Figura 4.43 se compara la microestructura de tres geles obtenidos a diferente T y/o R. Se observa que la imagen B no muestra poros definidos como los que se observan en la imagen A. Al aumentar T, se incrementa la velocidad de descenso de pH y la difusión de las partículas llevando a una formación rápida de la malla de gel, pudiéndose notar en la imagen B partículas sin agregar. A menor T, el proceso de gelación se realiza más lentamente y la malla de gel puede reestructurarse por ruptura de algunas interacciones y formación de otras nuevas, obteniéndose una malla más apretada y, por lo tanto, con poros más pequeños. En la imagen C puede verse el efecto combinado del descenso de R y T respecto de B pero a mayor T que A, distinguiéndose poros definidos pero de tamaño más grandes que en A.



**Figura 4.43.** Microestructura de geles ácidos formados por  $C_{\text{NaCAS}} 3\%^{\text{P}}/_{\text{P}}$ ,  $C_{\text{GG}} 0,05\%^{\text{P}}/_{\text{P}}$  y R 1 a 19°C (A) o R 1 a 50°C (B) o R 0,75 a 30°C (C); objetivo de inmersión de 100x, cámara digital con zoom de 7.1x y adaptador de 52 mm.

Estos resultados coinciden con las deducciones obtenidas a partir del diseño de experimentos relatado en la sección 4.2.6.

La Tabla XIX muestra los valores de tamaño de poro de los geles ácidos estudiados, obtenidos a partir del análisis de las imágenes digitales.

**Tabla XIX. Tamaño promedio de poro de los geles de  $C_{\text{NaCAS}} 3\%$ ;  $C_{\text{GG}} 0,05\%$  y diferentes R y T**

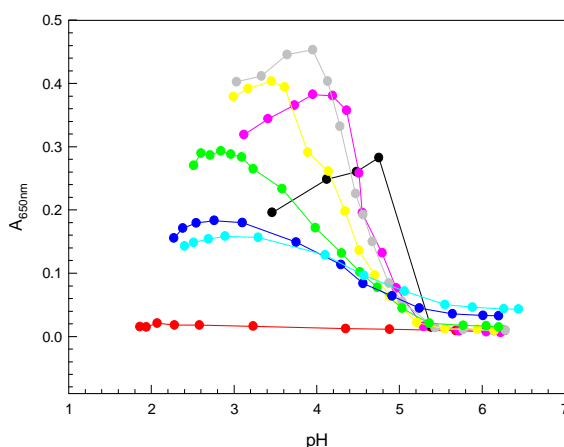
R	T (°C)	Tamaño promedio de poro ( $\mu\text{m}$ )
0,50	19	$3,92 \pm 0,02$
0,50	50	$5,04 \pm 0,03$
0,75	30	$4,51 \pm 0,02$
1,00	19	$4,50 \pm 0,03$
1,00	50	$5,31 \pm 0,03$

Cuando R permaneció constante, aumentó el tamaño promedio de poro al incrementarse la T. El observó el mismo comportamiento cuando la T permaneció constante y lo que aumentó fue R. Estos resultados coinciden con el análisis cualitativo de las imágenes realizado anteriormente. El efecto combinado de R y T (0,75 y 30°C) originó poros con un tamaño intermedio.

### 4.3. Efecto de la presencia de goma xantana (GX)

#### 4.3.1. Ensayo de solubilidad del NaCAS en ausencia y presencia de GX

Se realizaron titulaciones potenciométricas por adición de HCl 1M a la proteína, en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de GX para evaluar la solubilidad del NaCAS frente a cambios de pH y estudiar el efecto que éste polisacárido ejerce sobre la misma. Se midió la  $A_{650\text{nm}}$  de los sistemas cada vez que variaba el pH. En la Figura 4.44 se muestran las curvas de titulación obtenidas.

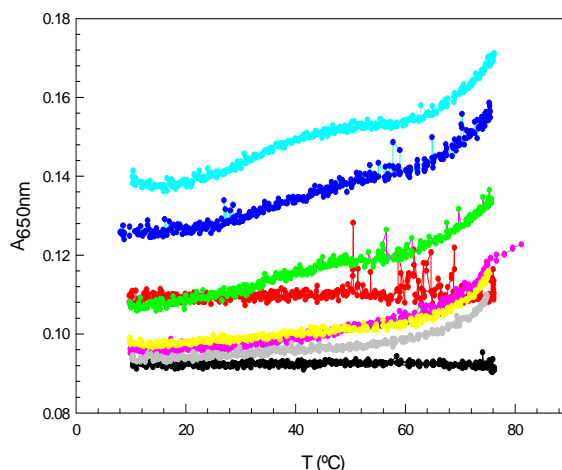


**Figura 4.44.** Curvas de titulación potenciométrica del polisacárido (●), la proteína (●) y las mezclas NaCAS:GX: (●) 8:1; (●) 6:1; (●) 4:1; (●) 2:1; (●) 1:1; (●) 1:1,5.  $C_{\text{NaCAS}} 0,02\% \text{ P/P}$ ;  $C_{\text{GX}} 0,02\% \text{ P/P}$ ; T 25°C.

Teniendo en cuenta que el polisacárido es soluble en todo el rango de pH estudiado y que el NaCAS agrega a un pH cercano al pI de las CN, reflejado esto en un aumento de la  $A_{650\text{nm}}$  medida, se observó que a medida que aumentó la cantidad de GX adicionada al sistema, la agregación proteica comenzó a pH menores. Estos resultados estarían indicando un efecto estabilizante de la GX sobre las partículas de NaCAS en suspensión. Además, se observaron cambios en los valores de A máxima obtenidos. En presencia de cantidades crecientes de GX, la A máxima observada disminuyó, lo que estaría vinculado a una disminución de la cantidad de agregados formados y/o un descenso del tamaño medio de los mismos.

### 4.3.2. Evaluación de la estabilidad térmica del NaCAS en ausencia y presencia de GX

Se realizaron medidas de la  $A$  durante el calentamiento continuo de los diferentes sistemas con el objeto de evaluar la estabilidad térmica de la proteína y del polisacárido (Figura 4.45).



**Figura 4.45.** Curvas de estabilidad térmica del NaCAS (●), de la GX (●) y de las mezclas NaCAS:GX: (●) 8:1; (●) 6:1; (●) 4:1; (●) 2:1; (●) 1:1; (●) 1:1,5.  $C_{GX}$  0,02% P/P;  $C_{NaCAS}$  0,02% P/P; pH 6,80; Rango de T ensayado: 10-100°C.

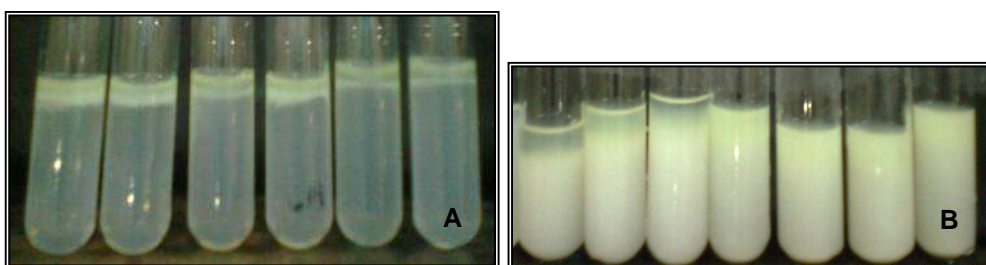
Se observó desestabilización térmica de las mezclas, hasta la proporción 4:1 inclusive, a partir de los 60°C. Para proporciones mayores de GX disminuyó la  $T$  a la cual comienza la agregación. Al igual que con GG, la  $A$  inicial de los sistemas fue mayor a medida que aumentó la cantidad de polisacárido adicionado, indicando esto la posible formación de micropartículas por interacción proteína-polisacárido. Aunque la GX es considerada como un hidrocoloide no gelificante, algunos autores han obtenido hidrogeles a partir de soluciones de GX calentadas (136). Por lo tanto, el aumento de  $A$  podría deberse a la formación de agregados de GX inducidos por calentamiento.

### 4.3.3. Estudio de la compatibilidad termodinámica de las mezclas NaCAS/GX

A fin de evaluar la existencia de incompatibilidad termodinámica ocasionada por las interacciones entre el NaCAS y la GX, se realizaron las mezclas de los polímeros, en distintas proporciones, en *buffer* Tris-HCl 10mM pH 6,80 a  $T$  ambiente, y se incubaron 24 o 48hs a 25 o 35°C, en condiciones

de T y humedad controladas. Luego de este período, se verificó la existencia o no de separación de fases y/o aparición de turbidez mediante una inspección visual.

La Figura 4.46 muestra algunos sistemas seleccionados donde se observa la separación total de fases. Por ello, no se pudieron obtener los diagramas de fases correspondientes debido a que el sistema mostró incompatibilidad termodinámica en todo el rango de concentración ensayado ( $C_{GX}$ : 0 - 0,45%<sup>P/P</sup>;  $C_{NaCAS}$ : 0 - 4%<sup>P/P</sup>).

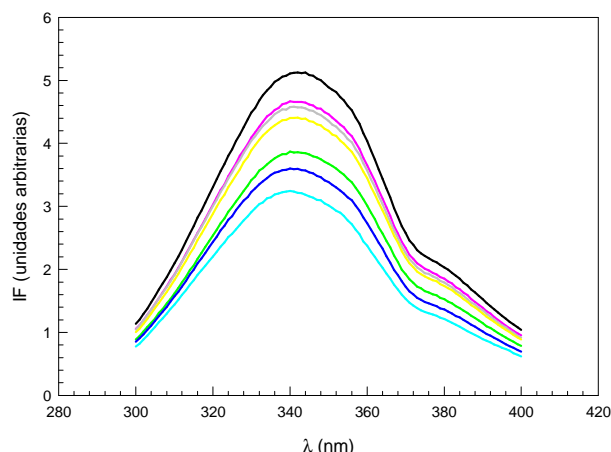


**Figura 4.46** Sistemas seleccionados de NaCAS/GX donde se evidencia la separación total de fases (Incompatibilidad Termodinámica) luego de 24hs (A) y 48hs (B) de incubación a 35°C y humedad controlada.

#### 4.3.4. Estudio de los cambios estructurales del NaCAS en presencia de GX

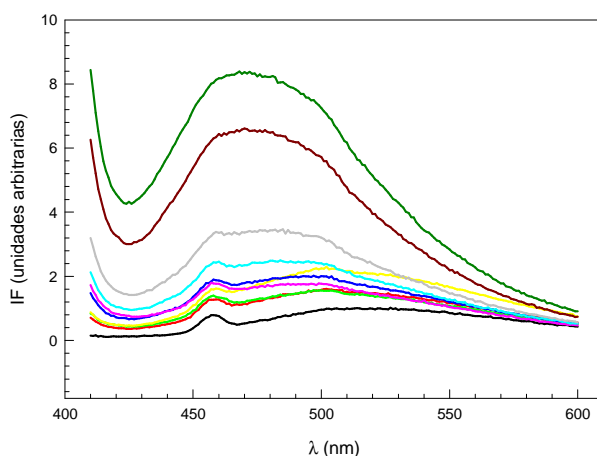
Se realizaron espectros de excitación y de emisión de la fluorescencia intrínseca proteica en ausencia y presencia de GX (Figuras 4.47). La IF disminuyó a medida que se incrementó la cantidad de polisacárido adicionado. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en la  $\lambda_{em}$  máxima. Este comportamiento estaría vinculado a un cambio en el entorno de los fluoróforos intrínsecos proteicos hacia un medio más polar cuando la proteína se encuentra en presencia de los polisacáridos.





**Figura 4.47.** Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca del NaCAS en ausencia (—) y presencia de diferentes relaciones NaCAS:GX: (—) 8:1; (—) 6:1; (—) 4:1; (—) 2:1; (—) 1:1 y (—) 1:1,5.  $C_{\text{NaCAS}}$  0,1%  $^{\text{P}}/\text{P}$ ; T 35°C; Rango de  $\lambda_{\text{em}} = 300\text{-}400\text{nm}$ ;  $\lambda_{\text{exc}}$  286nm.

Cuando se determinó la  $S_0$  de la proteína en ausencia y presencia de la GX en todo el rango de concentraciones ensayado se detectó que el marcador fluorescente empleado, ANS, interaccionaría con la GX. Para corroborar esta hipótesis se realizaron espectros de emisión de fluorescencia de mezclas de GX con ANS en ausencia de proteína, que se muestran en la Figura 4.48.



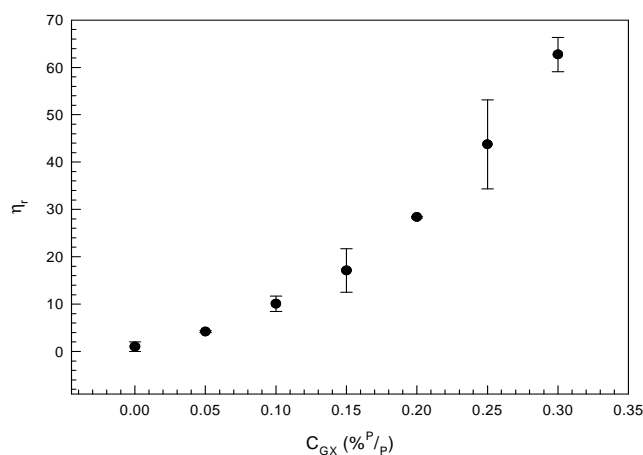
**Figura 4.48.** Espectros de emisión de fluorescencia del ANS en ausencia (—) y en presencia de distintas  $C_{\text{GX}}$  (% $^{\text{P}}/\text{P}$ ): (—) 0,0125; (—) 0,0143; (—) 0,0167; (—) 0,0200; (—) 0,0250; (—) 0,0330; (—) 0,0500; (—) 0,1000 y (—) 0,1500.  $C_{\text{ANS}}$  0,04mM; T 35°C;  $\lambda_{\text{exc}}$  396nm; Rango de  $\lambda_{\text{em}} = 410\text{-}600\text{nm}$ .

Se observó que la IF del ANS se incrementó a medida que aumentó la concentración de GX presente en el medio. Además se detectó un corrimiento del  $\lambda_{\text{em}}$  máximo hacia la banda azul del espectro de emisión de fluorescencia. Este comportamiento estaría indicando la presencia de algún tipo de interacción entre el marcador y el polisacárido. Por lo tanto no se pudo utilizar

el marcador fluorescente ANS para determinar la  $S_0$  del NaCAS en presencia de GX.

#### 4.3.5. Efecto de la GX sobre la viscosidad del medio ( $\eta$ )

En la Figura 4.49 se observa la variación de la  $\eta_r$  en presencia de GX en todo el rango de concentraciones ensayadas y a 35°C, la cual aumentó en forma exponencial creciente con la concentración del polisacárido.



**Figura 4.49.** Variación de la  $\eta_r$  de las soluciones de GX en todo el rango de concentraciones ensayado (0 - 0,30%<sup>P/P</sup>); Velocidad de corte: 3rpm; T 35°C

#### 4.3.6. Estudio de la agregación ácida de las partículas de NaCAS mediante técnicas turbidimétricas. Efecto de la presencia de GX

Se aplicó un diseño factorial completo  $2^3$  para evaluar la significancia de los efectos de los factores independientes T (15 y 35°C), R (0,35 y 1,0) y  $C_{GX}$  (0,010 y 0,075%<sup>P/P</sup>) sobre las variables dependientes  $t_{ag}$  y  $pH_{ag}$  durante la agregación ácida del NaCAS inducida por GDL y la  $D_f$  de los agregados formados al final de la misma. En la Tabla XX se muestran los valores de las variables codificadas (+1, 0 y -1) y no codificadas independientes y dependientes, de los cuales en esta etapa sólo se analizaron los que corresponden al diseño mencionado (destacados en la tabla con negrita y subrayado). Los efectos estimados sobre las variables dependientes fueron determinados usando los parámetros estadísticos obtenidos del t-test ANOVA y los valores de p fueron utilizados para confirmar la significancia de dichos factores, asumiendo  $p < 0,05$  (132).

Tabla XX. Diseño experimental para evaluar la agregación ácida del NaCAS (0,5% P/p) en presencia de GX

Factores			Respuestas					
C <sub>GX</sub> (% P/p)	T (°C)	R	t <sub>ag</sub> (min) ± 0,02		pH <sub>ag</sub> ± 0,02		D <sub>f</sub> ± 0,02	
			O	D	O	D	O	D
<b>0,010 (-1)</b>	<b>35 (+1)</b>	<b>1 (+1)</b>	7,50	7,50	4,73	4,72	4,05	4,00
0,050 (0)	35 (+1)	1 (+1)	11,00	12,00	4,33	4,22	4,05	4,00
<b>0,075 (+1)</b>	<b>35 (+1)</b>	<b>1 (+1)</b>	9,75	13,00	4,27	4,11	3,95	4,01
0,010 (-1)	35 (+1)	0,7 (0)	3,95	4,01	4,80	4,70	4,08	4,02
0,050 (0)	35 (+1)	0,7 (0)	19,00	18,50	4,21	4,14	3,99	4,07
0,075 (+1)	35 (+1)	0,7 (0)	15,50	16,00	5,04	5,01	4,05	4,07
<b>0,010 (-1)</b>	<b>35 (+1)</b>	<b>0,35 (-1)</b>	31,00	29,00	4,80	4,90	4,02	4,08
0,050 (0)	35 (+1)	0,35 (-1)	32,00	37,00	4,97	4,73	4,12	4,09
<b>0,075 (+1)</b>	<b>35 (+1)</b>	<b>0,35 (-1)</b>	40,50	48,50	5,02	4,91	4,04	3,97
0,010 (-1)	25 (0)	1 (+1)	11,50	12,50	5,17	5,09	3,94	4,05
0,050 (0)	25 (0)	1 (+1)	16,50	18,00	4,86	4,48	4,01	4,96
0,075 (+1)	25 (0)	1 (+1)	19,00	24,00	4,90	5,05	3,60	3,27
0,010 (-1)	25 (0)	0,7 (0)	17,50	20,00	5,12	4,99	4,00	4,09
0,050 (0)	25 (0)	0,7 (0)	22,50	23,50	4,79	5,05	3,95	4,08
0,075 (+1)	25 (0)	0,7 (0)	28,00	28,00	5,13	5,03	3,42	3,05
0,010 (-1)	25 (0)	0,35 (-1)	53,00	57,00	5,14	5,12	3,85	3,98
0,050 (0)	25 (0)	0,35 (-1)	74,00	62,00	5,12	5,16	4,01	4,00
0,075 (+1)	25 (0)	0,35 (-1)	65,00	59,00	5,16	5,20	3,26	3,49
<b>0,010 (-1)</b>	<b>15 (-1)</b>	<b>1 (+1)</b>	22,50	22,50	5,51	5,50	4,02	4,02
0,050 (0)	15 (-1)	1 (+1)	36,00	36,50	5,38	5,24	3,83	3,74
<b>0,075 (+1)</b>	<b>15 (-1)</b>	<b>1 (+1)</b>	-	-	-	-	-	-
0,010 (-1)	15 (-1)	0,7 (0)	41,00	42,00	5,34	5,18	3,97	3,93
0,050 (0)	15 (-1)	0,7 (0)	66,00	68,00	5,07	5,10	2,09	2,16
0,075 (+1)	15 (-1)	0,7 (0)	-	-	-	-	-	-
<b>0,010 (-1)</b>	<b>15 (-1)</b>	<b>0,35 (-1)</b>	75,00	85,00	5,31	5,31	4,02	3,82
0,050 (0)	15 (-1)	0,35 (-1)	3,53	4,00	125,00	131,10	5,34	5,44
<b>0,075 (+1)</b>	<b>15 (-1)</b>	<b>0,35 (-1)</b>	3,66	2,24	135,00	100,00	5,16	5,24

En la Tabla XXI se muestra la evaluación de los efectos, coeficientes y valores de p para t<sub>ag</sub>, pH<sub>ag</sub> y D<sub>f</sub> obtenidos a partir del ajuste factorial.

Tabla XXI. Efectos, coeficientes y valores de p estimados para t<sub>ag</sub>, pH<sub>ag</sub> y D<sub>f</sub> (unidades codificadas)

Factores	Respuestas								
	t <sub>ag</sub>			pH <sub>ag</sub>			D <sub>f</sub>		
	Efecto	Coef	p	Efecto	Coef	p	Efecto	Coef	p
Constante		42,42	0,002		5,02	<0,001		3,95	0,000
C <sub>GX</sub> (% P/p)	No significativo			No significativo			-0,15750	-0,08	0,016
R	-51,44	-25,89	0,023	No significativo			No significativo		
T (°C)	-44,94	-22,47	0,039	-0,6375	-0,32	0,010	0,13250	0,07	0,030
C <sub>GX</sub> *T	No significativo			No significativo			0,11750	0,06	0,044
	r <sup>2</sup> = 63,97%			r <sup>2</sup> = 64,09%			r <sup>2</sup> = 76,50%		

A partir del análisis anterior y tomando la totalidad de los datos obtenidos (Tabla XX completa), se ajustó mediante superficie de respuesta y se obtuvo la Ecuación 4.9, que presenta el modelo para la variación de t<sub>ag</sub>, comprobándose

la normalidad e independencia de los residuos (Figura 4.50). Sólo los términos lineales de R y T fueron estadística y negativamente significativos para  $t_{ag}$ .

$$t_{ag} = 42,42 - 25,89R - 22,47T \quad (4.9)$$

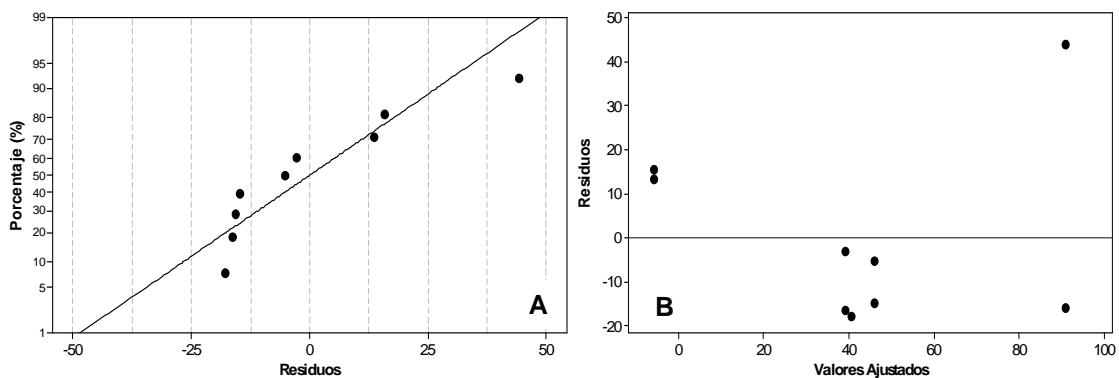


Figura 4.50. Gráfica de probabilidad normal (A) y de independencia de los residuos (B) para  $t_{ag}$ .

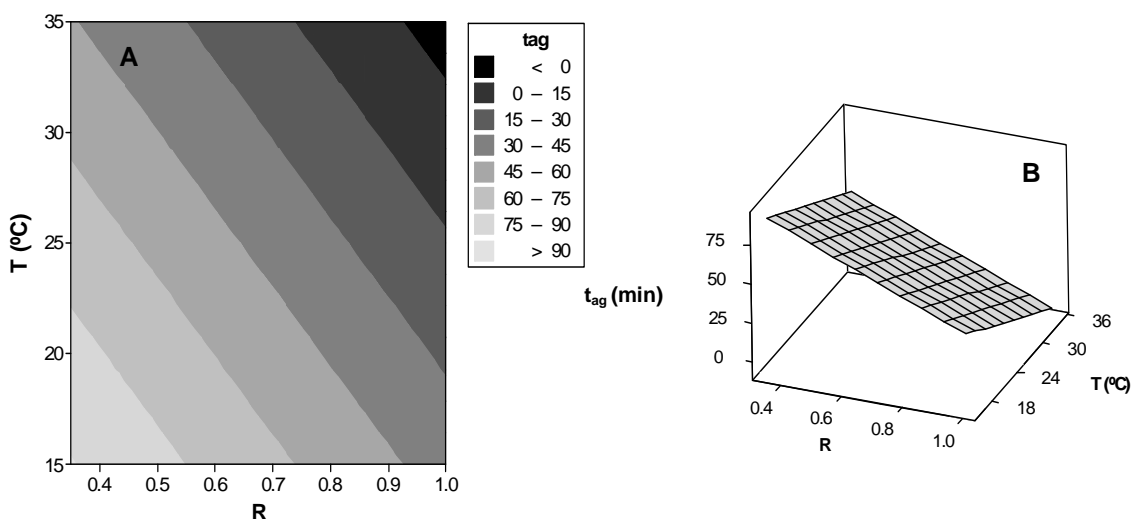
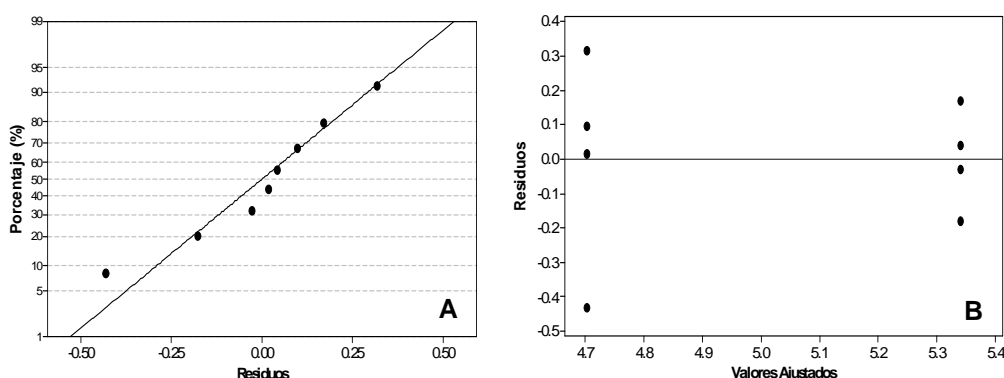


Figura 4.51. Gráficos de contorno (A) y de superficie de respuesta (B) de  $t_{ag}$  (en min) vs. R y T

De acuerdo a la Ecuación 4.9 y a lo que se puede observar en los gráficos de contorno y de superficie de respuesta (Figura 4.51),  $t_{ag}$  aumenta al disminuir R o T, siendo ambos factores igualmente significativos. Las posibles causas de estos efectos ya fueron discutidas en la sección 4.2.5.

En la Tabla XXI se observa que sólo el término lineal T fue negativo y estadísticamente significativo para  $pH_{ag}$ . La Ecuación 4.10 presenta el modelo para la variación de  $pH_{ag}$  en función de T, comprobándose la normalidad e independencia de los residuos (Figura 4.52). Debido a que la relación es lineal, no se obtuvieron los gráficos de superficie y contorno correspondientes.

$$pH_{ag} = 5,02 - 0,32T \quad (4.10)$$

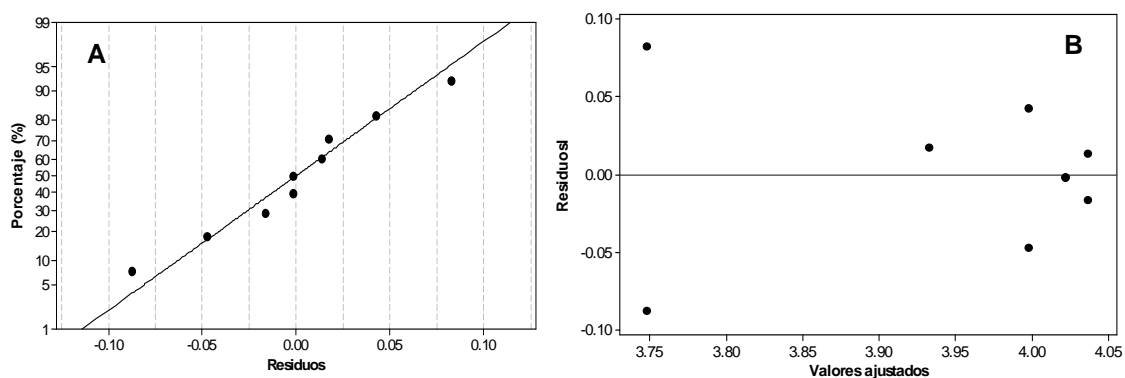


**Figura 4.52.** Gráfica de probabilidad normal (A) y de independencia de los residuos (B) para  $pH_{ag}$ .

Al igual que en el caso de la GG, un incremento de temperatura condujo a un menor  $pH_{ag}$ , corroborando el valor de  $\Delta H$  negativo para la fijación de los protones a los residuos protonables del NaCAS.

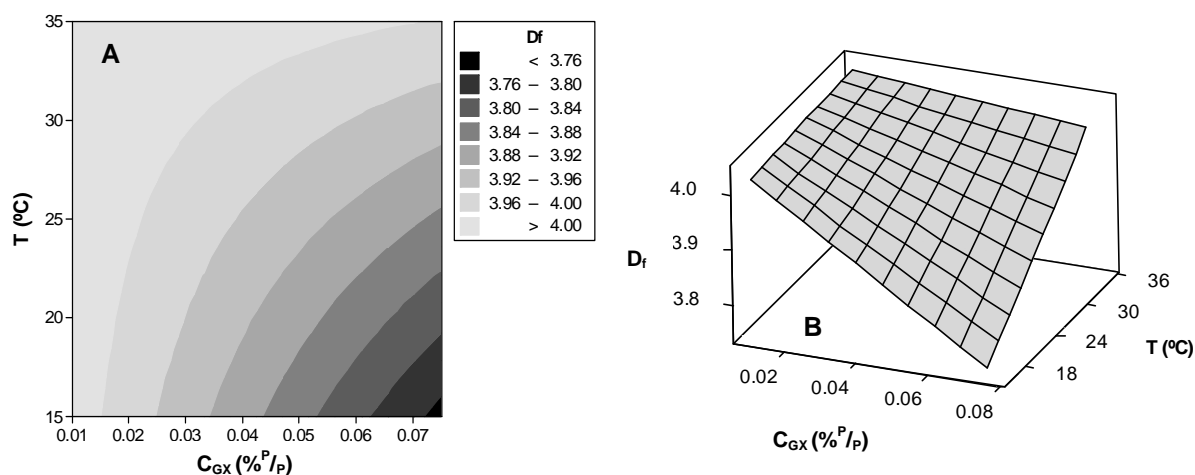
A partir de la evaluación de los valores de p para  $D_f$  obtenidos del ajuste factorial, sólo los términos lineales de  $C_{GX}$  y T fueron estadísticamente significativos para  $D_f$ . La interacción de estos factores tuvo un  $p > 0,05$  y se consideró no significativa. Sin embargo, al ajustar la totalidad de los datos (Tabla XX completa) mediante superficie de respuesta, los p de  $C_{GX}$  y T mejoraron y el de la interacción  $C_{GX} * T$  resultó significativo (Tabla XXI). De esta manera se obtuvo la Ecuación 4.11, que presenta el modelo para la variación de  $D_f$ , comprobándose la normalidad e independencia de los residuos (Figura 4.53).

$$D_f = 3,95 + 0,07T - 0,08C_{GX} + 0,06TC_{GX} \quad (4.11)$$



**Figura 4.53.** Gráfica de probabilidad normal (A) y de independencia de los residuos (B) para  $D_f$ .

De acuerdo a la Ecuación 4.11 y a lo que se observa en los gráficos de contorno y de superficie de respuesta (Figura 4.54 A y B), el grado de compactación de los agregados formados al final del proceso de acidificación, estimado a través de la  $D_f$ , presentó pequeños cambios al variar T y  $C_{GX}$ .



**Figura 4.54.** Gráficos de contorno (A) y de superficie de respuesta (B) de  $D_f$  vs.  $C_{GX}$  y T

Los efectos contrarios y simultáneos de la variación de T sobre el establecimiento de las interacciones que participan en la compactación de los agregados (o geles) ya fue discutido en la sección 4.2.6.

La GX es un polisacárido cargado negativamente al pH isoiónico del NaCAS, por lo tanto su adición a las soluciones de NaCAS conduce a un aumento de la estabilidad electrostática de las partículas proteicas antes y durante la agregación, conduciendo así a agregados menos compactos. Por otra parte, el aumento de la  $C_{GX}$  modifica sustancialmente la viscosidad del medio (Figura 4.49), disminuyendo la velocidad de agregación, lo que permitiría

una mayor reestructuración de los agregados. Estos dos efectos opuestos dan como resultado una leve disminución de la  $D_f$  con la  $C_{GX}$  (coeficiente: -0,08).

#### 4.3.7. Estudio de las propiedades reológicas de geles ácidos de NaCAS en presencia de GX

El estudio de las propiedades reológicas de los geles ácidos de NaCAS en presencia de GX se realizó a partir de un diseño factorial fraccionado  $2^{4-1}$  que permitió evaluar la significancia de los efectos de las variables independientes T (15 y 35°C), R (0,35 y 1,0),  $C_{GX}$  (0,10 y 0,20 %<sup>P</sup>/P) y  $C_{NaCAS}$  (3 y 5 %<sup>P</sup>/P) sobre las respuestas  $t_{gel}$ ,  $pH_{gel}$  y  $G'_{máx}$ . En la Tabla XXII se muestran los valores de las variables codificadas (+1 y -1) y no codificadas independientes y de respuestas obtenidos.

**Tabla XXII. Diseño experimental para estudiar los parámetros reológicos de los geles ácidos de NaCAS en presencia de GX**

Factores				Respuestas		
$C_{NaCAS}$ (% <sup>P</sup> /P)	$C_{GX}$ (% <sup>P</sup> /P)	R	T (°C)	$t_{gel}$ (min) ± 0,02	$pH_{gel}$ ± 0,02	$G'_{máx}$ (Pa) ± 0,01
3 (-1)	0,2 (+1)	1,00 (+1)	15 (-1)	3,04	6,11	1070,00
3 (-1)	0,1 (-1)	0,35 (-1)	15 (-1)	26,92	5,77	1346,00
5 (+1)	0,2 (+1)	0,35 (-1)	15 (-1)	3,39	6,39	2733,00
5 (+1)	0,1 (-1)	1,00 (+1)	15 (-1)	10,90	5,59	1236,00
5 (+1)	0,2 (+1)	1,00 (+1)	35 (+1)	3,62	5,92	1400,00
3 (-1)	0,1 (-1)	1,00 (+1)	35 (+1)	5,33	5,65	218,65
3 (-1)	0,2 (+1)	0,35 (-1)	35 (+1)	3,23	6,18	2496,25
5 (+1)	0,1 (-1)	0,35 (-1)	35 (+1)	14,61	5,49	484,30

En la Tabla XXIII se muestra la evaluación de los efectos, coeficientes y valores de p para  $t_{gel}$ ,  $pH_{gel}$  y  $G'_{máx}$  obtenidos a partir del ajuste factorial.

**Tabla XXIII. Efectos, coeficientes y valores de p estimados para  $t_{gel}$ ,  $pH_{gel}$  y  $G'_{máx}$  (unidades codificadas)**

Factores	Respuestas								
	$t_{gel}$			$pH_{gel}$			$G'_{máx}$		
	Efecto	Coef	p	Efecto	Coef	p	Efecto	Coef	p
Constante		8,88	0,008		5,89	0,000		1373,0	0,001
$C_{NaCAS}$ (% <sup>P</sup> /P)	No significativo			No significativo			No significativo		
$C_{GX}$ (% <sup>P</sup> /P)	-11,12	-5,56	0,050	0,525	0,2625	0,004	1103,6	551,8	0,034
R	No significativo			No significativo			No significativo		
T (°C)	No significativo			No significativo			No significativo		
$C_{GX}$ *R	No significativo			No significativo			No significativo		
	$r^2 = 41,18\%$			$r^2 = 74,51\%$			$r^2 = 68,20\%$		

Sólo el término lineal  $C_{GX}$  resultó estadísticamente significativo para todas las variables respuesta analizadas. Teniendo en cuenta el ANOVA anterior, se analizó la totalidad de los datos mediante ajuste factorial obteniéndose las Ecuaciones 4.12 a 4.14, que presentan los modelos para la variación de  $t_{gel}$ ,  $pH_{gel}$  y  $G'_{máx}$ , respectivamente, comprobándose normalidad en los residuos.

$$t_{gel} = 8,88 - 5,56 C_{GX} \quad (4.12)$$

$$pH_{gel} = 5,89 + 0,2625 C_{GX} \quad (4.13)$$

$$G'_{máx} = 1373 + 551,8 C_{GX} \quad (4.14)$$

Debido a que las relaciones son lineales, no se obtuvieron los gráficos de superficie y contorno correspondientes. Las ecuaciones anteriores indican que un incremento de la concentración de GX conduce a una disminución del  $t_{gel}$  y a un aumento significativo de la elasticidad final alcanzada. Por otra parte, el  $pH_{gel}$  sólo se modificó levemente.

De todos los polisacáridos ensayados, la GX fue la que produjo el mayor aumento de viscosidad relativa a una dada concentración. Este efecto parecería ser el dominante, por reducción de la difusión de las partículas unas hacia las otras, retrasando la formación del gel. Esto permite que se puedan realizar reestructuraciones durante la formación de la red de gel, con ruptura de interacciones y formación de otras nuevas, conduciendo a una malla más compacta y elástica.

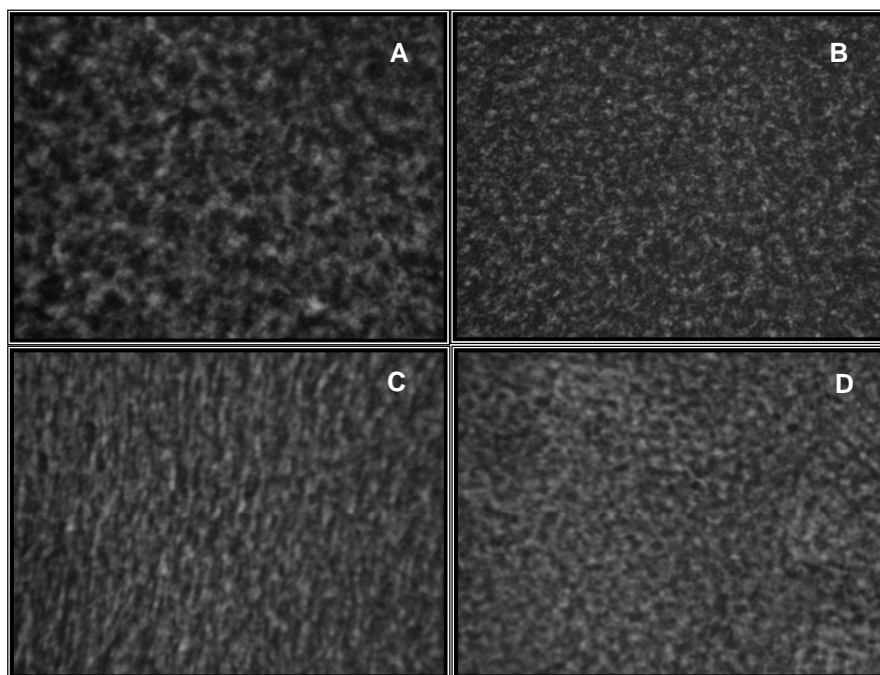
#### 4.3.8. Análisis de la microestructura de los geles en presencia de GX

Mediante el análisis digital de las imágenes obtenidas por OCM se evaluó la microestructura de los geles ácidos proteicos formados por mezclas de NaCAS (3% P/P) y GX a T (25°C) y R (0,5) constantes, evaluando el efecto de la  $C_{GX}$  (0 - 0,20% P/P) sobre dicha microestructura.

En la Figura 4.56 se compara la microestructura de cuatro geles obtenidos a diferentes  $C_{GX}$ . Se observó que la presencia de GX aumenta el grado de compactación de los geles y dicho efecto crece con la concentración del



polisacárido, en coincidencia con lo descrito en los resultados para el módulo elástico.



**Figura 4.56.** Microestructura de geles ácidos formados por  $C_{NaCAS}$  3%<sup>P/P</sup>, R 0,5 y T 25°C: **(A)** sin GX **(B)**  $C_{GX}$  0,10%<sup>P/P</sup> **(C)**  $C_{GX}$  0,15%<sup>P/P</sup> y **(D)**  $C_{GX}$  0,20%<sup>P/P</sup>; objetivo de inmersión de 100x, cámara digital con zoom de 7.1x y un adaptador de 52mm.

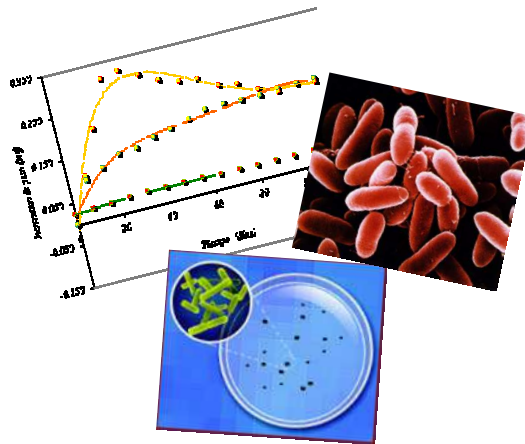
La Tabla XXIV muestra los valores de tamaño de poro de los geles ácidos de  $C_{NaCAS}$  3%<sup>P/P</sup>, R 0,50, T 25°C y  $C_{GX}$  variables, obtenidos a partir del análisis de las imágenes digitales.

**Tabla XXIV. Tamaño promedio de poro de los geles de  $C_{NaCAS}$  3%, R 0,5 y T 25°C**

$C_{GX}$ ( <sup>P/P</sup> )	Tamaño promedio de poro ( $\mu\text{m}$ )
0	$4,57 \pm 0,04$
0,10	$4,30 \pm 0,09$
0,15	$4,07 \pm 0,04$
0,20	$3,98 \pm 0,04$

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que, en coincidencia con lo observado en la Figura 4.56, a medida que aumentó la  $C_{GX}$  en la mezcla, el tamaño de poro de los geles fue menor, indicando una mayor compactación de la malla o red de gel.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN Parte III



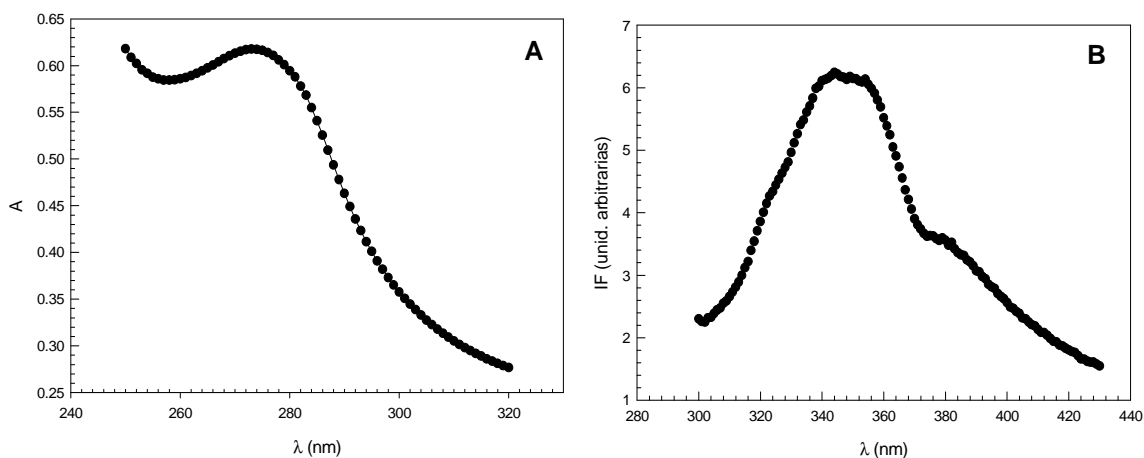
## CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN: Parte III

### FORMACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AGREGADOS Y GELES ÁCIDOS DE NaCAS Y SUS HIDROLIZADOS: PROPIEDADES ESTRUCTURALES, FUNCIONALES Y REOLÓGICAS

#### 5.1. Caracterización fisicoquímica de la enzima proteolítica P45

Se produjo la enzima proteolítica P45 a partir del cultivo bacteriano *Bacillus* sp. P45 y se obtuvo a partir de la precipitación del sobrenadante de cultivo con sulfato de amonio y posterior cromatografía líquida en Sephadex G-100 (Sección 2.3.11). Se armó un *pool* con todas las alícuotas eluidas (volumen final = 19mL) y se determinó la actividad proteolítica por el método de la azocaseína (Sección 2.3.11.1). El *pool* enzimático presentó una actividad proteasa del 78%.

Para poder caracterizar fisicoquímicamente a la enzima, se realizaron espectros de absorción y emisión de fluorescencia intrínseca de la misma a 35°C. La Figura 5.1 A y B muestran, respectivamente, los espectros obtenidos.



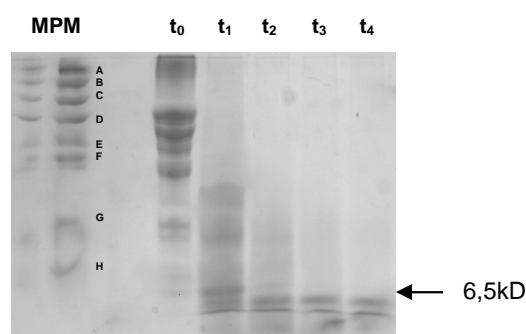
**Figura 5.1.** Espectro de absorción (A) y de emisión de fluorescencia (B) de la enzima proteolítica P45, empleada en la obtención de los hidrolizados proteicos de NaCAS.

Ambos espectros revelan la presencia de cromóforos intrínsecos en la composición aminoacídica de la enzima.

## 5.2. Obtención de los hidrolizados proteicos de NaCAS. Determinación del grado de hidrólisis alcanzado y los péptidos resultantes

Muestras de NaCAS fueron sometidas a hidrólisis enzimática en medio alcalino utilizando el *pool* de enzimas P45 obtenido (relación enzima: sustrato 1:50). La hidrólisis fue interrumpida a distintos tiempos por desnaturalización térmica de la enzima, tal como se explicó en la sección 2.3.12.

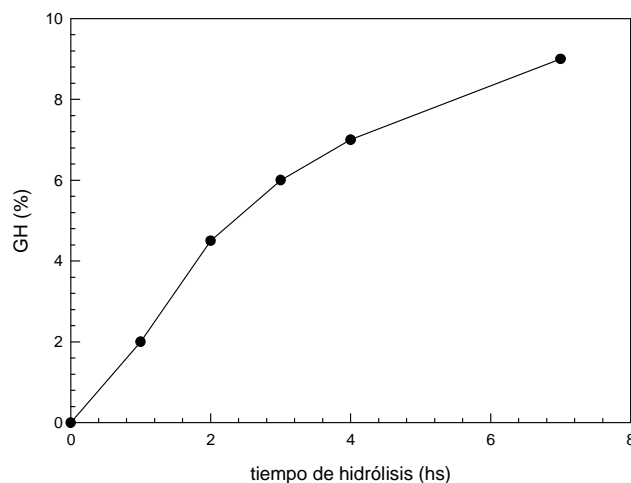
Los péptidos resultantes fueron evaluados por electroforesis en geles de poliacrilamida (urea-PAGE).



**Figura 5.2.** Urea-PAGE de los hidrolizados de NaCAS obtenidos con la enzima proteolítica P45. Marcador de pesos moleculares (MPM): **(A)** 66 kD; **(B)** 45 kD; **(C)** 36 kD; **(D)** 29 kD; **(E)** 24 kD; **(F)** 20 kD; **(G)** 14,2 kD y **(H)** 6,5 kD.

Se observó que la extensión de la hidrólisis aumentó hasta las dos horas de incubación alcanzándose a los tiempos mayores pesos moleculares menores a 6,5 kD (Figura 5.2).

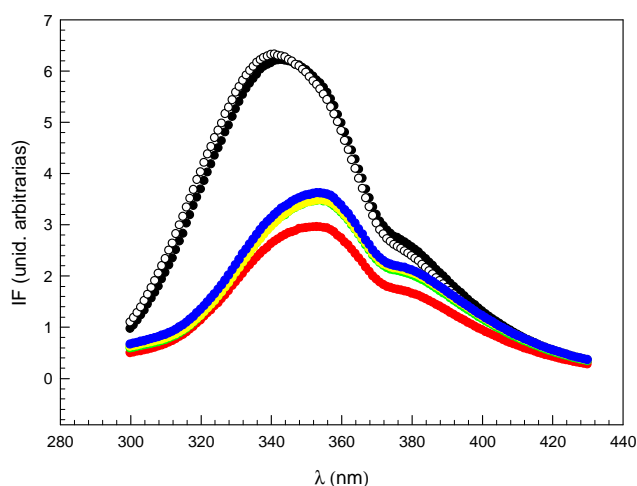
El avance del grado de hidrólisis (GH) del NaCAS por la proteasa P45 se muestra en la Figura 5.3. El GH aumentó a medida que el tiempo de hidrólisis se incrementó, alcanzando un 9% luego de las 7hs. de incubación. Este valor se asemeja al GH obtenido por hidrólisis de CN de leche de búfalo con alcalasa (obtenida a partir de *Bacillus licheniformis*) o neutrasa (obtenida a partir de *Bacillus amyloliquefaciens*) (137).



**Figura 5.3.** Grado de hidrólisis de los hidrolizados de NaCAS obtenidos con la proteasa P45.

### 5.3. Estudio conformacional de los hidrolizados a través de espectrofluorometría

Se realizaron espectros de emisión de fluorescencia de los hidrolizados de NaCAS obtenidos a diferentes tiempos de hidrólisis (Figura 5.4). La muestra con los hidrolizados  $t_7$  no pudo ser analizada por ser turbia. Probablemente en este caso, la inestabilidad de los péptidos formados conduzca a una agregación espontánea de los mismos, con el consiguiente aumento de turbidez de la muestra.



**Figura 5.4.** Espectros de emisión de fluorescencia de los hidrolizados obtenidos con la enzima proteolítica P45. (●) NaCAS sin hidrolizar 0,1%  $P/P$ ; (○) hidrolizado  $t_0$ ; (●) hidrolizado  $t_1$ ; (●) hidrolizado  $t_2$ ; (●) hidrolizado  $t_3$ ; (●) hidrolizado  $t_4$ .  $C_{\text{hidrolizados}} 0,1\% P/P$ , Rango de  $\lambda_{\text{em}} = 300-430\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} 286\text{nm}$ ,  $T 35^\circ\text{C}$ .

Se observó que los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca del NaCAS sin hidrolizar y de los hidrolizados obtenidos a tiempo 0 ( $t_0$ ) con la enzima P45 coinciden. Para el resto de los hidrolizados se observó un marcado corrimiento del  $\lambda_{m\acute{a}x}$  de emisión hacia el rojo y descenso de la IF. Este comportamiento estaría indicando un aumento de la hidrofiliidad del entorno de los grupos fluoróforos proteicos.

Por otro lado se midió la  $S_0$  de los hidrolizados obtenidos. A partir de una solución acuosa de NaCAS 0,5%  $P/P$ , se obtuvieron los péptidos a diferentes tiempos de hidrólisis y se les determinó la concentración proteica por el método de Kuaye. En la Tabla XXV se informan los resultados obtenidos.

**Tabla XXV. Resultados de  $S_0$  de los hidrolizados de NaCAS obtenidos con la proteasa P45. T 35°C**

Muestra	$S_0$
NaCAS sin hidrolizar (0,5% $P/P$ )	115 ± 7
$t_0$ (0,565% $P/P$ )	114 ± 8
$t_1$ (0,436% $P/P$ )	89,7 ± 0,6
$t_2$ (0,501% $P/P$ )	14 ± 2
$t_3$ (0,523% $P/P$ )	18 ± 1
$t_4$ (0,375% $P/P$ )	8,6 ± 0,1

Se observó que a medida que aumentó el tiempo de hidrólisis con la enzima P45, los valores de  $S_0$  disminuyeron, indicando un aumento en la hidrofiliidad del péptido formado. Estos resultados coinciden con lo observado en los espectros de emisión de fluorescencia (Figura 5.4).

#### 5.4. Evaluación de la bioactividad *in vitro* de los péptidos obtenidos

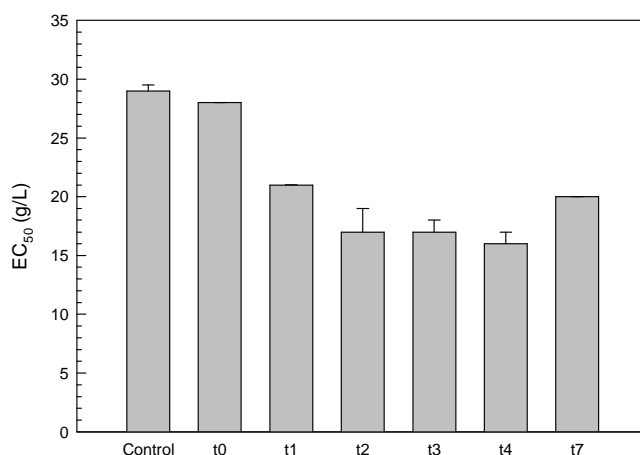
Se evaluó la actividad antioxidante y antibacteriana de los productos de hidrólisis obtenidos a diferentes tiempos por acción de la enzima P45.

##### 5.4.1. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de los péptidos obtenidos fue evaluada por los métodos DPPH y TBARS, considerados los más útiles para dicho propósito (96).

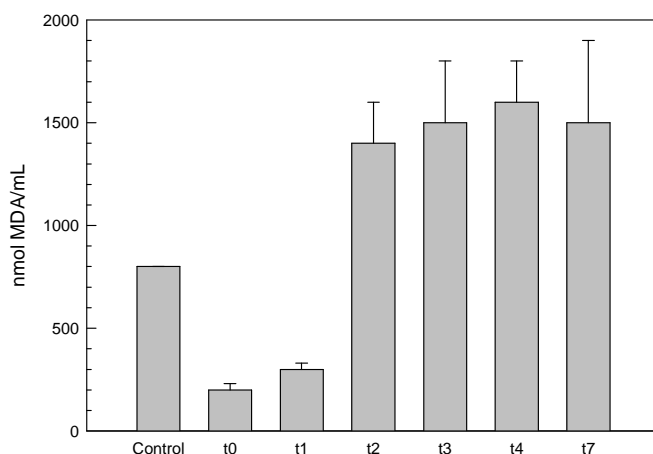
En la Figura 5.5 se observa que los hidrolizados de NaCAS obtenidos luego de 1h de incubación ( $t_1$ ) mostraron mayor capacidad de captura del radical DPPH (menor  $EC_{50}$ ) comparado con NaCAS sin hidrolizar y los

hidrolizados  $t_0$  (control). Al aumentar el tiempo de hidrólisis (2-7hs.) no aumentó significativamente la actividad antioxidante, sino que mantuvo los valores similares a los obtenidos para  $t_1$ . Estos resultados sugieren que los hidrolizados de NaCAS contienen péptidos que actúan como dadores de electrones y pueden reaccionar con los radicales libres para convertirlos en productos más estables terminando la reacción en cadena de radicales (138, 139). Se ha reportado que las CN digeridas por varias proteasas presentan menor actividad DPPH que las CN sin digerir (140). La actividad antioxidante de los hidrolizados proteicos está relacionada con el tamaño y la secuencia aminoacídica de los péptidos generados, que a su vez está determinada por la especificidad de la proteasa (96). En general, los péptidos de bajo peso molecular tienden a tener mayor actividad antioxidante (elevada capacidad de captura del DPPH) que aquellos de mayor peso molecular (128, 141). En este sentido, el GH parecería afectar el potencial antioxidante de los hidrolizados proteicos (142, 143).



**Figura 5.5.** Determinación de la actividad antioxidante de los hidrolizados de NaCAS obtenidos con la proteasa P45, empleando el método de captura del DPPH.

Los hidrolizados  $t_0$  y  $t_1$  muestran una inhibición similar a la oxidación lipídica medida a través del método TBARS (Figura 5.6); sin embargo, la hidrólisis prolongada del NaCAS (2-7hs.) afectó negativamente la actividad TBARS, la cual estaría relacionada con el tipo de péptidos formado durante la hidrólisis (128).



**Figura 5.6.** Actividad antioxidante de los hidrolizados de NaCAS obtenidos con la enzima P45, evaluada por el Método TBARS.

El análisis de estos resultados sugiere entonces que la hidrólisis del NaCAS con la proteasa P45 durante 1h genera péptidos bioactivos con propiedades antioxidantes. Por encima de ese tiempo, los péptidos generados pierden su actividad biológica.

#### 5.4.2. Actividad antibacteriana

Se ensayó la actividad antibacteriana de los péptidos obtenidos sobre 3 microorganismos patógenos: *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*.

Es conocido que los péptidos antibacterianos derivados de las proteínas lácteas usualmente poseen carácter anfifílico y catiónico, lo cual parece ser relevante para su mecanismo de acción, dado que la unión electrostática entre los péptidos y las membranas bacterianas (cargadas negativamente) es el paso inicial para la formación del poro que conduce a la muerte celular (144).

El análisis de los resultados mostró actividad antibacteriana contra *Salmonella enteritidis* sólo de los hidrolizados obtenidos luego de 1h de hidrólisis ( $t_1$ ). El halo de inhibición obtenido fue de 11,5mm.

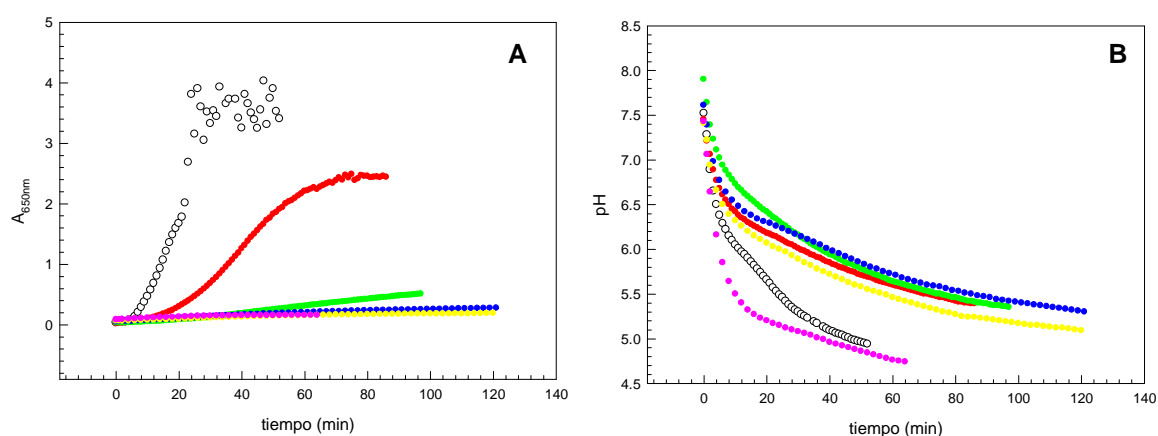


### 5.5. Evaluación del proceso de agregación ácida de los hidrolizados de NaCAS obtenidos con la enzima P45

Se estudió la cinética del proceso de agregación ácida inducida por la adición de GDL de cada uno de los hidrolizados proteicos obtenidos a partir de NaCAS 0,5% P/P con la enzima P45. La concentración de los hidrolizados obtenidos fue determinada por el método de Kuaye. En todos los casos se trabajó con un R 0,5 y T 35°C. Los espectros de absorción (450-650nm) y la  $A_{650nm}$  fueron medidas en función del tiempo hasta que se alcanzó un valor máximo y constante de A; registrando simultáneamente el descenso de pH (Figura 5.7).

Se observó que por encima de la hora de hidrólisis ( $t_1$ ) no hubo agregación. Este hecho podría estar relacionado con la disminución brusca en la  $S_0$  de los hidrolizados, lo cual no favorecería a las interacciones hidrofóbicas que conducen a la agregación de las partículas.

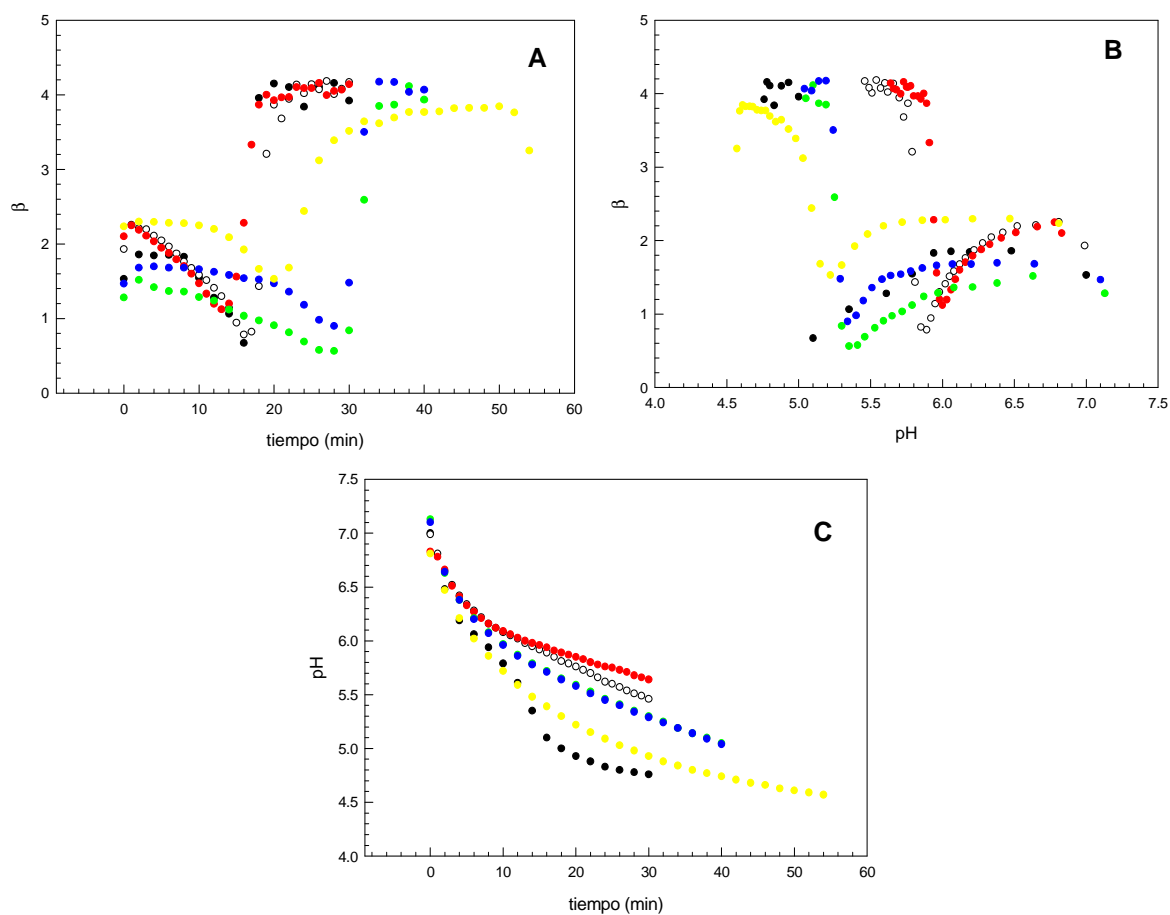
Respecto a la velocidad de descenso de pH, se observó una disminución de la misma para los hidrolizados  $t_1$ ,  $t_2$ ,  $t_3$  y  $t_4$ ; y un efecto opuesto para el  $t_7$ . Esto, sumado a la turbidez inicial que poseen las muestras obtenidas a las 7hs. de incubación, sugiere un proceso de agregación de las partículas hidrolizadas a partir de dicho tiempo, previo a la adición de GDL.



**Figura 5.7.** Variación de la  $A_{650nm}$  (A) y descenso de pH (B) en función del tiempo, una vez adicionada la GDL, de los hidrolizados obtenidos con la enzima proteolítica P45. (○) hidrolizado  $t_0$ ; (●) hidrolizado  $t_1$ ; (●) hidrolizado  $t_2$ ; (●) hidrolizado  $t_3$ ; (●) hidrolizado  $t_4$ ; (●) hidrolizado  $t_7$ . R 0,5; T 35°C.

### 5.6. Efecto de la adición de los hidrolizados sobre la agregación ácida del NaCAS

Para evaluar el efecto que produce la adición de los diferentes hidrolizados de NaCAS obtenidos con la enzima P45 sobre el proceso de agregación ácida de la proteína, sobre 3mL de muestra de NaCAS 0,5%  $P/P$  se adicionó 1mL de cada uno de los hidrolizados obtenidos. La cinética de estas mezclas (NaCAS: hidrolizado 4:1) fue iniciada por la adición de GDL y analizada por medidas turbidimétricas. Simultáneamente se registró el descenso de pH de las muestras ensayadas. En todos los casos se trabajó a un R constante de 0,5 y a 35°C. Se analizaron los parámetros  $\beta$ ,  $t_{ag}$ ,  $pH_{ag}$  y  $D_f$  (Figura 5.8).



**Figura 5.8.** Variación del parámetro  $\beta$  (A), y descenso de pH (C) en función del tiempo y variación de  $\beta$  con el pH (B), una vez adicionada la GDL de las mezclas NaCAS:hidrolizados (4:1): (●) NaCAS sin hidrolizar; (○) hidrolizado  $t_0$ ; (●) hidrolizado  $t_1$ ; (●) hidrolizado  $t_2$ ; (●) hidrolizado  $t_3$ ; (●) hidrolizado  $t_4$ .  $C_{NaCAS}$  0,5%  $P/P$ ; R 0,5; T 35°C.

Se observó que la presencia de los hidrolizados modificó el  $t_{ag}$  y el  $pH_{ag}$  (Figura 5.8 A y B). El  $t_{ag}$  aumentó al aumentar el tiempo de hidrólisis, especialmente para tiempos mayores a 1h. Esto podría estar parcialmente

asociado con una disminución en el  $pH_{ag}$ . Este comportamiento indicaría que un aumento en el tiempo de hidrólisis favorecería la estabilidad electrostática de las mezclas NaCAS:hidrolizados. Es probable que la adición de los hidrolizados aumente la carga neta negativa de las partículas coloidales de NaCAS. Durante la primera etapa del proceso, donde el pH disminuye, la barrera energética debida a la repulsión electrostática entre residuos de igual carga decrece y los choques efectivos necesarios para que se formen los agregados se ven afectados. Al aumentar la barrera energética se requiere de un mayor número de protones (menor  $pH_{ag}$ ) para neutralizar todas las cargas y por ende, mayor tiempo para alcanzar el  $t_{ag}$ . No se observaron cambios significativos en el grado de compactación ( $D_f$ ) de los agregados formados durante el proceso por esta técnica (Tabla XXVI). Por lo tanto, los hidrolizados se podrían incluir en la matriz de gel de NaCAS sin alterar significativamente su grado de compactación.

**Tabla XXVI. Valores de  $D_f$  obtenidos para las mezclas NaCAS:hidrolizados (4:1); R 0,5 y T 35°C**

Sistema	$D_f \pm 0,02$
NaCAS sin hidrolizar	4,16
NaCAS: $t_0$	4,17
NaCAS: $t_1$	4,14
NaCAS: $t_2$	4,12
NaCAS: $t_3$	4,17
NaCAS: $t_4$	4,17

### 5.7. Estudio de las propiedades reológicas de los geles ácidos de los hidrolizados y su mezcla con NaCAS

Debido a que solamente los hidrolizados  $t_0$  y  $t_1$  demostraron capacidad de agregar en presencia de GDL, se decidió evaluar las características reológicas de los geles ácidos que se forman a altas concentraciones de los mismos. Además, el hidrolizado  $t_1$  presentó actividad antibacteriana y antioxidante (por ambos métodos ensayados), por ello se decidió evaluar el efecto de su adición en las propiedades viscoelásticas de geles ácidos de NaCAS. Los resultados se presentan en la Tabla XXVII.

Tabla XXVII. Resultados de  $G'_{\text{máx}}$ ,  $t_{\text{gel}}$  y  $\text{pH}_{\text{gel}}$  para los sistemas en estudio a 35°C (R = 0,5)

Sistema	$t_{\text{gel}}$ (min)	$G'_{\text{máx}}$ (Pa)	$\text{pH}_{\text{gel}}$
NaCAS 3% <sup>P</sup> /P	16,4 ± 0,2	67 ± 8	4,89 ± 0,02
Hidrolizado $t_0$ 2,49% <sup>P</sup> /P	34,5 ± 0,2	71 ± 1	4,79 ± 0,06
Hidrolizado $t_1$ 2,21% <sup>P</sup> /P	37,0 ± 0,2	7 ± 1	4,94 ± 0,02
Mezcla NaCAS:hidrolizado $t_1$ (4:1)	25,0 ± 0,2	53 ± 5	5,06 ± 0,04

Se observó que la elasticidad ( $G'_{\text{máx}}$ ) del gel ácido formado por el hidrolizado  $t_1$  es mucho menor respecto a la del NaCAS y a la del hidrolizado  $t_0$ . Esto se debe a que los péptidos obtenidos luego de 1h de hidrólisis presentan pesos moleculares inferiores a los del NaCAS sin hidrolizar, y por lo tanto, probablemente la malla de gel sea más abierta y, por ende, de menor elasticidad. Este tipo de geles podría ser utilizado en la manufactura de productos untables. El  $t_{\text{gel}}$  en las condiciones de la hidrólisis fue mayor debido a que las muestras se encuentran en un medio tamponado. No se detectaron cambios significativos en los  $\text{pH}_{\text{gel}}$  medidos.

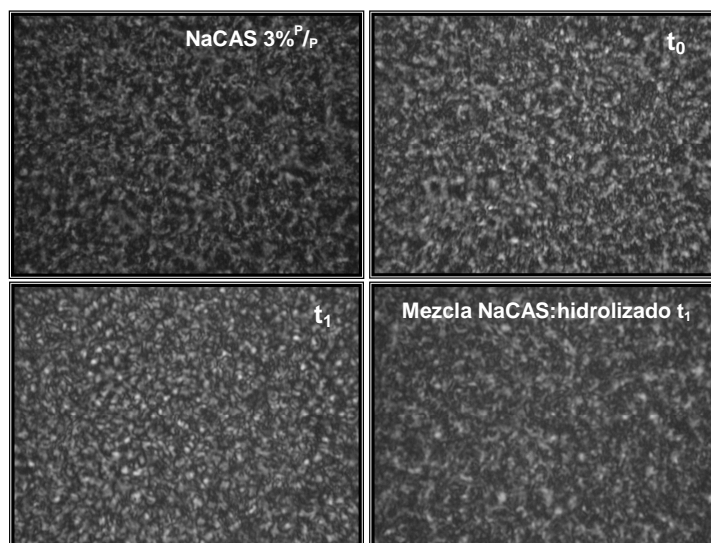
Cuando se evaluó el efecto de la adición de los péptidos bioactivos ( $t_1$ ) al NaCAS sin hidrolizar se observó que la elasticidad del gel formado no presentó cambios significativos respecto del gel ácido de NaCAS sin hidrolizar. Por su parte,  $t_{\text{gel}}$  aumentó levemente mientras que el  $\text{pH}_{\text{gel}}$  no se modificó significativamente. Estos resultados indicarían que es posible la incorporación de un péptido con actividad biológica en una matriz formada por NaCAS sin modificar significativamente la elasticidad y las propiedades reológicas de dicha matriz alimenticia.

### 5.8. Análisis de la microestructura de los geles ácidos de hidrolizados y de la mezcla NaCAS:hidrolizado $t_1$

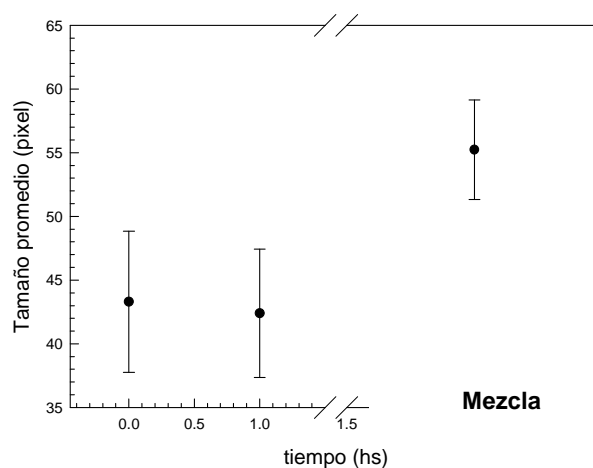
La microestructura de los geles ácidos formados se muestra en la Figura 5.9. A partir de estas imágenes, fue posible observar diferencias en la microestructura interna de los geles.

Los geles formados a partir de los hidrolizados  $t_1$  presentaron pequeños agregados y partículas libres, y los intersticios o poros poco definidos, resultando una imagen uniforme y homogénea. Sin embargo, el tamaño medio de los poros fue semejante (Figura 5.10), lo que sugiere que la pérdida de elasticidad de estos geles respecto de los originados a partir del NaCAS sin

hidrolizar ( $t_0$ ) se debería a la inclusión de una menor cantidad de partículas proteicas para conformar la red tridimensional.



**Figura 5.9.** Microestructura de los geles ácidos formados por NaCAS 3%<sup>P</sup>/<sub>P</sub>; hidrolizados  $t_0$  y  $t_1$  2%<sup>P</sup>/<sub>P</sub> obtenidos por acción de la enzima P45 y la mezcla de NaCAS:hidrolizado  $t_1$  (4:1). R 0,5 y T 35°C.



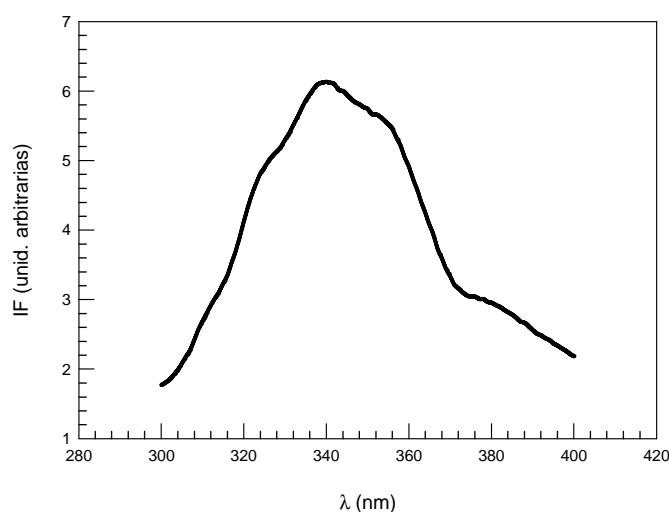
**Figura 5.10.** Medidas de tamaño promedio de poro (píxel) para los geles ácidos formados por los hidrolizados  $t_0$  y  $t_1$  obtenidos por acción de la enzima P45 y la mezcla NaCAS:hidrolizado  $t_1$  (4:1).

Por otra parte, los geles de NaCAS sin hidrolizar mostraron un grado de compactación levemente mayor que aquellos obtenidos de la mezcla de NaCAS con los hidrolizados  $t_1$ . Ambas imágenes muestran una malla de red con poros bien definidos.

### 5.9. Caracterización fisicoquímica de la enzima proteolítica P7

Se produjo la enzima proteolítica P7 a partir del cultivo bacteriano *Bacillus* sp. P7 y se obtuvo a partir de la precipitación del sobrenadante de cultivo con sulfato de amonio y posterior cromatografía líquida en Sephadex G-100 (Sección 2.3.11). Se armó un *pool* con todas las alícuotas eluidas (volumen final = 20mL) y se determinó la actividad proteolítica por el método de la azocaseína (Sección 2.3.11.1). El *pool* enzimático presentó una actividad proteasa del 80%.

Para poder caracterizar fisicoquímicamente a la enzima, se realizaron espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de la misma en condiciones nativas. En la Figura 5.11 se observa el espectro típico de emisión de los fluoróforos intrínsecos proteicos con una  $\lambda_{em}$  máxima de 340nm.



**Figura 5.11.** Espectro de emisión de fluorescencia de la enzima proteolítica P7, empleada en la obtención de los hidrolizados proteicos de NaCAS. Rango de  $\lambda_{em}$  = 300-400nm,  $\lambda_{exc}$  288nm.

### 5.10. Obtención de los hidrolizados proteicos de NaCAS. Determinación del grado de hidrólisis alcanzado y los péptidos resultantes

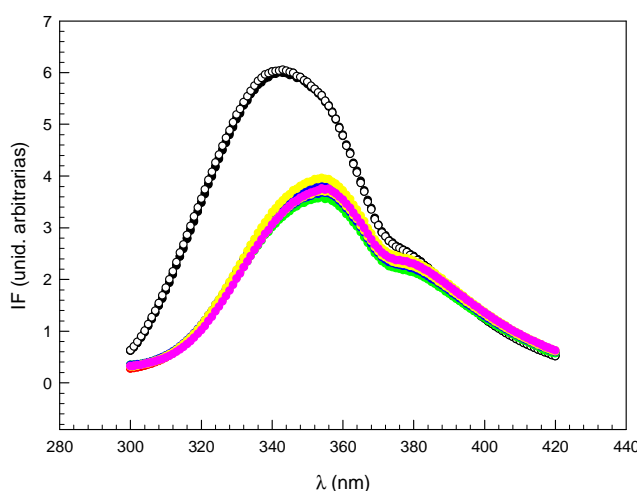
Muestras de NaCAS fueron sometidas a hidrólisis enzimática en medio alcalino utilizando el *pool* enzimático P7 (relación enzima: sustrato 1:50). La hidrólisis fue interrumpida a distintos tiempos por desnaturalización térmica de la enzima, tal como se explicó en la sección 2.3.12.

Los péptidos resultantes fueron evaluados por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-urea-PAGE). Se observó que todos los hidrolizados

presentaron pesos moleculares muy pequeños (inferiores a los 6,0 kD) y los mismos no permanecieron en el gel de corrida, aún trabajando con elevadas concentraciones de poliacrilamida. Los perfiles electroforéticos revelaron un GH mayor que en el caso de la enzima P45.

### 5.11. Estudio conformacional de los hidrolizados a través de espectrofluorimetría

Se realizaron espectros de emisión de fluorescencia de los hidrolizados de NaCAS obtenidos por hidrólisis a distintos tiempos con la enzima P7 (Figura 5.12).



**Figura 5.12.** Espectros de emisión de fluorescencia de los hidrolizados obtenidos con la enzima proteolítica P7. (●) NaCAS sin hidrolizar; (○) hidrolizado  $t_0$ ; (●) hidrolizado  $t_1$ ; (●) hidrolizado  $t_2$ ; (●) hidrolizado  $t_3$ ; (●) hidrolizado  $t_4$ ; (●) hidrolizado  $t_7$ .  $C_{\text{hidrolizados}} 0,1\% \text{ P/P}$ , Rango de  $\lambda_{\text{em}} = 300\text{-}420\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} 286\text{nm}$ ,  $T 35^\circ\text{C}$ .

Los espectros de emisión de fluorescencia de los hidrolizados revelaron la presencia de fluoróforos intrínsecos en la composición aminoacídica de los mismos. Se observó un corrimiento aproximado de 12nm hacia la banda roja del espectro y una disminución de la IF máxima respecto del NaCAS sin hidrolizar y de la muestra obtenida a  $t_0$  (control). Esto estaría indicando una mayor exposición de los fluoróforos proteicos al medio en el caso de los hidrolizados.

Además, se midió la  $S_0$  de los hidrolizados obtenidos tal como se detalló en la sección 2.3.3.2. En la Tabla XXVIII se informan los resultados obtenidos.

Tabla XXVIII. Resultados de  $S_0$  de los hidrolizados de NaCAS obtenidos con la proteasa P7.  $C_{NaCAS}$  0,5%<sup>P</sup>/<sub>P</sub> y  $C_{hidrolizados}$  0,1%<sup>P</sup>/<sub>P</sub>. T 35°C

Muestra	$S_0$
NaCAS sin hidrolizar	115 ± 0,2
$t_0$	111,2 ± 0,2
$t_1$	170,1 ± 0,2
$t_2$	83,4 ± 0,2
$t_3$	31,4 ± 0,3

Se observó que a medida que aumentó el tiempo de hidrólisis, los valores de  $S_0$  disminuyeron (excepto para  $t_1$ ), indicando un aumento en la hidrofiliidad de los péptidos formados. Estos resultados coinciden con lo observado en los espectros de emisión de fluorescencia.

### 5.12. Evaluación de la bioactividad *in vitro* de los péptidos obtenidos

Se evaluaron la actividad antioxidante, antibacteriana, el poder quelante del Fe y el poder reductor de los productos de hidrólisis obtenidos a diferentes tiempos por acción de la enzima P7.

#### 5.12.1. Actividad antibacteriana

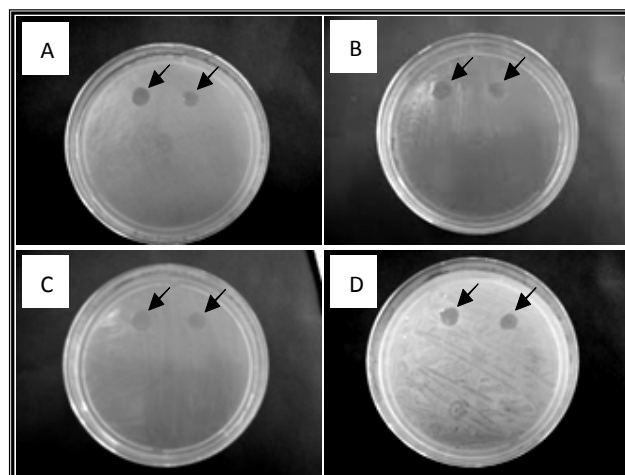
Se estudió la capacidad de los hidrolizados de NaCAS para inhibir el crecimiento de una serie de bacterias patógenas. Se observó que los hidrolizados obtenidos a  $t_{0,5}$  y  $t_1$  presentaron bioactividad contra *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* y *Corynebacterium fimi*. No se observó bioactividad contra *Bacillus cereus* ni *Staphylococcus aureus*. Los resultados se resumen en la Tabla XXIX y en la Figura 5.13.

Tabla XXIX. Actividades antibacteriana de los hidrolizados de NaCAS luego de 0,5 y 1h de hidrólisis con la proteasa P7

Bacterias indicadoras	Zona de inhibición (mm) <sup>a</sup>	
	0,5h	1h
<b>Gram positivas</b>		
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15131	8,0	10,0
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 9634	Sin inhibición	
<i>Corynebacterium fimi</i> NCTC 7547	7,0	10,0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 1901	Sin inhibición	
<b>Gram negativas</b>		
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	8,0	11,0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	6,0	9,0

<sup>a</sup> diámetro del halo





**Figura 5.13.** Inhibición del crecimiento de bacterias por los hidrolizados de NaCAS obtenidos luego de 0,5 y 1 h de hidrólisis con la proteasa P7. **(A)** *Escherichia coli*, **(B)** *Salmonella enteritidis*, **(C)** *Listeria monocytogenes*, **(D)** *Corynebacterium fimi*.

### 5.12.2. Actividad antioxidante, quelante de hierro (Fe) y poder reductor

La actividad antioxidante de los hidrolizados de NaCAS fue determinada utilizando el método de captura del radical ABTS. Los resultados obtenidos respecto a este estudio y a la capacidad quelante del Fe y el poder reductor de los hidrolizados se resumen en la Tabla XXX.

**Tabla XXX.** Actividades antioxidantes, quelante y poder reductor de los hidrolizados de NaCAS obtenidos con la proteasa P7

Tiempo hidrólisis (hs)	Captura radical ABTS (%)	Actividad quelante de Fe <sup>2+</sup> (%)	Poder reductor
0	52,60 ± 0,08	78,400 ± 0,005	0,106 ± 0,007
0,5	59,5 ± 0,1	89,800 ± 0,003	0,133 ± 0,002
1	70,20 ± 0,02	93,40 ± 0,02	0,171 ± 0,005
2	67,90 ± 0,05	93,300 ± 0,008	0,22 ± 0,03
3	71,20 ± 0,02	94,600 ± 0,043	0,30 ± 0,01
4	74,100 ± 0,008	80,300 ± 0,004	0,25 ± 0,01
6	75,30 ± 0,01	91,200 ± 0,005	0,262 ± 0,004

Se observó que la actividad antioxidante de los péptidos aumentó con el incremento del tiempo de hidrólisis, alcanzando un máximo a t<sub>6</sub> de 75,30 ± 0,01%. El incremento de la actividad antioxidante a medida que aumenta el tiempo de hidrólisis sugiere que el proceso proteolítico contribuye a la actividad biológica liberando péptidos inicialmente inactivos encriptados en la secuencia del NaCAS. En este estudio se observa que los hidrolizados proteicos presentan mayor actividad antioxidante que la proteína sin hidrolizar.

Los hidrolizados de NaCAS obtenidos con la enzima P7 demostraron una importante actividad quelante del Fe para todos los tiempos de hidrólisis, alcanzándose la máxima a  $t_3$  ( $94,60 \pm 0,04\%$ ). El  $\text{Fe}^{2+}$  actúa como un catalizador en la producción de radicales hidroxilo a través de la reacción Fenton (145) contribuyendo al desarrollo de enfermedades vinculadas con el estrés oxidativo. Además, los metales de transición estimulan la peroxidación de los lípidos en los alimentos, dando lugar a la rancidez (146). En consecuencia, la quelación de iones metálicos contribuiría con la actividad antioxidante de los hidrolizados proteicos. Se ha reportado la acción quelante de iones metálicos de las CN y los péptidos derivados de su hidrólisis (147, 148). Las proteínas y los péptidos tienen la capacidad de quelar metales. Los grupos carboxilos y aminos de los aminoácidos básicos y ácidos, respectivamente, estarían involucrados en la quelación de los iones metálicos  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  por parte de los péptidos (95). La presencia de aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos en las fracciones peptídicas contribuirían con la actividad quelante (145).

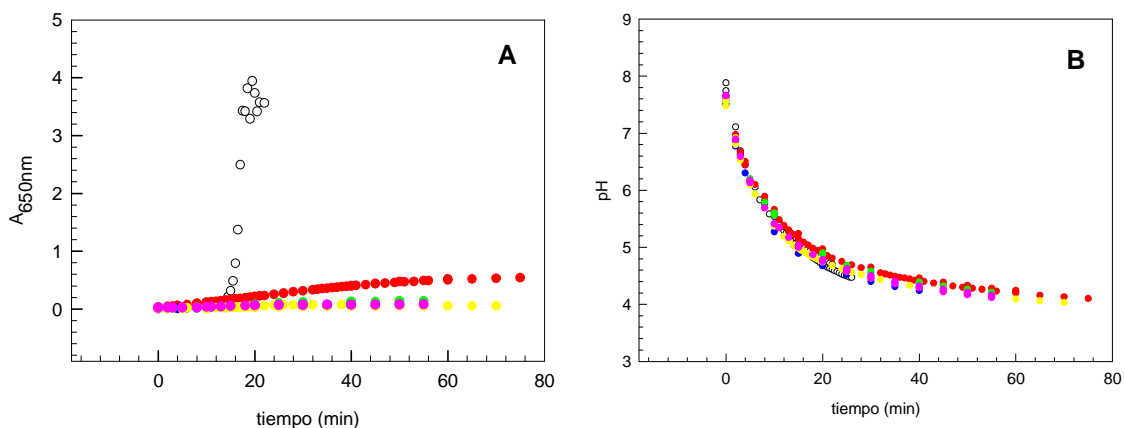
El poder reductor alcanzó un valor máximo a  $t_3$  ( $0,30 \pm 0,01$ ) y luego disminuyó. Este ensayo está basado en la capacidad que tienen los hidrolizados para reducir el complejo  $\text{Fe}^{3+}$ /ferricianida a  $\text{Fe}^{2+}$ . En consecuencia, el poder reductor de los hidrolizados de NaCAS indica que los mismos pueden actuar como dadores de electrones, reduciendo los intermediarios oxidados del proceso de peroxidación lipídica, lo que sugiere que el poder reductor probablemente contribuiría con la actividad antioxidante (97).

### **5.13. Evaluación del proceso de agregación ácida de los hidrolizados de NaCAS obtenidos con la enzima P7**

Se estudió la cinética del proceso de agregación ácida inducida por la adición de GDL de cada uno de los hidrolizados proteicos obtenidos a partir de NaCAS 0,5% P/P con la enzima P7. En todos los casos se trabajó con un R 0,5 y T 35°C. Los espectros de absorción y la  $A_{650\text{nm}}$  fueron medidas en función del tiempo, registrando simultáneamente el descenso de pH (Figura 5.14).

Como puede observarse, sólo agregaron las muestras  $t_0$ , que son las que no sufrieron hidrólisis (control). La ausencia de formación de agregados a partir de los hidrolizados  $t_{1-7}$  detectables por esta técnica, probablemente se deba al

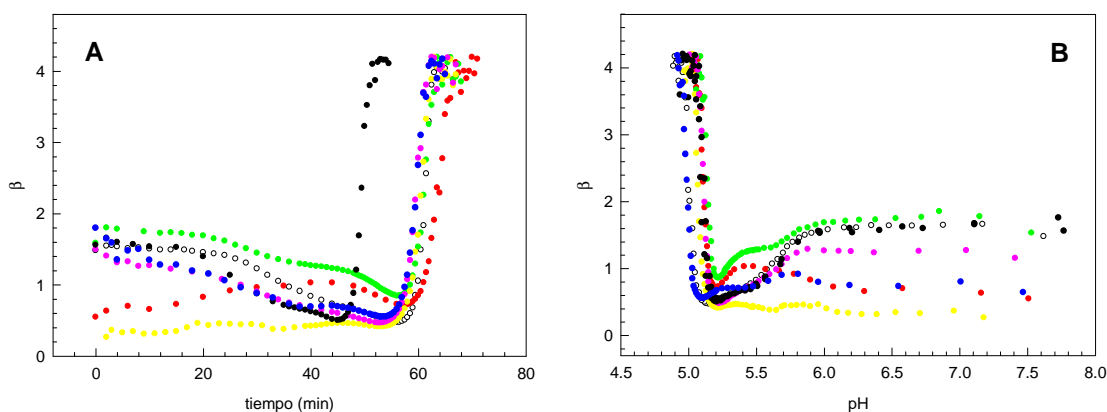
pequeño tamaño medio de los mismos que no pueden formar o solo generan agregados pequeños (menores que la  $\lambda$  incidente) no detectados por medidas de turbidez.



**Figura 5.14.** Medidas de  $A_{650nm}$  vs. tiempo **(A)** y de pH vs. tiempo **(B)** de los hidrolizados obtenidos con la enzima P7. (○) hidrolizado  $t_0$ ; (●) hidrolizado  $t_1$ ; (●) hidrolizado  $t_2$ ; (●) hidrolizado  $t_3$ ; (●) hidrolizado  $t_4$ ; (●) hidrolizado  $t_7$ .  $C_{\text{hidrolizados}} 0,5\% \text{ P/P}$ ; R 0,5; T  $35^\circ\text{C}$ .

#### 5.14. Efecto de la adición de los hidrolizados obtenidos sobre la agregación ácida del NaCAS

Con el objetivo de evaluar si la incorporación de los hidrolizados con actividad biológica modifica la cinética del proceso de agregación del NaCAS y/o el grado de compactación de los agregados formados, se estudió la capacidad de agregación de mezclas de NaCAS y los hidrolizados frente a la adición de GDL (Figura 5.15).



**Figura 5.15.** Variaciones del parámetro  $\beta$  **(A)** y del pH **(B)** en función del tiempo luego de la adición de GDL. (●) NaCAS sin adición de hidrolizado; (○) hidrolizado  $t_0$ ; (●) hidrolizado  $t_1$ ; (●) hidrolizado  $t_2$ ; (●) hidrolizado  $t_3$ ; (●) hidrolizado  $t_4$  y (●) hidrolizado  $t_7$ .  $C_{\text{NaCAS}} 0,5\% \text{ P/P}$ ;  $C_{\text{hidrolizados}} 0,125\% \text{ P/P}$ ; mezclas NaCAS:hidrolizados (4:1); R 0,5; T  $35^\circ\text{C}$ .

Durante el proceso de agregación ácida del NaCAS, la presencia de los hidrolizados no modificó el valor de pH al cual comienza la agregación ( $pH_{ag}$ ), es decir, no afectó apreciablemente la estabilidad electrostática del NaCAS. Tampoco se observaron modificaciones en la velocidad de descenso del pH ni en el grado de compactación ( $D_f$ ) de los agregados formados al final de la acidificación en presencia de los hidrolizados (Tabla XXXI). Sin embargo, se observó un incremento del tiempo al cual comienza la agregación ( $t_{ag}$ ).

**Tabla XXXI. Valores de  $D_f$  obtenidos para las mezclas NaCAS: hidrolizados (4:1); R 0,5 y T 35°C**

Sistema	$D_f \pm 0,02$
NaCAS sin hidrolizar	4,17
NaCAS: $t_0$	4,14
NaCAS: $t_1$	4,16
NaCAS: $t_2$	4,18
NaCAS: $t_3$	4,17
NaCAS: $t_4$	4,18
NaCAS: $t_7$	4,19

### 5.15. Estudio de las propiedades reológicas de los geles ácidos de NaCAS. Efecto de la presencia de los hidrolizados obtenidos por acción de la proteasa P7

A elevadas concentraciones de NaCAS durante la acidificación, los agregados tienen un tamaño lo suficientemente grande como para formar una malla de gel. En el caso de los hidrolizados, no se obtuvieron geles por adición de GDL, probablemente debido al pequeño tamaño medio de los mismos que dificulta la formación de la malla de gel. Por lo tanto, se evaluó si la presencia de los péptidos produce alguna modificación en la cinética de gelación del NaCAS y/o la elasticidad de los geles.

Se realizaron ensayos reológicos oscilatorios para determinar las propiedades viscoelásticas de dichos geles en ausencia y en presencia de los hidrolizados. Se estimó el  $t_{gel}$  a partir del punto de cruce del módulo elástico  $G'$  y del módulo viscoso  $G''$ . También se determinó el pH correspondiente al  $t_{gel}$  ( $pH_{gel}$ ). En la Tabla XXXII se resumen los resultados de  $t_{gel}$ ,  $pH_{gel}$  y el  $G'_{m\acute{a}x}$  obtenidos para los sistemas evaluados.

Tabla XXXII. Resultados de  $G'_{\text{máx}}$ ,  $t_{\text{gel}}$  y  $\text{pH}_{\text{gel}}$  para los sistemas en estudio. T 35°C y R 0,5

Sistema	$t_{\text{gel}}$ (min $\pm$ 0,01)	$\text{pH}_{\text{gel}}$ ( $\pm$ 0,01)	$G'_{\text{máx}}$ ( $\pm$ 0,01)
NaCAS 3% <sup>P</sup> / <sub>P</sub>	16,36	4,91	66,89
NaCAS: hidrolizado $t_0$ (4:1)	22,43	4,92	57,24
NaCAS: hidrolizado $t_1$ (4:1)	22,36	4,97	53,68
NaCAS: hidrolizado $t_2$ (4:1)	23,91	4,93	47,64
NaCAS: hidrolizado $t_3$ (4:1)	25,89	4,91	39,28
NaCAS: hidrolizado $t_4$ (4:1)	23,65	4,93	26,16

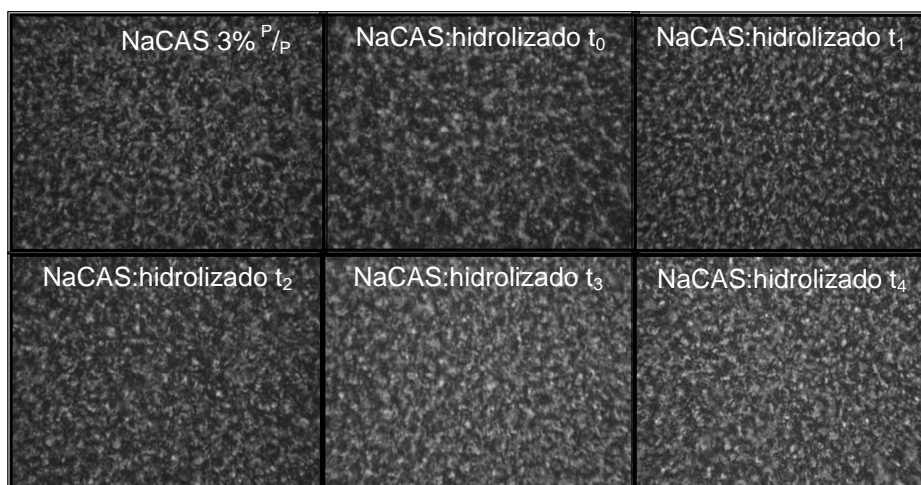
Los valores de  $G'_{\text{máx}}$  observados indican que la elasticidad de los geles ácidos formados por las mezclas NaCAS:hidrolizados disminuyó a medida que aumentó el tiempo de hidrólisis con que dichos hidrolizados fueran obtenidos, sin detectarse cambios significativos en los valores de  $t_{\text{gel}}$  y  $\text{pH}_{\text{gel}}$ . Esto indicaría que la presencia de los hidrolizados, si bien no afecta la cinética de gelación, produce cambios en la elasticidad de los geles, probablemente por interrupción de la malla de gel.

#### 5.16. Análisis de la microestructura de los geles en presencia de los péptidos bioactivos

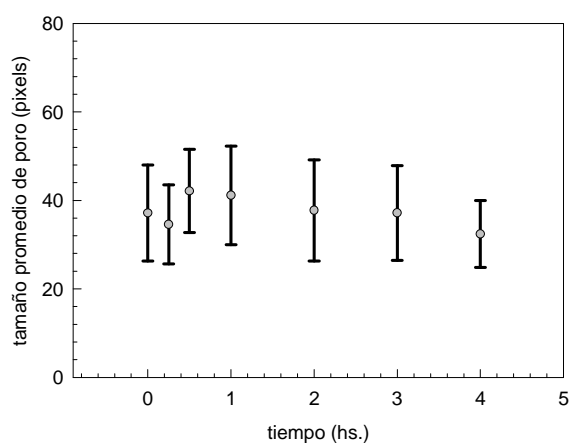
Mediante el análisis digital de las imágenes obtenidas por microscopía óptica invertida se evaluó la microestructura de los geles ácidos proteicos formados por mezclas de NaCAS y los hidrolizados, evaluando el efecto que la presencia de los péptidos ejerce sobre dicha microestructura (Figura 5.16).

A pesar que la elasticidad de los geles obtenidos por mezcla de los hidrolizados de P7 con NaCAS disminuyó a medida que aumentó el tiempo de hidrólisis, no se detectaron cambios significativos en la microestructura de dichos geles por análisis de las imágenes digitales.

Lo observado en las imágenes se validó a través de la determinación del tamaño promedio de poro, a partir del análisis de las imágenes digitales con el *software* Image J (Figura 5.17). El mismo fue de aproximadamente 40 *píxeles*, que corresponde a 2,5 $\mu\text{m}$  y se observó que no varió significativamente con el tiempo de hidrólisis de obtención de los péptidos.



**Figura 5.16.** Microestructura de geles ácidos formados por NaCAS 3%  $P/P$  y las mezclas NaCAS: hidrolizados  $t_0$ - $t_4$  (4:1) obtenidos por acción de la enzima P7. R 0,5 y T 35°C.



**Figura 5.17.** Medidas de tamaño promedio de poro (*pixel*) para las distintas mezclas de NaCAS con sus hidrolizados obtenidos a distintos tiempos por acción de la proteasa P7.

Por lo tanto, será necesario tener en cuenta el efecto de la presencia de los hidrolizados sobre la elasticidad de los geles de NaCAS si se desea utilizar dicho geles como vehículo de los principios activos demostrados en este estudio.

# CONCLUSIONES



## CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES

### 6.1. Evaluación de la formación de agregados y/o geles de NaCAS por acidificación inducida por GDL

Al evaluar el proceso de agregación del NaCAS por acidificación lenta inducida por la adición de GDL, se observó la existencia de dos etapas bien definidas. En la primera, más lenta y, por lo tanto, la que determina la velocidad total del proceso, se detectó una disminución del tamaño medio de las partículas. Este efecto puede deberse a la existencia de un proceso de disociación de las partículas de NaCAS, que existen asociadas en suspensión, según lo revelado por el SDS-PAGE. La otra posibilidad es la existencia de pequeños agregados que provocan el corrimiento de la distribución de tamaños hacia valores menores cuyas partículas de origen no fueron detectadas por las técnicas empleadas. En la segunda etapa ocurre la agregación espontánea de las partículas coloidales que han perdido su estabilidad electrostática por el descenso del pH. Esta etapa está caracterizada por el aumento brusco del tamaño particular hasta que el agregado llega a su crecimiento y grado de compactación máximo, caracterizado por la dimensión fractal. Los sitios que participan en las interacciones interparticulares se encontrarían cercanos a los grupos cromóforos del NaCAS, dado el cambio en los espectros de emisión de la fluorescencia intrínseca durante la agregación.

El proceso estudiado resultó dependiente de la concentración proteica, la cantidad de GDL adicionada y la temperatura de trabajo, de modo tal que una variación de cualquiera de estos parámetros, lleva a una modificación principalmente de la primera etapa y, por ende de la estructura de los agregados finales.

Para completar el estudio del efecto de la temperatura, concentración de NaCAS y cantidad de GDL adicionada sobre la agregación ácida del NaCAS, se evaluó la significancia de dichas variables sobre los parámetros  $t_{ag}$ ,  $pH_{ag}$  y  $D_f$  y se obtuvieron los modelos matemáticos correspondientes a través de un diseño factorial, los cuales permitieron predecir el comportamiento del sistema.

A través de ensayos reológicos oscilatorios se determinaron las propiedades viscoelásticas de los geles ácidos de NaCAS. Se observó que la elasticidad de los geles formados durante la gelación proteica dependió tanto



de la concentración proteica como de la cantidad de GDL adicionada. El  $t_{gel}$  y el  $pH_{gel}$  disminuyeron a medida que aumentó la cantidad de GDL adicionada. Esto puede deberse al aumento de la velocidad de descenso del pH cuando crece la concentración de protones (mayor R).

Se observó que los geles formados a menor velocidad de gelación (menor R), muestran una mayor estructuración, presentando un aspecto más compacto y poros de menor tamaño. Esto se debe a que, si el proceso se realiza lentamente, la malla de gel puede reestructurarse por ruptura de algunas interacciones y formación de otras nuevas, obteniéndose una malla más apretada y, por lo tanto, con poros cada vez más pequeños. Se puede concluir entonces que el grado de compactación y el tamaño de los poros del gel dependen de la velocidad de gelación, la cual está relacionada en forma directa con la cantidad de GDL adicionada.

## **6.2. Estudio de los cambios conformacionales del NaCAS en solución frente a la presencia de pequeños cosolutos: iones calcio, sacarosa, lactosa, glicerol. Efecto sobre la formación de agregados y/o geles ácidos**

La adición de sacarosa, lactosa y glicerol aumentaron la viscosidad del medio y afectaron la hidrofobicidad superficial del NaCAS dependiendo de la naturaleza y concentración de los mismos. Esta variación estaría vinculada con la exclusión preferencial de cada cosoluto de la superficie proteica.

La presencia de todos los cosolutos ensayados modificó el tiempo al cual comienza la agregación y, el glicerol en particular, aumentó la estabilidad electrostática del NaCAS.

Se observó que a medida que aumentó la concentración de sacarosa, se incrementó la elasticidad de los geles formados. Podríamos pensar que estos geles presentan una malla más fina y homogénea, donde el tamaño de los poros es menor, lo que implicaría un aumento de la interconectividad de la red de gel que incrementa la rigidez del mismo. Por otro lado, según Pugnaroni et al (2005), la presencia del azúcar favorecería las interacciones entre las partículas proteicas (133). Este cambio en las uniones moleculares proteicas también contribuiría al incremento de la compactación y, por lo tanto, de la elasticidad de la red de gel.

La lactosa presentó un efecto opuesto sobre la elasticidad de los geles formados. Este comportamiento estaría vinculado, por un lado con la naturaleza química del disacárido que generaría un impedimento estérico para las interacciones CN-CN, y por otro por el aumento de la viscosidad del medio, dificultando la difusión de las partículas unas a otras y, por lo tanto, disminuyendo la probabilidad de interaccionar entre ellas.

La presencia del catión calcio produjo un significativo cambio en el estado inicial de las partículas de NaCAS, probablemente vinculado a la fijación del mismo a los residuos fosfoseril y/o carboxilatos de las cadenas polipeptídicas. Este catión disminuyó la estabilidad electrostática de las partículas coloidales como consecuencia de una reducción en la carga neta, favoreciendo las fuerzas intermoleculares durante el proceso de gelación.

El grado de compactación de los agregados y la elasticidad de los geles formados dependieron de la concentración de calcio. Cuando el proceso de agregación es lento (concentración de  $\text{Ca}^{2+} \leq 0,5\text{mM}$ ), las cadenas polipeptídicas pueden adquirir diferentes orientaciones, dando lugar a la formación de agregados más compactos y geles más elásticos y rígidos. Por lo tanto, la diferencia de la elasticidad final de los geles ácidos formados en presencia de distintas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  puede ser atribuida a cambios conformacionales de las partículas de CAS y a modificaciones cinéticas durante el proceso de gelación.

### **6.3. Estudio de la interacción entre el NaCAS y polisacáridos (CMC, GG y GX). Efecto de los mismos sobre la agregación y/o gelación ácidas**

La adición de polisacáridos al NaCAS genera cambios en la solubilidad de los sistemas, en la conformación proteica y en las propiedades funcionales dependiendo del tipo y concentración del polisacárido.

Al evaluar las mezclas NaCAS:CMC en función del pH y de la temperatura, se observó un efecto estabilizante del polisacárido sobre el NaCAS en solución, debido probablemente a la adsorción de la CMC en la superficie proteica, incrementando así la carga neta negativa (135). Al estudiar el proceso de agregación del NaCAS y de las mezclas NaCAS:CMC, por acidificación inducida por adición de GDL, manteniendo la velocidad de descenso de pH aproximadamente constante, se observó un aumento del tiempo en que se

forman los agregados y una disminución del pH al cual comienza la agregación a medida que aumenta la proporción de CMC en la mezcla. Esto afectó la dimensión fractal de los agregados formados, disminuyendo el grado de compactación de los mismos con el aumento de la relación CMC:NaCAS. Esto estaría vinculado a cambios conformacionales proteicos en presencia de la CMC con disminución de la hidrofobicidad superficial, dificultándose así el establecimiento de interacciones de tipo hidrofóbico.

Cuando se analizaron las mezclas a concentraciones en las que se pueden formar geles, se observó que las características reológicas de los mismos dependieron de la composición relativa de las mezclas. A bajas relaciones CMC:NaCAS los geles presentaron mayor elasticidad que a altas relaciones. Por lo tanto, se pueden obtener geles de diferente textura variando la relación proteína:polisacárido, debido a que se parte de un estado inicial diferente con formación de micropartículas inducido por la presencia del polisacárido. El hecho de que los geles de mezclas NaCAS:CMC se formen a muy bajos valores de pH podría aprovecharse para su utilización como vehículo de principios bioactivos que se deseen incorporar por vía digestiva.

La adición de GG a soluciones acuosas de NaCAS produjo un aumento de la hidrofobicidad superficial proteica debido a un cambio conformacional con exposición al medio de los fluoróforos intrínsecos proteicos. Las mezclas NaCAS:GG no mostraron cambios significativos en la estabilidad térmica pero se observó incompatibilidad termodinámica a concentraciones de NaCAS mayores a 3% y/o de GG mayores a 0,2%. El tamaño medio inicial de las partículas de las diferentes mezclas fue mayor a medida que aumentó la proporción de GG, lo que indicaría la formación inicial de micropartículas.

Durante la agregación ácida no se observaron cambios significativos en el tiempo y el pH a los cuales comienza dicho proceso, probablemente debido a que la GG no modifica la estabilidad electrostática del NaCAS por ser un galactomanano neutro. A la concentración proteica estudiada, no se observaron cambios significativos en el grado de compactación de los agregados ácidos obtenidos.

El diseño de experimentos permitió evaluar la significancia de los efectos de las variables T, R y concentración de GG sobre la cinética de la agregación ácida del NaCAS inducida por GDL y sobre el grado de compactación de los

agregados formados al final de la misma. Se pudo comprobar que el tiempo al que comienza la agregación ( $t_{ag}$ ) depende de la cantidad de GDL adicionada y de la temperatura, siendo el efecto de la primera variable mucho más significativo. El valor de pH que hay que alcanzar para desestabilizar al NaCAS se supedita a la temperatura y a la concentración de GG; vinculándose esta última dependencia al grado de compatibilidad termodinámica entre el polisacárido y la proteína. El grado de compactación de los agregados estimado a través de la dimensión fractal resultó independiente de todos los factores evaluados.

El análisis del cambio de viscosidad de las mezclas NaCAS:GG a concentraciones proteicas que permiten la formación de un gel ácido llevó a la conclusión de que el tiempo al cual se forma el gel no se modificó con la concentración de GG, pero dependió de la concentración de NaCAS, la temperatura y de la cantidad de GDL adicionada.

Cuando el estudio se completó con los ensayos reológicos, se observó que para las tres respuestas analizadas ( $t_{gel}$ ,  $pH_{gel}$  y  $G'_{máx}$ ) todos los factores estudiados resultaron significativos. Esto estaría indicando que la elasticidad final de los geles obtenidos dependerá de las condiciones en las que se lleve a cabo el proceso de gelación ácida.

La microestructura de los geles ácidos de NaCAS resultó afectada por la temperatura a la que se realizó la gelación y por la cantidad de GDL adicionada. Este resultado tiene estrecha relación con la velocidad de formación de la malla de gel y coincide con lo expuesto anteriormente.

Es decir que la GG podría utilizarse para la obtención de micropartículas de NaCAS como posible vehículo de principios activos, con diferentes texturas de acuerdo a la concentración relativa de los biopolímeros empleados y a las condiciones del proceso.

La adición de GX a las soluciones de NaCAS, originó incompatibilidad termodinámica en todo el rango de concentraciones de la proteína y el polisacárido. La GX es un polisacárido aniónico y el NaCAS tiene, al pH isoiónico carga neta negativa, por lo tanto, la repulsión electrostática generada por cargas de igual signo conduciría a la separación de fases. También se observó desestabilización térmica de las mezclas NaCAS:GX, la cual se incrementó con el aumento de proporción de GX. Teniendo en cuenta que las

soluciones de NaCAS son estables térmicamente y que sólo se desestabilizan a  $T > 140^{\circ}\text{C}$ , es evidente que el aumento de  $T$  induce la separación de fases en presencia de GX.

Por otra parte, la presencia del polisacárido condujo a cambios conformacionales del NaCAS vinculados a una modificación del entorno de los fluoróforos intrínsecos proteicos hacia un medio más polar a medida que aumentó la proporción de polisacárido.

El diseño de experimentos permitió evaluar la significancia de los efectos de las variables temperatura, cantidad de GDL adicionada y concentración de GX sobre la cinética de la agregación ácida del NaCAS inducida por GDL y sobre el grado de compactación de los agregados formados al final del proceso. Se comprobó que el  $t_{ag}$  depende de la cantidad de GDL adicionada y de la temperatura, siendo ambos factores igualmente significativos, y es independiente de la concentración de GX en el rango ensayado. El valor de  $\text{pH}_{ag}$  dependió únicamente y de manera lineal con la temperatura. A diferencia de lo observado para GG, la  $D_f$  de los agregados formados por NaCAS y GX dependió levemente tanto de la temperatura como de la concentración del polisacárido.

Las mediciones reológicas revelaron que la concentración de GX fue el único factor significativo para  $t_{gel}$  y  $G'_{m\acute{a}x}$ . Los geles formados en presencia del polisacárido resultaron más elásticos a medida que aumentó la concentración del mismo. En coincidencia, en las imágenes digitales de los geles pudo observarse un incremento del grado de compactación al aumentar la concentración de GX adicionada.

#### **6.4. Evaluación del efecto de la hidrólisis enzimática sobre los procesos de agregación y gelación ácidas del NaCAS**

*Bacillus* sp. P45, aislados del intestino del pez de la cuenca amazónica *Piaractus mesopotamicus*, producen la proteasa extracelular P45. Se utilizó dicha enzima para generar hidrolizados de NaCAS a distintos tiempos de hidrólisis ( $t_i$ ). Los péptidos obtenidos luego de 1 hora de hidrólisis proteica con dicha enzima presentaron un peso molecular inferior a los 6,5 kD y la hidrofobicidad superficial de los mismos disminuyó a medida que aumentó el tiempo de hidrólisis.

La actividad antioxidante de los hidrolizados obtenidos a  $t_1$ , evaluada por el método de DPPH, fue similar y mayor que la observada para la muestra sin hidrolizar ( $t_0$ ). Sin embargo, solo los hidrolizados  $t_0$  y  $t_1$  mostraron inhibición en la oxidación lipídica evaluada a través del método TBARS. La actividad antibacteriana contra *Salmonella enteritidis* sólo se observó para el hidrolizado  $t_1$ .

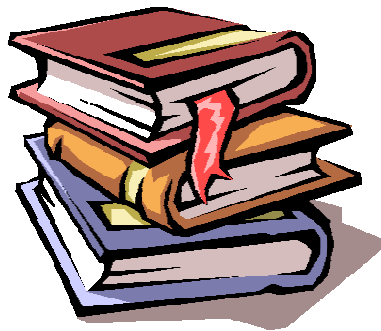
Cuando se evaluó la capacidad de agregación de los hidrolizados frente a la disminución del pH, se observó que sólo los hidrolizados  $t_1$  mantuvieron la capacidad para agregar luego de adicionada GDL. Esto coincide con la brusca disminución de la hidrofobicidad superficial, lo que demuestra la participación de las interacciones hidrofóbicas durante el proceso de agregación. Así los geles finales obtenidos con este hidrolizado resultaron ser menos compactos y estructurados.

Por otro lado, la incorporación de los hidrolizados bioactivos a soluciones de NaCAS modificó la cinética de agregación ácida pero no alteró significativamente el grado de compactación de los agregados formados. En particular, los geles obtenidos a partir de la mezcla NaCAS:hidrolizado  $t_1$  presentaron una elasticidad y microestructura similar a las de los geles de NaCAS.

La hidrólisis enzimática del NaCAS con la enzima P7, producida por *Bacillus* sp. P7, produjo péptidos de pesos moleculares menores a 6,0 kD que presentaron diversas bioactividades (antibacteriana, antioxidante, quelante y poder reductor), cuya magnitud dependió del  $t_i$ . Estos hidrolizados perdieron la capacidad de gelificar por adición de GDL, y su incorporación a soluciones concentradas de NaCAS no modificó la cinética de gelación pero si la elasticidad de los geles formados, sin variación significativa del tamaño promedio de sus poros.

Estos resultados son prometedores con respecto a la incorporación de estos péptidos bioactivos como aditivos en la elaboración de diferentes productos lácteos, por ejemplo yogures y postres lácteos, donde la agregación ácida constituye la base para su producción, pero se debe tener en cuenta su efecto sobre las propiedades reológicas y de textura de los geles formados.

# REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



**CAPÍTULO 7: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Tolstoguzov, V.B. (1991) Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction. *Food Hydrocolloid.* 4, (6), 429-468.
2. Ribeiro, K.O., M.I. Rodrigues, E. Sabadini, and R.L. Cunha (2004) Mechanical properties of acid sodium caseinate-[kappa]-carrageenan gels: effect of co-solute addition. *Food Hydrocolloid.* 18, (1), 71-79.
3. Braga, A.L.M., M. Menossi, and R.L. Cunha (2006) The effect of the glucono-[delta]-lactone/caseinate ratio on sodium caseinate gelation. *Int. Dairy J.* 16, (5), 389-398.
4. Ju, Z.Y. and A. Kilara (1998) Gelation of Hydrolysates of a Whey Protein Isolate Induced by Heat, Protease, Salts and Acid. *Int. Dairy J.* 8, (4), 303-309.
5. Bryant, C.M. and D.J. McClements (2000) Influence of xanthan gum on physical characteristics of heat-denatured whey protein solutions and gels. *Food Hydrocolloid.* 14, (4), 383-390.
6. Dickinson, E. (1998) Stability and rheological implications of electrostatic milk protein-polysaccharide interactions. *Trends in Food Science & Technology* 9, (10), 347-354.
7. Baeza, R., L.M. Gugliotta, and A.M.R. Pilosof (2003) Gelation of [beta]-lactoglobulin in the presence of propylene glycol alginate: kinetics and gel properties. *Colloid Surface B* 31, (1-4), 81-93.
8. Pilosof, A.M. (2006). II Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Córdoba, Noviembre, 2006.
9. Sabadini, E., M.D. Hubinger, and R.L. Cunha (2006) The effects of sucrose on the mechanical properties of acid milk proteins- $\kappa$ -carrageenan gels. *Braz. J. Chem. Eng.* 23, 55-65.
10. Lucey, J.A. (2002) Formation and Physical Properties of Milk Protein Gels. *J. Dairy Sci.* 85, (2), 281-294.
11. Risso, P., V. Relling, M. Armesto, M. Pires, and C. Gatti (2007) Effect of size, proteic composition, and heat treatment on the colloidal stability of proteolyzed bovine casein micelles. *Colloid Polym. Sci.* 285, (7), 809-817.
12. Stanley, D.W., H.D. Goff, and A.K. Smith (1996) Texture-structure relationships in foamed dairy emulsions. *Food Res. Int.* 29, (1), 1-13.
13. Shih, W.-H., W.Y. Shih, S.-I. Kim, J. Liu, and I.A. Aksay (1990) Scaling behavior of the elastic properties of colloidal gels. *Phys. Rev. A* 42, (8), 4772.
14. Renard, D., F. van de Velde, and R.W. Visschers (2006) The gap between food gel structure, texture and perception. *Food Hydrocolloid.* 20, (4), 423-431.
15. van den Berg, L., Y. Rosenberg, M.A.J.S. van Boekel, M. Rosenberg, and F. van de Velde (2009) Microstructural features of composite whey protein/polysaccharide gels characterized at different length scales. *Food Hydrocolloid.* 23, (5), 1288-1298.
16. FitzGerald, R.J., B.A. Murray, and D.J. Walsh (2004) Hypotensive peptides from milk proteins. *J. Nutr.* 134, (4), 980S-988S.
17. Haque, E. and R. Chand (2008) Antihypertensive and antimicrobial bioactive peptides from milk proteins. *Eur. Food Res. Technol.* 227, (1), 7-15.
18. Sarmadi, B.H. and A. Ismail (2010) Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides* 31, (10), 1949-1956.
19. Silva, S.V. and F.X. Malcata (2005) Caseins as source of bioactive peptides. *Int. Dairy J.* 15, (1), 1-15.



20. Minervini, F., F. Algaron, C.G. Rizzello, P.F. Fox, V. Monnet, and M. Gobetti (2003) Angiotensin I-Converting-Enzyme-Inhibitory and Antibacterial Peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 Proteinase-Hydrolyzed Caseins of Milk from Six Species. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, (9), 5297-5305.
21. Korhonen, H. and A. Pihlanto (2006) Bioactive peptides: Production and functionality. *Int. Dairy J.* 16, (9), 945-960.
22. Phelan, M., A. Aherne, R.J. FitzGerald, and N.M. O'Brien (2009) Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. *Int. Dairy J.* 19, (11), 643-654.
23. Corrêa, A.P.F., D.J. Daroit, and A. Brandelli (2010) Characterization of a keratinase produced by *Bacillus* sp. P7 isolated from an Amazonian environment. *Int. Biodeter. Biodegr.* 64, (1), 1-6.
24. Daroit, D.J., A.P.F. Corrêa, and A. Brandelli (2009) Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. *Int. Biodeter. Biodegr.* 63, (3), 358-363.
25. Walstra, P., R. Jenness, and H.T. Badings (1984) *Dairy chemistry and physics*; Ed, John Wiley & Sons, New York, USA, pp. 467.
26. Qi, P.X., E.M. Brown, and H.M. Farrell (2001) New views' on structure-function relationships in milk proteins. *Trends in Food Science & Technology* 12, (9), 339-346.
27. Creamer, L.K. and A.K.H. MacGibbon (1996) Some recent advances in the basic chemistry of milk proteins and lipids. *Int. Dairy J.* 6, (6), 539-568.
28. Wong, D.W.S., W.M. Camirand, A.E. Pavlath, N. Parris, and M. Friedman (1996) Structures and functionalities of milk proteins. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.* 36, (8), 807-844.
29. West, D.W. (1986) Structure and function of the phosphorylated residues of casein. *J. Dairy Res.* 53, (02), 333-352.
30. Dickinson, E. and G. Stainsby (1982) Colloidal aspects of milk: a case study. In: *Colloids in food*; Applied Science Publishers, London and New York. pp. 411-423.
31. Farrell, H.M., E.D. Wickham, and M.L. Groves (1998) Environmental Influences on Purified  $\hat{\text{I}}^{\circ}$ -Casein: Disulfide Interactions<sup>1</sup>. *J. Dairy Sci.* 81, (11), 2974-2984.
32. Farrell, H.M.J., T.F. Kumosinski, E.L. Malin, and E.M. Brown (2002) The caseins of milk as calcium binding proteins. In: *Calcium binding proteins*, Ed.; Vogel, Editor; Humana Press, Totowa, NJ. pp. 91-140.
33. Swaisgood, H.E. (1982) Chemistry of milk proteins. In: *Developments in dairy chemistry*, Ed.; P.F. Fox, Editor, London. pp. 1-60.
34. Holt, C. and L. Sawyer (1993) Caseins as rheomorphic proteins: interpretation of primary and secondary structures of the  $\alpha_{\text{S1}}$ -,  $\beta$ - and  $\kappa$ -caseins. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 89, (15), 2683-2692.
35. Farrell, H.J., E. Brown, P. Hoagland, and E. Malin (2003) Higher order structures of caseins: a paradox. In: *Advanced dairy chemistry*, Ed.; P.F.P.M. Sweeney, Editor; Academic Plenum Publishers, New York. pp. Cap. 4.
36. Alvarez, E., P. Risso, C. Gatti, M. Burgos, and V. Suarez Sala (2007) Calcium-induced aggregation of bovine caseins: effect of phosphate and citrate. *Colloid Polym. Sci.* 285, (5), 507-514.
37. Mulvihill, D.M. and P.F. Fox (1989) Caseins and manufactured. In: *Development in Dairy Chemistry*, Ed.; P.F.F. Ed., Editor; Elsevier Applied Science, London & New York. pp. 97-130.

38. HadjSadok, A., A. Pitkowski, T. Nicolai, L. Benyahia, and N. Moulai-Mostefa (2008) Characterisation of sodium caseinate as a function of ionic strength, pH and temperature using static and dynamic light scattering. *Food Hydrocolloid*. 22, (8), 1460-1466.
39. Ennis, M.P. and M.D. Mulvihill (2000) *Milk proteins*; Ed, Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, Cork.
40. Carlson, A., C. Hill, and N. Olson (1987a) Kinetics of milk coagulation: I. The kinetics of kappa casein hydrolysis in the presence of enzyme deactivation. *Biotech. Bioeng.* 29, 582-589.
41. Carlson, A., C. Hill, and N. Olson (1987b) Kinetics of milk coagulation: II. Kinetics of secondary phase: Micelle flocculation. *Biotech. Bioeng.* 29, 590-600.
42. de Kruif, C.G. (1997) Skim Milk Acidification. *J. Colloid Interf. Sci.* 185, (1), 19-25.
43. Mohammad, K.S. and P.F. Fox (1987) Heat induced microstructural changes in casein micelles before and after heat coagulation. *New Zealand J. Dairy Sci. Tech.* 22, 191-198.
44. Tuinier, R. and C.G. de Kruif (2002) Stability of casein micelles in milk. *J. Chem. Phys.* 117, 1290-1295.
45. Lucey, J.A., T. van Vliet, K. Grolle, T. Geurts, and P. Walstra (1997) Properties of acid casein gels made by acidification with glucono- $\delta$ -lactone. 2. Syneresis, permeability and microstructural properties. *Int. Dairy J.* 7, (6-7), 389-397.
46. Verheul, M. and S.P. Roefs (1998) Structure of whey protein gels, studied by permeability, scanning electron microscopy and rheology. *Food Hydrocolloid*. 12, 17-24.
47. Cavallieri, A.L.F. and R.L. da Cunha (2008) The effects of acidification rate, pH and ageing time on the acidic cold set gelation of whey proteins. *Food Hydrocolloid*. 22, (3), 439-448.
48. Lucey, J.A., M. Tamehana, H. Singh, and P.A. Munro (1998) A comparison of the formation, rheological properties and microstructure of acid skim milk gels made with a bacterial culture or glucono- $\delta$ -lactone. *Food Res. Int.* 31, (2), 147-155.
49. Alvarez, E., P.H. Risso, M.A.M. Canales, M.S. Pires, and C.A. Gatti (2008) Hydrodynamic properties-structure relationship for sodium caseinates in presence of calcium. *Colloid Surface A* 327, (1-3), 51-56.
50. Antipova, A.S., M.G. Semenova, and L.E. Belyakova (1999) The effect of sucrose on the thermodynamic properties of ovalbumin and sodium caseinate in bulk solution and at air-water interface. *Colloid Surface B* 12, (3-6), 261-270.
51. Leningher, A.L. (1982) Azúcares, polisacáridos de reserva y paredes celulares. In: *Bioquímica: las bases moleculares de la estructura y función celular*, Ed.; Omega, Editor, Barcelona. pp. 267-269.
52. Belyakova, L.E., A.S. Antipova, M.G. Semenova, E. Dickinson, L. Matia Merino, and E.N. Tsapkina (2003) Effect of sucrose on molecular and interaction parameters of sodium caseinate in aqueous solution: relationship to protein gelation. *Colloid Surface B* 31, (1-4), 31-46.
53. Sothornvit, R. and J.M. Krochta (2001) Plasticizer effect on mechanical properties of  $\beta$ -lactoglobulin films. *J. Food Eng.* 50, (3), 149-155.

54. Pires, M., C.A. Gatti, G.A. Orellana, and E. Morales (2004) Rennet coagulation of casein micelles and heated casein micelles in presence of sucrose or lactose. *Food Res. Int.* 37, (1), 95-101.
55. Dalgleish, D.G. (1990) The effect of denaturation of b-lactoglobulin on renneting a quantitative study. *Milchwissenschaft* 45, 491-496.
56. Rinaudo, M. (2001) Relation between the molecular structure of some polysaccharides and original properties in sol and gel states. *Food Hydrocolloid.* 15, (4-6), 433-440.
57. Turgeon, S.L., M. Beaulieu, C. Schmitt, and C. Sanchez (2003) Protein-polysaccharide interactions: phase-ordering kinetics, thermodynamic and structural aspects. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 8, (4-5), 401-414.
58. Capitani, C., O.E. Pérez, B. Pacheco, M. Teresa, and A.M.R. Pilosof (2007) Influence of complexing carboxymethylcellulose on the thermostability and gelation of [ $\alpha$ ]-lactalbumin and [ $\beta$ ]-lactoglobulin. *Food Hydrocolloid.* 21, (8), 1344-1354.
59. de Britto, D. and O.B.G. Assis (2009) Thermal degradation of carboxymethylcellulose in different salty forms. *Thermochim. Acta* 494, (1-2), 115-122.
60. Cancela, M.A., E. Álvarez, and R. Maceiras (2005) Effects of temperature and concentration on carboxymethylcellulose with sucrose rheology. *J. Food Eng.* 71, (4), 419-424.
61. Sandolo, C., P. Matricardi, F. Alhaique, and T. Coviello (2007) Dynamomechanical and rheological characterization of guar gum hydrogels. *Eur. Polym. J.* 43, (8), 3355-3367.
62. Li, J., M.M. Ould Eleya, and S. Gunasekaran (2006) Gelation of whey protein and xanthan mixture: Effect of heating rate on rheological properties. *Food Hydrocolloid.* 20, (5), 678-686.
63. Coviello, T., K. Kajiwara, W. Burchard, M. Dentini, and V. Crescenzi (1986) Solution properties of xanthan. 1. Dynamic and static light scattering from native and modified xanthans in dilute solutions. *Macromolecules* 19, (11), 2826-2831.
64. Vega, C. and H.D. Goff (2005) Phase separation in soft-serve ice cream mixes: rheology and microstructure. *Int. Dairy J.* 15, (3), 249-254.
65. Piculell, L. and B. Lindman (1992) Association and segregation in aqueous polymer/polymer, polymer/surfactant, and surfactant/surfactant mixtures: similarities and differences. *Adv. Colloid Interface Sci.* 41, 149-178.
66. Goff, H.D., E. Verespej, and A.K. Smith (1999) A study of fat and air structures in ice cream. *Int. Dairy J.* 9, (11), 817-829.
67. Schorsch, C., A.H. Clark, M.G. Jones, and I.T. Norton (1999) Behaviour of milk protein/polysaccharide systems in high sucrose. *Colloid Surface B* 12, (3-6), 317-329.
68. Schorsch, C., M.G. Jones, and I.T. Norton (1999) Thermodynamic incompatibility and microstructure of milk protein/locust bean gum/sucrose systems. *Food Hydrocolloid.* 13, (2), 89-99.
69. Syrbe, A., W.J. Bauer, and H. Klostermeyer (1998) Polymer science concepts in dairy systems. An overview of milk protein and food hydrocolloid interaction. *Int. Dairy J.* 8, 179-193.
70. Kato, A. and S. Nakai (1980) Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 624, (1), 13-20.

71. Nakai, S., E. Li-Chan, and G.E. Arteaga (1996) Measurement of surface hydrophobicity. In: *Methods of testing protein functionality*, Ed.; Chapman and Hall, Editors, Great Britain. pp. 226-259.
72. Shimizu, M., M. Saito, and K. Yamauchi (1986) Hydrophobicity and emulsifying activity of milk proteins. *Agr. Biol. Chem.* 50, 791-792.
73. Walstra, P. and A. de Roos (1993) Proteins at air–water and oil–water interfaces: Static and dynamic aspects. *Food Rev. Int.* 9, 503-525.
74. Strasburg, G. and R. Ludescher (1995) Theory and applications of fluorescence spectroscopy in food research. *Trends in Food Science & Technology* 6, 69-75.
75. Haskard, C.A. and E.C.Y. Li-Chan (1998) Hydrophobicity of Bovine Serum Albumin and Ovalbumin Determined Using Uncharged (PRODAN) and Anionic (ANS-) Fluorescent Probes. *J. Agric. Food Chem.* 46, (7), 2671-2677.
76. Andley, U., J. Liang, and B. Chakrabarti (1982) Spectroscopic investigations of bovine lens crystalins. 2. Fluorescent probes for polar - apolar nature and sulfhydryl group accessibility. *Biochem.* 21, 1853-1858.
77. Bonomi, F. and S. Lametti (1991) Real time monitoring of the surface hydrophobicity changes associated with isotherma treatment of milk and milk protein fractions. *Milchwissenschaft* 46, 71-74.
78. Pecora, R. (1985) *Dynamic light scattering. Applications of photon correlation spectroscopy*; Ed, Plenum Press, New York.
79. Foegeding, A.E., J. Brown, M. Drake, and C.R. Daubert (2003) Sensory and mechanical aspects of cheese texture. *Int. Dairy J.* 13, (8), 585-591.
80. Dahbi, L., M. Alexander, V. Trappe, J.K.G. Dhont, and P. Schurtenberger (2010) Rheology and structural arrest of casein suspensions. *J. Colloid Interf. Sci.* 342, (2), 564-570.
81. Donato, L., E. Kolodziejczyk, and M. Rouvet (2011) Mixtures of whey protein microgels and soluble aggregates as building blocks to control rheology and structure of acid induced cold-set gels. *Food Hydrocolloid.* 25, (4), 734-742.
82. Guyomarc'h, F., M. Jemin, V. Le Tilly, M.-N. Madec, and M.-H. Famelart (2009) Role of the Heat-Induced Whey Protein/ $\kappa$ -Casein Complexes in the Formation of Acid Milk Gels: A Kinetic Study Using Rheology and Confocal Microscopy. *J. Agric. Food Chem.* 57, (13), 5910-5917.
83. Gonzalez, J. and R.E. Woods (2001) *Digital Image Processing*; Second ed Ed, Prentice Hall.
84. Langton, M. and A.-M. Hermansson (1996) Image analysis of particulate whey protein gels. *Food Hydrocolloid.* 10, (2), 179-191.
85. Zheng, C., D.-W. Sun, and L. Zheng (2006) Recent applications of image texture for evaluation of food qualities - a review. *Trends Food Sci.Tech.* 17, (3), 113-128.
86. Borah, S., E.L. Hines, and M. Bhuyan (2007) Wavelet transform based image texture analysis for size estimation applied to the sorting of tea granules. *J. Food Eng.* 79, (2), 629-639.
87. Khuri, A.I. and J.A. Cornell (1987) *Response Surfaces. Design and Analyses*. In: *Statistics: Textbooks and monographs*, Ed.; M. Dekker, Editor, New York.
88. Kuehl, R.O. (2001) *Diseño De Experimentos.* ; Ed, International Thomson.
89. Montgomery, D.C. (1991) *Diseño Y Análisis De Experimentos.*; Ed, Grupo Editorial Iberoamérica.
90. Mikkelsen, T.L., E. Rasmussen, A. Olsen, V. Barkholt, and H. Frøkiær (2006) Immunogenicity of  $\kappa$ -Casein and Glycomacropeptide. *J. Dairy Sci.* 89, (3), 824-830.

91. Brody, E. (2000) Biological activities of bovine glycomacropeptide. *Br. J. Nutr.* 84, 39-46.
92. Hartmann, R. and H. Meisel (2007) Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr. Opp. Biotech.* 18, (2), 163-169.
93. He, H., X. Chen, C. Sun, Y. Zhang, and P. Gao (2006) Preparation and functional evaluation of oligopeptide-enriched hydrolysate from shrimp (*Acetes chinensis*) treated with crude protease from *Bacillus* sp. SM98011. *Bioresource Technol.* 97, (3), 385-390.
94. Moure, A., H. Domínguez, and J.C. Parajó (2006) Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. *Proc. Biochem.* 41, (2), 447-456.
95. Saiga, A., S. Tanabe, and T. Nishimiura (2003) Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *J. Agric. Food Chem.* 51, 3661-3667.
96. Pihlanto, A. (2006) Antioxidative peptides derived from milk proteins. *Int. Dairy J.* 16, (11), 1306-1314.
97. Zhu, K., H. Zhou, and H. Qian (2006) Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Proc. Biochem.* 41, (6), 1296-1302.
98. Madureira, A.R., C.I. Pereira, A.M.P. Gomes, M.E. Pintado, and F. Xavier Malcata (2007) Bovine whey proteins - Overview on their main biological properties. *Food Res. Int.* 40, (10), 1197-1211.
99. Ashwell, M., *ILSI Europe Concise Monograph Series*. 2004, International Life Sciences Institute.
100. Rao, M.B., A.M. Tanksale, M.S. Ghatge, and V.V. Deshpande (1998) Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology Mol. Biol. Rev.* 62, (3), 597-635.
101. van de Hulst, H.C. (1957) *Light Scattering by Small Particles*; Ed, New York, pp. 729-736.
102. Kuaye, A.Y. (1994) An ultraviolet spectrophotometric method to determine milk protein content in alkaline medium. *Food Chem.* 49, (2), 207-211.
103. Rendell, D. (1987) Quantitative fluorimetry. In: *Analytical chemistry by open learning*, Ed.; D. Mowthorpe, Editor; ACOL Press, London. pp. 105-122.
104. Spyropoulos, F., A. Portsch, and I.T. Norton (2010) Effect of sucrose on the phase and flow behaviour of polysaccharide/protein aqueous two-phase systems. *Food Hydrocolloid.* 24, (2-3), 217-226.
105. Yang, K. and R. Hogg (1979) Estimation of particle size distributions from turbidimetric measurements. *Analytical Chemistry* 51, 758-763.
106. Horne, D.S. (1987) Determination of the fractal dimension using turbidimetric techniques. Application to aggregating protein systems. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 83, (0), 259-270.
107. Worning, P., R. Bauer, L. Øgdenal, and S. Lomholt (1998) A Novel Approach to Turbidimetry of Dense Systems: An Investigation of the Enzymatic Gelation of Casein Micelles. *J. Colloid Interf. Sci.* 203, (2), 265-277.
108. Teixeira, J. (1986) Fractal and non-fractal Patterns in Physics. In: *On growth and form*, Ed.; Stanley and Ostrowsky, Editors; Martinus Nijhoff Publisher, Dordrecht, The Netherlands. pp. 145-162.

109. Holt, C., T.G. Parker, and D.G. Dalgleish (1975) Measurement of particle sizes by elastic and quasi-elastic light scattering. *Biochim. Biophys. Acta* 400, (2), 283-292.
110. Camerini-Otero, R.D. and L.A. Day (1978) The wavelength dependence of the turbidity of solutions of macromolecules. *Biopolymers* 17, (9), 2241-2249.
111. Kourti, T. and J. MacGregor (1991) Particle size determination using turbidimetry; Ed, Th. Provder Ed., pp. 34-63.
112. Lloset, M.A., L.M. Gugliotta, and G.R. Meira (1996) Particle size distribution of SBR and NBR latexes by UV-vis turbidimetry near the rayleigh region. *Rubber Chem. Tech.* 6, (9), 696-712.
113. Dalgleish, D.G. and F. Hallett (1995) Dynamic light scattering: applications to food systems. *Food Res. Int.* 28, (3), 181-193.
114. Jakeman, E. and E.R. Pike (1968) Theory of periodic sampling of photon-counting distributions. *J. Phys. A: Gen. Phys.* 1, (6), 690-693.
115. Jakeman, E. and E. Pike (1969) Spectrum of clipped photon-counting fluctuations of Gaussian light. *J. Phys. A: Gen. Phys.* 2, (3), 411-412.
116. Koppel, D. (1972) Analysis of macromolecular polydispersity in intensity correlation spectroscopy: the method of cumulants. *J. Chem. Phys.* 57, 4814-4820.
117. Provencher, S.W. (1982) A constrained regularization method for inverting data represented by linear algebraic or integral equations. *Comput. Phys. Commun.* 27, 213-227.
118. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
119. Foegeding, E.A. (2007) Rheology and sensory texture of biopolymer gels. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 12, (4-5), 242-250.
120. Corrêa, A.P.F., A. Brandelli, D.J. Daroit, M. Mancilla Canales, and P. Risso (2010) Evaluation of hydrolysates obtained from ovine caseinate by a bacterial enzyme. XXII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (XXII CBCTA), Salvador, Bahía, Brasil, November 2010.
121. Adler-Nissen, J. (1979) Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J. Agric. Food Chem.* 27, (6), 1256-1262.
122. Ohkawa, H., N. Ohishi, and K. Yagi (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, (2), 351-358.
123. Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* 26, (9-10), 1231-1237.
124. Rice-Evans, C.A. and N.J. Miller (1996) Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochemical Society Transactions* 24, 790-795.
125. Brand-Williams, W., M.E. Cuvelier, and C. Berset (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.* 28, (1), 25-30.
126. Arnao, M.B. (2000) Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends Food Sci. Tech.* 11, (11), 419-421.
127. Motta, A.S. and A. Brandelli (2002) Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *J. Appl. Microbiol.* 92, (1), 63-70.

128. Chang, C.-Y., K.-C. Wu, and S.-H. Chiang (2007) Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates. *Food Chem.* 100, (4), 1537-1543.
129. Fox PF, M.D. (1983) Physico-chemical aspects of dehydrated protein-rich milk products. International Dairy Federations Symposium, Hillerod, Denmark, 17-19 May, 1983.
130. Farrell, H.M., P.H. Cooke, G. King, P.D. Hoagland, M.L. Groves, T.F. Kumosinski, and B. Chu (1996) Particle sizes of casein submicelles and purified  $\kappa$ -casein. In: *Macromolecular Interactions in Food Technology*, Ed.; K.A. Parriss N, Creamer LK, Pearce J Eds., Editor; American Chemical Society, Washington. pp. 61.
131. Pitkowski, A., D. Durand, and T. Nicolai (2008) Structure and dynamical mechanical properties of suspensions of sodium caseinate. *J. Colloid Interf. Sci.* 326, (1), 96-102.
132. Burkert, J.F.M., F. Maugeri, and M.I. Rodrigues (2004) Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. *Bioresource Technol.* 91, 77-84.
133. Pugnali, L.A., L. Matia-Merino, and E. Dickinson (2005) Microstructure of acid-induced caseinate gels containing sucrose: Quantification from confocal microscopy and image analysis. *Colloid Surface B* 42, (3-4), 211-217.
134. Mora-Gutierrez, A., T.F. Kumosinski, and H.M. Farrell (1997) Oxygen-17 Nuclear Magnetic Resonance Studies of Bovine and Caprine Casein Hydration and Activity in Deuterated Sugar Solutions. *J. Agric. Food Chem.* 45, (12), 4545-4553.
135. Du, B., J. Li, H. Zhang, P. Chen, L. Huang, and J. Zhou (2007) The stabilization mechanism of acidified milk drinks induced by carboxymethylcellulose. *Lait* 87, (4-5), 287-301.
136. Yoshida, T., M. Takahashi, T. Hatakeyama, and H. Hatakeyama (1998) Annealing induced gelation of xanthan/water systems. *Polymer* 39, (5), 1119-1122.
137. Jiang, J., S. Chen, F. Ren, Z. Luo, and S.S. Zeng (2007) Yak milk casein as a functional ingredient: preparation and identification of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides. *J. Dairy Res.* 74, 18-25.
138. Wu, H.-C., H.-M. Chen, and C.-Y. Shiau (2003) Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Res. Int.* 36, (9-10), 949-957.
139. Wang, J.-s., M.-m. Zhao, Q.-z. Zhao, and Y.-m. Jiang (2007) Antioxidant properties of papain hydrolysates of wheat gluten in different oxidation systems. *Food Chem.* 101, (4), 1658-1663.
140. Rival, S.G., C.G. Boeriu, and H.J. Wichers (2001) Caseins and Casein Hydrolysates. 2. Antioxidative Properties and Relevance to Lipoxigenase Inhibition. *J. Agric. Food Chem.* 49, (1), 295-302.
141. Li, B., F. Chen, X. Wang, B. Ji, and Y. Wu (2007) Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Chem.* 102, (4), 1135-1143.
142. Klompong, V., S. Benjakul, D. Kantachote, and F. Shahidi (2007) Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chem.* 102, (4), 1317-1327.

143. Thiansilakul, Y., S. Benjakul, and F. Shahidi (2007) Antioxidative activity of protein hydrolysate from round scad muscle using alcalase and flavourzyme. *J. Food Biochem.* 31, (2), 266-287.
144. Benkerroum, N. (2010) Antimicrobial peptides generated from milk proteins: a survey and prospects for application in the food industry. A review. *Int. J. Dairy Technol.* 63, (3), 320-338.
145. Pownall, T.L., C.C. Udenigwe, and R.E. Aluko (2010) Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (*Pisum sativum* L.) enzymatic protein hydrolysate fractions. *J. Agric. Food Chem.* 58, 4712–4718.
146. Zhang, L., J. Li, and K. Zhou (2010) Chelating and radical scavenging activities of soy protein hydrolysates prepared from microbial proteases and their effect on meat lipid peroxidation. *Bioresource Technol.* 101, (7), 2084-2089.
147. Hogan, S., L. Zhang, J. Li, H. Wang, and K. Zhou (2009) Development of antioxidant rich peptides from milk protein by microbial proteases and analysis of their effects on lipid peroxidation in cooked beef. *Food Chem.* 117, 438–443.
148. Rival, S.G., C.G. Boeriu, and H.J. Wichers (2001) Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. *J. Agric. Food Chem.* 49, 295–302.