Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Propiedades de no equilibrio en sistemas vítreos y sobreenfriados en relación con la estabilidad enzimática

Mazzobre, María Florencia

2001

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

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

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

Cita tipo APA:
Mazzobre, María Florencia. (2001). Propiedades de no equilibrio en sistemas vítreos y sobreenfriados en relación con la estabilidad enzimática. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3390_Mazzobre.pdf

Cita tipo Chicago:
Mazzobre, María Florencia. "Propiedades de no equilibrio en sistemas vítreos y sobreenfriados en relación con la estabilidad enzimática". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2001.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3390_Mazzobre.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Industrias

Propiedades de no equilibrio en sistemas vítreos y sobreenfriados en relación con la estabilidad enzimática

Autora: Lic. María Florencia Mazzobre

Tesis para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires

Directora: María del Pilar Buera

2001

"Propiedades de no equilibrio en sistemas vítreos o sobreenfriados en relación con la estabilidad enzimática"

El objetivo del presente trabajo fue analizar propiedades de no equilibrio en sistemas amorfos o sobre-enfriados obtenidos por liofilización o congelación (transición vítrea (T_g), cristalización de hielo o azúcar, propiedades de sorción) y su influencia sobre la estabilidad enzimática (β-galactosidasa). Se estudió en particular el impacto de la cristalización de la matriz sobre la capacidad protectora de azúcares en sistemas de baja humedad. La estabilidad enzimática se vio afectada por cambios moleculares independientes de T_g en matrices vítreas y por la cristalización del azúcar en estado sobreenfriado. Los azúcares no reductores trehalosa y rafinosa en estado amorfo ofrecieron mayor protección que las matrices poliméricas de T_g más elevada, lo cual sugiere un mecanismo de protección no relacionado con el estado físico del medio pero sí con interacciones intermoleculares específicas. La dependencia de la cinética de inactivación enzimática y de la cristalización de azúcar con la temperatura se pudo describir con las ecuaciones de Arrhenius, VTF y WLF, empleando los coeficientes adecuados. El uso de excipientes como azúcares, sales o polímeros permitió retrasar la cristalización de azúcares o la formación de hielo y extender el efecto protector a la zona de líquido sobreenfriado. Tanto la inactivación enzimática en matrices vítreas como el retraso de la cristalización de hielo o azúcar se asociaron con cambios microestructurales (a nivel molecular) no relacionados con cambios en el valor de T_g del sistema (nivel supramolecular). Los mecanismos por los cuales los azúcares y las sales retrasan la cristalización del azúcar, analizados por la ecuación de JMAK, serían distintos.

Palabras clave: transición vítrea, deshidratación, congelación, azúcares amorfos, estabilidad térmica enzimática, cristalización, sales.

"Non-equilibrium properties in glassy or supercooled liquid systems in relation to enzyme stabilization"

The objective of present work was to analyze several non-equilibrium properties in amorphous or supercooled liquid systems prepared by freeze-drying or freezing (glass transition (T_g), ice or sugar crystallization, sorption properties) and their influence on enzyme stability ((β-galactosidase). The impact of crystallization on the protective effect of sugars in low moisture systems was particularly investigated. Enzyme stability was affected by molecular changes, not related with T_g in the glassy matrices, and by sugar crystallization in the supercooled region. The stability in the reducing sugars trehalose and raffinose, was better than in the polymeric matrices of higher T_g, indicating that the protective mechanism was more related with specific molecular interactions than with physical properties of the system. Arrhenius, VTF and WLF equations described fairly well the temperature dependence of both, the kinetic of enzyme inactivation and sugar crystallization, using the adequate coefficients. The addition of sugars, salts or polymers promoted a delay on sugar or ice crystallization, being the protective effect extended to the supercooled region. Enzyme inactivation in glassy systems and the delay on sugar or ice crystallization were associated with microstructural changes (at a molecular level) not related with changes of the T_g value (supramolecular level). However, the mechanisms by which sugars or salts delay sugar crystallization (analyzed using equation JMAK), seem to be different.

Key words: glass transition, dehydration, freezing, amorphous sugars, enzyme stability, crystallization, salts.

A Oscar

A mis padres

A Vir y a Lucy

Agradecimientos

A la Dra. María del Pilar Buera, con quien me inicié en el trabajo científico, por su constante estímulo y apoyo brindados, por haberme guiado con inteligencia en la realización de este trabajo, y por su trato personal.

Al Dr. Jorge Chirife, por su valioso aporte en la realización y análisis de parte de los resultados que conforman esta tesis.

A mis compañeros y amigos:
Carolina, Leila, Betty, Luis, Lidia, Rosa, Oscar, Dina, Viviana, Mónica, Virginia y Vanesa, por todos los momentos cotidianos compartidos durante estos años.
A Caro, por los comentarios realizados al manuscrito, y porque siempre está dispuesta a ayudarme cuando la necesito.

A toda la gente del laboratorio de Microbiología: Marta, Patricia, Mauricio, Rosita, Miguel, María del Carmen y Silvia.

Al Dr. José Miguel Aguilera, quien a través del proyecto CYTED, me permitió utilizar el equipo de microscopía de la Universidad Católica de Chile.

A CONICET, por las becas otorgadas.

Al Departamento de Industraias de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, de la Universidad de Buenos Aires, por permitirme utilizar las instalaciones.

I. Introducción

I.A. ESTABILIDAD DE BIOMATERIALES LÁBILES EN CONDICIONES EXTREMAS DE HUMEDAD Y TEMPERATURA.

La preservación de biomateriales lábiles en estado deshidratado o congelado ha adquirido gran interés en los últimos años en diversos campos tanto de ciencia básica como de aplicación tecnológica (Suzuki y col., 1996). Los recientes avances en el entendimiento de los mecanismos involucrados en la supervivencia de ciertos organismos a condiciones extremas de deshidratación, ya sea por congelación o por pérdida de agua, promovieron el estudio de las propiedades de los azúcares en relación con su estructura y su capacidad protectora de biomoléculas.

Mientras la mayoría de las células metabólicamente activas contienen aproximadamente 85 a 95% de agua, ciertos nematodos, semillas de plantas, esporas de hongos y quistes de algunos crustáceos, entre otros, son capaces de sobrevivir largos períodos de tiempo en estado deshidratado. Este fenómeno se conoce como anhidrobiosis (Crowe y Crowe, 1982). En estas condiciones, los organismos son altamente resistentes a temperaturas extremadamente altas o bajas, a la exposición a la luz ultravioleta o rayos-X, etc. Estructuras biológicas claves como membranas, ácidos nucleicos y proteínas estarían de algún modo protegidas. La acumulación de distintos azúcares y oligosacáridos tiene un papel muy importante en la tolerancia de los organismos anhidrobióticos a la deshidratación (Aguilera y Karel, 1997). Entre ellos, el disacárido no reductor trehalosa se encontró en concentraciones

particularmente elevadas en organismos tolerantes a la deshidratación y en plantas de resurrección (Salahas y col., 1997). Se observó que este azúcar resulta óptimo para proteger distintos organismos anhidrobióticos (levaduras, nematodos, hongos, bacterias) como así también materiales biológicos (enzimas, liposomas, anticuerpos, proteínas aisladas y membranas) durante la deshidratación y el almacenamiento (Uritani y col., 1995; Leslie y col., 1995; Crowe y col., 1984a, 1996; Aguilera y Karel, 1997). La trehalosa se ha usado también para preservar esperma de ratón (Storey y col., 1998), células de levadura (Lodato y col., 1999; Cerrutti y col., 2000), y anticuerpos monoclonales (Duddu y Dal Monte, 1997). Muchas semillas acumulan sacarosa durante el desarrollo, y β-fructofuranosil oligosacáridos como rafinosa, estaquiosa o verbascosa, son muy importantes en la tolerancia de semillas al estrés hídrico (Koster y Leopold, 1988; Obendorf, 1997). Estos solutos permitieron también estabilizar biomateriales lábiles frente a procesos como la deshidratación o el congelado *in vitro* (Arakawa y Timasheff, 1982; Colaço y col., 1992; Duddu y Dal Monte, 1997; Crowe y col., 1998).

El estudio de la estabilidad de biomoléculas, microorganismos o estructuras biológicas lábiles en sistemas deshidratados, es de gran importancia práctica para mejorar la manipulación de estos materiales, aumentar la estabilidad al almacenamiento y lograr una mejor comprensión de los mecanismos de protección involucrados.

I.A.1. ESTABILIDAD ENZIMÁTICA

Los recientes avances en el campo de la biotecnología han permitido el desarrollo de nuevas proteínas que tendrían importantes aplicaciones en diversas áreas como biología molecular, salud (desarrollo de proteínas terapéuticas) y ciencia de los alimentos. Sin embargo el uso de estas proteínas aún es limitado ya que son generalmente moléculas grandes, con una arquitectura muy compleja y por lo tanto muy sensibles a las condiciones operacionales (las afectan variaciones de temperatura, pH, concentración de sales) en las que se requiere su funcionalidad (Manning y col., 1989; Devi y Appu Rao, 1998). La protección observada de distintos biomateriales en presencia de azúcares despertó un gran interés por el estudio de la dinámica de proteínas en matrices deshidratadas de azúcar (Cottone y col., 2001). En este sentido, las enzimas constituyen un sistema modelo adecuado para estudiar los distintos factores que afectan la estabilidad en sistemas de baja humedad. El entendimiento de los mecanismos de inactivación involucrados sería de gran utilidad en el desarrollo de nuevas estrategias para la estabilización de proteínas (Mozhaev, 1993), además de ser importante desde el punto de vista científico y tecnológico (Kristjánsson y Kinsella, 1991).

Las proteínas pueden perder su funcionalidad por efecto de procesos tanto químicos como físicos que pueden afectar la estructura durante la purificación, análisis, distribución o almacenamiento. En general, gran parte de las reacciones químicas pueden controlarse eligiendo adecuadamente la composición y las condiciones del medio. La estabilidad física se refiere a los procesos de desnaturalización, agregación, precipitación y adsorción a

superficies, que son modificaciones que no implican cambios en la naturaleza química de la proteína (Manning y col., 1989). En particular, la desnaturalización ha sido considerada como el paso inicial y esencial en la inactivación de enzimas (Gianfreda y Scarfi, 1991). Este proceso está implicado en los demás fenómenos físicos y puede influir en la suceptibilidad química de la proteína (Manning y col., 1989). La desnaturalización de proteínas produce un cambio menor o mayor en la estructura tridimensional nativa de la proteína, sin alterar la secuencia de aminoácidos (Tanford, 1968; Lapanje, 1978). Este desdoblamiento puede comprometer la estructura del sitio activo, y por lo tanto puede resultar en la inactivación enzimática. La inactivación puede ser reversible o irreversible.

La cinética del proceso de desnaturalización generalmente se ajusta a la de una reacción de primer orden:

$$N \leftrightarrow D \rightarrow I$$

Donde N, D, e I representan las estructuras: nativa, desnaturalizada en forma reversible y desnaturalizada en forma irreversible respectivamente (Janecek, 1993).

En las primeras etapas de la inactivación, ocurre un cambio conformacional reversible (desdoblamiento de la enzima), y luego se producen los procesos irreversibles entre los que se incluyen la agregación y la modificación covalente (Mozhaev y col., 1990).

La desnaturalización proteica se ve favorecida en condiciones extremas de pH, temperatura o deshidratación y en presencia de solventes orgánicos u otros agentes desnaturalizantes (Manning y col., 1989).

I.A.2. ESTABILIZACIÓN DE ENZIMAS

El estudio detallado del fenómeno de desnaturalización y renaturalización ha contribuido en gran medida al entendimiento de los eventos o factores responsables. Se han propuesto distintas técnicas para obtener enzimas termoestables. Algunas de las estrategias de estabilización son las siguientes (Klibanov, 1984):

Obtención de enzimas a partir de microorganismos termófilos, los cuales producen enzimas termorresistentes.

Modificación de la secuencia de aminoácidos por técnicas de ingeniería genética.

Estabilización por inmovilización, modificación química o modificación del medio de reacción por inclusión de aditivos.

Una enzima inmovilizada es aquella cuyos movimientos han sido restringidos, ya sea completamente o limitados a una pequeña región, con lo cual se previene significativamente el desdoblamiento de la molécula por impedimentos físicos. Es un hecho conocido que la inmovilización o la deshidratación en presencia de excipientes adecuados produce un aumento

de la estabilidad térmica (Pomeranz, 1985). Una enzima deshidratada en una matriz, bajo ciertas condiciones controladas, puede considerarse inmovilizada en dicho medio. La remoción de agua conduce a la obtención de sistemas de alta viscosidad donde la movilidad molecular está muy reducida. Por lo tanto la formación de una matriz sólida obtenida por deshidratación de enzimas lábiles en presencia de solutos estabilizantes ofrece una estrategia que permite aumentar considerablemente la estabilidad enzimática. Algunos compuestos que se han utilizado para estabilizar enzimas son polímeros, azúcares, polialcoholes y proteínas (Crowe y col., 1984a; Colaço y col., 1992; Gibson y col., 1992; Leslie y col; 1995; Bell y Hageman, 1996; Schebor y col., 1996 y 1997; Rossi y col., 1997; Suzuki y col., 1997; Terebiznik y col., 1998). Se han hecho numerosos trabajos de estabilización de enzimas utilizando esta metodología

I.A.3. EFECTO PROTECTOR DE AZÚCARES Y MECANISMOS INVOLUCRADOS.

Se sabe que los polioles y azúcares son capaces de proteger a las proteínas del daño que causa el secado y de la inactivación térmica producida durante el almacenamiento (Suzuki y col., 1997). A pesar de la gran cantidad de observaciones experimentales relacionadas con la estabilidad de diversos biomateriales en presencia de azúcares, los mecanismos moleculares involucrados aún están en discusión (Allison y col., 1999).

Se han postulado dos hipótesis con respecto al mecanismo molecular por el cual los azúcares estabilizan moléculas biológicas en sistemas secos. La primera es la teoría del reemplazo del agua. Establece que, siendo polioles, los azúcares pueden formar múltiples puentes de hidrógeno externos que reemplazarían a las moléculas de agua estructural esenciales que se encuentran unidas por puentes de hidrógeno a las biomoléculas, y de esta manera mantener su estructura molecular cuando se deshidratan o congelan (Carpenter y col., 1987; Carpenter y Crowe, 1988). En este sentido, existe probada evidencia de la interacción directa entre los azúcares y componentes de las membranas, proteínas purificadas y liposomas (Crowe y col., 1984 a y b; Lee y col., 1986 y 1989; Carpenter y Crowe, 1989; Crowe y col., 1989; Hoekstra y col., 1991; Allison y col., 1999). La segunda teoría, postula que luego del proceso de secado los azúcares forman una fase continua amorfa, en la cual la movilidad molecular y las reacciones degradativas son cinéticamente insignificantes (Burke, 1985; Green y Angell, 1989; Levine y Slade, 1992a).

I.B. SÓLIDOS AMORFOS Y ESTADO VÍTREO

La estructura física de un dado sistema o matriz está definida por el estado físico de sus principales constituyentes: lípidos, hidratos de carbono, proteínas y agua, como así también por el tipo de procesamiento y

almacenamiento al que fue sometido, es decir por su historia térmica. Muchos alimentos deshidratados, ingredientes, aditivos y preparaciones farmacéuticas, se encuentran en un estado muy concentrado, con un orden molecular azaroso (no cristalino), conocido como sólido amorfo. Los sólidos amorfos se obtienen cuando las moléculas del soluto son inmovilizadas mediante un rápido congelamiento o una rápida deshidratación. Específicamente, los métodos utilizados para obtener sistemas amorfos incluyen: 1) Concentración de una solución a alta temperatura, seguido de un enfriamiento rápido; 2) secado por aspersión de una solución; 3) liofilización de una solución; 4) congelación extremadamente rápida de una solución y 5) fusión de sólidos cristalinos, seguido de un enfriamiento rápido (White y Cakebread, 1966; Roos y Karel, 1991a; Slade y Levine, 1991; Roos, 1995). En la mayoría de estos métodos (1 a 4) el agua se separa rápidamente desde la solución inicial como vapor de agua o como hielo resultando en la formación de una solución sobresaturada altamente viscosa (sólido amorfo vítreo). Si la remoción de agua de la solución inicial es lenta, las moléculas pueden reordenarse para formar una estructura cristalina, en la cual prevalece la interacción entre moléculas de soluto. El cristal resultante se encuentra en un estado termodinámicamente estable, caracterizado por una movilidad molecular baja y muy poco espacio entre moléculas. En la Figura I.1 se muestra un esquema de la formación de un sólido amorfo o cristalino.

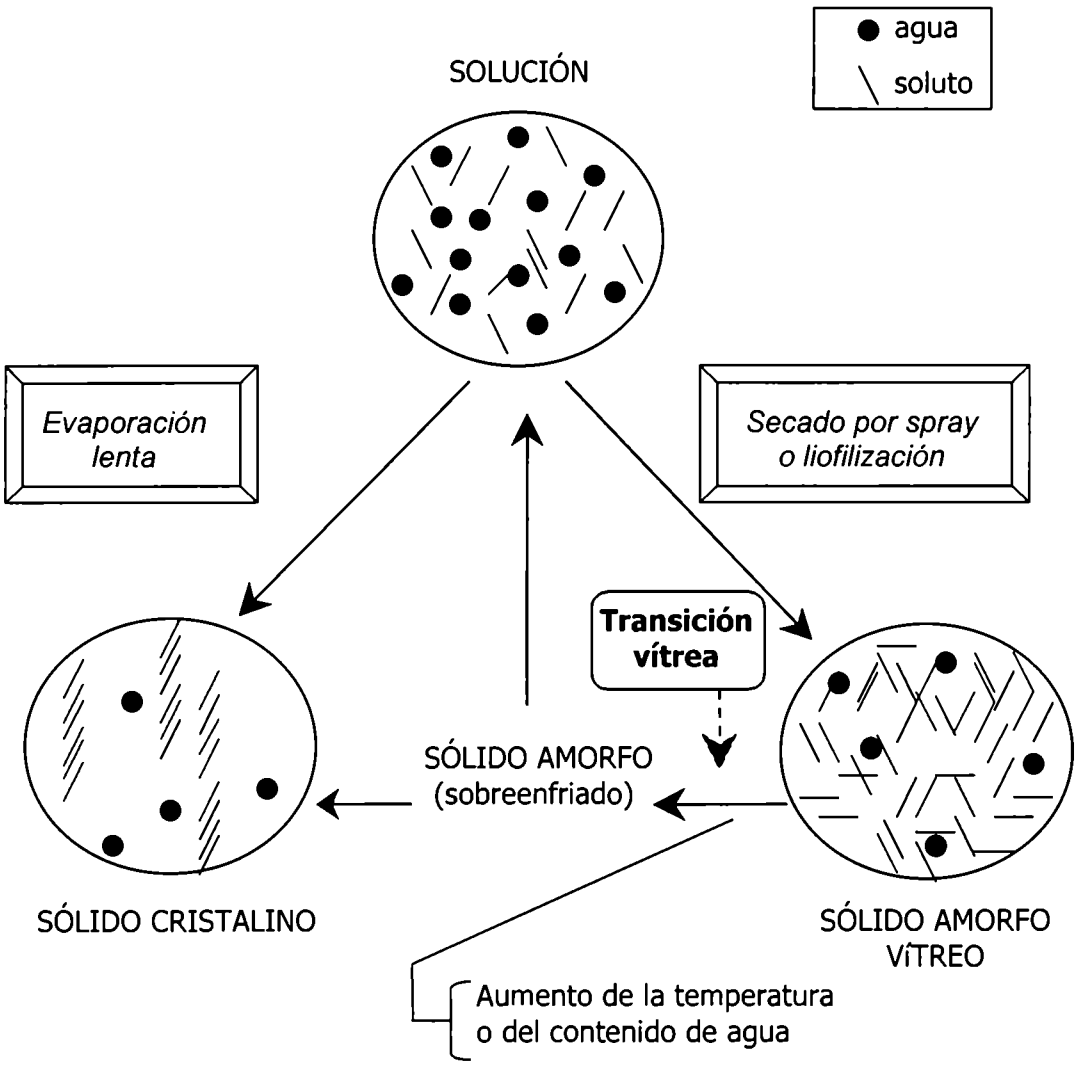


Figura I.1: *Formación de un sólido amorfo o cristalino a partir de una solución (adaptado de Karmas, 1994).*

Un material amorfo vítreo puede pasar al estado líquido sobreenfriado dependiendo de la temperatura y de la presencia de agua. El cambio entre los estados vítreo y sobreenfriado, se conoce como transición vítrea. El término transición vítrea se refiere a la temperatura a la cual los vidrios inorgánicos empiezan a ablandarse y fluir (Sperling, 1986). Por debajo de la temperatura

de transición vítrea (T_g), que es característica de cada sistema, el material es un sólido amorfo (vidrio). Los sólidos amorfos son materiales meta-estables con alta viscosidad y baja movilidad molecular, existen en un estado de no-equilibrio y exhiben cambios dependientes del tiempo a medida que se acercan al equilibrio. El aspecto de un material vítreo es el de un sólido rígido quebradizo caracterizado por una altísima viscosidad (alrededor de 10^{12} a 10^{14} Pa s) (Sperling, 1986). Las propiedades típicas de la mayor parte de los materiales vítreos (llamados frágiles) son la fragilidad y la transparencia. Angell (1991) clasifica los líquidos como "fuertes" o "frágiles" de acuerdo con la dependencia del logarítmo de la viscosidad con T_g/T. Los "fuertes" son redes de líquidos que generalmente muestran un cambio chico en el calor específico a T_g. En cambio los líquidos "frágiles" presentan un cambio en el calor específico grande a T_g, con cambios drásticos en la viscosidad. La movilidad molecular en los vidrios está restringida a vibraciones y movimientos rotacionales de rango corto (Sperling, 1986). Los cambios que ocurren en el estado vítreo, generalmente llamados "envejecimiento físico", son extremademente lentos, y por lo tanto, los sistemas se pueden considerar estables a cambios físicos y químicos (Levine y Slade, 1986; Slade y Levine, 1991; Jouppila, 1999). La transformación de materiales vítreos en líquidos sobreenfriados viscosos ocurre en el rango de la temperatura de transición vítrea. Es importante notar, que a temperaturas en el rango de la T_g, un cambio de pocos grados puede provocar en los materiales frágiles, una disminución significativa en la rigidez. El cambio en la rigidez es particularmente importante para la estructura y estabilidad de alimentos o preparaciones farmacéuticas (Roos, 1995; Suzuki y col., 1997). A temperaturas superiores a T_g, el sistema pasa

del estado vítreo al de líquido sobreenfriado, la viscosidad disminuye de aproximadamente 10^{12} a 10^{3} Pa.s (Sperling, 1992), aumenta la movilidad molecular y los movimientos traslacionales y se produce encogimiento estructural o colapso de la matriz como consecuencia de la disminución de viscosidad. El volumen libre del material, definido como el volumen no ocupado por lo sólidos de la matriz, también aumenta significativamente cuando el sistema amorfo pasa al estado de líquido sobreenfriado. En consecuencia, al ocurrir la transición vítrea, los materiales son más susceptibles a cambios físicos o químicos. El estado de líquido sobreenfriado recibe el nombre de "rubbery" (o gomoso) en la bibliografía concerniente a polímeros. A pesar de que esta denominación se extendió a cualquier sistema sobresaturado, en sistemas no poliméricos (por ejemplo aquellos formados por azúcares), esta denominación no es correcta, y el término líquido sobreenfriado es el adecuado (Angell y col., 1994).

La transición vítrea es el factor más importante que controla el cambio en el estado físico y las propiedades mecánicas de polímeros sintéticos (Sperling, 1986). La presencia e importancia de compuestos amorfos en los alimentos ha sido reconocida en numerosos trabajos (White y Cakebread, 1966; Katz y Labuza, 1981; Flink, 1983; Blanshard y Franks, 1987; Roos, 1987; Karel y col., 1994). Algunos autores introdujeron entonces los principios utilizados en la ciencia de los polímeros sintéticos a la ciencia de los alimentos (Levine y Slade, 1986, 1988, 1989, 1990; Franks, 1993) y consideraron a la transición vítrea como uno de los cambios más importantes en el estado físico de sistemas biológicos concentrados y materiales alimenticios amorfos (Slade y Levine, 1991). Se propuso que las transiciones vítreas afectan las reacciones químicas

controladas por la difusión de los reactivos a través del aumento del coeficiente de difusión, y que la diferencia entre la temperatura de almacenamiento (T) y la T_g, ($T-T_g$) podría dar cuenta de los efectos de la temperatura y de la humedad simultáneamente (el efecto de la humedad estaría considerado en el valor de T_g) (Karel y Saguy, 1991; Slade y Levine, 1991). Si se considera que la estabilidad está relacionada con la transición vítrea del sistema en forma directa, esto permitiría establecer un mapa de estabilidad hipotético como el que se muestra en la Figura I.2 (Roos, 1995).

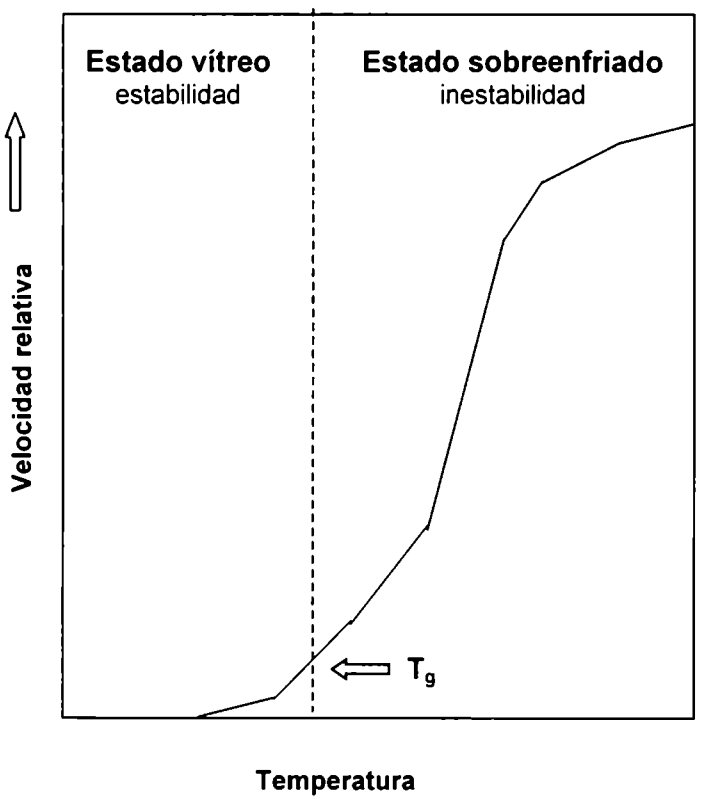


Figura I.2: *Mapa de estabilidad para alimentos amorfos, que describe el efecto de la temperatura sobre la velocidad relativa de cambios controlados por la T_g (Adaptado de Roos, 1995).*

I.B.1. DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA DE TRANSICIÓN VÍTREA.

Distintas propiedades del sistema amorfo cambian al ocurrir la transición vítrea, por lo cual puede ser detectada y estudiada por distintos métodos. Se producen cambios o discontinuidades en algunas propiedades dieléctricas (constante dieléctrica), mecánicas (módulo, viscosidad) y térmicas (entalpía, volumen libre, capacidad calorífica, coeficiente de expansión térmica) (White y Cakebread, 1966; Wunderlich, 1981; Sperling, 1986). Diferentes métodos pueden detectar alguno de estos cambios en función de la frecuencia, del tiempo o de la temperatura (Roos, 1995).

La técnica más utilizada para determinar la T_g es la calorimetría diferencial de barrido (DSC), la cual detecta la transición vítrea en base al cambio en la capacidad calorífica (ΔC_p). La muestra se calienta a una velocidad constante en una cápsula sellada, y en general se utiliza una cápsula vacía como referencia. El instrumento registra las diferencias en el flujo de calor entre la muestra y la referencia en función de la temperatura y del tiempo. En la Figura I.3 se muestra un termograma típico (obtenido por DSC) de un azúcar liofilizado que muestra sus transiciones de fase y cambios de estado (Roos, 1992). El cambio en el ΔC_p del sólido que ocurre a la temperatura de transición vítrea de la muestra, se evidencia como un cambio en la línea de base del termograma. A temperaturas mayores que T_g, el azúcar se transforma en un líquido sobreenfriado. A medida que la temperatura y la movilidad aumentan, y la viscosidad disminuye, las moléculas de azúcar pueden reorientarse hasta alcanzar un estado termodinámicamente más estable como lo es la estructura cristalina. La cristalización se manifiesta como

un pico exotérmico en el termograma. Al incrementar aun más la temperatura, el azúcar funde produciendo un pico endotérmico.

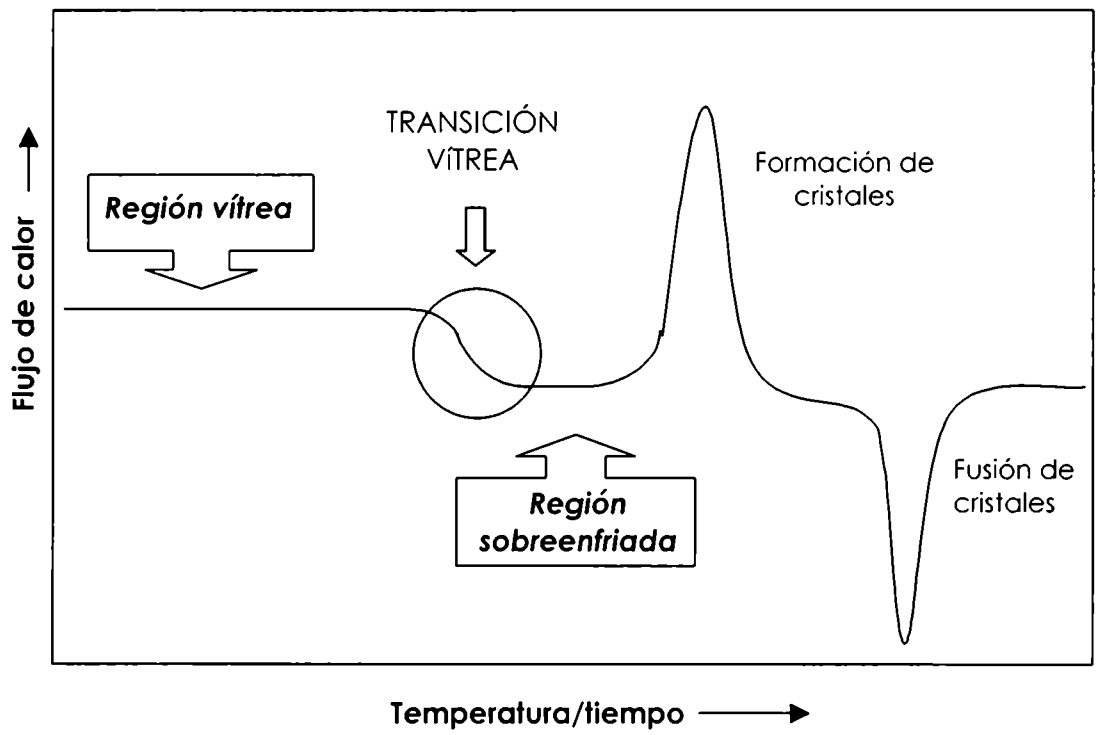


Figura I.3: *Termograma típico de un azúcar liofilizado (adaptado de Roos, 1992).*

Otros métodos útiles, y muchas veces más sensibles, incluyen los análisis dinámicos mecánicos (DMA, también referidos como análisis dinámicos termomecánicos, DMTA) (Kalichevsky y col., 1992), análisis dieléctricos (DEA, también referidos como análisis termodieléctricos, DETA) (Chan y col., 1986, Kalichevsky y col., 1992; Noel y col., 1992; Goff, 1995) y espectroscopía dieléctrica (Huang y col., 1996). Estas técnicas determinan el efecto de una

perturbación que varía en forma sinusoidal sobre los módulos dinámicos o dieléctricos (Cocero y Kokini, 1991; Le Meste y col., 1991; Kalichevsky y col., 1992, 1993; de Graaf y col., 1993; Goff, 1995).

Kalichevsky y col. (1992) sugirieron que las técnicas de DMA y DEA son más sensibles para determinar el valor de la T_g que el DSC. La transición vítrea se considera como una transición α, a temperaturas por debajo de la T_g podrían suceder otras transiciones referidas como β, γ, etc. (Roos, 1995). La relajación α detectada utilizando DMA o DEA a T_g, se puede correlacionar con la transición calorimétrica observada por DSC, pero es altamente dependiente de la frecuencia y es difícil definir la frecuencia exacta correspondiente a la T_g calorimétrica (Kalichevsky y col., 1992). Además en DEA los resultados se pueden apreciar únicamente por la presencia de dipolos del sistema (Roos y col., 2000). Como señalan Chuy y Labuza (1994), por DSC se detectan cambios en la capacidad calorífica de una muestra pequeña (alrededor de 10 mg), mientras que en la determinación semicuantitativa del módulo dinámico se observan cambios en las propiedades físicas de una muestra de mayor tamaño (1-5 g), la cual requiere más tiempo de calentamiento y, por lo tanto, se percibiría a temperaturas mayores.

Hay también técnicas espectroscópicas importantes, como la resonancia magnética nuclear (NMR) y resonancia de espín electrónico (ESR) que permiten detectar los cambios de movilidad molecular y de difusión asociados con la T_g (Le Meste y col., 1991; Kalichevsky y col., 1992, Ablett y col., 1993; Hemminga y col., 1993; Le Meste, 1995). La resonancia magnética de imágen (MRI) o también llamada resonancia magnética nuclear de imágen (NMRI) es una variante de la espectroscopía NMR. La diferencia reside en que

por MRI se obtiene información espacial acerca de los protones presentes en la muestra. Esta técnica permite obtener "mapas de T_g", que serían particularmente útiles para el estudio de sistemas heterogeneos como los alimentos o materiales biológicos (Ruan y Chen, 1998). Para el estudio de la difusión de compuestos en alimentos amorfos, recientemente Champion y col. (1995) introdujeron el uso de recuperación de fluorescencia luego del fotoblanqueado (FRAP). Esta técnica detecta la recuperación de la fluorescencia en una muestra que contiene sondas fluorescentes: se destruye el compuesto fluorescente en un área (fotoblanqueado) y se detecta la difusión de las sondas no destruídas hacia el área fotoblanqueada. Se puede relacionar entonces la difusión con los cambios de viscosidad del medio en las cercanías de la transición vítrea.

I.B.2. FACTORES QUE AFECTAN LA T_g .

I.B.2.1. Plastificación por el agua.

La movilidad de un sistema amorfo puede ser afectada por la adición de un agente plastificante. Un plastificante es una sustancia que al ser agregada a un material, aumenta su flexibilidad y extensibilidad. Para que un compuesto sea plastificante debe ser compatible con el material al que se incorpora. En los sistemas biológicos el plastificante más importante es el agua. El agregado de un plastificante produce un aumento en el volumen libre, y por lo tanto,

tiene el efecto de reducir la T_g del sistema y de incrementar la posibilidad de que éste cristalice. En la Figura I.4 se muestran, para una matriz de azúcar, la curva de T_g, de solubilidad y la zona de cristalización dependiente del tiempo, en función del contenido de agua. Se puede ver, que a medida que aumenta el contenido acuoso, disminuye la T_g, y además se promueve la cristalización (Roos, 1992).

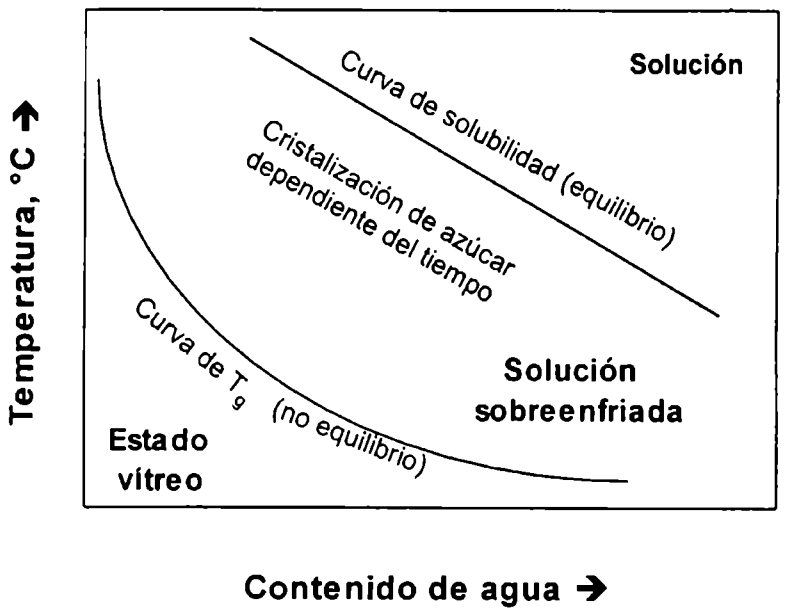


Figura I.4: *Curva de temperatura de transición vítrea, curva de solubilidad (equilibrio) y la zona de cristalización dependiente del tiempo para un dado azúcar (Buera, 2001).*

Las proteínas, al igual que los hidratos de carbono, muestran una transición dinámica "tipo vidrio", con temperaturas de transición vítrea que disminuyen con la hidratación (Gregory, 1998). En el estado vítreo la proteína está fijada cinéticamente y la movilidad está restringida a transiciones de tipo

local. Se postuló que en el estado seco las barreras para los reordenamientos conformacionales son tan altas que las transiciones entre dichos estados no son probables a temperaturas accesibles (antes de que se inicie la degradación térmica de la proteína). El agua plastifica la proteína y permite que las transiciones ocurran a temperaturas mucho menores (Gregory, 1998).

I.B.2.2. Efecto de la estructura y masa molar.

Fox y Flory (1950), trabajando con poliestireno de distintas masas molares, observaron que el valor de T_g aumentaba rápidamente al aumentar la masa molar. Al graficar T_g en función de la inversa de la masa molar obtuvieron una relación lineal. Debe destacarse que la relación entre la masa molar y la temperatura de transición vítrea no es general sino que sólo se verifica para series homólogas (Nelson, 1993).

La Ecuación I.1 es la ecuación de Fox y Flory, que ha sido aplicada para gran cantidad de polímeros sintéticos y biopolímeros, incluyendo maltodextrinas (Roos y Kare, 1991b).

$$T_g = T_g(\infty) - K / Mr \qquad (I.1)$$

Donde:

$T_g(\infty)$ es el valor límite de T_g a alta masa molar

Mr es la masa molar

K es una constante

Roos y Karel (1991b) determinaron las temperaturas de transición vítrea de maltosa y de una variedad de maltodextrinas en un rango amplio de humedades relativas. Al aumentar la humedad relativa, las temperaturas de transición vítrea de estos sistemas disminuyeron, como era esperado, ya que el aumento de humedad plastificó los sistemas. También se observó que la T_g aumentó al aumentar la masa molar para una dada humedad relativa, y pudo utilizarse la ecuación de Fox y Flory para relacionar las temperaturas de transición vítrea y la masa molar. Roos (1993) analizó el comportamiento de distintos azúcares (pentosas, hexosas y disacáridos) con respecto a la T_g, y se observó la misma tendencia general, las pentosas tuvieron menor T_g que las hexosas, que a su vez tuvieron menor T_g que los disacáridos.

Se ha demostrado que en matrices con la misma masa molar promedio, la T_g depende rigurosamente de la proporción de moléculas lineales que constituyen la matriz. Polímeros conteniendo una alta proporción de cadenas lineales (como por ejemplo de amilosa), presentan valores de T_g mayores que aquellos con una alta proporción de cadenas ramificadas (ej. amilopectina). Además se observó que la T_g es mayor para las formas cíclicas y que el tipo de enlace glicosídico afecta los valores de T_g al modificar la conformación espacial de la molécula (Slade y Levine, 1991). Zeleznak y Hoseney (1987) observaron que también el grado de entrecruzamiento del polímero afecta la temperatura de transición vítrea. La T_g determinada por estos autores para almidón nativo fue mayor que para almidón gelatinizado, las áreas cristalinas en el almidón nativo actuarían como redes físicas que conducen a una mayor

restricción de la movilidad segmental y en consecuencia al aumento del valor de T_g.

I.B.2.3. Transición vítrea de mezclas.

La disminución de T_g con el aumento del contenido de agua de la mayoría de los materiales biológicos, farmacéuticos y alimenticios puede describirse utilizando la ecuación de Gordon y Taylor (Gordon y Taylor, 1952) (Ecuación I.2). Esta ecuación relaciona la T_g de mezclas binarias con la fracción en masa y la T_g de los componentes individuales. La ecuación de Gordon y Taylor se aplica a sistemas modelo formados por mezclas anhidras de dos componentes distintos y también a sistemas que contienen un componente sólido y diferentes contenidos de agua. En general, la ecuación se cumple para calcular la T_g resultante de mezclas de polímeros con diluyentes.

$$T_{gmezcla} = \frac{W_1 \cdot T_{g1} + k \cdot W_2 \cdot T_{g2}}{W_1 + k \cdot W_2} \qquad (I.2)$$

Donde: $T_{g\,mezcla}$ = T_g observado para una mezcla binaria

w_1 y w_2 = fracción en masa de los componentes puros

T_{g1} y T_{g2} = T_g de los componentes puros

k = constante (representa la fuerza de interacción entre los componentes del sistema).

La ecuación de Gordon y Taylor también se utilizó para describir el efecto del agregado de moléculas distintas del agua a macromoléculas sobre la T_g. Buera y col., (1992) informaron constantes de Gordon y Taylor para la adición de xilosa, glucosa y lisina a una matriz de PVP. Roos y Karel (1991b) determinaron las T_gs de mezclas de maltodextrina y sacarosa. Las muestras estaban formadas por maltodextrinas de distintas masas molares y sacarosa en distintas concentraciones. Los resultados obtenidos fueron comparables con los predichos por la ecuación de Gordon y Taylor (para k = 3) (Figura I.5).

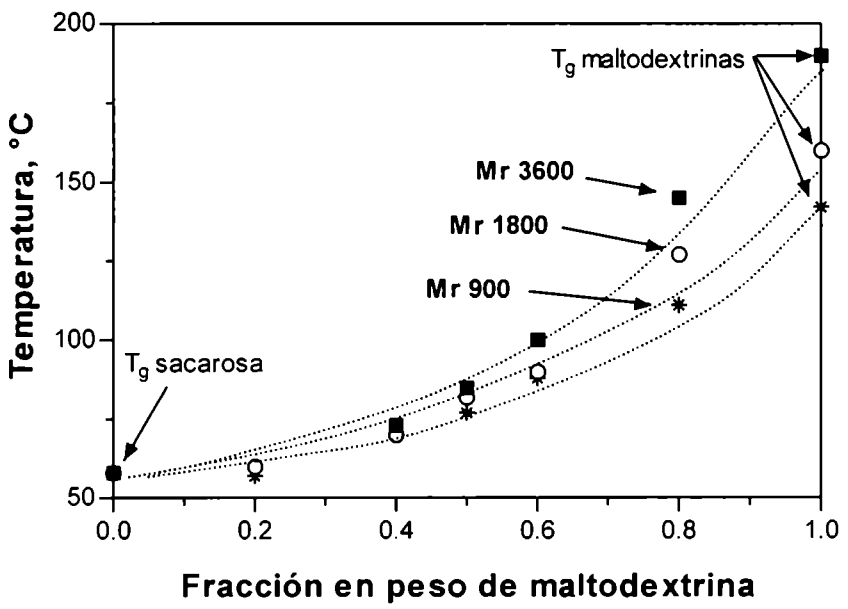


Figura I.5: *Efecto del agregado de maltodextrina sobre la temperatura de transición vítrea de la sacarosa (adaptado de Roos y Karel, 1991b), (.....) curvas predichas utilizando la ecuación de Gordon y Taylor.*

La adición de hidratos de carbono inertes de alta masa molar a alimentos o componentes de los mismos, se puede usar para alterar la T_g y retrasar los cambios físicos que pueden afectar la estabilidad del producto. Se observó que los alimentos que contienen grandes cantidades de azúcares, retienen su calidad en un amplio rango de temperaturas y humedades, cuando se les adicionan macromoléculas. En numerosos productos se logró retrasar la cristalización de azúcares (Berlin y col., 1973; Iglesias y Chirife, 1978), y el colapso del sistema (Tsourouflis y col., 1976; Gerschenson y col., 1981).

I.B.3. ISOTERMAS DE SORCIÓN DE AGUA Y ESTADO FÍSICO.

La presencia de agua y sus interacciones con otros componentes son factores importantes a tener en cuenta en la estabilidad de diferentes formulaciones o alimentos. Sin embargo, se ha observado que sistemas con el mismo contenido de agua difieren significativamente en su estabilidad microbiológica y química. Esta situación es atribuible a las diferencias de intensidad con la que el agua se asocia con los constituyentes no acuosos. El agua unida fuertemente está menos disponible para las reacciones degradativas, tales como el crecimiento de microorganismos y las reacciones químicas hidrolíticas, que el agua que tiene asociaciones débiles. El término actividad de agua (a_w) caracteriza la intensidad con la cual el agua se asocia con los distintos constituyentes no acuosos (Fennema, 1996). La a_w se define como:

$$a_w = (p / p_0)_T \qquad (I.3)$$

Donde:

a_w es la actividad de agua

p es la presión de vapor de agua en el producto a la temperatura T

p_0 es la presión de vapor del agua pura a la temperatura T

Esta igualdad se basa en asumir la existencia de equilibrio termodinámico. Generalmente en alimentos o formulaciones deshidratados esta condición puede no cumplirse y por ello sería más correcto usar el término presión de vapor relativa (PVR) en lugar del término a_w (Fennema, 1996).

En el equilibrio, a temperatura constante, las actividades de agua de los componentes de una mezcla son iguales, mientras que los contenidos de agua pueden no serlo. La actividad de agua está relacionada con el contenido acuoso a través de la isoterma de sorción de agua. Las isotermas de sistemas cristalinos y amorfos son significativamente diferentes, tal como se observa en la Figura I.6.

Un sólido cristalino adsorbe muy poca agua hasta una a_w dada, a partir de la cual comienza la disolución de los cristales. En el sistema amorfo, las moléculas se encuentran en un ordenamiento al azar, y están relativamente más libres para interactuar con el agua, por lo tanto la adsorción de agua a bajas a_w es mayor en los sistemas amorfos que en los cristalinos. Además existen materiales que a bajos contenidos de agua y bajas a_w, son amorfos, pero cristalizan con la adición de agua (Fig. I.6).

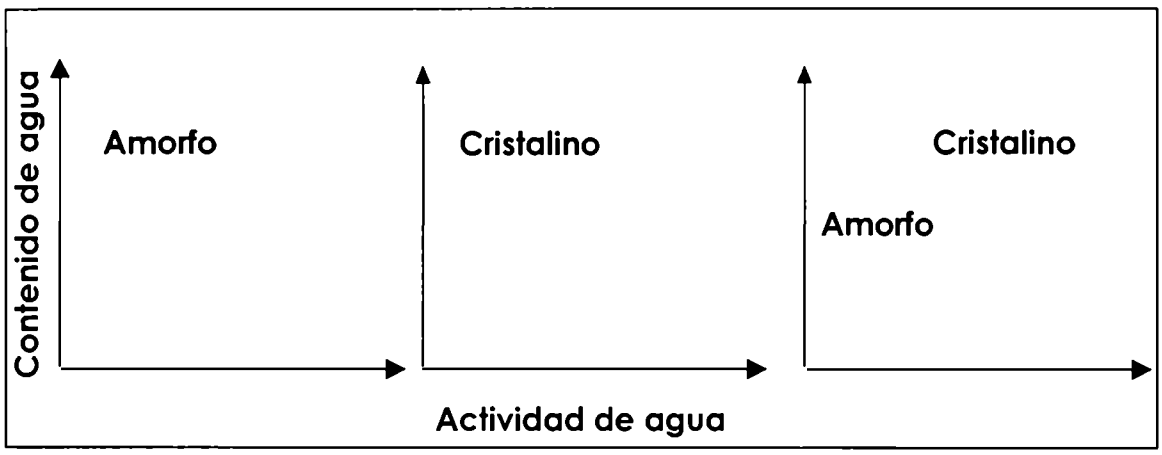


Figura I.6: *Isotermas correspondientes a sistemas amorfos, cristalinos y a materiales amorfos que cristalizan a medida que aumenta el contenido de agua y la* a_w.

Las isotermas son herramientas útiles, ya que a partir de ellas se puede obtener información sobre la cristalización y la plastificación de un sistema. También se pueden calcular los valores de contenido de agua correspondientes a la monocapa y puntos de disolución (Fennema, 1996).

I.B.4. DIAGRAMAS DE ESTADO

El conocimiento de los diagramas de "estado" es de gran importancia en los estudios relacionados con la movilidad molecular y la estabilidad de sistemas congelados o con bajo contenido de agua. Son más apropiados, en estos casos, que los diagramas de fase convencionales (Fennema, 1996). Además de las condiciones de equilibrio que proveen los diagramas de fase,

los diagramas de estado proveen información acerca de condiciones de no equilibrio y estados de equilibrio metaestable. Por lo tanto, incluyen la noción de tiempo y permiten complementar la información de los diagramas de fase. Son especialmente útiles en sistemas deshidratados, parcialmente deshidratados o congelados que no corresponden a estados de equilibrio termodinámico (Fennema, 1996; Roberts y Franks, 1996; Roos y col., 1999). En la Figura I.7 se muestra un diagrama de estado temperatura-composición simplificado para un sistema binario.

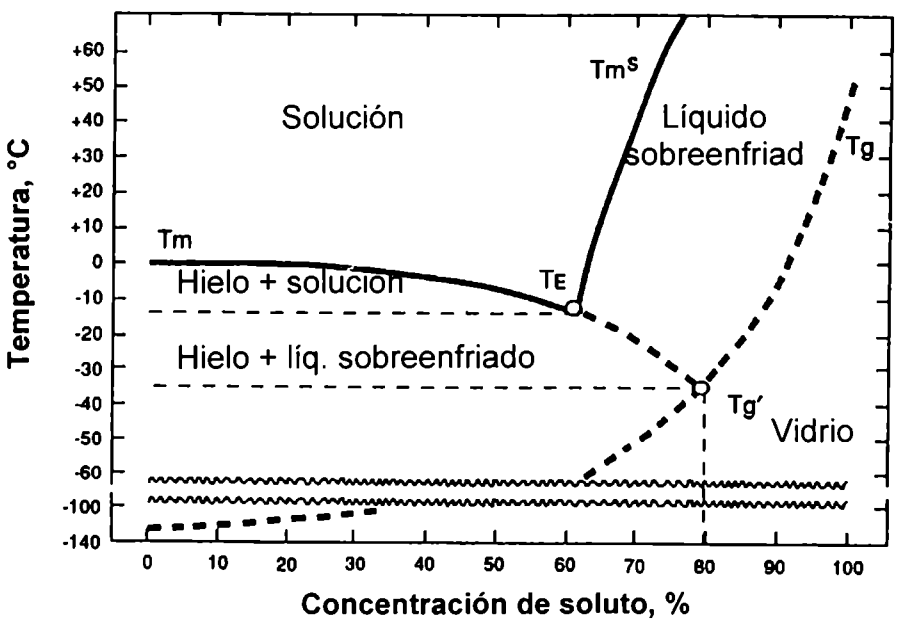


Figura I.7: *Diagrama de estado de un sistema binario (adaptado de Fennema, 1996).*

El gráfico incluye la curva de temperatura de transisición vítrea (T_g), la curva de fusión de hielo (T_m) y la curva de solubilidad (T_m^s). El punto donde la

curva de fusión intercepta la curva de T_g define el punto (C_g', T_g') que corresponde a una concentración de soluto/temperatura particular a la cual la cristalización de agua está inhibida cinéticamente. C_g' es la concentración correspondiente a la matriz máximamente concentrada por formación de hielo, es decir que a C_g' se alcanza la mínima cantidad de agua asociada a la fase amorfa que se puede alcanzar por congelación de agua en el sistema. T_g' es la temperatura de transición vítrea correspondiente a esa matriz máximamente concentrada (Simatos y Blond, 1991; Slade y Levine, 1991). La curva de T_g y la línea que se extiende desde el punto eutéctico (T_E) a T_g', representan condiciones de no equilibrio. Cuando un sistema se encuentra en condiciones intermedias entre la curva de T_g y las curvas de T_m o T_m^s, se encuentra, con raras excepciones, en un estado de no equlilibrio. La formación de hielo en el sistema se favorece congelando lentamente, y se hace máxima a temperaturas entre T_E y T_g'. A temperaturas mayores que T_E se produce fusión del hielo, y a temperaturas menores que T_g' el sistema es altamente viscoso, la movilidad molecular está muy reducida y hay limitaciones difusionales que impiden la cristalización de agua (Fennema, 1996). Contrariamente, cuando una solución se congela rápidamente (por ejemplo con nitrógeno líquido), el congelamiento rápido previene la cristalización de hielo y por lo tanto se obtiene un sistema amorfo con un valor de T_g (en este caso menor que T_g') que será dependiente de la cantidad de agua asociada a la fase amorfa (Figura I.8) (Luyet y Rasmussen, 1968; Hartel, 2001a). El valor de T_g' es independiente de la concentración inicial, sólo depende de la composición o tipo de soluto. Por lo tanto, es importante señalar que cada sistema tendrá su diagrama de estado característico que

diferirá cuantitativamente pero no cualitativamente del diagrama mostrado en la Figura I. 7 (Fennema, 1996).

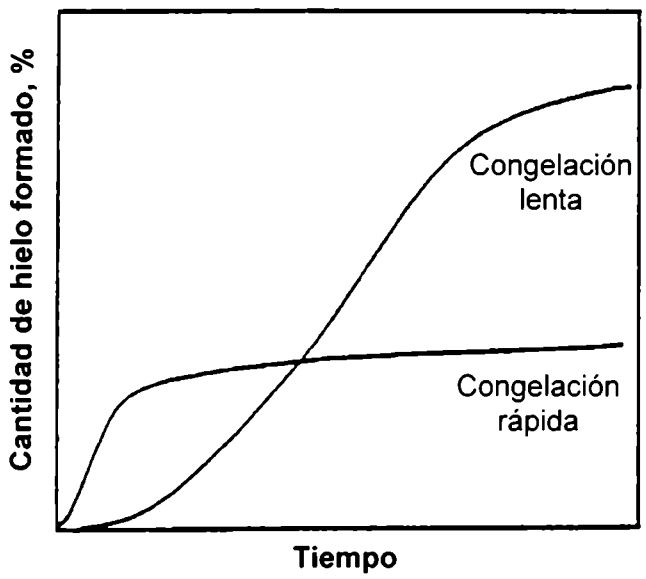


Figura I.8: *Formación de hielo durante la congelación rápida o lenta del sistema (adaptado de Hartel, 2001a).*

I.B.5. CAMBIOS FÍSICOS RELACIONADOS CON T_g.

Los materiales amorfos son sistemas metaestables que sufren cambios dependientes del tiempo hasta alcanzar la condición de equilibrio. Existe un acuerdo general acerca de la influencia de la transición vítrea sobre cambios de tipo mecánico o cambios relacionados con la difusión de las moléculas que constituyen el sistema (Roos y col., 1996a). Los cambios mecánicos incluyen sobre el fenómeno de colapso, que es la resultante de un cambio en la estructura o en el flujo viscoso de los componentes de la matriz por

disminución de viscosidad, y provoca pegajosidad, apelmazamiento y pérdida de porosidad (White y Cakebread, 1966; Bellows y King, 1973; Tsourouflis y col., 1976; To y Flink, 1978 a y b; Flink, 1983; Levine y Slade, 1988; Slade y Levine, 1991). Los cambios físicos asociados con cambios en la difusión, incluyen la cristalización de azúcares amorfos (Roos y Karel, 1990; Jouppila y Roos, 1994a y b; Kedward y col., 1998; Mizuno y col., 1998; Roos, 1998b), la retención y liberación de aromas (Whorton y Reineccius, 1995), recristalización de hielo en productos congelados (Hagiwara y Hartel, 1996; Sutton y col., 1997; Roos, 1998a;) y pérdida de crocancia en cereales (Simatos y Karel, 1988; Le Meste y col., 1992; Nicholls y col., 1995; Roos y col., 1998).

En particular, si bien la cristalización de azúcares en sistemas amorfos es un punto importante ya que puede afectar significativamente la vida útil del producto o la estabilidad de sus componentes, los factores que afectan el proceso de cristalización y la cinética de cristalización aún no han sido comprendidos completamente (Roos y col., 1999).

I.B.5.1. Cristalización de hidratos de carbono amorfos.

La cristalización es un cambio de estado típico que puede ocurrir durante el almacenamiento de hidratos de carbono amorfos deshidratados o congelados. Afecta en gran medida la calidad del producto y acelera incluso otros cambios deteriorativos como reacciones químicas o enzimáticas. Es una transición de fase de primer orden, generalmente controlada cinéticamente

por el estado físico del sistema (Roos, 1995; Roos y col., 1996b; Roos, 1998b). Si bien se observó que existe movilidad rotacional, relajaciones y "envejecimiento físico" en el estado vítreo, la movilidad no sería suficiente para permitir la difusión traslacional y los arreglos moleculares necesarios para que se produzca la nucleción y el crecimiento de los cristales (Sperling, 1986; Slade y Levine, 1991; Roos, 1995). Como la movilidad traslacional aumenta rápidamente al ocurrir la transición vítrea, la velocidad de cristalización aumenta mucho a temperaturas mayores que T_g (Slade y Levine, 1991; Roos, 1995). Se observó que la velocidad de cristalización depende de la temperatura, de la diferencia entre la temperatura de almacenamiento (T) y T_g ($T-T_g$), y del contenido de agua (Roos y Karel, 1990; Jouppila y Roos, 1997; Jouppila y col., 1998).

Los sistemas con bajo contenido de agua o congelados, son metaestables y sus componentes tienden a cristalizar debido a la sobresaturación. La cristalización de materiales amorfos es un proceso complicado que requiere del tiempo suficiente para la nucleción, propagación o crecimiento y maduración de los cristales formados, que puede involucrar transformaciones entre diferentes formas cristalinas y recristalización (Slade y Levine, 1987; Levine y Slade, 1992 b; Roos, 1995). En la Figura I.9 se muestra esquemáticamente el efecto de la temperatura y/o de la plastificación, sobre la velocidad de cristalización en un sistema en estado líquido sobreenfriado.

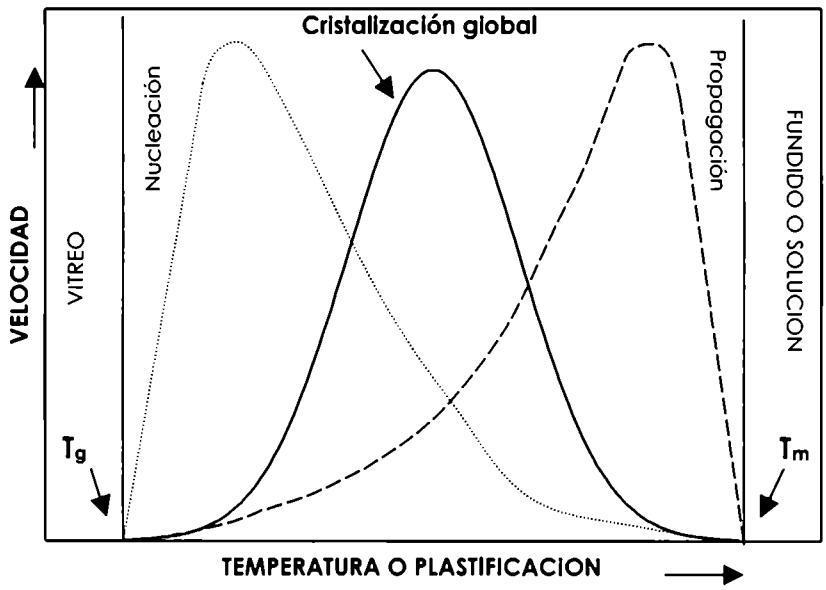


Figura I.9: *Esquema del efecto de la temperatura (o de la plastificación) sobre la velocidad de nucleación, propagación y cristalización global en sistemas amorfos. Adaptado de Slade y Levine, (1991) y Roos (1995).*

En la Fig I.9 se observa que a temperaturas mayores, pero cercanas a la T_g, la nucleación es rápida pero el crecimiento o propagación de los cristales es lento debido a que la viscosidad es alta y la difusión de las moléculas a los centros de cristalización está restringida. A temperaturas cercanas a la temperatura de fusión (T_m) la nucleación es lenta pero el crecimiento de los cristales se ve favorecido por la menor viscosidad y mayor movilidad de las moléculas, que pueden difundir y orientarse adecuadamente sobre la superficie del cristal en crecimiento (Jouppila, 1999). Por lo tanto la velocidad de cristalización global en función de la temperatura (o de $T-T_g$) describe una curva en forma de campana con un máximo a temperaturas entre T_g y T_m (o a valores de ($T-T_g$) intermedios (Sperling, 1986; Slade y Levine 1991; Roos, 1995)). Jouppila y col. (1998) y Kedward y col. (1998) sugirieron que la velocidad de

cristalización máxima para lactosa ocurre a valores de ($T-T_g$)= 60-100°C. Por otro lado, en condiciones de ($T-T_g$) bajos, el grado de cristalización global en el sistema será menor porque aunque la nucleción es rápida el crecimiento de los cristales está restrigido cinéticamene. Además, en esta condición, los cristales que se forman al comienzo del almacenamiento están rodeados por regiones amorfas rígidas que actúan como barreras para que se produzcan los reordenamientos moleculares y la cristalización completa. Si la cristalización ocurre a valores altos de ($T-T_g$), el crecimiento es rápido y generalmente los cristales que se forman son más grandes y perfectos (Flory, 1953).

La velocidad de cristalización se podría controlar entonces, modificando la velocidad de difusión de las moléculas durante la nucleación o durante la propagación, o afectando los sitios de crecimiento del cristal (Hartel y Shastry, 1991; Roos, 1995).

Distintos autores observaron que la cristalización en alimentos o formulaciones complejas estaría controlada no sólo por la temperatura y el contenido de agua sino también por la presencia de otros componentes en el sistema. Algunos materiales se incorporan a soluciones sobresaturadas para inducir nucleación, mientras que hay otros materiales que inhiben el proceso de nucleación (Hartel, 2001c). El retraso del proceso de cristalización por adición de compuestos de alta masa molar ha sido demostrado por Berlin y col. (1973) para lactosa y por Iglesias y Chirife (1978) para sacarosa. Karmas y col (1992), observaron que la cristalización de lactosa se puede retrasar incorporando al sistema amioca (almidón de alta amilosa) o carboximetilcelulosa. Saleki-Gerhardt y Zografi (1994) encontraron que la cristalización de sacarosa amorfa se retrasa en presencia de lactosa, trehalosa

o rafinosa. Si bien se ha estudiado la cristalización en sistemas combinados, aún hay poca información cuantitativa acerca de los efectos que producen distintos aditivos sobre la cristalización en alimentos o formulaciones complejas (Hartel, 2001c).

Hay gran cantidad de técnicas disponibles para evaluar cantidad, tamaño, tipo de cristales o velocidad de crecimiento en un producto alimenticio o sistema modelo. Cada técnica se basa en la medición de diferentes propiedades físicas de los cristales. La cristalización de azúcares en sistemas amorfos ha sido detectada usando calorimetría diferencial de barrido, microcalorimetría isotérmica y técnicas de difracción por rayos-X. Sin embargo se observaron diferencias en el grado de cristalización dependiendo de la técnica empleada debido a que los azúcares pueden cristalizar en diferentes formas dependiendo de la temperatura y del contenido de agua (Jouppila y col., 1997; Jouppila y col., 1998). En los últimos años, se incorporaron distintos tipos de técnicas microscópicas y de espectroscopía. La principal ventaja de la microscopía, reside en que permite la observación visual del tamaño y forma de los cristales en la muestra. Sin embargo debe tenerse en cuenta que los cristales deben tener un tamaño mayor que 3-4 μm para poder resolverlos por microscopía óptica. El uso de microscopía óptica con luz polarizada aumenta el contraste y permite resolver cristales más pequeños (entre 1 y 3 μm). Actualmente se están utilizando técnicas más sofisticadas como microscopía laser, confocal, microscopía de fuerza atómica. Dentro de las técnicas espectroscópicas, comenzaron a usarse en alimentos la resonancia magnética nuclear, espectroscopía Raman e infrarroja. La espectroscopía se utiliza principalmente para determinar la presencia de

material cristalino en un producto y para identificar estructuras polimórficas, pero también se puede utilizar para evaluar cinéticas de cristalización en alimentos o sistemas modelo (Hartel, 2001b). Es importante tener en cuenta que cada técnica puede determinar una u otra forma cristalina o bien la cristalización global en el sistema. Por lo tanto, la selección de la técnica más adecuada para una aplicación determinada, dependerá de los resultados esperados y de la practicidad en cada caso (Hartel, 2001b).

I.B.5.2. Cinética de cristalización.

La ecuación general de Avrami (Ec. I.4) también conocida como Johnson-Mehl-Avrami-Komogorov (JMAK) (Avrami, 1939; Chvoj y col., 1991; Graydon y col., 1994), ha sido frecuentemente usada para describir la velocidad global de cristalización isotérmica (Sperling, 1986; Roos y Karel, 1992; Gedde, 1995; Roos, 1995; Jouppila y col., 1997). El modelo supone que la cristalización comienza al azar en diferentes puntos y se propaga hacia afuera a partir de los sitios de nucleación (Figura I.9) (Gedde, 1995).

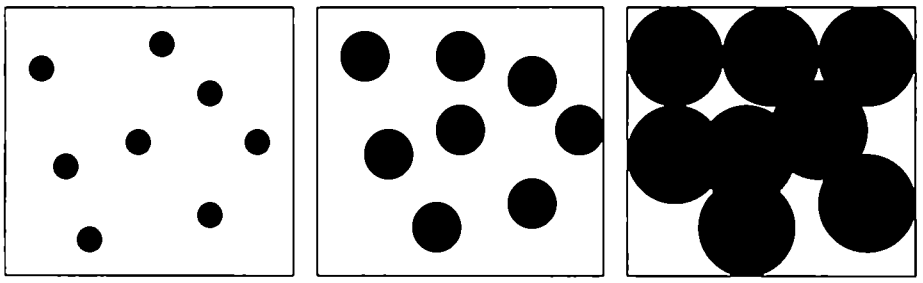


Figura I.10: *Esquema ilustrando la cristalización al azar en diferentes puntos y el crecimiento circular de los cristales (supuestos del modelo de JMAK).*

El modelo es válido no sólo para crecimiento lineal (velocidad de crecimiento constante) sino también para las primeras etapas donde el crecimiento está controlado por difusión (Graydon y col., 1994). La ecuación relaciona en forma sigmoidea la cristalinidad global con el tiempo de cristalización:

$$\alpha = 1 - \exp\left(-K_c t^n\right) \qquad (I.4)$$

donde α representa la fracción de azúcar cristalizado a un dado tiempo t, K_c es la constante de cristalización isotérmica, que depende principalmente de la temperatura, y *n* es el índice de Avrami, relacionado con el mecanismo de nucleación y crecimiento de los cristales (Arvanitoyanis y Blanshard, 1994). La calorimetría diferencial de barrido ha sido la técnica más comúnmente usada para estudiar la cinética de cristalización aplicando la ecuación de JMAK ya que permite determinar la fracción cristalina en función del tiempo de calentamiento isotérmico (Metin y Hartel, 1998). Roos y karel (1990, 1992)

realizaron mediciones isotérmicas por DSC para estudiar la cinética de cristalización de sacarosa y lactosa a temperaturas mayores que T_g.

La determinación de los valores K_c y n puede realizarse ajustando la Ecuación I.4 a los datos experimentales a través de una regresión no lineal o bien aplicando la forma doble logarítmica de la ecuación de Avrami, que permite obtener K_c y n de la ordenada al orígen y de la pendiente respectivamente

$$\ln[-\ln(1-\alpha)] = \ln K_c + n \ln t \qquad (I.5)$$

En la Figura I.11 se muestra la representación gráfica de la fracción cristalina en función del tiempo y la forma doble logrítmica de la ecuación JMAK.

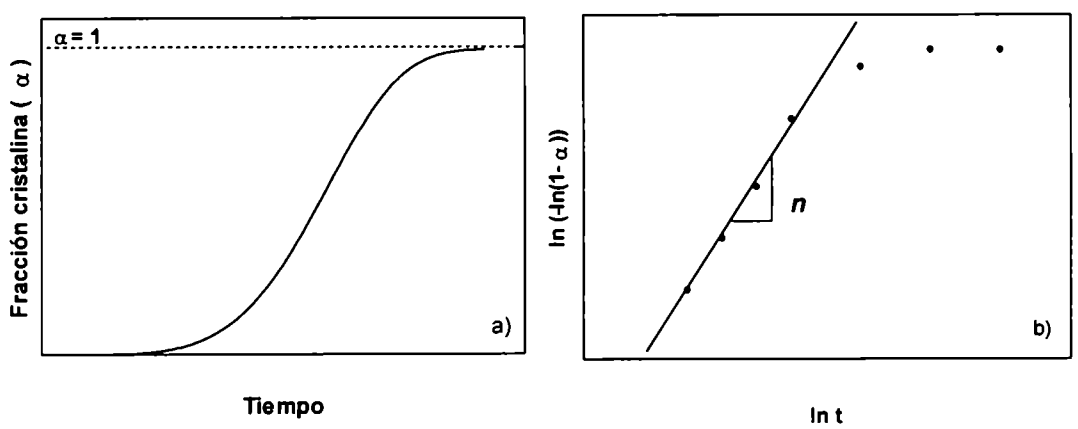


Figura I.11: *a) Representación gráfica de la fracción cristalina en función del tiempo. b) Forma doble logrítmica de la ecuación JMAK. La ecuación representa los datos para un grado de conversión bajo.*

El valor numérico de K_c es una combinación de las constantes de velocidad de nucleación y de crecimiento, se relaciona directamente con el tiempo medio de cristalización ($\tau_{1/2}$) y por lo tanto con la velocidad de cristalización global o total. El valor de K_c es muy dependiente de la temperatura (Graydon y col., 1994). La inversa del $\tau_{1/2}$ se calculó usando la siguiente ecuación:

$$\tau_{1/2} = \left(\frac{0.693}{K_c}\right)^{1/n} \qquad (I.6)$$

El tiempo medio de cristalización permitiría evaluar la estabilidad durante el almacenamiento de formulaciones conteniendo azúcares (Jouppila y col. (1997, 1998).

Distintos autores encontraron que los valores del exponente *n* son mayores al aumentar el número de dimensiones en que se produce el crecimiento. Para varias condiciones de transformación, se observó que cuando el crecimiento está controlado por difusión, el valor de *n* se reduce en un factor de 0.5 respecto al valor obtenido para el caso de crecimiento libre (Avrami, 1940; Doremus, 1985; Chvoj y col., 1991). Graydon y col (1994) encontraron que para muchas transformaciones, el valor de n se mantiene constante en un rango importante de temperaturas. Christian (1975) tabuló valores de n esperados para varias condiciones de transformación. Valores de *n*= 4, indican nucleación heterogénea y desarrollo de cristales en forma de esfera a partir de núcleos aislados. Un valor de n= 3, indica un crecimiento esférico a partir de núcleos aislados. Valores de *n* cercanos a 2 indican un

crecimiento inicial en dos dimensiones, con una alta tasa de nucleación al comienzo que disminuye con el tiempo. Datos experimentales y teóricos mostraron que se requiere un sobreenfriamiento de 50-100K para que la nucleción sea totalmente homogénea. De lo contrario, en las condiciones prácticas comúnmente usadas, la nucleación se inicia a partir de partículas preexistentes y se conoce como nucleción heterogénea (Gedde, 1995).

I.B.6. CAMBIOS QUÍMICOS RELACIONADOS CON T_g.

El pardeamiento no enzimático, las reacciones catalizadas por enzimas y la estabilidad estructural son algunos de los procesos químicos que determinan la estabilidad en sistemas de bajo contenido acuoso (Roos y col., 1996a; To y Flink, 1978 a,b y c). La velocidad de estos cambios en alimentos con bajo contenido de agua parece depender de la movilidad molecular (Duckworth, 1981). Simatos y Karel (1988) y Slade y Levine (1991) sugirieron que en alimentos amorfos, la velocidad de las reacciones químicas estaría controlada por la difusión de los reactivos. Por lo tanto, la velocidad de reacción aumentaría significativamente a temperaturas mayores que la T_g del sistema (Roos y col., 1996a).

La reacción de Maillard, un caso particular de pardeamiento no enzimático, es probablemente el ejemplo más estudiado de una reacción química controlada por la difusión, en relación con la transición vítrea. Comienza con la condensación de grupos amino con grupos carbonilo, y

luego de reacciones complejas de isomerización, deshidratación y condensación, conduce a la formación de pigmentos pardos. Es un buen modelo para estudiar los efectos de la transición vítrea sobre la cinética de reacción, debido a que es un proceso con varias etapas que requieren la difusión y reordenamiento de los reactivos (Namiki, 1988). Además, la reacción de Maillard es una reacción química importante en alimentos o formulaciones que contienen proteínas y azúcares. Los azúcares reductores proveen grupos carbonilo y las proteínas grupos amino que constituyen los reactivos iniciales de la reacción de Maillard. Produce aromas, oscurecimiento o perdeamiento del sistema y también puede disminuir la calidad durante el procesamiento y el almacenamiento del producto (Roos, 1995). Suzuki y col. (1997) sugirieron que la inactivación enzimática puede ocurrir no sólo por cambios en la estructura terciaria de la proteína, sino también vía la reacción de Maillard. Por lo tanto, se le ha dado mucha atención al control de la velocidad de esta reacción. Uno de los primeros estudios acerca del efecto de la transición vítrea sobre el pardeamiento en alimentos y sistemas modelo de alimentos fue realizado por Karmas y col. (1992). Estos autores concluyeron que aunque la velocidad de pardeamiento no enzimático era fuertemente dependiente de la humedad y la temperatura, también era afectada por la transición vítrea. Roos y Himberg (1994) llegaron a una conclusión semejante al estudiar el pardeamiento no enzimático en función del contenido de agua, la a_w y la T_g a temperaturas de enfriamiento. Postularon que el pardeamiento se inicia en una zona cercana a la T_g a cada contenido de agua y que la velocidad de la reacción aumenta al aumentar ($T-T_g$). Himberg y Roos (1992) estudiaron las velocidades de pardeamiento no enzimático en sistemas liofilizados de

maltodextrina en presencia de lisina y xilosa. Ellos observaron que se desarrolló pardeamiento a temperaturas menores que la T_g del sistema, aunque a muy bajas velocidades. Bell (1995) concluyó que la concentración de los reactivos en la fase acuosa de sistemas de baja humedad afecta la velocidad de pardeamiento en mayor medida que el estado físico (caracterizado por T_g o la a_w). Estudios recientes demostraron que la reacción de Maillard en matrices anhidras poliméricas no estuvo gobernada totalmente por la movilidad molecular asociada a la transición vítrea (Schebor y col., 1999). La movilidad rotacional y la difusión podrían ocurrir en el estado vítreo, en poros preexistentes, descartando la hipótesis de la no reactividad por debajo de T_g. La temperatura tendría más importancia que el valor de ($T-T_g$). Como remarca Chinachoti, (1997), análisis a diferentes niveles (macroscópicos o moleculares) proveen información en distintas dimensiones de tiempo o distancia, y no necesariamente se correlacionan.

I.B.7. DEPENDENCIA DE CAMBIOS FÍSICOS Y QUÍMICOS CON LA TEMPERATURA

La dependencia de las velocidades de reacciones con la temperatura puede analizarse utilizando diferentes modelos teóricos:

I.B.7.1. Modelo de Arrhenius.

La expresión matemática más utilizada para analizar el efecto de la temperatura sobre la velocidad de procesos químicos, físicos, reacciones de desnaturalización o enzimáticas, es la ecuación de Arrhenius:

$$K = K_0 \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) \qquad (I.7)$$

En el modelo *K* correspondientes a alguna propiedad relacionada con aspectos cinéticos a la temperatura T (por ej. viscosidad, cristalización, inactivación de proteínas), K_0 es un factor de frecuencia o constante de Arrhenius, R es la constante de los gases y E_a la energía de activación. La forma logarítmica de la Ec. (I.7) permite determinar si el modelo es aplicable o describe los datos experimentales:

$$\ln K = \ln K_0 - \frac{E_a}{RT} \qquad (I.8)$$

Si el modelo describe bien los datos experimentales, la representación gráfica del ln *K* vs 1/T debe ser una línea recta. Si además la cinética es de primer orden, la constante de velocidad puede representarse como $1/\tau$, donde τ sería el tiempo al cual ocurre el proceso en estudio, y la Ec. (I.8) puede describirse como:

$$\ln\left(\frac{1}{\tau}\right) = \ln(k_0) - \frac{E_a}{RT} \qquad (I.9)$$

La aplicabilidad del modelo puede probarse entonces graficando $1/\tau$ o $1/\tau_{1/2}$ vs $1/T$. A partir de la pendiente ($-E_a/R$) se puede calcular E_a que expresa el grado de dependencia respecto a la temperatura del proceso en cuestión.

Las curvas tipo Arrhenius se observan principalmente en sistemas con alto contenido de agua. En sistemas con bajo contenido de agua pueden presentarse desviaciones de esta cinética, generalmente causadas por cambios físicos (transición vítrea, cristalización), o cambios en los mecanismos de reacción (Figura I.12) en las cercanías de T_g.

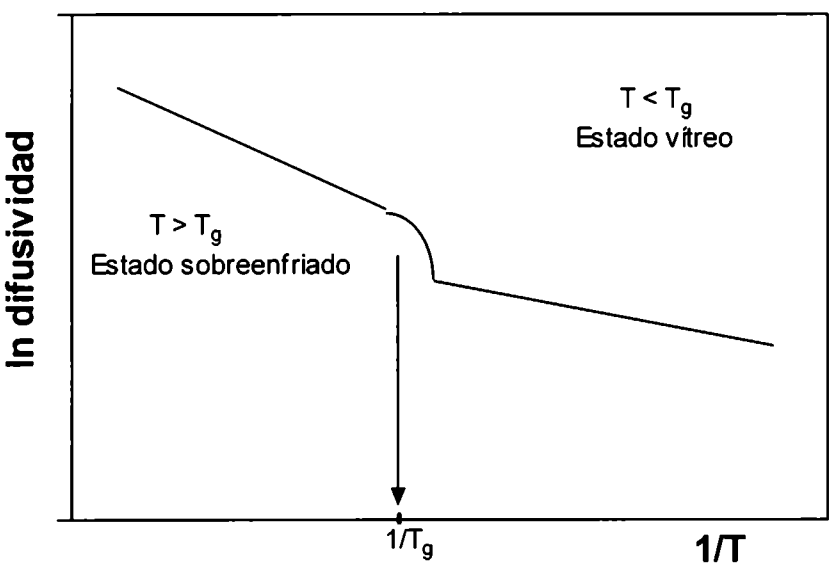


Figura I.12: *Representación esquemática del efecto de la transición vítrea sobre la dependencia de la difusividad con la temperatura en un gráfico de Arrhenius (adaptado de Roos, 1995).*

I.B.7.2. Modelo de Williams-Landel-Ferry (WLF)

La ecuación WLF (Williams y col., 1955) (Eq. I.10) relaciona tiempos de relajación de propiedades mecánicas con temperaturas mayores que la T_g del sistema. Esta ecuación fue obtenida empíricamente para describir la dependencia de la viscosidad de materiales amorfos con la temperatura, pero el modelo puede aplicarse a otros parámetros de relajación o cinéticos (Ferry, 1980):

$$\log \frac{K}{K_g} = \frac{-C_1(T - T_g)}{C_2 + (T - T_g)} \qquad (I.10)$$

Donde:

K y K_g ,son valores correspondientes a propiedades relacionadas con aspectos cinéticos a las temperaturas T y T_g, respectivamente.

C_1 y C_2 son constantes que fueron obtenidas promediando valores obtenidos para muchos polímeros sintéticos, y se les dieron los valores considerados "universales" que corresponden a −17.44 para C_1 y 51.6 para C_2 (Williams y col., 1955). Uno de los inconvenientes en el empleo de la Eq. (I.10) es que el valor K_g, o sea el tiempo de relajación a la temperatura de transición vítrea, es difícil de obtener en la práctica, y se recurre a extrapolaciones o suposiciones.

El método de las variables reducidas propuesto por Peleg (1992) es una modificación de la ec. (I.10) y permite calcular las constantes de WLF en sistemas reales, evitando extrapolaciones, ya que se basa en aproximaciones

físicas. Para ello, se elige una temperatura de referencia dentro del área experimental obteniéndose la siguiente ecuación:

$$\log\frac{K}{K_r} = \frac{-C_{1r}(T-T_r)}{C_{2r}+(T-T_r)} \qquad (I.11)$$

donde T_r es la temperatura de referencia, K_r corresponde al valor de alguna propiedad relacionada con aspectos cinéticos a la temperatura T_r y C_{1r} y C_{2r} son coeficientes constantes. Para evaluar C_{1r} y C_{2r} es necesario definir una temperatura a la cual el tiempo del proceso es infinito (T_∞). Una buena aproximación de este valor se obtiene calculando:

$$T_\infty = T_g - 50K$$

y a esta temperatura se tiene que:

$$C_{2r} = T_r - T_\infty \qquad (I.12)$$

Cuando la Ec. (I.12) se combina con la Ec. (I.11) se obtiene la siguiente ecuación:

$$\log\frac{K}{K_r} = \frac{-C_{1r}(T-T_r)}{(T-T_\infty)} \qquad (I.13)$$

Si el modelo describe los datos experimentales, al graficar log (K/K_r) vs $((T-T_r)/(T-T_x))$ debe obtenerse una línea recta.

La diferencia entre la temperatura de referencia y T_g se define (Ferry, 1980; Peleg, 1992) como:

$$\delta = T_r - T_g \qquad (I.14)$$

$$C_1 = (C_{1r}\, C_{2r})/(C_{2r} - \delta) \qquad (I.15)$$

$$C_2 = C_{2r} - \delta \qquad (I.16)$$

C_1 y C_2 son los coeficientes de WLF cuando $T_r = T_g$

En la bibliografía se encontró una tendencia general a utilizar los coeficientes de WLF como "constantes universales" (Levine y Slade, 1989; Lim y Reid, 1991) y aunque en algunos casos se señala que son valores promedio, igualmente se han usado con frecuencia para probar la aplicabilidad del modelo WLF (Soesanto y Williams, 1981; Ollet y Parker, 1991; Kerr y col., 1993).

Debido a que los valores C_1 y C_2 son promedios obtenidos de un gran número de polímeros sintéticos, y que se aplican a relajaciones mecánicas, no es apropiado usar estos coeficientes para juzgar la aplicabilidad del modelo WLF para reacciones químicas que ocurren en sistemas biopoliméricos. Por ejemplo, Karmas y col. (1992) encontraron que en un sistema de hidratos de carbono a $T > T_g$, el aumento de la velocidad de pardeamiento no enzimático no fue tan grande como el predicho utilizando los coeficientes promedio de WLF. Esto no significa que el modelo WLF no sea aplicable, sino que se deben usar los coeficientes en la ecuación WLF correspondientes a cada sistema

particular (Nelson y Labuza, 1994) que a veces difieren hasta en un orden de los "universales".

I.B.7.3. Modelo de Vogel-Tamman-Fulcher (VTF)

Angell y col. (1994) recomendaron el uso de la ecuación VTF en lugar de la de WLF para líquidos no poliméricos, ya que presenta coeficientes que serían más universales. La ecuación VTF puede expresarse para cinéticas de cristalización como:

$$K = K_0 \cdot \exp(B/T - T_0) \qquad (I.17)$$

donde B, T_0 y K_0 son constantes. El valor de T_0 se fijó como 184K, valor que fue estimado de valores recomendados por Parker y Ring (1995), y B se calculó como la pendiente de la forma lineal de la Eq. (I.17).

I.B.7.4.Comparación de los modelos empleados para evaluar la dependencia de la cinética de procesos con la temperatura.

Las ecuaciones VTF y WLF son interconvertibles, a partir de los coeficientes de VTF pueden obtenerse los parámetros correspondientes a la ecuacion de WLF (Soesanto y Williams, 1981). Se realizaron un gran número de

trabajos en los que se comparó la validez de las ecuacioes de Arrhenius y WLF. La ecuación WLF fue particularmente muy adecuada para describir la dependencia de la velocidad de los cambios físicos dependientes de la viscosidad en relación con ($T-T_g$), tales como los tiempos de cristalización de azúcares (Roos y Karel, 1991a), flujo y pegajosidad (Roos y Karel, 1992), aunque las dificultades en la determinación experimental a valores cercanos a T_g, hizo difícil la comprobación de la aplicabilidad de la ecuación de WLF en el rango de temperaturas en el que hay mayor variación de las propiedades termofísicas con la temperatura. Los resultados de estos trabajos indicaron que los coeficientes universales deben emplearse como primera aproximación, cuando no hay datos suficientes de los sistemas, de lo contrario resultó siempre mejor emplear los coeficientes calculados en base a los datos correspondientes a cada sistema particular (Ferry, 1980; Buera y Karel, 1993).

Para las reacciones químicas se encontraron resultados contradictorios en cuanto a la aplicabilidad de ecuaciones como WLF y Arrhenius. Estas contradicciones se pueden explicar considerando que en realidad hay dos factores que controlan la velocidad global de la reacción: el coeficiente de difusión de los reactivos, y la cinética de la reacción involucrada, que a su vez son ambos dependientes de la temperatura (Karel, 1994). La cinética de reacción generalmente se puede describir mediante la ecuación de Arrhenius, pero el coeficiente de difusión puede seguir la ecuación (I.8) con un cambio de pendiente cercano al valor de T_g, o la ecuación (I.11), especialmente en el rango de temperaturas entre 10 y 100 grados por encima de T_g. Por lo tanto, el tipo de ecuación que mejor refleje los cambios dependerá de la influencia relativa de cada uno de estos parámetros (Buera y Chirife, 1997).

Nelson (1993) estudió los efectos de T_g en fenómenos cinéticos incluyendo la cristalización de azúcares amorfos y las velocidades de cambios químicos en productos alimenticios. Concluyó que la aplicación correcta del modelo WLF para predecir datos cinéticos involucra la determinación de los coeficientes WLF, ya que dependen del sistema y de su contenido de agua. También sugirió que la velocidad de los cambios químicos en matrices sobreenfriadas suelen tener una dependencia con la temperatura de tipo Arrhenius, en vez de seguir el modelo WLF.

I.C. ASPECTOS REMARCABLES SOBRE LOS FACTORES INVOLUCRADOS EN LA ESTABILIDAD DE BIOMOLÉCULAS EN CONDICIONES DE HUMEDAD RESTRINGIDA.

El papel de los hidratos de carbono en la estabilización por deshidratación de membranas, proteínas y células ha sido estudiado extensivamente en los últimos 15 años. Como resultado de estas investigaciones, azúcares como sacarosa, lactosa y recientemente trehalosa han sido ampliamente usados como excipientes durante el secado de una variedad de biomateriales lábiles incluyendo productos de la industria farmacéutica (Suzuki y col., 1997).

La acción de los agentes crio y dehidroprotectores ha sido atribuída a efectos de tipo cinéticos y a efectos específicos. A nivel cinético estos agentes crio y dehidroprotectores promueven la formación de un sistema amorfo

vítreo, inhiben la cristalización e influyen sobre la cinética de reacciones de deterioro que pueden ocurrir durante el almacenamiento (Burke, 1985; Green y Angell, 1989; Levine y Slade, 1992a). En este sentido, Levine y Slade (1992b), propusieron al estado vítreo como factor determinante de la estabilidad en sistemas deshidratados. Sin embargo, distintos autores observaron que la formación de vidrios no fue suficiente para la preservación de membranas (Crowe y col., 1994; Sun y col., 1996) y proteínas (Duddu y Dal Monte, 1997) durante la liofilización y el almacenamiento, ni para la supervivencia de semillas en la deshidratación (Sun y Leopold, 1994b). Prestrelski y col. (1993) y Tanaka y col. (1991), observaron que carbohidratos de alto peso molecular como los dextranos, capaces de formar estructuras vítreas, no fueron efectivos para estabilizar proteínas durante la deshidratación. La estabilización en sistemas de baja humedad dependería no sólo de factores cinéticos sino también de interacciones específicas entre la estructura biológica a estabilizar y la matriz protectora (Carpenter y Crowe, 1988). Crowe y col. (1998), encontraron que la formación de vidrios era una condición necesaria pero no suficiente en la estabilización de enzimas y liposomas deshidratados.

Recientemente se asoció la inactivación enzimática con la cristalización del azúcar utilizado como agente estabilizante (Cardona y col., 1997; Suzuki y col., 1997; Sun y davison, 1998). Podría proponerse entonces que los efectos de tipo cinéticos como también los efectos de interacción específica involucrados en la capacidad protectora de los azúcares serían importantes y estarían de algún modo relacionados, ya que las interacciones específicas necesarias para la estabilización de biomoléculas sólo pueden manifestarse si el azúcar se encuentra en estado amorfo y la vitrificación es la propiedad que

asegura la inhibición de la cristalización. En particular, en el presente trabajo se analizaron propiedades específicas de los sistemas amorfos y el impacto de la cristalización sobre la estabilidad enzimática en realación con distintas estrategias para retrasar/nihibir la cristalización de azúcares protectores.

II. Objetivo

- Analizar la influencia del estado físico-químico de agentes estabilizantes de enzimas sobre su acción protectora.
- Analizar el uso de excipientes específicos (sales, azúcares, polímeros) para mejorar le eficiencia de los azúcares como agentes protectores.
- Establecer pautas generales para lograr la estabilización de enzimas en sistemas vítreos o sobreenfriados.

III. Materiales y métodos

III.A. ELECCIÓN DE LOS SISTEMAS MODELO

- Se utilizó como sistema modelo a estabilizar una enzima de actividad β-galactosidasa aislada de una cepa especial de la levadura láctica *Kluyveromyces lactis*. La elección se basó en que las enzimas provenientes de levaduras son intracelulares y tienen poca estabilidad térmica en los medios de cultivo habituales.
- Se emplearon sistemas modelo de azúcares, polímeros y mezclas polímero-azúcar, azúcar-azúcar o azúcar-sal, capaces de formar matrices amorfas por deshidratación o congelación. En estos sistemas se analizó la estabilidad de la enzima β-galactosidasa en distintas condiciones de humedad y temperatura de almacenamiento, en relación con la temperatura de transición vítrea y el estado físico-químico de la matriz.

III.B. MATERIALES

➢ **Polímeros:**

- Polivinilpirrolidona (PVP), de masa molar promedio (Mr) 40.000 (PVP 40) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).
- Maltodextrinas (MD) de masas molares promedio (Mr) 3600, 1800, 1200, 1000, 900, 720 (MD 3600, 1800, 1200, 1000, 900, 720, respectivamente) (Grain Processing Corp., Refinacoes de Milho, Corn Products Corp.).
- β-ciclodextrina (CD), (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).

- Almidón de trigo nativo (AN), (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).

➢ **Azúcares:**

- Trehalosa (α-α-trehalosa) (T), (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO; Pfanstiehl Laboratories, Inc., IL USA).
- Rafinosa (R), (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).
- Sacarosa (S), (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).
- Maltosa (M), (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).
- Melibiosa (Mb), (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).
- Lactosa (L) (Mallinckrodt Chem. Works, New York).

➢ **Sistemas combinados:**

- Polímero/azúcar: maltodextrina (MD 1800)/trehalosa (MD/T) (80:20, 50:50 p/p).
- Azúcar/azúcar: sacarosa/rafinosa (S/R) (50:50, 60:40, 65:35, 80:20, 90:10 p/p), sacarosa/trehalosa (S/T) (50:50, 65:35 p/p), lactosa/trehalosa (L/T) (60:40, 70:30, 80:20 p/p).
- Azúcar/sal: trehalosa en presencia de diferentes sales: KCl, NaCl, CsCl, $CaCl_2.2H_2O$, $ZnCl_2.2H_2O$ (T/K, T/Na, T/Cs, T/Ca, T/Zn, respectivamente) (preparadas en relación molar T/sal anhidra (R) 5 y 10) y $MgCl_2.6H_2O$ (T/Mg) (con R= 0.5, 1, 2, 5, 10 y 20).

Para estudiar la estabilidad enzimática en los sistemas anteriores se utilizó la enzima lactasa (β-galactosidasa producida por *Kluyveromyces lactis*),

Maxilact 5000L, Gist Brocades, Holland, nv., Dinamarca). pH óptimo: 6.8, Mr: 135 KD.

III.C. PREPARACIÓN DE LOS SISTEMAS MODELO

III.C.1. SISTEMAS LÍQUIDOS.

Se preparó una solución conteniendo buffer fosfato 0.1 M de pH 6.9 y la enzima β-galactosidasa (35 unidades enzimáticas (UE) / ml de buffer, donde una unidad es la cantidad de enzima que libera 1 μmol de glucosa/hora a 37°C y pH 6.9.)

III.C.2. SISTEMAS DESHIDRATADOS.

Los sistemas en estado amorfo se obtuvieron por liofilización de soluciones acuosas que contenían (salvo que se indique específicamente en los resultados), 20% (p/v) de cada uno de los sistemas detallados en el punto III.B. Para los estudios de estabilidad enzimática, las soluciones se mantuvieron en un baño de hielo y se agregó la enzima ß-galactosidasa (174 UE / g de matriz).

Alícuotas de 1 ml de cada solución se distribuyeron en viales de vidrio de 3 ml. Los sistemas poliméricos y azúcares empleados en los estudios de la sección

IV.A. se congelaron inmediatamente con aire líquido. Los sistemas empleados en la sección IV.B. se congelaron durante 24 horas a –26°C y luego se sumergieron de 1 a 2 minutos en nitrógeno líquido (temperatura= -190°C). Los sistemas se liofilizaron durante 48 horas. Se utilizó un liofilizador Virtis 10-342 (The Virtis Company, Inc. Gardiner, N.Y.) que opera a -50°C en la placa condensadora y a una presión de 0.4 mbar. Gran parte de los sistemas T/Sal y las mezclas lactosa/trehalosa se liofilizaron en un liofilizador Heto Lab Equipment Cooling Trap modelo CT 110 (Heto Lab Equipment, Dinamarca) que opera a –110°C en la placa condensadora y a una presión de menos de 4.10^{-4} mbar en la cámara. Luego del liofilizado las matrices se colocaron en desecadores de vacío y se expusieron durante una semana en una cámara a 25°C sobre un agente desecante ($Mg(ClO_4)_2$ o P_2O_5) o sobre las siguientes soluciones salinas saturadas: LiCl, CH_3COOK, $MgCl_2$, K_2CO_3. $Mg(NO_3)_2$, NaCl y KCl_2 que permitieron obtener humedades relativas (H.R.) de 11, 22, 33, 43, 52, 75 y 84% respectivamente, según los requerimientos de cada experimento (Greenspan, 1977).

III.C.3. SISTEMAS CONGELADOS.

Se prepararon sistemas amorfos por congelación de soluciones acuosas (fracción en masa de agua (W) 0.4, 0.6 y 0.8) de trehalosa y trehalosa en presencia de NaCl, KCl y $MgCl_2.6H_2O$. Los sólidos se disolvieron calentando a 80°C y se colocaron 20 μl de cada solución en cápsulas de aluminio (Mettler aluminium pan, 40μl para calorimetría diferencial de barrido (DSC)). Se realizaron dos tipos de experimentos:

a) Sistemas con W= 0.4: Congelando estas soluciones concentradas rápidamente se puede evitar la cristalización de agua o azúcar durante el enfriamiento. Los sistemas se congelaron rápidamente colocando las cápsulas en el horno del DSC cuando éste había alcanzado una temperatura de −150°C. Las muestras se mantuvieron a esa temperatura durante 2 minutos, previo a la medición en el DSC. De esta manera se obtienen sistemas donde toda el agua de la solución inicial forma parte de la matriz amorfa y en los cuales se analizó el valor de la temperatura de transición vítrea (T_g) y la recristalización de hielo realizando calentamientos dinámicos en el DSC.

b) Sistemas con W= 0.6 o 0.8: En estos sistemas diluídos se analizó la cantidad de agua congelada luego de almacenar las cápsulas durante 24 horas a −26°C. Las condiciones de temperatura (-26°C) y concentración (W= 0.6-0.8) seleccionadas en este caso, corresponden a una región en el diagrama de fases en la cual se espera que la formación de hielo ocurra fácilmente (I.B.4).

III.D. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE AGUA EN SISTEMAS DESHIDRATADOS.

El contenido de agua de las matrices poliméricas se determinó por diferencia en el peso antes y después del secado en estufas de vacío durante 48 horas a 70°C en presencia de perclorato de magnesio. En los sistemas que contenían azúcares se determinó el contenido acuoso total secando en estufas de vacío durante 48 horas a 98°C en presencia de perclorato de

magnesio. En ambos casos se expresaron los resultados en fracción en masa de agua (W).

Estas condiciones aseguran una determinación adecuada de la cantidad de agua en cada sistema y fueron seleccionadas en base a estudios previos (Cardona y col., 1997).

En las matrices donde se produjo cristalización parcial de la trehalosa como dihidrato, el contenido acuoso de la fase amorfa (W_A) se calculó utilizando las siguientes ecuaciones:

$$X + Y = 1$$

$$W = X \cdot 0.1 + Y \cdot W_A$$

$$Y \cdot W_A = W - X \cdot 0.1$$

$$W_A = (W - X \cdot 0.1)/(1 - X) \qquad \text{(III.1)}$$

donde X= fracción en masa de trehalosa cristalina; Y= fracción en masa de trehalosa amorfa; W= fracción en masa de agua total; W_A= fracción en masa de agua de la fase amorfa; 0.1= fracción en masa de agua del cristal dihidratado.

III.E. ESTIMACIÓN DE LA CANTIDAD DE AGUA CRISTALIZADA EN SISTEMAS CONGELADOS.

La cantidad de hielo formado luego de almacenar los sistemas (W= 0.6-0.8) en condiciones isotérmicas a –26°C se estimó calculando la diferencia entre

la fracción en masa de agua total del sistema (contenido de agua de la solución inicial, previo al congelamiento) y la cantidad de agua asociada a la fase amorfa:

$$W_A + W_c = W_T$$

$$W_c = W_T - W_A \qquad \text{(III.2)}$$

donde: W_A es la cantidad de agua asociada a la fase amorfa, W_c es la cantidad de agua cristalizada y W_T es el contenido de agua total del sistema.

El contenido de agua de la fase amorfa fue calculada a partir de los valores de T_g correspondientes, determinados luego del almacenamiento, y en base a la curva general de T_g versus W.

III.F. TRATAMIENTO TÉRMICO.

Luego de exponer los sistemas liofilizados a las humedades relativas seleccionadas, se cerraron los viales herméticamente con teflón alrededor de sus tapas y se incubaron en estufa de circulación forzada de aire a temperatura constante (± 1°C). Las temperaturas de almacenamiento se seleccionaron en función del sistema en estudio (temperaturas mayores o menores que el valor de T_g correspondiente) y del objetivo del experimento (rango 37-95°C). Se retiraron de la estufa muestras por duplicado a distintos

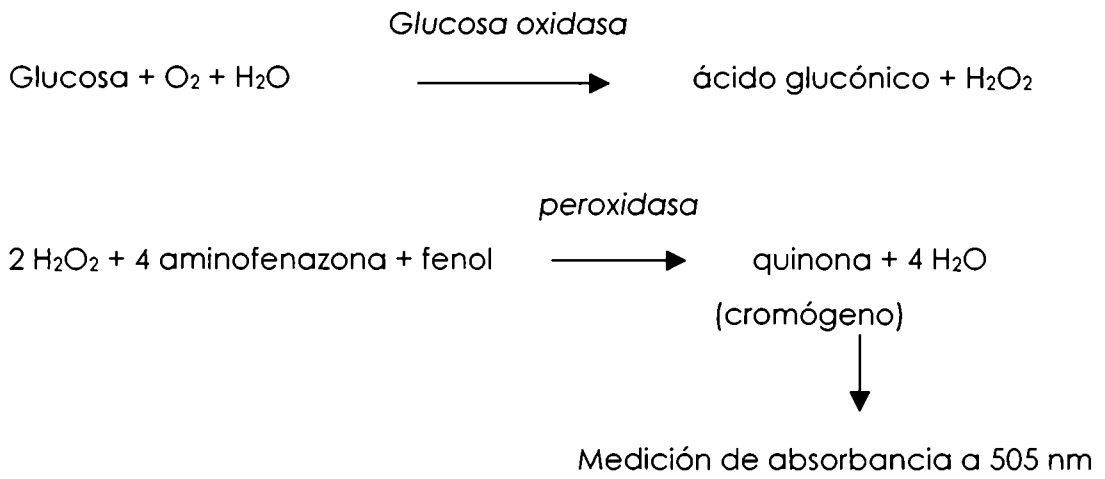
tiempos, y se determinó la actividad enzimática remanente como se describe a continuación.

III.G. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

La actividad enzimática se determinó en las matrices empleadas (excepto las de sacarosa) midiendo la cantidad de glucosa liberada luego de incubar los sistemas en presencia de lactosa (sustrato de la enzima β-galactosidasa). Se agregó 1 ml de buffer fosfato (0.1M, pH 6.9) a cada vial conteniendo la muestra deshidratada y se mantuvieron los sistemas a 5°C hasta la disolución completa de los sólidos. Se incorporaron luego 2 ml de una solución al 15% (p/v) de lactosa, condición en la cual la enzima opera a sustrato saturante (el K_M de la enzima β-galactosidasa, obtenido por distintos autores en productos lácteos o en sistemas modelo con buffer y lactosa, está entre 40 y 112 mM (Leiras, 1992)). Los sistemas se incubaron durante 60 minutos en un baño de agua a 37°C, luego de los cuales, la inactivación se realizó exponiendo las muestras a 80°C durante 3 min. Se determinó el grado de hidrólisis de lactosa midiendo la concentración de glucosa, uno de los productos de la reacción. Se utilizó el método enzimático Trinder modificado (Wiener Lab. Argentina, Bergmeyer y Grassi, 1983) basado en la oxidación de la glucosa por la enzima glucosa-oxidasa a ácido glucónico y peróxido de oxígeno. En presencia de peroxidasa, este último compuesto produce una reacción oxidativa del fenol con la 4-aminofenazona, produciéndose un

cromógeno color rojo que se puede medir en espectrofotómetro a una longitud de onda de 505 nm. Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro Carl Zeiss Spekol UV-Vis.

El esquema de reacción del método es el siguiente:



En sistemas que contenían sacarosa se observó la liberación de glucosa durante el tratamiento térmico por hidrólisis parcial del azúcar. Por lo tanto, en estas matrices, la actividad enzimática no se pudo determinar midiendo la glucosa generada empleando lactosa como sustrato y se determinó midiendo la cantidad de o-nitrofenol producido en presencia del sustrato o-nitrofenil-β-D-galactopiranósido (ONPG) (Park y col., 1979). Se agregaron 2ml de buffer fosfato (0.1 M, pH 6.9) a cada vial y se mantuvieron a 5°C hasta la disolución completa de los sólidos. Se tomaron 0.25 ml de una dilución apropiada de la solución conteniendo la enzima y se incubaron 5 minutos a 33°C en presencia de 0.25 ml de una solución del sustrato ONPG (0.25 g / 100 ml de buffer fosfato 0.1 M, pH 6.9). Luego de la incubación, la enzima se inactivó agregando 0.5 ml

de una solución de carbonato de sodio (10% p/v), se agregaron 2 ml de agua destilada y se determinó la cantidad de o-nitrofenol liberado midiendo la absorbancia a 420 nm y refiriéndola a la absorbancia de una muestra de referencia.

La determinación de actividad enzimática en todos los sistemas modelo estudiados, se realizó en base a mediciones por duplicado de cada muestra, y como por cada tiempo se extrajeron dos muestras, cada valor informado es el promedio de 4 mediciones. Para este número de mediciones se calculó un error relativo del 5%.

La cantidad de sustrato (lactosa u ONPG) hidrolizado después de un tratamiento dado (S) se relacionó con la cantidad de sustrato hidrolizado en la condición inicial (S_o) y la actividad remanente (AR) fue calculada como:

$$AR = 100 \cdot (S/S_o) \qquad (III.3)$$

III.H. ISOTERMAS DE SORCIÓN DE AGUA.

Se determinaron las isotermas de sorción de agua para las matrices mezcla T/Mg de R= 5 y 1 (preparadas como se describe en el punto III.C.2). En este caso, alícuotas de 3 ml de cada solución se distribuyeron en pesafiltros. Los sistemas se congelaron durante 24 horas a –26°C, se sumergieron en nitrógeno líquido y se liofilizaron (liofilizador Heto Lab Equipment Cooling Trap modelo CT 110 (Heto Lab Equipment, Dinamarca) que opera a –110°C en la placa

condensadora y a una presión de menos de 4.10^{-4} mbar en la cámara. Luego del liofilizado, las muestras se secaron en estufa de vacío 48 hs. a 90°C, para que el contenido de agua fuera W < 0.03 en todos los casos, y se expusieron a distintas humedades relativas (rango 11-84%). Se determinó el contenido de agua de las muestras (como se describió en el punto III.D) en función del tiempo de exposición a las distintas H.R. hasta alcanzar la condición de equilibrio (diferencias de peso menores que 0.0005 g).

III.I. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC).

Se utilizó un calorímetro diferencial de barrido DSC 30 Mettler TA 4000, procesador TC11 TA y sistema de análisis térmico TA72. Para evitar fenómenos de distorsión observados al comienzo y final del calentamiento o enfriamiento, las determinaciones se realizaron en todos los casos comenzando el barrido por lo menos 30°C por debajo de la temperatura esperada para el inicio de una dada transición y finalizando por lo menos a una temperatura 10°C mayor.

El equipo se calibró con indio (punto de fusión 156,6°C), plomo (punto de fusión 327,5°C) y zinc (punto de fusión 419,6°C). Las muestras se colocaron en cápsulas de aluminio (Mettler aluminium pan, 40µl) herméticamente cerradas, se pesaron para determinar la masa (7-15 mg/cápsula según el tipo de material) y se midieron utilizando como referencia una cápsula de aluminio pinchada vacía en todas las mediciones. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado o triplicado y se informó el valor promedio.

III.I.1. DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA DE TRANSICIÓN VÍTREA (T_g).

Las temperaturas de transición vítrea de gran parte de los sistemas modelo estudiados se determinaron en forma dinámica (velocidad de calentamiento 10°C/min.) a partir de las discontinuidades detectadas en las curvas de flujo de calor versus temperatura. La T_g se consideró como la temperatura a la cual comienza el cambio en el calor específico (valor "onset") que se detecta en el termograma como un corrimiento endotérmico en la línea de base.

Las temperaturas de transición vítrea correspondientes a matrices de PVP 40, almidón de trigo nativo, algunos sistemas de sacarosa y maltodextrinas de diferentes masas molares, fueron obtenidas por Buera y col. (1992), Zeleznak y Hoseney (1987), Kedward y col. (1998) y por Roos y Karel (1992) respectivamente, siguiendo la misma metodología empleada en este trabajo.

Para determinar la temperatura de transición vítrea de la enzima β-galactosidasa pura, se dializó la solución enzimática (para eliminar de esta manera compuestos de bajo peso molecular que pudieran estar presentes en la sulución comercial y que podrían afectar la determinación de T_g). Utilizando una membrana de corte 10000 se suspendieron 20 ml de la enzima comercial en un recipiente conteniendo 2 litros de agua destilada que se mantuvo durante 4 días a 5°C. El volúmen de agua se renovó 2 veces por día, durante los 2 primeros días de diálisis y 1 vez por día, los útimos dos días. La solución dializada se deshidrató por liofilización (como se describe en la sección III.C.2) y se expuso durante una semana sobre perclorato de magnesio o sobre

soluciones salinas saturadas que permitieron obtener humedades relativas de 33 y 43%.

III.I.2. DETERMINACIÓN DE TEMPERATURAS DE CRISTALIZACIÓN Y GRADO DE CRISTALINIDAD.

Se realizaron mediciones dinámicas para determinar temperaturas de cristalización (T_c) y entalpías de cristalización (ΔH_c) o fusión (ΔH_f) de azúcar, en algunos de los sistemas modelo deshidratados, o de agua, en sistemas amorfos congelados (W= 0.4). En todos los casos el calentamiento se realizó a una velocidad de 10°C/min. Las temperaturas de cristalización informadas corresponden a la temperatura a la cual la curva comienza a desviarse de la línea de base para dar el pico exotérmico de cristalización. Los valores de entalpía de cristalización o fusión se obtuvieron calculando el área de la transición exotérmica o endotérmica respectivamente, en relación a la masa de muestra.

La fracción cristalina (α) en sistemas conteniendo trehalosa luego de un cierto tratamiento, se calculó relacionando la entalpía de fusión obtenida en forma dinámica luego del tratamiento, con el valor de entalpía de fusión obtenido para el cristal dihidrato puro de trehalosa (139 J/g) medido en las mismas condiciones.

III.I.3. EVALUACIÓN DE CINÉTICAS DE CRISTALIZACIÓN.

La cinética de cristalización de azúcares en sistemas amorfos se analizó empleando DSC. Los estudios se realizaron a partir de mediciones isotérmicas y a partir de mediciones realizadas en forma dinámica. En las determinaciones isotérmicas, las muestras se colocaron en el horno del DSC una vez alcanzada la temperatura deseada y se registraron los cambios en el flujo de calor en función del tiempo. A partir de los termogramas isotérmicos, la cinética de cristalización de un dado azúcar (sacarosa o lactosa) se obtuvo calculando la entalpía de cristalización (por integración del pico exotérmico) en función del tiempo de calentamiento (Figura III.1). Se obtuvo la fracción cristalina (α) en función del tiempo de calentamiento refiriendo integraciones parciales del pico con el área o entalpía total. El tiempo de inducción y el tiempo necesario para que el azúcar cristalice completamente, se consideraron como el tiempo al cual se inicia o finaliza el pico exotérmico de cristalización, respectivamente.

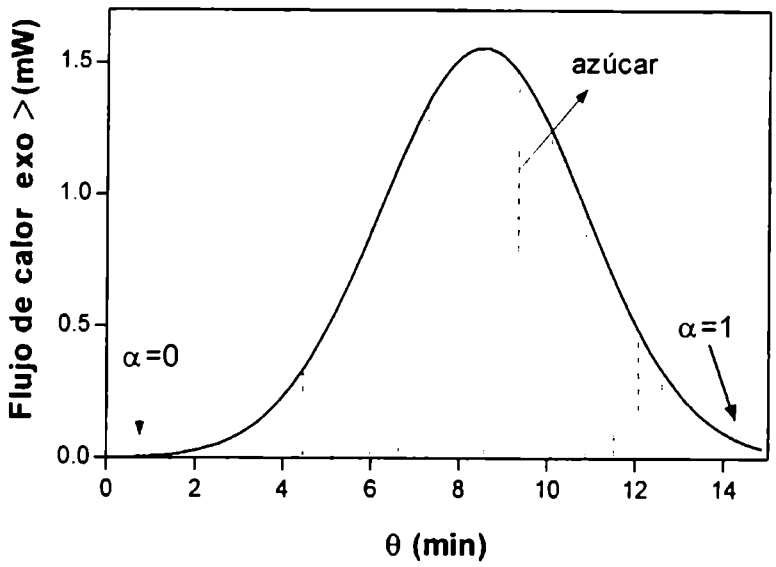


Figura III.1: *Esquema de la cristalización isotérmica de un azúcar, determinado por DSC. La fracción cristalina (α) en función del tiempo de calentamiento se obtiene refiriendo integraciones parciales del pico con el área total.*

La cinética de cristalización de trehalosa y trehalosa en presencia de sales se estudió durante el almacenamiento de los sistemas a 43% H.R. y 25°C. Estas condiciones aseguraron la cantidad de agua (W= 0.1) y la movilidad ($T-T_g$= 15°C) suficientes para que se forme el cristal dihidratado. La fracción cristalina se calculó relacionando el área del pico endotérmico determinado en este caso en forma dinámica por DSC a distintos tiempos de almacenamiento, con el área correspondiente a la fusión del dihidrato puro (139 J/g) medido en las mismas condiciones.

La fracción cristalina, determinada a partir de termogramas isotérmicos o dinámicos, se graficó en función del tiempo y se analizó usando la ecuación JMAK (sección I.B.5.2, Ec. I.4).

III.J. MICROSCOPÍA ÓPTICA CON LUZ POLARIZADA (M.O.).

Para la evaluación de cambios físicos por microscopía se utilizó un microscopio óptico con luz polarizada (Olympus BX50 microscope with polarizer filters) y una platina (Linkam TMS 92) acoplada al microscopio que permitió controlar la temperatura y la velocidad de calentamiento de la muestra. Las imágenes se obtuvieron utilizando una cámara de video (JVC TK-128E) conectada al microscopio y a una computadora (se utilizó el programa Paint Shop Pro Image (versión 7.00 Evaluation) para recoger las imágenes). El microscopio se utilizó con un objetivo 10X.

La preparación de la muestra se realizó como se describe en la sección III.C. En este caso, una pequeña porción de las matrices liofilizadas se colocó en el interior de un aro de goma montado sobre un portaobjetos (Figura III.2). La muestra en este dispositivo se colocó 48 horas a 25°C en desecadores de vacío que contenían soluciones salinas saturadas de diferente humedad relativa (33, 43 y 52%). Luego de la humidificación, el dispositivo se selló con un segundo portaobjetos para mantener constante la humedad de la muestra, y se colocó sobre la platina térmica del microscopio. En todos los casos se realizó un tratamiento isotérmico, con una rampa inicial de 50°C/min para alcanzar la temperatura final seleccionada (60-110°C±2°C). Se observaron los cambios físicos (vidrio-líquido sobreenfriado-cristalización) en función del tiempo.

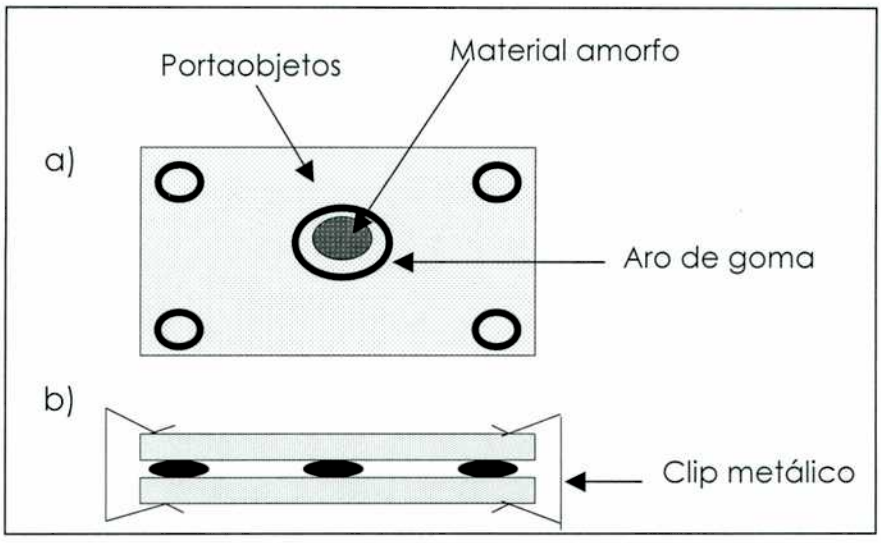


Figura III.2: *Esquema del dispositivo empleado para analizar por microscopía óptica con luz polarizada las características y cambios físicos de azúcares sometidos a tratamiento térmico. a) El anillo central contiene la muestra, los aros de goma en las esquinas facilitan el sellado. b) Vista lateral del dispositivo sellado.*

III.J.1. EVALUACIÓN DE CINÉTICAS DE CRISTALIZACIÓN.

La cinética de cristalización se evaluó determinando el área de cristales aislados en función del tiempo de calentamiento en la platina usando el programa Scion Image (Release Beta 4.0.2) para analizar imágenes. El crecimiento en cada caso se siguió mientras podían analizarse cristales individuales, el campo de observación del microscopio se movió durante el experimento en los casos en los cuales parte del área del cristal comenzaba a crecer fuera del campo inicial. Usando esta metodología se evaluaron muestras de lactosa y mezclas L/T (80:20) liofilizadas y humidificadas a 33% H.R., a varias temperaturas (60, 63, 65, 70 y 80°C para lactosa y 70, 80, 90 y 95°C

para L/T). Se hicieron al menos triplicados para cada condición y se siguió el crecimiento de 1 a 5 cristales por muestra. Se graficó el área de los cristales (en vez del % de cristalinidad) en función del tiempo ya que surgieron dificultades para definir el área máxima de cristalización. Algunos autores (Aguilera y Soto, 2000) definieron el área máxima de crecimiento de un cristal como la mayor área que puede evaluarse dentro del campo de observación, o bien el área a partir de la cual los cambios de tamaño en el tiempo se hacen muy lentos. Estas opciones serían decuadas para analizar cinéticas iniciales de cristalización. Trabajando con azúcares amorfos, la segunda opción sólo podría lograrse trabajando a temperaturas cercanas al valor de T_g donde el proceso de cristalización es excesivamente lento. Las curvas de variación de tamaño de los cristales en función del tiempo se ajustaron al modelo de regresión lineal y se empleó el valor de la pendiente para describir la velocidad de crecimiento en cada caso. Para tener una estimación de la velocidad global de cristalización de lactosa o de lactosa en presencia de trehalosa en función de la temperatura de calentamiento isotérmico, se calculó una pendiente o velocidad promedio para cada condición.

El tiempo necesario para que el azúcar amorfo cristalizara completamente a partir de la matriz amorfa, se consideró como el tiempo al cual una muestra de 4-6 mm de diámetro (similar al diámetro que tienen las muestras en las cápsulas usadas en el DSC) se observaba completamente cristalizada.

III.K. CINÉTICA DE PROCESOS Y DEPENDENCIA CON LA TEMPERATURA.

La dependencia de las velocidades, ya sea de inactivación enzimática o de cristalización de azúcares con la temperatura, se analizó utilizando los modelos teóricos de Arrhenius, Williams-Landel-Ferry (WLF) (método de variables reducidas) y Vogel-Tamman-Fulcher (VTF) descriptos en la sección I.B.7, ecuaciones (I.7), (I.11) e (I.17), respectivamente. Cuando se analizó la dependencia de la inactivación enzimática con la temperatura, la constante *K* que aparece en las distintas ecuaciones, correspondió a la constante de inactivación enzimática (K_i). En los estudios de cristalización de azúcares, *K* se consideró como la constante de cristalización (K_c) o como el tiempo medio de cristalización ($\tau_{1/2}$) que fue calculado a partir de la ecuación (I.6), sección I.B.5.2.

III.L. DIFRACCIÓN POR RAYOS-X.

Se realizaron análisis de difracción por rayos-X utilizando un difractómetro Siemens D5000, modo θ-2θ, radiación de CuKα (λ= 1.5406 Å) y un monocromador de grafito, desde 5 a 50 grados (step size 0.02 degree and 0.7 second/step). Se empleó el software Diffract AT para resolver los picos de difracción.

III.M. TRATAMIENTO DE DATOS.

El modelado de los datos experimentales y regresiones presentados se realizó utilizando programas provistos por la biblioteca (Graph Pad Prism V3.1), a través de correlación lineal o no lineal, según los casos. Este programa minimiza el cuadrado de la diferencia entre los valores predichos y experimentales.

IV. Resultados

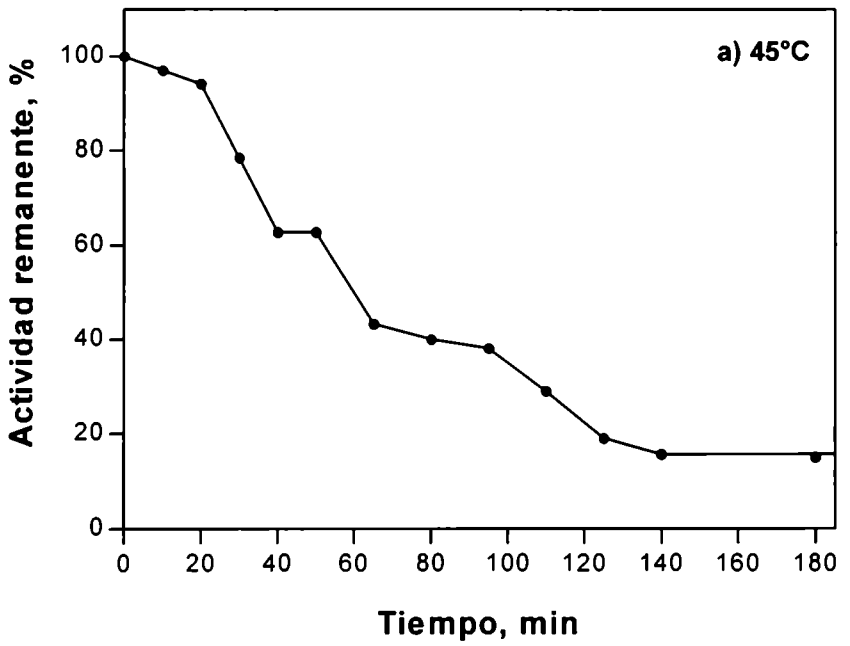
IV.A. ESTABILIDAD TÉRMICA DE β-GALACTOSIDASA EN MATRICES AMORFAS.

La deshidratación de distintos biomateriales (enzimas, polen, anticuerpos, hormonas, microorganismos) en presencia de polímeros o hidratos de carbono que permiten la obtención de una estructura vítrea, ha permitido aumentar la estabilidad y mejorar la manipulación de estos materiales (Aguilera y Karel, 1997).

El concepto de que la transición vítrea es un factor fundamental en el control de la estabilidad tanto física como química y biológica de alimentos deshidratados adquirió gran aceptación en la década del 90 (Slade y Levine, 1991; 1993). Como la movilidad molecular está restringida en un sistema vítreo, los cambios físicos y químicos que dependen de la difusión de los reactivos involucrados estarían inhibidos (Franks, 1993). Los cambios conformacionales que dan lugar a la desnaturalización proteica como así también las reacciones intra e intermoleculares que afectan su funcionalidad, estarían limitados en un medio altamente viscoso. En este sentido, las enzimas constituyen un sistema modelo adecuado para estudiar los distintos factores (humedad, temperatura, estructura física y tipo de matriz) que afectan la estabilidad en sistemas amorfos de baja humedad.

Se empleó la enzima β-galactosidasa como sistema modelo para analizar en sistemas liofilizados la capacidad protectora de distintos agentes estabilizantes en relación con el estado físico-químico y la temperatura de transición vítrea de la matriz.

Como estudio preliminar, se estudió la actividad remanente en medio líquido y luego del proceso de liofilización en ausencia de aditivos. Se partió de una solución conteniendo 35 UE/ml de buffer. En la Figura IV.A.1. (a, b) se observa que en medio líquido (buffer fosfato, pH 6.9) la actividad remanente disminuye a medida que aumenta el tiempo de incubación, siendo la "vida media" (tiempo para reducir la actividad de la enzima a un 50% de su valor inicial), aproximadamente de 60 minutos a 45°C (Fig. IV.A.1.a) y menos de 0.5 min. a 55°C (Fig. IV.A.1.b). Estos resultados muestran que la enzima tiene baja resistencia térmica en medio líquido. Mahoney y Wilder (1987) informaron un tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de 1.1 min. para la enzima lactasa de *Escherichia Coli* en buffer fosfato (con adición de NaN_3 y $MgCl_2$) a 60°C. Estos autores encontraron también que el $t_{1/2}$ de lactasa variaba con el lote y disminuía con el tiempo de almacenamiento tanto en estado líquido como deshidratado.



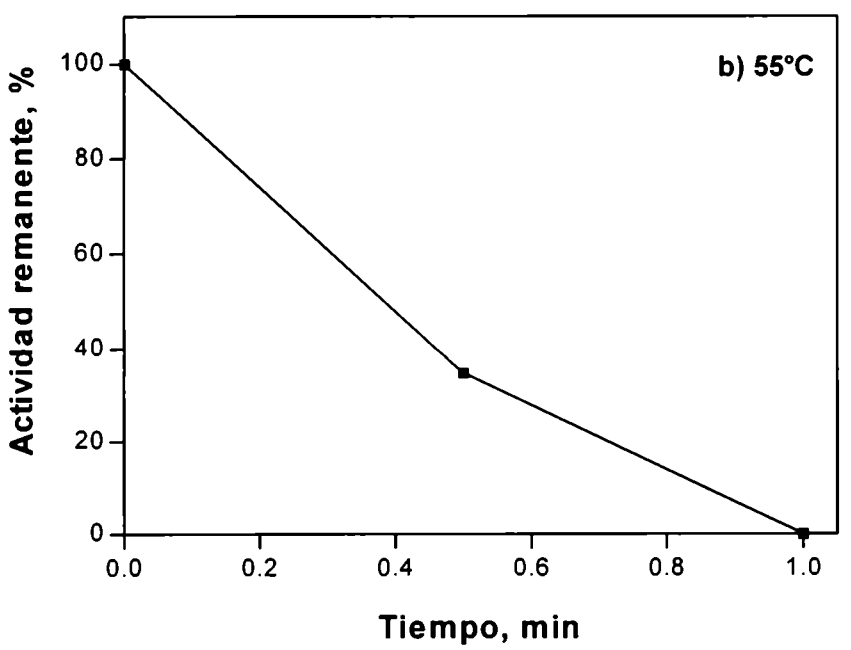


Figura IV.A.1.: *Actividad remanente de lactasa en medio líquido (35 UE/mL, buffer fosfato pH: 6.9), en función del tiempo de calentamiento a 45°C (a) y a 55°C (b).*

Luego de analizar la estabilidad en medio líquido, se estudió la actividad remanente de la enzima lactasa luego del proceso de liofilización a partir de una solución acuosa de la enzima (35 UE/mL). Las muestras se congelaron durante 24 horas a –26°C y se liofilizaron durante 48 horas bajo condiciones fijas de presión y temperatura (ver sección III.C.2). La actividad remanente luego de este proceso de deshidratación fue menor del 2%. Si bien la liofilización permite aumentar la estabilidad de biomateriales lábiles durante el almacenamiento, es sabido que el proceso en sí mismo inactiva ciertas proteínas (Carpenter y col., 1987; Izutsu y col., 1995) y que para evitar estos efectos negativos tienen que estar presentes durante el proceso determinados componentes (Colaço y col., 1992; Palumbo y col., 1995; Whitaker, 1995; Crowe y col., 1998). En estos trabajos se presenta a los azúcares y otros compuestos polihidroxílicos, incluyendo polímeros, como compuestos que pueden actuar adecuadamente como estabilizantes de enzimas. En el presente trabajo la adición de ciertos polímeros o azúcares a la solución de β-galactosidasa evitó la inactivación de la enzima durante del proceso de liofilización. En presencia de dichos compuestos la actividad remanente fue de un 80-90% (dependiendo de la matriz empleada) respecto a la actividad de la enzima en la solución, previo a la congelación y secado (Figura IV.A.2)

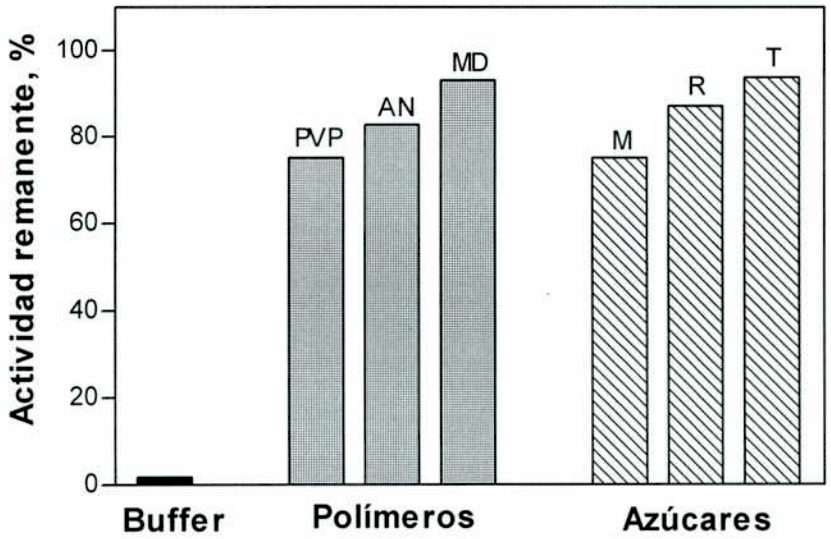


Figura IV.A.2.: *Actividad remanente de lactasa luego del proceso de liofilización de soluciones acuosas que contenían la enzima (35 UE/ml de buffer) o soluciones conteniendo polímeros o azúcares (20% p/v).*

IV.A.1. ESTABILIDAD TÉRMICA DE β-GALACTOSIDASA EN MATRICES POLIMÉRICAS DESHIDRATADAS.

Las matrices poliméricas empleadas fueron polivinilpirrolidona (Mr 40000 (PVP 40)), maltodextrina (Mr (720-3600) (MD)) y almidón nativo (AN). Las maltodextrinas y el PVP son polímeros totalmente amorfos empleados como excipientes en la industria farmacéutica o como ingredientes en la industria de alimentos. Las maltodextrinas están constituídas por unidades de glucosa unidas en posición α 1-4. El PVP es un polímero sintético, soluble en agua y de masa molar elevada (Mr 10000-360000). El almidón nativo en cambio, es un material semicristalino compuesto a nivel molecular por polímeros de amilopectina (unidades de glucosa con uniones α 1-4 y α 1-6) y de amilosa (unidades de glucosa con uniones α 1-4) que se disponen en gránulos y le dan una estructura supramolecular compleja. Se informó su empleo para la conservación de microorganismos (Tan y col., 1995). Luego de la liofilización las maltodextrinas y el PVP forman una matriz amorfa porosa y reticular, mientras que el almidón forma una estructura también porosa pero particulada (friable).

Los sistemas modelo conteniendo la enzima y la matriz se liofilizaron, se almacenaron a temperaturas mayores y menores que la temperatura de transición vítrea correspondiente (en un rango de 37 a 80°C) y se analizó la estabilidad enzimática en el estado vítreo y sobreenfriado.

IV.A.1.1. Efectos de la temperatura, el contenido de agua y la T_g.

En la Tabla IV.A.1. se muestra el contenido de agua y los valores de temperatura de transición vítea (T_g) determinados para matrices liofilizadas de PVP 40, maltodextrina (MD 1800) y almidón equilibradas en atmósfera de distintas humedades relativas (H.R.). En la tabla se incluyen datos obtenidos en el presente trabajo y datos de bibliografía. Como el almidón nativo tiene una T_g mucho más alta que MD 1800 o PVP 40 a igual contenido acuoso, el almidón se humidificó a humedades relativas mayores para que los valores de T_g fueran comparables con los valores de los demás sistemas.

Tabla IV.A.1. *Contenido de agua y T_g de matrices de PVP 40, maltodextrina y almidón (liofilizadas y equilibradas a distintas humedades relativas).*

Matriz	H.R. %	Fracción en masa de agua (W)	T_g (°C)
PVP 40,000 [a]	22	0.071	63
	33	0.093	55
	43	0.133	48
	75	0.242	-1
MD 1800	22	0.039	81
	43	0.065	42
	75	0.099	13
Almidón [b]	57	0.130	95
	75	0.141	74
	90	0.188	58

(a) Buera y col. (1992); [b] *Zeleznak y Hoseney,(1987).*

En la Figura IV.A.3. se muestra como ejemplo el termograma obtenido por calorimetría diferencial de barrido para una matriz de MD 1800 liofilizada y equilibrada en una atmósfera de humedad relativa 75%. Los valores de T_g obtenidos se encuentran en el rango esperado de acuerdo con los valores informados previamente por Roos y Karel, (1991a). La presencia de la enzima no modificó los valores de T_g de la matriz.

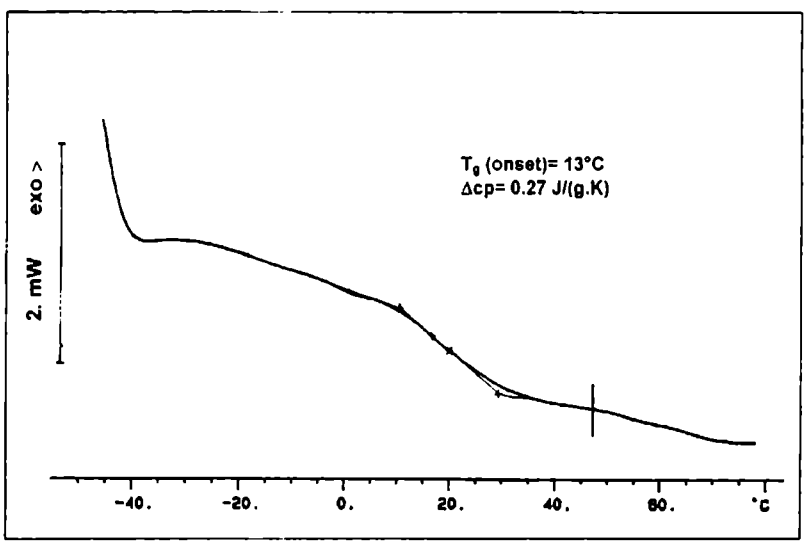


Figura IV.A.3.: *Termograma obtenido por DSC para una matriz de maltodextrina (MD 1800) liofilizada y expuesta durante 7 días a una atmósfera de humedad relativa 75%.*

En las Figuras IV.A.4, 5 y 6 se muestra la actividad remanente de la enzima lactasa en matrices de PVP 40, maltodextrina (MD 1800) y almidón humidificadas a distintas humedades relativas (22-90% H.R.) en función del tiempo de almacenamiento a varias temperaturas (37-80°C). Para PVP 40 y MD 1800 se comparó a cada H.R., la estabilidad a diferentes temperaturas. En la matriz de almidón, como el efecto de la temperatura fue muy importante,

para poder visualizar mejor los resultados se representó para cada temperatura la estabilidad en sistemas de distinta H.R. La pérdida de actividad enzimática en el rango de temperaturas y humedades estudiado mostró una dependencia logarítmica en función del tiempo, ajustándose al comportamiento de una reacción de primer orden (característica de los procesos de desnaturalización de proteínas) según la ecuación:

$$v = k_i \cdot a$$

$$da/dt = k_i \cdot a$$

$$\ln a/a_0 = - k_i \cdot t \qquad \text{(IV.1)}$$

donde v: velocidad

t: tiempo de incubación

a_0: actividad de la enzima a t=0

a: actividad de la enzima al tiempo t

k_i: constante de inactivación

Multon y Guilbot (1975) observaron también cinéticas de primer orden para la inactivación térmica de enzimas en sistemas de baja humedad.

La enzima lactasa en presencia de PVP 40, maltodextrina o almidón fue resistente al proceso de liofilización (Fig. IV.A.2) y además fue mucho más estable al tratamiento térmico que en medio líquido (por ej. a 45°C la "vida media" en matrices de PVP 40 deshidratadas, está en el orden de cientos de horas, mientras que en medio líquido fue de aproximadamente 60 minutos). Otros autores encontraron resultados similares trabajando con otras enzimas.

Whitaker (1995) observó que la estabilidad de enzimas como lisozima y ribonucleasa aumentó marcadamente en sistemas de baja humedad respecto a la estabilidad observada en soluciones buffer diluídas almacenadas a la misma temperatura. Por ejemplo en el trabajo mencionado, la vida media a 145°C de la enzima ribonucleasa conteniendo 6% de humedad fue de dos horas, mientras que en solución diluída, la inactivación de la enzima fue demasiado rápida (fracción de segundos) como para poder medir el tiempo. De igual manera, Schebor y col. (1997) observaron que la vida media de la enzima invertasa en medio líquido a 90°C fue de 4 min. y aumentó a 2400 min. en una matriz deshidratada de maltodextrina almacenada a la misma temperatura.

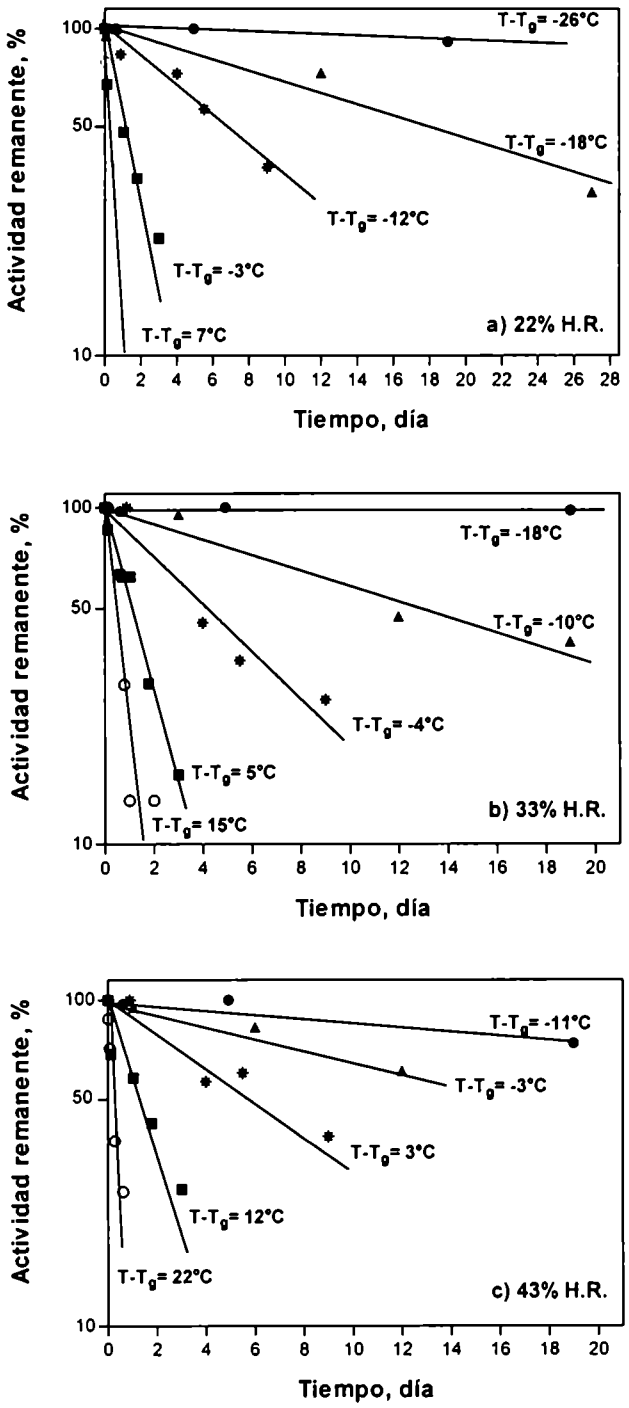


Figura IV.A.4.: *Cinéticas de primer orden para la inactivación de lactasa en matrices de PVP 40 liofilizadas y expuestas durante 7 días a (a) 22%, (b) 33% y (c) 43% H.R.. Los distintos sistemas se almacenaron a varias temperaturas:*
• 37°C, ▲ 45°C, ✳ 51°C, ■ 60°C, O 70°C

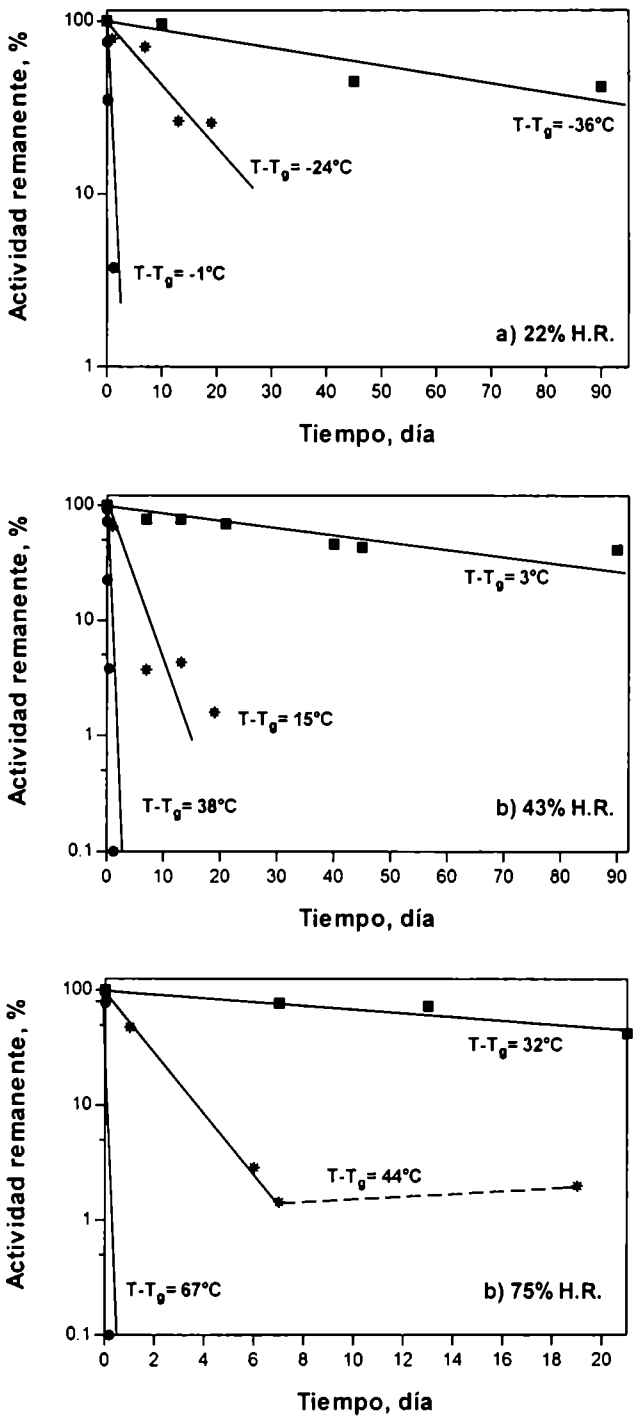


Figura IV.A.5: *Cinéticas de primer orden para la inactivación de lactasa en matrices de maltodextrina (MD 1800) liofilizadas y expuestas durante 7 días a 22% (a), 43% (b) y 75% H.R.(c). Los sistemas se almacenaron a distintas temperaturas:* ■ 45°C, ✳ 57°C, • 80°C.

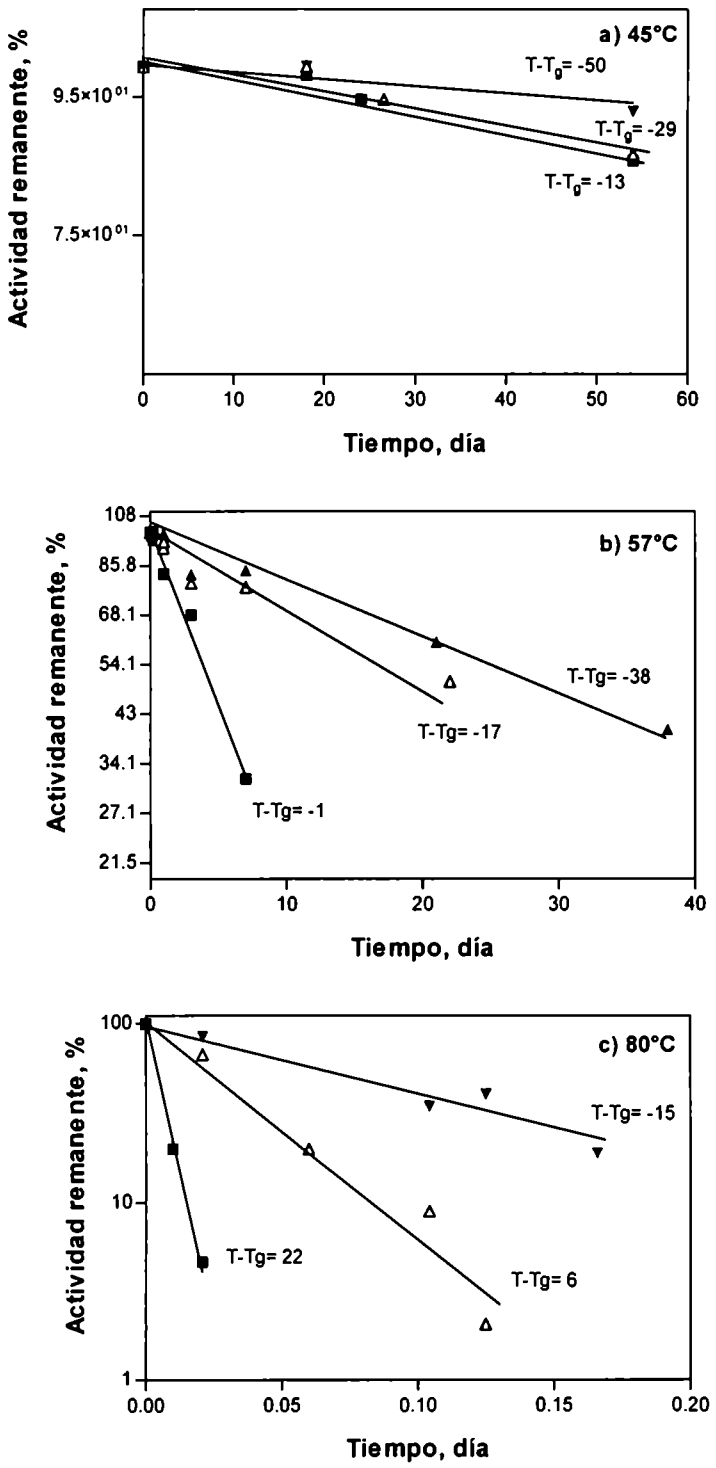


Figura IV.A.6: *Cinéticas de primer orden para la inactivación de lactasa en matrices de almidón (AN) liofilizadas y expuestas durante 7 días a ▼ 57%, △ 75% y ■ 90% H.R.. Los sistemas se almacenaron a distintas temperaturas a)* 45°C, b) 57°C, c) 80°C.

Las Figuras IV.A.4, 5 y 6, muestran que a una dada temperatura la actividad remanente en matrices de PVP 40, maltodextrina, y almidón disminuye al aumentar el tiempo de incubación y el contenido de humedad. La diferencia entre la temperatura de almacenamiento (T) y la temperatura de transición vítrea (T_g) (indicada en las Figs. IV.A.4, 5 y 6 como ($T-T_g$)), ha sido usada por distintos autores como un parámetro adecuado para describir la magnitud de cambios en propiedades físicas y reacciones químicas controladas por difusión, que ocurren a temperaturas mayores que T_g (Roos y Karel, 1991a, 1992). El aumento de la velocidad de reacciones de deterioro a partir de valores de ($T-T_g$) cercanos a cero ocurriría como consecuencia de la disminución de viscosidad y aumento de la movilidad que sufre un sistema al acurrir la transición vítrea. La desnaturalización proteica implica el movimiento de grandes grupos de átomos con la consecuente pérdida de la función biológica de la molécula. Por lo tanto, se esperaría alta estabilidad enzimática en el estado vítreo donde la movilidad está restringida y una inactivación drástica a temperaturas cercanas pero superiores al valor de T_g de la matriz. Sin embargo, los experimentos realizados mostraron que aún cuando las matrices se encontraban en estado vítreo (($T-T_g$)<0), la pérdida de actividad de la enzima lactasa fue importante, principalmente a temperaturas de almacenamiento suficientemente altas (60-80°C), y no se observaron diferencias importantes en la estabilidad a valores de ($T-T_g$) cercanos a cero. La temperatura de calentamiento sería un factor importante en la inactivación de lactasa en sistemas semihúmedos de PVP 40, MD 1800 o almidón. Schebor y

col. (1996) y Terebiznik y col. (1998) obtuvieron resultados similares trabajando con las enzimas Invertasa y α-amilasa respectivamente.

El colapso es un fenómeno físico causado por el flujo viscoso que resulta de la disminución de la viscosidad a temperaturas superiores a la de la transición vítrea (Roos, 1995). Se produce una pérdida de la estructura debido a que el material es incapaz de soportar su propio peso. En la Figura IV.A.7 se muestra la diferencia en el aspecto físico de una matriz amorfa en estado vítreo y en estado de líquido sobreenfriado. La observación visual macroscópica del estado físico de los sistemas analizados en las Figs. IV.A.4, 5 y 6 coincidió con lo esperado a partir de sus valores de T_g.

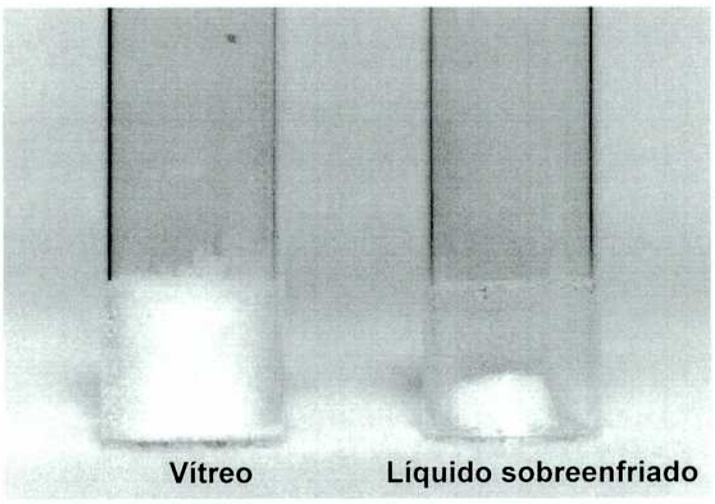


Figura IV.A.7: *Aspecto físico de una matriz amorfa en estado vítreo y en estado de líquido sobreenfriado.*

A partir del tratamiento de los datos con el modelo cinético de primer orden (Ec. (IV.1), Figs. IV.A.4, 5 y 6) se calcularon las constantes de inactivación

(k_i) para las distintas humedades y temperaturas de almacenamiento, los coeficientes de correlación correspondientes mostraron un buen ajuste en todos los casos (los resultados se muestran en la Tabla IV.A.2). El error relativo estimado para las constantes fue del 6 al 12%. Debido a que en la matriz de PVP 40 a cualquiera de las humedades relativas estudiadas (22, 33 y 43% H.R.) se perdió menos del 10% de actividad a 37°C, la constante de inactivación no pudo ser evaluada a esta temperatura, ya que una baja pérdida introduce un error muy grande en el cálculo de la constante. Por este mismo motivo tampoco se calculó la constante de inactivación en almidón humidificado a 57% H.R. y almacenado a 45°C.

Tabla IV.A.2: Constantes de inactivación (k_i) de la enzima lactasa en sistemas amorfos de PVP 40, calculadas con un ajuste correspondiente a una cinética de orden 1, para las distintas humedades y temperaturas de almacenamiento analizadas. Se muestra también el coeficiente de correlación lineal (r^2) correspondiente.

a) PVP 40.

Temperatura (°C)	22% H.R.		33% H.R.		43% H.R.	
	k_i (h^{-1})	r^2	k_i (h^{-1})	r^2	k_i (h^{-1})	r^2
45	0.001692	0.98	0.002808	0.99	0.001396	0.99
51	0.004285	0.98	0.006705	0.97	0.004540	0.97
60	0.01526	0.74	0.02509	0.99	0.01626	0.97
70	0.1557	0.99	0.05902	0.96	0.08848	0.96
80	0.5354	0.94	0.3692	0.98	1.8388	0.93

b) Maltodextrina (MD 1800).

Temperatura (°C)	22% H.R. k_I (h^{-1})	r^2	43% H.R. k_I (h^{-1})	r^2	75% H.R. k_I (h^{-1})	r^2
45	0.000441	0.84	0.000411	0.80	0.00163	0.93
57	0.00311	0.89	0.0088	0.84	0.02465	0.99
80	0.103	0.95	0.223	0.96	1.427	0.99

c) Almidón (AN).

Temperatura (°C)	57% H.R. k_I (h^{-1})	r^2	75% H.R. k_I (h^{-1})	r^2	90% H.R. k_I (h^{-1})	r^2
45	_		0.0000618	0.89	0.000121	0.89
57	0.001294	0.87	0.001294	0.94	0.00672	0.99
80	1.208	0.95	1.208	0.96	6.142	0.99

La dependencia de las constantes de inactivación enzimática con la temperatura se analizó en la matriz de PVP 40 (donde la estabilidad de la enzima se estudió a varias temperaturas (en un rango de 37 a 80°C)), utilizando los modelos de Arrhenius, Williams-Landel-Ferry (WLF) y Vogel-Tamman-Fulcher (VTF) (Eq. (I.7), (I.11) y (I.17), sección I.B.7). La representación gráfica de las formas logarítmicas de los distintos modelos (sección I.B.7) debe ajustar a una línea recta si el modelo es adecuado para describir los datos experimentales. En la Tabla IV.A.3 se muestran para la inactivación de la enzima en PVP 40, los coeficientes obtenidos para cada modelo, cuyo error relativo estimado fue de entre el 15 y el 20%.

Tabla IV.A.3: Coeficientes calculados a partir de la representación gráfica de las ecuaciones linealizadas de arrhenius, WLF y VTF, para la inactivación de lactasa en matrices de PVP 40 humidificadas a distintas humedades relativas.

PVP 40	Arrhenius		WLF		VTF	
	E_a ((KJ/mol)	r^2	C_1	r^2	B	r^2
22% H.R.	157	0.99	3.08	0.94	3842	0.98
33% H.R.	125	0.99	3.42	0.95	3021	0.98
43% H.R.	182	0.97	6.34	0.92	4391	0.96

En la Figura IV.A.8 se muestran los gráficos de Arrhenius obtenidos para la inactivación de lactasa en la matriz de PVP 40 a distintas humedades relativas. Estudios previos ((Karmas y col., 1992; Kovarskii y col., 1978; Hori y col., 1986), ver sección I.B.7.1, Fig. I.8) indicaron que en sistemas de bajo contenido acuoso pueden ocurrir desviaciones de la cinética o quiebres en el gráfico de Arrhenius, debidos a cambios físicos. Se ha sugerido también que los cambios de difusión o reactividad a temperaturas cercanas pero mayores que el valor de T_g seguirían el comportamiento predicho por la ecuación WLF (Williams y col., 1955, Slade y col., 1989, Karel y Saguy, 1991). El modelo de WLF predice, empleando los coeficientes universales para esta ecuación (C_1= 17, C_2= 56), que la constante aumenta 600 veces desde T_g a (T_g+10) (Slade y col., 1989) y habría en consecuencia un desvío en el comportamiento de Arrhenius. Sin embargo, como se observa en la Fig. IV.A.8, las constantes de inactivación térmica de lactasa en matrices de PVP 40 de baja humedad, se ajustaron al comportamiento predicho por la ecuación linealizada de Arrhenius y no se observaron quiebres en las cercanías de la temperatura de transición vítrea.

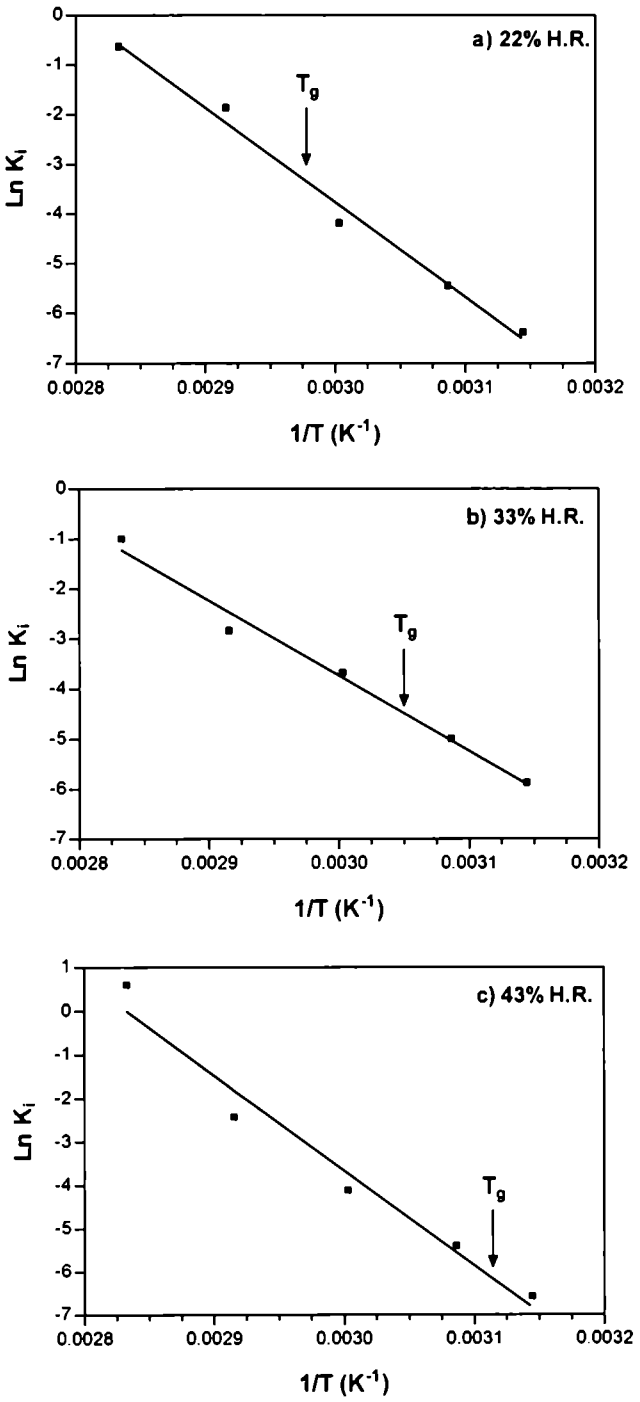


Figura IV.A.8: *Gráfico de Arrhenius mostrando la inactivación de lactasa en matrices de PVP 40 liofilizadas y expuestas durante 7 días a: (a) 22%, (b) 43% y (c) 75%H.R..*

Los gráicos de Arrhenius (Fig. IV.A.8) indicaron que la transición de la matriz donde se encuentra la enzima, del estado vítreo al sobreenfriado (estado de mayor movilidad molecular), no se vio reflejada en cambios drásticos en la velocidad de inactivación térmica, como se esperaría si este proceso fuera predecible en base a los cambios físicos de la matriz.

Los coeficientes de Arrhenius, WLF y VTF se estimaron para matrices de MD 1800 y almidón para tener un valor orientativo (ya que se obtuvieron usando tres temperaturas). En la Tabla IV.A.4 se compara el rango obtenido para cada coeficiente en las distintas matrices.

Tabla IV.A.4: Coeficientes de Arrhenius, WLF y VTF, estimados para la inactivación de lactasa en matrices de MD 1800 y almidón humidificadas a distintas humedades relativas.

Polímero	***H.R. %***	**Arrhenius** E_a (KJ/mol)	**WLF** C_1	**VTF** **B**
PVP 40	22-43	157-182	3.1-6.3	3800-4300
MD 1800	22-75	145-180	1-16	3500-4300
Almidón	75-90	255-288	2.5-7	6400-7036

Los valores de energías de activación (E_a) calculados a partir del modelo de Arrhenius (Tabla IV.B.4), fueron del orden de los normalmente obtenidos (160-290 KJ) para desnaturalización enzimática (Wang y col., 1979). Para la matriz de almidón habría una mayor dependencia de la inactivación enzimática con la temperatura ya que se estimaron energías de activación

mayores que en los demás sistemas y paralelamente se obtuvieron mayores valores del coeficiente B.

Para WLF el valor del coeficiente C_2 (50K) fue cercano al valor"universal" (51.6K) para cualquiera de los sistemas debido a las premisas y aproximaciones del método de variables reducidas empleado (Peleg, 1992). Sin embargo los valores obtenidos para C_1 fueron en general un orden de magnitud menores que el valor "universal" 17.44 (sólo para maltodextrina a 75% H.R. el valor fue cercano al valor "universal"). Buera y Karel (1993) calcularon los coeficientes C_1 y C_2 para la velocidad de pardeamiento no enzimático en diversos alimentos. Los coeficientes calculados fueron considerablemente diferentes de los llamados "universales" y además, como se observó también en este trabajo (Tabla IV.A.3), variaron al variar la humedad relativa de equilibrio. Karmas y col. (1992) encontraron que en un sistema de hidratos de carbono a $T > T_g$, el aumento de la velocidad de pardeamiento no fue tan grande como el predicho por WLF utilizando los coeficientes "universales". Nelson y Labuza, (1994) sugirió que esto no significa que el modelo no sea aplicable a dicha reacción, sino que deberían usarse otros coeficientes en la ecuación WLF para ese sistema. El valor del parámetro B obtenido para el modelo VTF fue mayor que el valor reportado por Parker y Ring (1995) (B= 1800) para viscosidad de sacarosa a distintas temperaturas.

En la Figura IV.A.9 se graficaron los tres modelos analizados y los datos experimentales obtenidos para la cinética de inactivación en sistemas de PVP 40 en función del parámetro ($T-T_g$). Se observa que para cualquiera de las humedades relativas estudiadas los modelos de Arrhenius o VTF serían los más adecuados para predecir la cinética de inactivación de la enzima en PVP 40 si

fuera necesario hacer alguna extrapolación. La ecuación de VTF describió bien los datos experimentales aún cuando el valor de uno de los coeficientes utilizados para el ajuste (T_o) (Eq. (I.17), sección I.B.7) fue tomado del valor obtenido por Parker y Ring (1995) para la dependencia de la viscosidad de sacarosa con la temperatura. La cinética de una reacción generalmente se puede describir mediante la ecuación de Arrhenius, el coeficiente de difusión en cambio puede seguir Arrhenius con un cambio de pendiente cercano al valor de T_g, o la ecuación WLF, especialmente en el rango de temperaturas entre 10 y 100 grados por encima de T_g. Por lo tanto, el tipo de ecuación que mejor refleje los cambios dependerá de la influencia relativa de cada uno de estos parámetros (Buera y Chirife, 1997). Considerando estas observaciones, los resultados de la Fig. IV.A.8 muestran que no habría un efecto marcado de los cambios físicos (disminución de viscosidad) que se producen a temperaturas cercanas a la T_g de la matriz sobre la inactivación de lactasa. En un rango de valores de ($T-T_g$) desde –20 hasta 35°C, las ecuaciones de Arrhenius y VTF representan modelos adecuados para describir la dependencia de la velocidad de inactivación con la temperatura (Fig. IV.A.9).

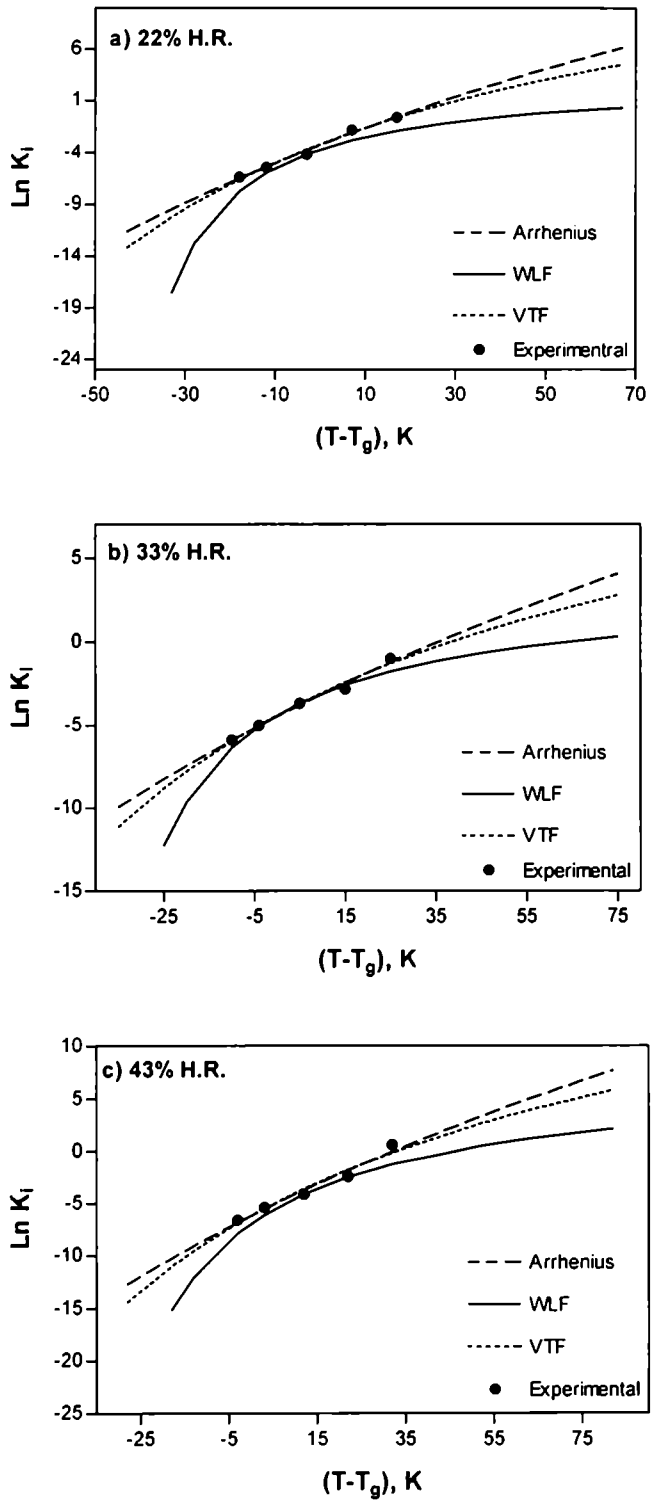


Figura IV.A.9: *Datos experimentales y curvas de predicción obtenidas por Arrhenius, WLF y VTF en función del parámetro $(T-T_g)$ para la inactivación de lactasa en matrices de PVP 40.*

IV.A.1.2. Efectos de la masa molar y de la conformación de la matriz.

Es sabido que para una dada matriz polimérica, la T_g aumenta al aumentar la masa molar (Fox y Flory, 1950) y depende de la estructura molecular (lineal, ramificada, cíclica) de la molécula (Levine y Slade, 1991). Por lo tanto a temperatura y humedad constante, ($T-T_g$) se puede modificar en sistemas que tienen la misma composición variando la masa molar de la matriz o usando polímeros con distinta estructura molecular (sección I.B.2.2). El efecto de la masa molar de la matriz sobre la estabilidad de lactasa se analizó empleando maltodextrinas (masa molar promedio (Mr) 720, 900, 1200, 1800, y 3600) y maltosa (Mr= 342). Tanto las maltodextrinas como la maltosa están constituídas por unidades de glucosa unidas en posición α 1-4. Se empleó además una β-ciclodextrina. La β-ciclodextrina es un oligosacárido cíclico constituido por siete unidades de D-glucosa unidas de modo que forman un anillo que es polar en la superficie y lipofílico en el interior.

En la Tabla IV.A.5 se muestran los valores de temperatura de transición vítrea y el contenido acuoso correspondiente (Roos y Karel, 1991b) para matrices de maltodextrina de varias masas molares y para maltosa equilibradas a distintas humedades relativas.

Tabla IV.A.5: Fracción en masa de agua (W) y valores de T_g (°C) de matrices de maltodextrina de varias masas molares y para maltosa, equilibradas a distintas humedades relativas. ND: no determinado.

	MD 3600		***MD 1800***		***MD 1200***		***MD 900***		***MD 720***		***Maltosa***	
H.R.%	**W**	**T_g**	**W**	**T_g**	**W**	**T_g**	**W**	**T_g**	**W**	**T_g**	**W**	**T_g**
"0"	0.000	188	0.000	160	0.000	ND	0.000	141	0.000	121	0.000	87
33	0.043	90	0.051	66	0.057	65	0.054	42	0.049	36	0.043	29
52	0.082	58	0.076	38	0.074	40	0.076	37	0.081	29	0.092	-1
75	0.096	44	0.095	13	0.102	8	0.139	-9	0.146	-18	ND	ND

Se analizó en primer lugar la estabilidad de la enzima en las maltodextrinas deshidratadas (liofilizadas y mantenidas una semana sobre P_2O_5) (Figura IV.A.10, a y b). Se representó la actividad remanente de la enzima en función de la T_g de las distintas maltodextrinas que fueron almacenadas a temperaturas crecientes (desde 57 a 105°C) durante 3 y 5 horas (Fig. IV.A.10, a y b respectivamente) (las líneas punteadas unen los puntos correspondientes a los sistemas de maltodextrina de distintas masas molares que fueron almacenadas a igual temperatura).

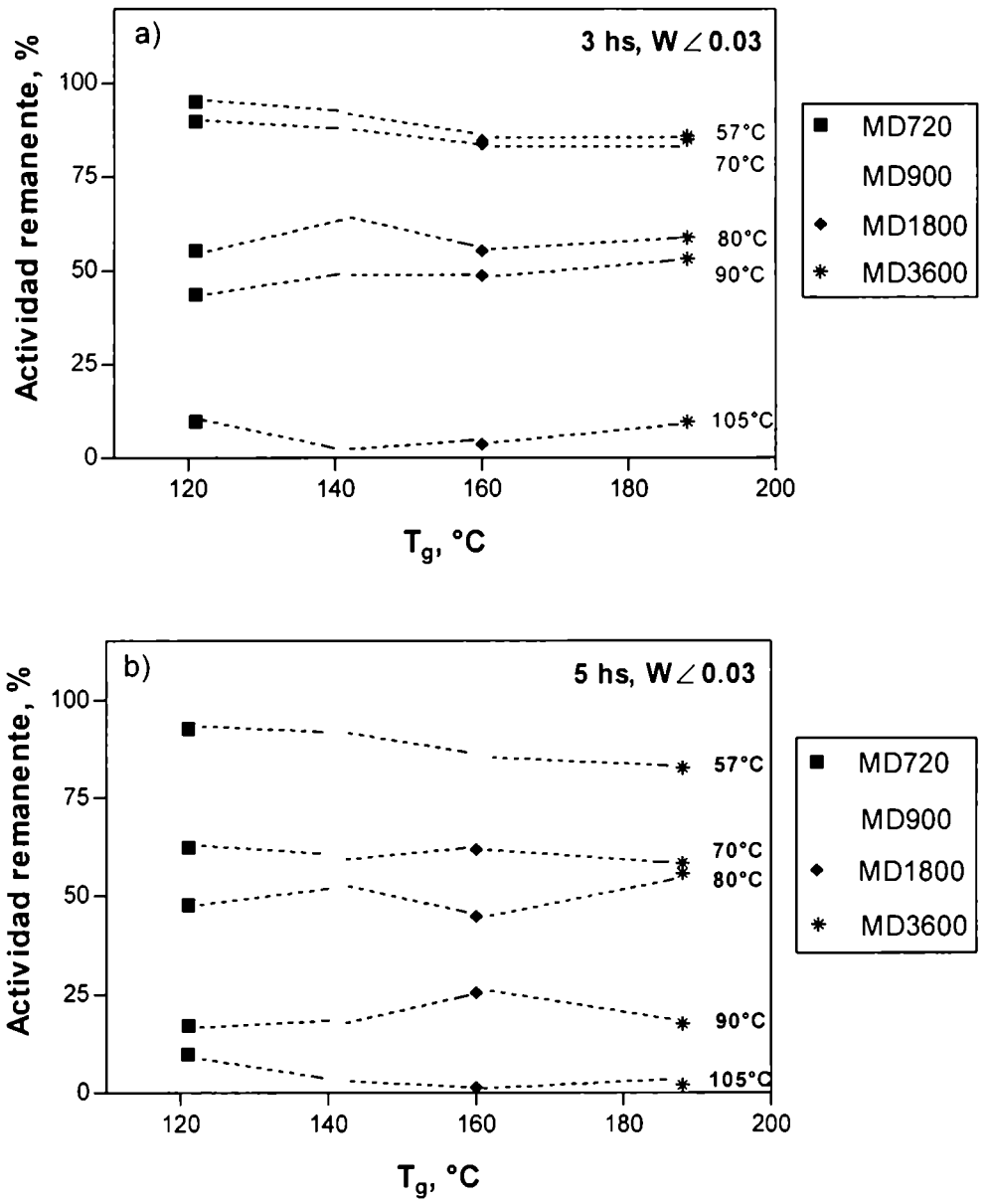
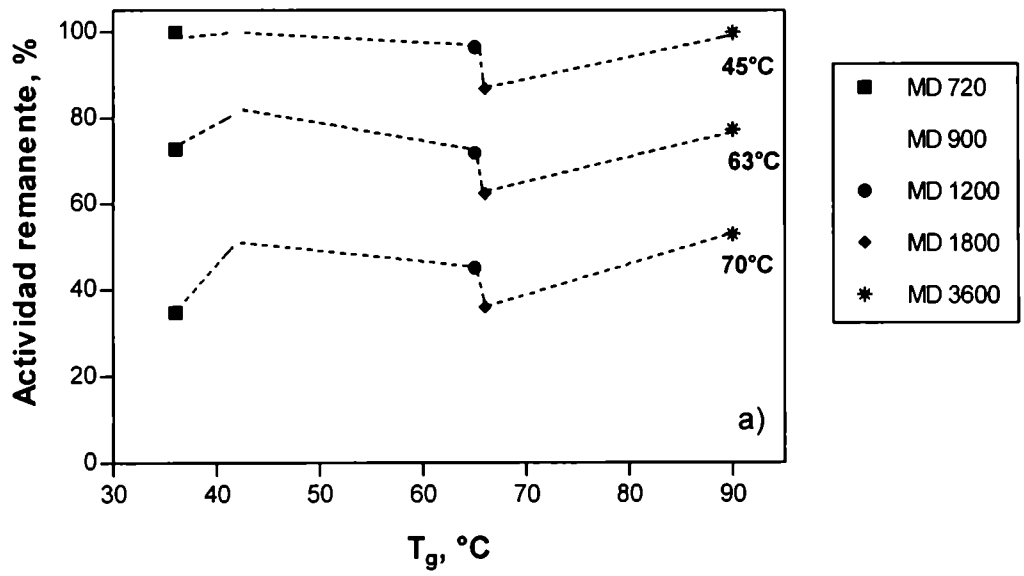


Figura IV.A.10: *Estabilidad térmica de lactasa en maltodextrinas anhidras de distintas masas molares almacenadas 3 horas (a) y 5 horas (b) a diferentes temperaturas. Se emplearon los valores de T_g publicados por Roos y Karel, (1991b).*

Como en condiciones anhidras la T_g de cualquiera de las maltodextrinas es alta (120 a 188°C), se pudo estudiar conjuntamente el efecto de la temperatura y de la T_g de la matriz en sistemas vítreos. Para la misma temperatura de almacenamiento, la estabilidad de la enzima fue similar en cualquiera de las maltodextrinas. A pesar de que todos los sistemas estaban vítreos luego de almacenarlos a las temperaturas seleccionadas, la inactivación aumentó con el tiempo de tratamiento térmico y con la temperatura. El hecho de aumentar la temperatura de calentamiento de 57 a 105°C tuvo un efecto mucho más importante sobre la estabilidad de la enzima que la variación en los valores de T_g (120 a 188°C) de las matrices. La estructura vítrea de cualquiera de las maltodextrinas estudiadas ($T < T_g$) no fue condición suficiente para evitar la inactivación de la enzima, principalmente a temperaturas altas ($T > 80°C$).

La estabilidad de lactasa se analizó también en maltodextrinas de distintas masas molares pero que fueron equilibradas a 33% H.R. (Figura IV.A.11 a y b). A diferencia de las matrices mostradas en la Fig. IV.A.10 que se encontraban todas en estado vítreo, en los sistemas equilibrados a 33% H.R. se analizó la estabilidad en condiciones vítrea y sobreenfriada. La observación visual macroscópica del estado físico de los sistemas coincidió con lo esperado a partir de sus valores de T_g. Las maltodextrinas almacenadas a 45°C no colapsaron aún luego de 15.5 horas de almacenamiento. El grado de colapso observado en las matrices tratadas a 63°C y 70°C está indicado en las Figuras IV.A.12 y IV.A.13, respectivamente para distintos tiempos de almacenamiento. Se puede ver que el tiempo fue una variable importante en el grado de colapso observado. La temperatura de almacenamiento tuvo un efecto

importante sobre la estabilidad de la enzima. A tiempos cortos de almacenamiento (por ej. 5 horas, Fig. IV.A.11.a) la actividad enzimática remanente fue casi exclusivamente dependiente de la temperatura de almacenamiento y no se observaron diferencias de estabilidad relacionadas con la masa molar o el estado físico de la matriz. A tiempos más largos (15.5 horas) a 70°C (Fig.IV.11.b) se observó mayor protección en la matriz de mayor masa molar (que era la única en estado vítreo en esas condiciones). Estos resultados demuestran que la estabilidad relativa en los estados vítreo y sobreenfriado depende del tiempo de observación, por lo cual no es posible la generalización del efecto observado a un único tiempo.



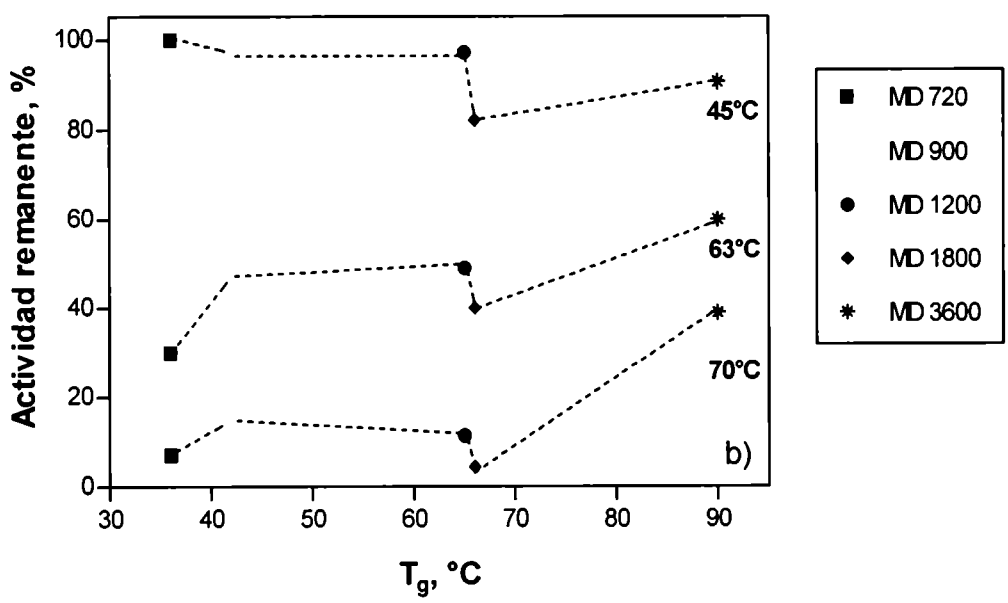


Figura IV.A.11: *Estabilidad térmica de lactasa en maltodextrinas de distintas masas molares equilibradas a 33% H.R. y almacenadas 5 horas (a) y 15.5 horas (b) a diferentes temperaturas. Se emplearon los valores de T_g publicados por Roos y Karel, 1991a*

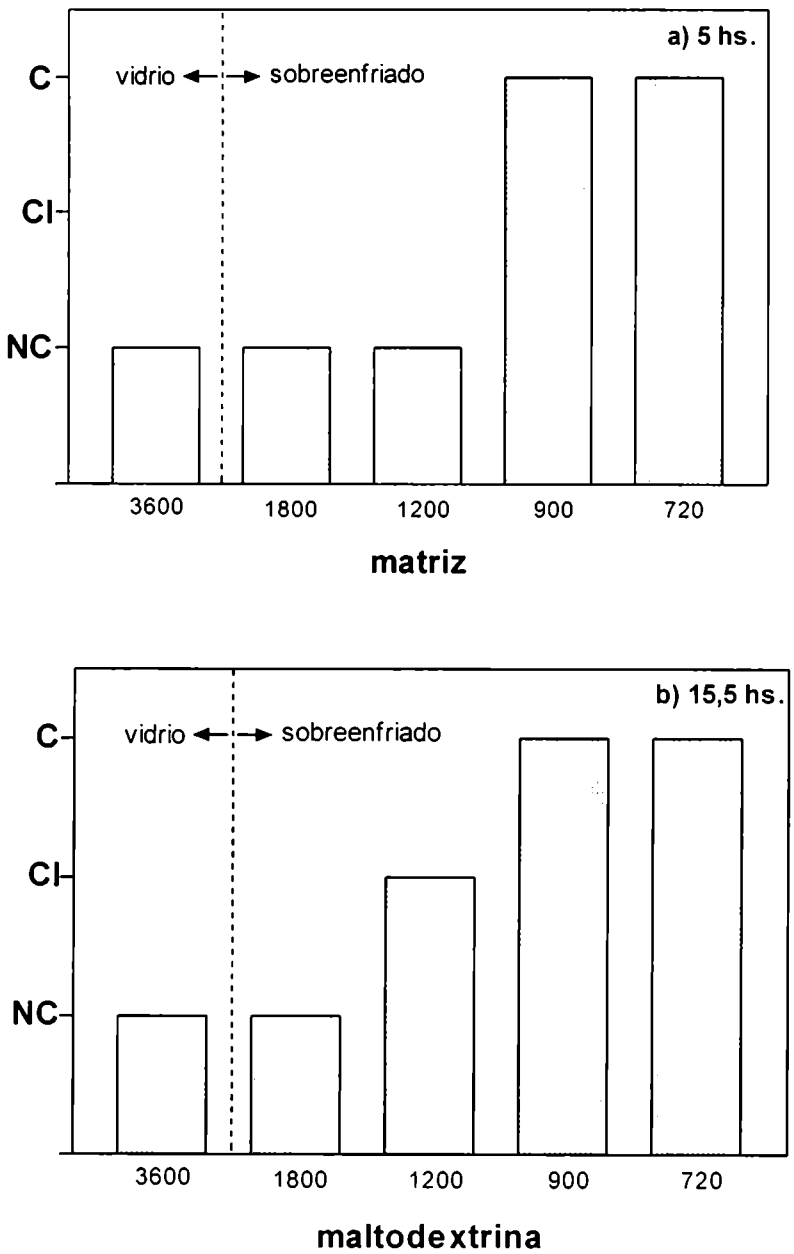
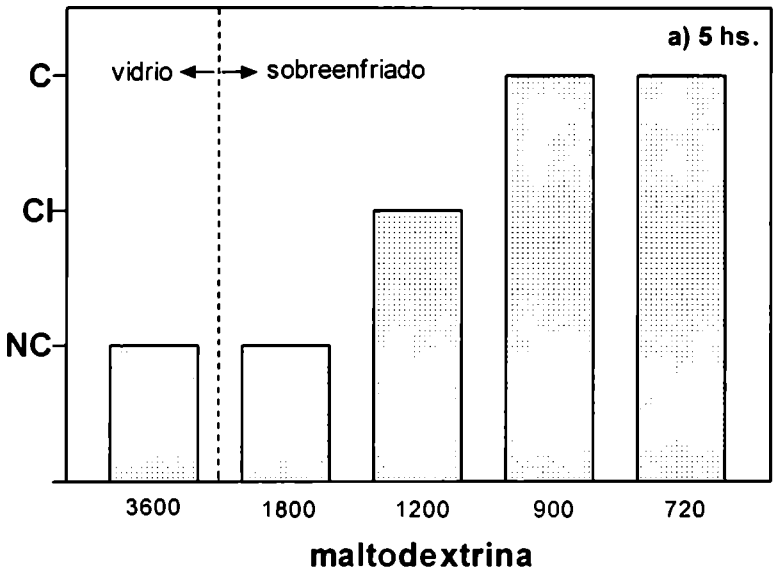


Figura IV.A.12: *Grado de colapso observado en matrices de maltodextrina de distintas masas molares equilibradas a 33% H.R. y almacenadas 5 horas (a) y 15.5 horas (b) a 63°C.* **NC**: *no colapsada,* **CI**: *colapso incipiente,* **C**: *colapsada.*



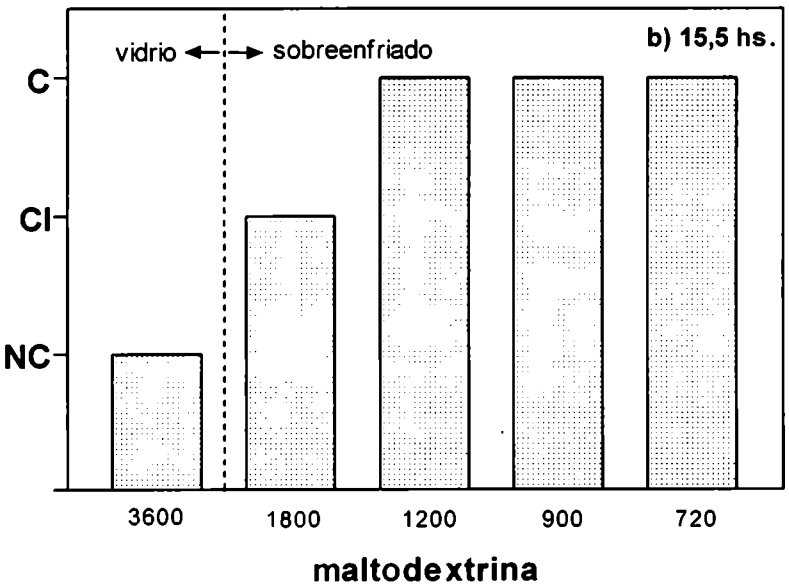


Figura IV.A.13: *Grado de colapso observado en matrices de maltodextrina de distintas masas molares equilibradas a 33% H.R. y almacenadas 5 horas (a) y 15.5 horas (b) a 70°C.* ***NC****: no colapsada,* ***CI****: colapso incipiente,* ***C****: colapsada.*

Para poder analizar el efecto de la humedad conjuntamente con el efecto de la T_g de las matrices, se graficó la actividad remanente de la enzima a 70°C en matrices de maltodextrina de diferentes masas molares y en maltosa que fueron equilibradas a distintas humedades relativas ("0", 33 y 52% H.R.) (Figura IV.A.14). A cada humedad, la variación del valor de ($T-T_g$) se debe a la variación en la masa molar de las matrices. Si se analizan los datos en forma global, se observa cierto efecto de la transición vítrea ya que la disminución de la estabilidad fue marcada a valores de ($T-T_g$) cercanos a cero. La maltosa fue menos efectiva para proteger a la enzima que las maltodextrinas a cualquiera de las humedades relativas estudiadas.

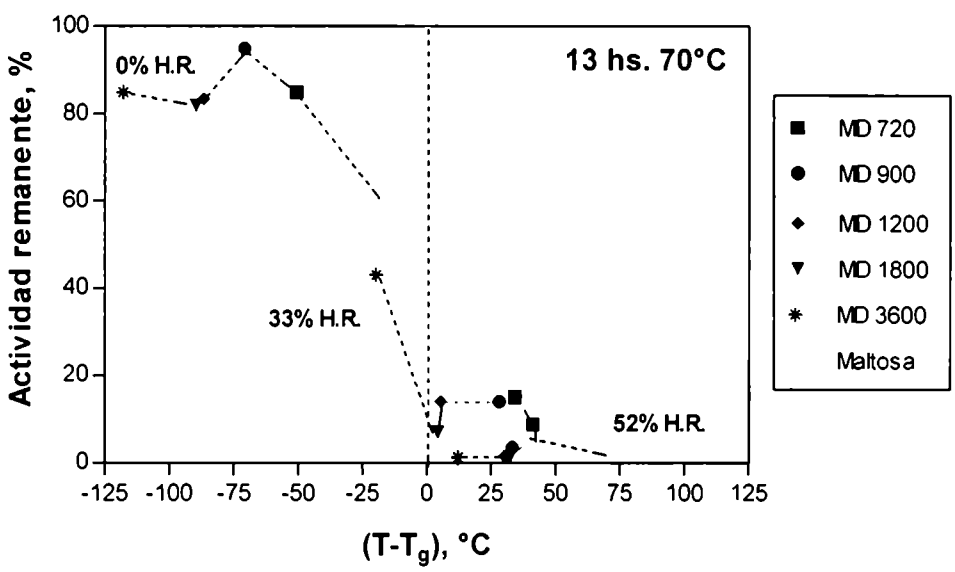


Figura IV.A.14: *Actividad remanente de la enzima lactasa a 70°C en maltodextrinas de diferentes masas molares y en maltosa (Mr= 342) que fueron humidificadas a distintas humedades relativas ("0", 33 y 52%).*

Con el fin de analizar si la estabilidad de la enzima estaba relacionada con la conformación molecular de la matriz se comparó la estabilidad en matrices de maltodextrina, ciclodextrina y maltosa. Los sistemas conteniendo la enzima fueron liofilizados, deshidratados sobre P_2O_5 y almacenados a 70°C, en la Figura IV.A.15 se muestra la actividad remanente en función del tiempo.

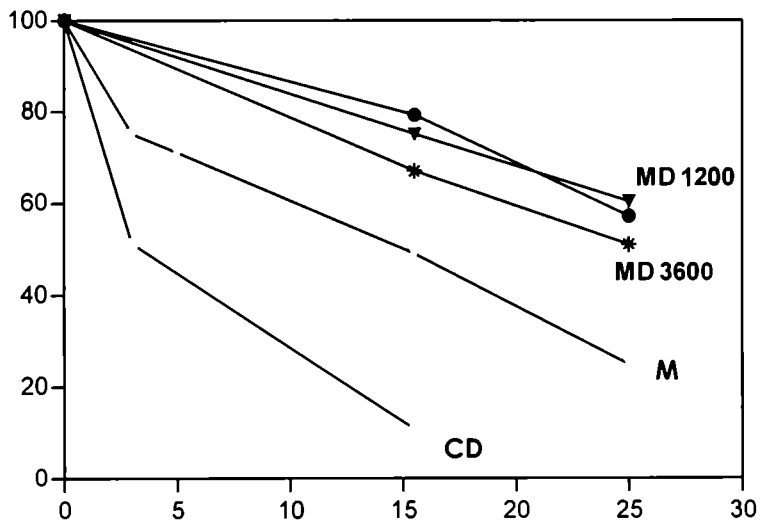


Figura IV.A.15: *Estabilidad de lactasa en compuestos homólogos anhidros almacenados a 70°C.*

Todos los sistemas en las condiciones analizadas se encontraban en estado vítreo, como lo indican los valores negativos de la variable ($T-T_g$) (<-120, -118, -87, -71, -17, para ciclodextrina, MD 3600, MD 1200, MD 900 y maltosa respectivamente), y en ninguno de ellos se observó colapso de la matriz. Como se observa en la Fig. IV.A.15 el estado vítreo de la matriz no aseguró la estabilidad de la enzima lactasa y no se observó ninguna relación con el valor de T_g de la matriz. El grado de protección ofrecido a la enzima por las

diferentes matrices siguió el orden: maltodextrina (MD 900, 1200 o 3600) > maltosa > ciclodextrina.

Además de los cambios a nivel supramolecular de la matriz, reflejados a través de cambios en el valor de T_g, se ha postulado la existencia de inhomogeneidades moleculares asociadas con la presencia de huecos o zonas de exceso de entalpía y volumen conocidas como volumen libre. La teoría del volumen libre sostiene que estos huecos entre moléculas proveen el espacio físico necesario para que ocurran los reordenamientos moleculares y movimientos dentro de un sistema amorfo (Frish y Stern, 1983; Le Meste y col., 1991). Hemminga y van den Dries (1997) estudiaron la movilidad molecular de sondas paramagnéticas en matrices vítreas de malto-*n*-osa (con n= 1 a 7) utilizando espectroscopía de resonancia de espín electrónico. Los resultados que obtuvieron mostraron que el grado de movilidad de la sonda aumentó al aumentar el valor de n, es decir la masa molar de la matriz. Por lo tanto dependiento de la molécula que forme la matriz vítrea se producen diferentes grados de empaquetamiento. La glucosa, al ser una molécula pequeña, puede empaquetarse más densamente que la maltoheptaosa formando una matriz con menor volumen libre donde la movilidad de la sonda está restringida. Por lo tanto las matrices de menor volumen libre serían las que podrían ofrecer una estabilización más efectiva a las enzimas. Sin embargo, como se observó tanto en la Fig. IV.A.14 como en la Fig. IV.A.15, la estabilidad de lactasa fue similar en las maltodextrinas de diferentes masas molares analizadas y mayor en cualquiera de ellas que en maltosa. Las maltodextrinas que se compararon en el presente trabajo, tienen distintos valores de T_g, pero son todas polímeros grandes donde las diferencias relativas a nivel de

movilidad molecular de la matriz (y en consecuencia de la enzima) probablemente no sean tan importantes. Por otro lado, las sondas empleadas por Hemminga y van den Dries (1997) para estudiar la movilidad molecular son muy pequeñas y podrían estar detectando cambios microestructurales menores entre las matrices que no afectarían en forma diferencial la estructura y funcionalidad de la enzima. Debe destacarse que si bien la estabilidad en maltosa se vería beneficiada por su menor volumen libre respecto a las maltodextrinas, al ser la maltosa un azúcar reductor puede interactuar con los grupos $-NH_2$ de las proteínas (reacción de Maillard, ver sección I.B.6) afectando de este modo la actividad catalítica de la enzima. En particular, la enzima de *K. lactis* analizada en el presente trabajo, posee un grupo $-NH_2$ en el sitio activo (Manual Maxilact, 1981) que la hace particularmente sensible a dicha reacción. Colaço y col. (1992) estudiaron la estabilidad durante el almacenamiento de enzimas de restricción en matrices deshidratadas de azúcares. Estos autores encontraron que la mayoría de los azúcares protectores eran no reductores y sugirieron que la reacción de Maillard sería un factor importante a considerar ya que podría afectar la estabilidad de sus preparaciones enzimáticas durante el almacenamiento. Schebor y col. (1999) observaron que puede ocurrir pardeamiento no enzimático incluso en sistemas en estado vítreo. Si bien en el presente trabajo no se observó pardeamiento de la matriz de maltosa luego del almacenamiento a 70°C, debe tenerse en cuenta que la proporción de enzima en la matriz es muy baja. Además, se sabe que los productos de las primeras etapas de la reacción de Maillard no son pardos pero podrían afectar igualmente la actividad de la enzima. Las maltodextrinas, si bien contienen cierta proporción de azúcares reductores,

contienen también otros disacáridos, trisacáridos y oligosacáridos que serían necesarios para estabilizar la enzima.

En el otro extremo, el empleo de matrices constituídas por moléculas con muy bajo grado de empaquetamiento molecular, como la ciclodextrina, ofreció muy poca protección a la enzima (Fig. IV.A.15). La estructura cíclica de la β-ciclodextrina suele acomodar moléculas huésped, dependiendo del tamaño y la polaridad de las mismas. La capacidad de las ciclodextrinas de aumentar la estabilidad conformacional de ciertas proteínas se relacionó con la interacción del excipiente con regiones hidrofóbicas de la molécula proteica evitando de este modo la hidrólisis, oxidación, reordenamiento estructural o polimerización de la proteína (Loftsson y Brewster, 1996). Sin embargo, su estructura no fue compatible en este caso para interactuar con la proteína. Por otro lado, si bien la ciclodextrina tiene una T_g mayor que cualquiera de las maltodextrinas (T_g > 190°C), el anillo de la β-ciclodextrina tendría un volumen hidrodinámico mucho mayor y por lo tanto menor grado de compactación, en relación con la forma lineal, que es más flexible y podría adoptar conformaciones más compactas (Slade y Levine, 1991).

El grado de empaquetamiento de las moléculas en la matriz o volumen libre, relacionado con la movilidad molecular, afectaría la estabilidad enzimática pero no sería el único factor involucrado. Propiedades como reactividad química (relacionadas con el poder reductor) de los componentes de la matriz deben tenerse en cuenta en la formulación del agente estabilizante deseado.

IV.A.1.3. Relación entre la estabilidad enzimática y el valor de ($T-T_g$).

La variable ($T-T_g$) involucra conjuntamente los efectos de la humedad y de las propiedades intrínsecas de la matriz (ya que estas variables modifican el valor de T_g) y también de la temperatura de almacenamiento a través de T (Karel y Saguy, 1991; Slade y Levine, 1991). Si el cambio en la estructura física de la matriz al ocurrir la transición vídrio-líquido sobreenfriado definiera el cambio relativo en la velocidad de las reacciones de deterioro físico-químico, se esperaría obtener para la estabilidad enzimática versus ($T-T_g$), una curva general independientemente de la temperatura, humedad o composición del sistema. Se analizó entonces el efecto de modificar ($T-T_g$), variando el contenido acuoso, la temperatura de almacenamiento, la masa molar de la matriz o la composición del sistema, sobre la estabilidad de lactasa.

La Figura IV.A.16 muestra el logaritmo del tiempo de vida media (tiempo que tarda la enzima en perder el 50% de la actividad que tenía antes del tratamiento térmico ($t_{1/2}$)) en función de la variable ($T-T_g$) en sistemas de PVP 40, maltodextrina (MD 1800) y almidón con distinto contenido acuoso y que fueron almacenados a distintas temperaturas. Si el contenido de agua se mantiene constante, la T_g de una dada matriz no varía y por lo tanto la variación de ($T-T_g$) se logró cambiando la temperatura de almacenamiento. A temperatura constante la variación de ($T-T_g$) se debe a distintos contenidos de agua del sistema.

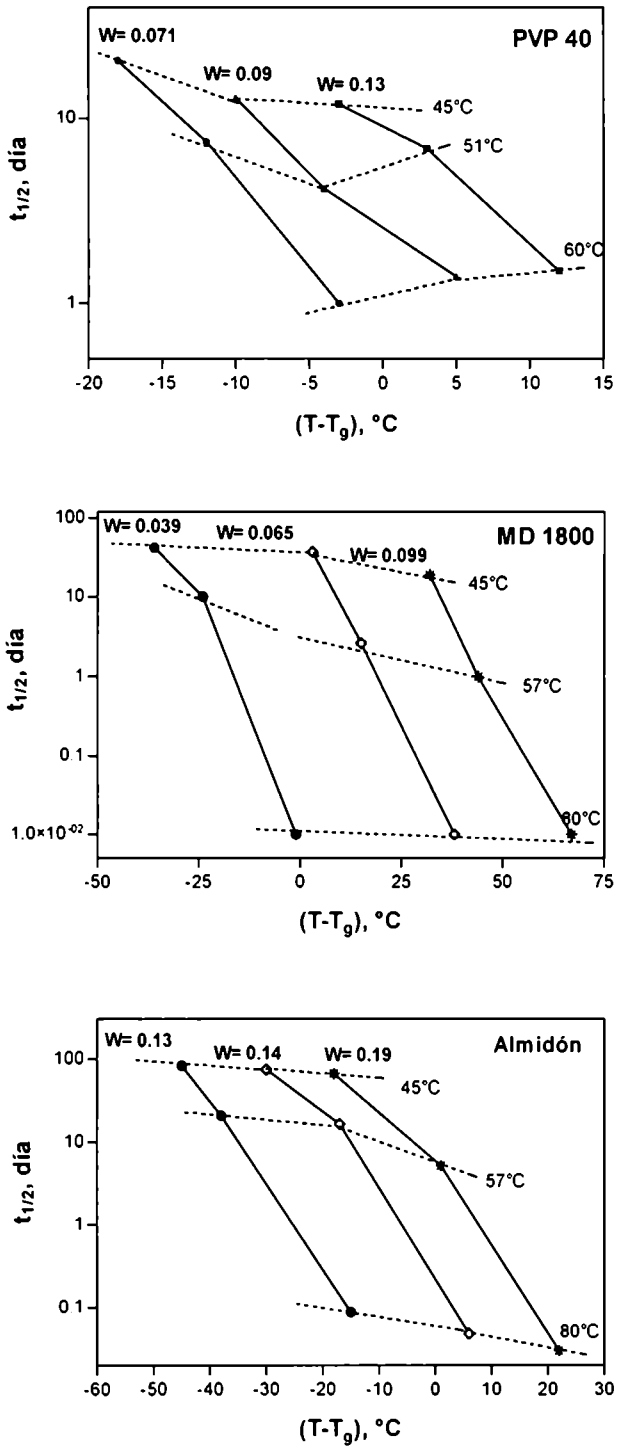


Figura IV.A.16: *Representación logarítmica de la estabilidad térmica (tiempo de vida media) de lactasa en función de la variable (T-T_g) en matrices de PVP 40, MD 1800 y almidón. Las líneas llenas unen sistemas con el mismo contenido de agua que fueron almacenados a distintas temperaturas, las líneas punteadas unen sistemas con distinto contenido acuoso almacenados a igual temperatura.*

Para cualquiera de los polímeros estudiados se obtuvieron diferentes curvas dependiendo del contenido acuoso y de la temperatura de almacenamiento. Por lo tanto, en estas matrices, el cambio de la estructura física de la matriz a T_g no puede explicar completamente el cambio de estabilidad enzimática observado al variar la temperatura o el contenido de agua. Se observa que para un mismo valor de $(T-T_g)$, la vida media es menor en los sistemas más secos. Esta aparente anomalía se debe a que para obtener el mismo valor de $(T-T_g)$ en sistemas que contienen distinta humedad, la temperatura de almacenamiento del más seco (mayor T_g) debe ser mayor.

En la Figura IV.A.17 se muestra la actividad remanente de la enzima en función de $(T-T_g)$ en matrices anhidras de maltodextrina de diferentes masas molares. Las líneas en este gráfico unen puntos correspondientes a maltodextrinas de igual masa molar pero que fueron almacenadas a distintas temperaturas (57, 70, 80, 90 y 105°C). Se observa nuevamente que se obtienen diferentes curvas de estabilidad, dependiendo de la masa molar de la maltodextrina y de la temperatura de almacenamiento. La inactivación enzimática observada a $(T-T_g) < 0$ podría deberse a cambios conformacionales menores de la estructura proteica que modifican el sitio activo, o al bloqueo de grupos activos específicos (por ej. por condensación entre grupos carbonilo y amino, oxidación de grupos sulfhidrilo) que modifican o hacen inaccesible el sitio activo de la enzima a su sustrato. Se ha sugerido la existencia de poros o defectos en sistemas vítreos donde la movilidad podría ser suficiente para que se produzcan cambios estructurales de la proteína (Kovarskii y col., 1978; Hori y col., 1986). Taragano y Pilosof (2001) informaron una pérdida importante de actividad enzimática en un extracto rico en pectínliasa deshidratado a

temperaturas por debajo del inicio de la desnaturalización, y concluyeron que la desnaturalización no sería el único mecanismo por el cual la pectínliasa se inactiva.

A partir de los experimentos realizados (Figs. IV.A. 14, 16 y 17) surge que al analizar la estabilidad enzimática versus ($T-T_g$) se obtienen diferentes curvas dependiendo de la composición, humedad y temperatura de almacenamiento. La temperatura de calentamiento fue un factor importante en la inactivación de la enzima en sistemas poliméricos de baja humedad más allá del estado físico de la matriz. En las condiciones investigadas, el efecto de aumentar 10°C la temperatura fue más importante que el efecto de aumentar aproximadamente dos veces al contenido de agua del sistema (Fig. IV.A.16), o bien que aumentar el valor de T_g en 20°C (Fig. IV.A. 17).

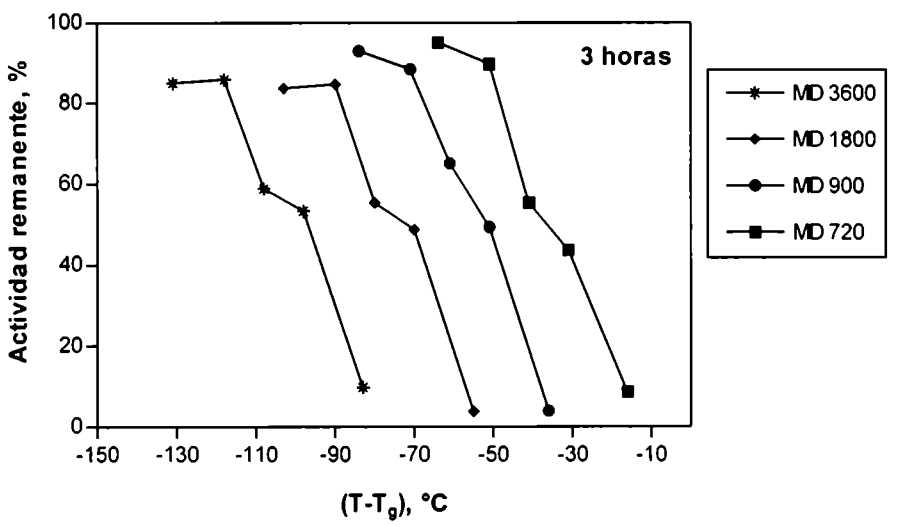


Figura IV.A.17: *Actividad remanente de lactasa en matrices de maltodextrina anhidras de distintas masas molares en función del parámetro ($T-T_g$). Para cada maltodextrina, el valor de ($T-T_g$) se modificó por cambio de la temperatura de almacenamiento (57, 70, 80, 90 y 105°C).*

IV.A.2. ESTABILIDAD TÉRMICA DE β-GALACTOSIDASA EN AZÚCARES AMORFOS.

En la actualidad, los azúcares son los excipientes más comúnmente incorporados en las formulaciones farmacéuticas y biotecnológicas debido principalmente a su baja toxicidad, alta pureza y propiedades físicoquímicas interesantes como son la capacidad de formar una estructura vítrea de baja movilidad molecular y la de reemplazar las moléculas de agua durante el secado formando uniones puente de hidrógeno con regiones polares del biomaterial a estabilizar (Hancock y Shamblin, 1998).

El uso de azúcares para preservar distintos biomateriales de los efectos adversos que producen tanto la congelación como el secado, surgió a partir del descubrimiento de la importante función que cumplen disacáridos como trehalosa o sacarosa y oligosacáridos como rafinosa, estaquiosa y verbascosa en la tolerancia de levaduras, esporas, crustáceos, nematodos y cierta variedad de semillas a la deshidratación (Aguilera y Karel, 1997). La capacidad de ciertos organismos para sobrevivir en ambientes de temperaturas extremadamente bajas, como es el caso de peces, insectos o nematodos antárticos, se relacionó también con la presencia de azúcares protectores (Montiel, 1998).

IV.A.2.1. Análisis comparativo de la estabilidad de β-galactosidasa en diferentes azúcares.

En la Figura IV.A.18, se muestra la actividad remanente de la enzima lactasa en matrices anhidras constituidas por diferentes azúcares (lactosa, melibiosa, maltosa, sacarosa, rafinosa y trehalosa) que fueron almacenadas a 70°C.

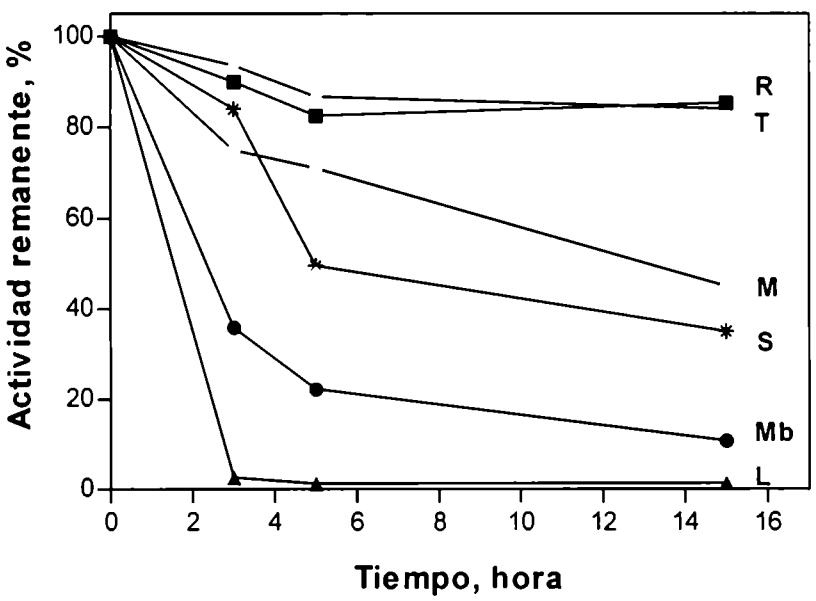


Figura IV.A.18: *Estabilidad de lactasa en varias matrices anhidras almacenadas a 70°C. (R: rafinosa, T: trehalosa, M: maltosa, S: sacarosa, Mb: melibiosa , L: lactosa).*

Se observó un efecto protector diferencial sobre la enzima ofrecido tanto por trehalosa como por el trisacárido rafinosa en relación con los otros azúcares estudiados, los cuales presentaron el siguiente orden de protección: maltosa > sacarosa > melibiosa > lactosa. Suzuki y col. (1997) estudiaron la

actividad de varias enzimas (alcohol deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa y malato deshidrogenasa) en matrices deshidratadas de azúcares y observaron que las actividades de las enzimas dependieron fuertemente del tipo de azúcar agregado, y que las matrices de trehalosa y rafinosa fueron superiores en mantener la actividad enzimática.

En la tabla IV.A.6 se muestran las temperaturas de transición vítrea correspondientes a los azúcares deshidratados empleados.

Tabla IV.A.6: Temperaturas de transición vítrea correspondientes a los azúcares deshidratados empleados. En la tabla se incluyen datos obtenidos en el presente trabajo y datos obtenidos de bibliografía.

Matriz	Trehalosa	Rafinosa	Maltosa	Lactosa	Melibiosa	Sacarosa
T_g, °C	90	91	87[a]	101[b]	85[b]	61

[a]Roos y Karel 1991c; [b]Roos, 1993.

Las temperaturas de transición vítrea de azúcares como maltosa, lactosa o melibiosa son similares a las de rafinosa y trehalosa. Es decir que, aunque estos azúcares almacenados a 70°C también se encontraban en estado vítreo (Fig. IV.A.18), la enzima fue menos estable en las matrices de azúcares reductores (lactosa, maltosa y melibiosa) probablemente porque, como se mencionó anteriormente analizando la estabilidad en la matriz de maltosa (Fig. IV.A.14 y 15), estos azúcares, si bien no se pardearon en el tiempo del experimento, pueden participar de las primeras etapas de la reacción de Maillard afectando la conformación del sitio activo y por lo tanto la actividad

catalítica de la proteína. Suzuki y col. (1997) sugirieron que en sistemas conteniendo azúcares la inactivación enzimática puede ocurrir no sólo por cambios en la estructura terciaria de la proteína, sino también vía la reacción de Maillard. Colaço y col. (1994) estudiaron la resistencia térmica de la enzima fosfatasa alcalina a 55°C en matrices deshidratadas de azúcares y encontraron que las matrices que desarrollaron color pardo, sufrieron pérdidas en la actividad de la enzima, mientras que en la matriz de trehalosa que fue estable al pardeamiento, la resistencia térmica de la enzima fue máxima. Schebor y col. (1997) demostraron que el orden de estabilidad ofrecido a la enzima invertasa por diferentes matrices de azúcares (trehalosa > rafinosa > lactosa > maltosa) fue inverso a la suceptibilidad al pardeamiento de los sistemas.

Debe destacarse que la estabilidad de lactasa en la matriz de lactosa se perdió totalmente en las primeras 3 horas de tratamiento térmico. Sin embargo, en trabajos desarrollados con enzimas lactasa de otra fuente (*Escherichia coli* y *Aspergillus oryzae*) se observó que el azúcar lactosa tuvo efecto protector sobre las mismas. La mayor estabilidad de muchas enzimas en presencia de su sustrato se relacionó con la capacidad del sustrato de mantener una estructura conformacional óptima de la proteína y de proteger el sitio activo (O'Fagain y col., 1988). Schebor y col. (1997) observaron que la enzima lactasa de *E. coli* fue estable en matrices de leche deshidratada, donde la lactosa es el componente principal. En sistemas líquidos, la presencia de lactosa evitó la agregación térmica de la enzima β-galactosidasa de *A. oryzae* (Yang y col., 1994). La estabilidad de lactasas provenientes de *E. coli* y de *A. oryzae* en matrices de lactosa deshidratadas fue similar a la observada

en trehalosa, rafinosa o maltodextrina (Schebor y col., 1997). Si bien estas enzimas y la empleada en este trabajo son β-galactosidasas, que tienen la misma acción catalítica, la masa molar y el origen de las enzimas es distinto y además las condiciones experimentales (concentración de enzima, pH y temperatura) en las que se evaluó la estabilidad fueron diferentes. Por otro lado, Burin y col. (2001) estudiando la estabilidad en matrices amorfas de suero hidrolizado, encontró que la β-galactosidasa de *K. lactis* fue mucho más sensible a disminuciones del pH del medio que la β-galactosidasa *de A. oryzae*. Probablemente, de la misma manera en que difieren en el pH y temperatura óptimos, las diferencias estructurales (relacionadas con la conformación del sitio activo o de la apoenzima, y con la capacidad para establecer interacciones moleculares proteína-matriz) provoquen las diferencias de estabilidad observadas en la matriz de lactosa (Mahoney y Wilder, 1989). Además, la particularidad de la enzima de *K. lactis* analizada en el presente trabajo de poseer un grupo $-NH_2$ en el sitio activo (Manual Maxilact, 1981) permite explicar la baja estabilidad de la enzima en presencia de azúcares reductores.

La enzima fue poco estable en la matriz de sacarosa a pesar de ser éste un azúcar no reductor. Sin embargo, debido al valor de T_g (Tabla IV.A.6) y al colapso observado, hay que destacar que era el único azúcar en estado líquido-sobreenfriado donde la mayor movilidad molecular del sistema seguramente afectó la estabilidad de la enzima. Suzuki y col. (1997) encontraron que la sacarosa pierde su capacidad para proteger enzimas cuando cristaliza, pero en las condiciones analizadas (Fig. IV.A.18), el valor de $(T-T_g)$ es pequeño $(T-T_g= 9)$ como para que ocurra cristalización en el tiempo

del experimento. Por otro lado, se observó que la matriz de sacarosa adquirió un color amarillento luego de 15 horas de almacenamiento a 70°C. Si bien la sacarosa es un azúcar no reductor, se detectaron pequeñas cantidades de glucosa en la matriz luego del tratamiento térmico que indicaron hidrólisis parcial del disacárido. Tanto la glucosa como la fructosa que se liberan a partir de la sacarosa son azúcares altamente reductores y explican el pardeamiento observado. Evidencias bibliográficas muestran que la sacarosa puede hidrolizarse durante procesos como congelación, deshidratación y almacenamiento (Karel y Labuza, 1968; Schoebel y col., 1969; Flink, 1983). La sacarosa es un β-fructofuranósido con un enlace de alta energía (mayor que 115 kJ/mol) que es fácilmente hidrolizable e inestable en presencia de grupos químicos reactivos como los grupos amino de las proteínas. Debe destacarse además que los enlaces β-fructofuranósidos se hidrolizan más fácilmente que los β-piranósidos (enlace presente por ejemplo en la trehalosa). Schebor y col. (1999) observaron hidrólisis de sacarosa y pardeamiento en presencia de aminoácidos y proteínas en sistemas equilibrados a 22% H.R. y almacenados a 45°C. En estas condiciones, el grado de hidrólisis fue muy bajo en rafinosa y nulo en sistemas conteniendo trehalosa. Si bien la rafinosa es también un β-fructofuranósido, probablemente su mayor valor de T_g, haya influído en que el trisacárido tuviera un grado de hidrólisis mucho menor que la sacarosa.

Murray y Liang (2000) encontraron que la adición de trehalosa permitió mantener la conformación de proteínas como β-lactoglobulina y albúmina de suero bovino (BSA) durante el secado, mientras que en presencia de sacarosa las proteínas perdieron la estructura conformacional y las propiedades de la proteína nativa. Sin embargo, Allison y col. (1999) observaron que la lisozima

liofilizada en presencia de sacarosa mantuvo mejor su estructura y las uniones puente de hidrógeno que en presencia de trehalosa. Estos resultados y los presentados en el presente trabajo confirman que la capacidad protectora no depende sólo de las propiedades de vitrificación de la matriz sino también de la estabilidad química del azúcar y de mecanismos de protección dependientes del tipo de proteína y de las interacciones que ésta pueda establecer con el azúcar. Los trabajos de Angyal (1972) sobre complejación de monosacáridos con cationes metálicos han permitido determinar que sólo ciertas secuencias de los grupos –OH (axial-ecuatorial-axial en las piranosas o tres grupos –OH cis-cis en las furanosas) forman complejos con ciertos cationes divalentes y trivalentes. Por lo tanto, el número, disposición y secuencia de los grupos hidroxilo en la molécula de azúcar seguramente determinan en gran medida la capacidad de interacción del azúcar con la proteína y la estabilidad de dicha interacción.

IV.A.2.2. Efecto de la cristalización de trehalosa sobre la capacidad protectora del azúcar.

Según lo observado en la sección previa, la estabilidad de lactasa en matrices de trehalosa o rafinosa fue superior que en presencia de otros azúcares como lactosa, melibiosa o sacarosa. Otros autores también encontraron al azúcar trehalosa como el hidrato de carbono más efectivo para proteger disitintos biomateriales durante la deshidratación y el

almacenamiento posterior (Crowe y col., 1983, 1984a; Mouradian y col., 1984; Roser, 1991; Leslie y col., 1995; Uritani y col., 1995; Schebor y col., 1996, Murray y Liang, 2000).

Resultó interesante analizar el efecto protector de trehalosa en sistemas con distinto contenido acuoso y almacenados a diferentes temperaturas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura IV.A.19 donde se graficó la actividad remanente de lactasa en matrices liofilizadas de trehalosa humidificadas a 22, 43 y 75% H.R. en función del tiempo de calentamiento a distintas temperaturas (45, 57 y 80°C).

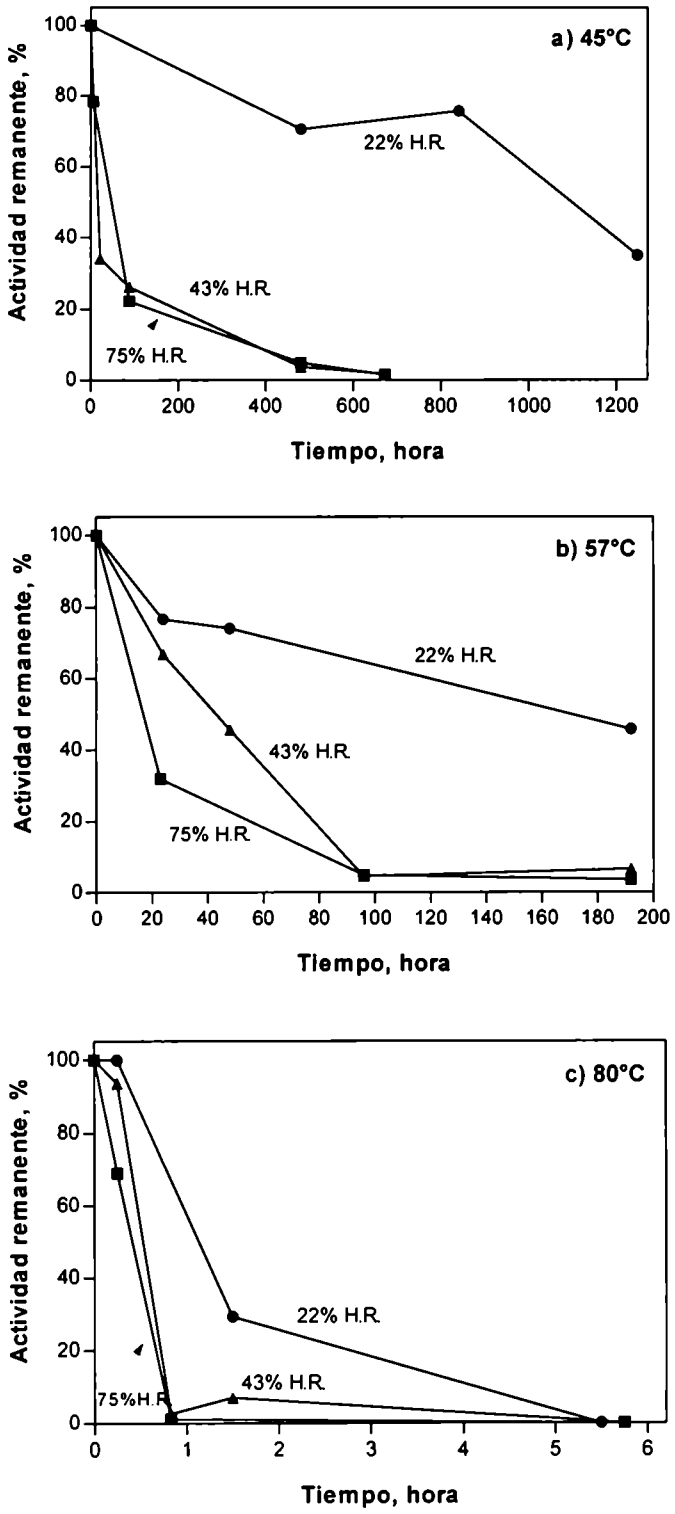


Figura IV.A.19: *Actividad remanente de lactasa en matrices liofilizadas de trehalosa expuestas durante 7 días a 22, 43 y 75% H.R., en función del tiempo de calentamiento a: (a), 45°C, (b) 57°C, y (c) 80°C.*

La estabilidad de la enzima se vio marcadamente afectada por la temperatura de almacenamiento ya que a cualquiera de las humedades estudiadas la velocidad de pérdida aumentó al aumentar la temperatura. Por ejemplo, en los sistemas expuestos a 22% H.R. el tiempo necesario para reducir la actividad de la enzima a un 50% de su valor inicial ($t_{1/2}$) fue de 46 días a 45°C y de aproximadamente 170 horas y 1 hora a 57°C y 80°C, respectivamente. El efecto protector de trehalosa se observó a humedades bajas (sistemas expuestos a 22% H.R.) y a temperaturas de calentamiento moderadas (45 y 57°C) (Fig. IV.A.19 a y b). Almacenando a 80°C (Fig. IV.A.19 c), la enzima fue poco estable y perdió su actividad aún en los sistemas más secos (expuestos a 22% H.R.). Al aumentar el contenido de agua del sistema (43 y 75% H.R.), la actividad de la enzima se perdió rápidamente (en comparación con la pérdida observada en la matriz de menor humedad (22% H.R.)) a cualquiera de las temperaturas analizadas.

La cristalización de azúcares amorfos ocurre a temperaturas mayores que el valor de T_g, siendo la velocidad de cristalización función del parámetro ($T-T_g$) y del tiempo. Se ha observado que el tiempo de cristalización aumenta marcadamente al disminuir el valor de ($T-T_g$) (Roos y Karel, 1991a). Dependiendo de las formas isoméricas del azúcar y de los hidratos que forme, la cristalización será también dependiente del contenido acuoso del sistema (Roos y Karel, 1992). La α, α-trehalosa, empleada en el presente trabajo, forma cristales estables anhidros o dihidratados (Sussich y col., 1998; Taylor y York, 1998). Según se observó en el presente trabajo por DSC, para obtener la forma cristalina anhidra a partir del azúcar amorfo se requiere una temperatura cercana a los 160°C. Esto está de acuerdo con las determinaciones realizadas

por Sussich y col. (1998). Para cristalizar como dihidrato, la α, α-trehalosa requiere (además de cierta movilidad definida por $T > T_g$) de una fracción en masa de agua de 0.1 (W= 0.1 es la cantidad de agua asociada al cristal dihidrato).

El comportamiento observado para la estabilidad de la enzima en trehalosa a distintas humedades relativas (Fig. IV.A.19) se estudió entonces en relación con el proceso de cristalización del azúcar. Los fenómenos de cristalización o fusión pueden observarse en un termograma obtenido por DSC como picos exotérmicos o endotérmicos respectivamente. En la Figura IV.A.20 se comparan los termogramas obtenidos por DSC para los sistemas de trehalosa expuestos a 22, 43, y 75% H.R. con el termograma obtenido para trehalosa cristalina dihidrato.

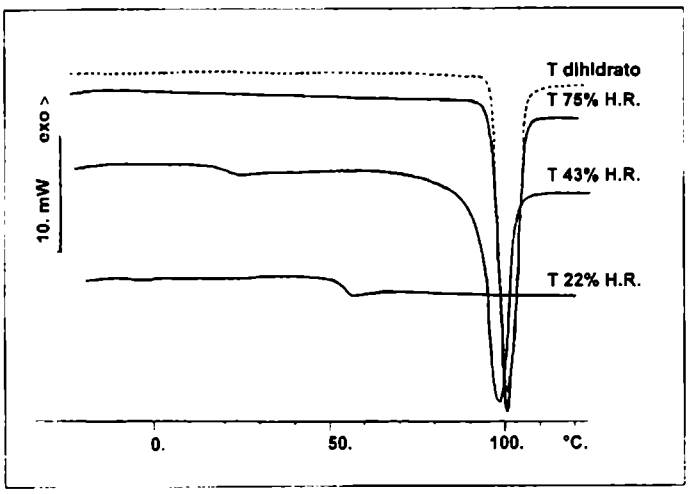


Figura IV.A.20: *Termogramas obtenidos por DSC para trehalosa cristalina dihidrato y para trehalosa liofilizada expuesta durante 7 días a 22, 43 y 75% H.R. en un ambiente a 25°C.*

Los sistemas expuestos a 22 y a 43% H.R. presentaron un cambio en la línea de base correspondiente a la temperatura de transición vítrea. Los sistemas expuestos a 43 y 75% H.R. presentaron además, un pico endotérmico a la misma temperatura (aproximadamente 100°C) que el observado para la fusión del cristal de trehalosa dihidrato.

Existen controversias en la literatura acerca de la naturaleza de este evento endotérmico. Algunos autores consideran que corresponde a la fusión de la trehalosa dihidrato (Shafizadeh y Susott, 1973; Weast y col., 1986; Green y Angell, 1989; Roos, 1993), mientras que otros autores (Taylor y York, 1998; Sussich y col, 1998) lo asocian con la deshidratación del cristal. Taylor y York (1998) y Sussich y col. (1998) encontraron que el tamaño de partícula y la velocidad de calentamiento influyen sobre las transiciones de fase complejas que presenta la trehalosa. Los termogramas que obtuvieron por DSC de la trehalosa dihidrato presentaron diferentes eventos térmicos a temperaturas mayores que 100°C dependiendo de la velocidad de calentamiento de la muestra. Estos autores sugirieron que las diferencias observadas se deben a diferencias en la velocidad de eliminación de agua del cristal (según la velocidad de calentamiento) que influyen sobre el mecanismo de deshidratación y sobre el tipo de estructura anhidra que puede recristalizar. El tipo de cápsula empleada en la medición como así también la hermeticidad de la misma afectaron el comportamiento térmico de la trehalosa cristalina (Shafizadeh y Susott, 1973). En el presente trabajo se observaron por microscopía óptica con luz polarizada (M.O.) los cambios físicos que sufre el cristal dihidrato de trehalosa al ser calentado a 115±5°C en una celda de vidrio cerrada herméticamente (Figura IV.A.21). Los cristales, inicialmente birrefringentes,

cambiaron de color durante el calentamiento y se tornaron transparentes sin perder prácticamente la morfología externa. Luego los cristales comenzaron a cambiar de forma (bordes redondeados), aumentó la movilidad, el sistema adquirió el aspecto de un material fundido y se observó una recristalización, probablemente de la forma anhidra del azúcar, en forma de agujas dispuestas radialmente. Cuando se realizó el mismo experimento pero manteniendo la celda de vidrio abierta, no se observó fusión, los cristales perdieron la birrefringencia pero mantuvieron su estructura durante el tiempo de calentamiento. Las mediciones en el DSC en este trabajo se realizaron en cápsulas herméticamente selladas. Por lo tanto, a partir de los resultados obtenidos por M.O. en sistemas cerrados (Fig. IV.A.21) y de estudios realizados por otros autores (Shafizadeh y Susott, 1973; Weast y col., 1986; Green y Angell, 1989; Roos, 1993), el evento endotérmico observado en los termogramas a 100°C (Fig. IV.A.20) se relacionó con la fusión del cristal dihidrato.

De todos modos, cualquiera sea el fenómeno asociado, el área del pico endotérmico puede usarse para estimar la cantidad de trehalosa cristalina presente en una muestra (fracción cristalina) por comparación con el área de pico (o entalpía) obtenida para el dihidrato puro de trehalosa (139 J/g medido en las mismas condiciones). La temperatura a la cual ocurren los eventos endotérmicos observados en la Figura IV.A.20 para los sistemas de trehalosa expuestos a 43 y 75% H.R. coinciden con la temperatura de fusión del cristal dihidrato e indican que el azúcar había cristalizado durante la humidificación en esas condiciones.

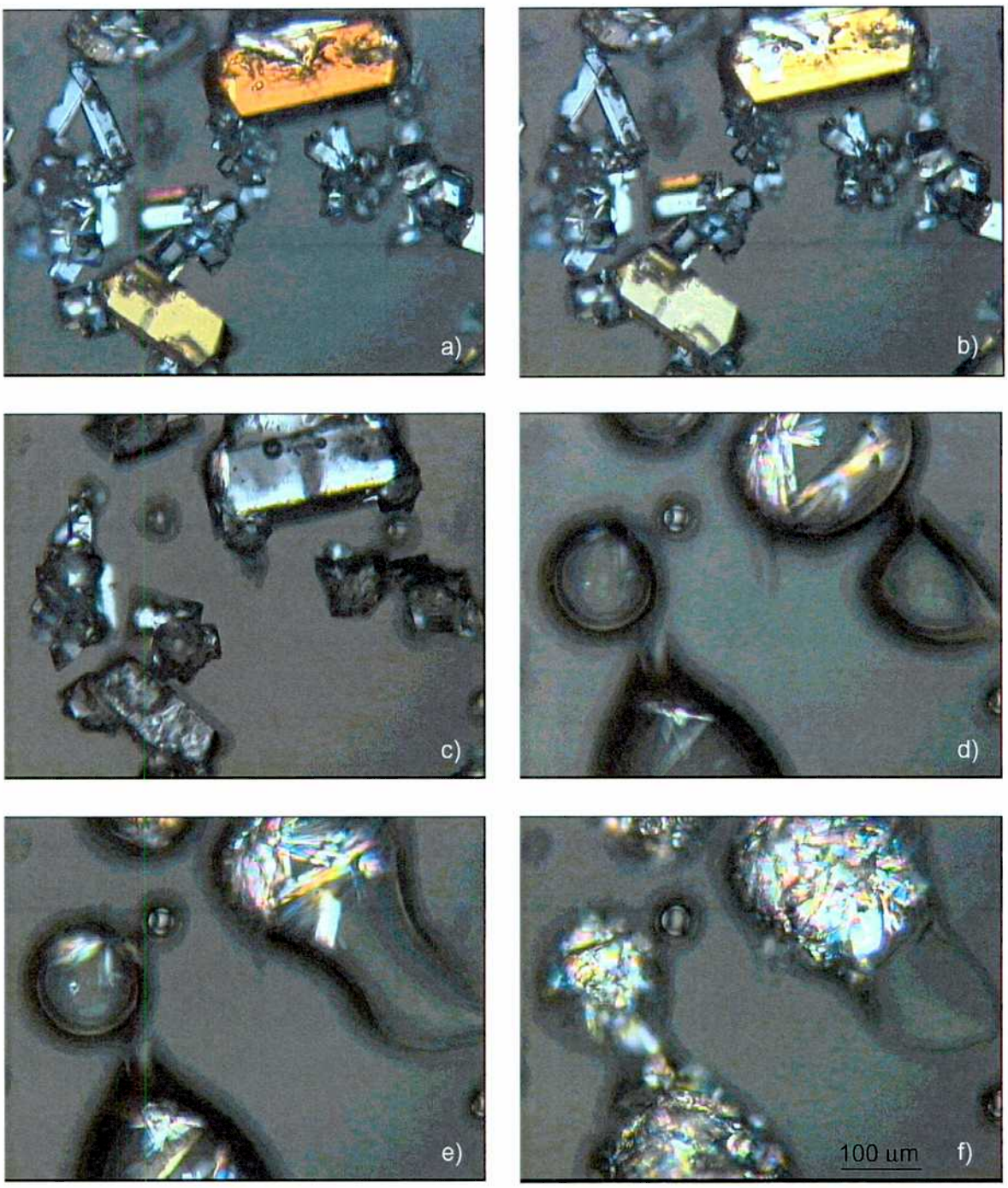


Figura IV.A.20: *Microscopía óptica con luz polarizada de cristales dihidratados de trehalosa calentados a 115°C en una celda de vidrio herméticamente cerrada. a) Condición inicial, b) 120 s, c) 147 s, d) 163 s, e) 182 s, f) 198 s.*

En la Tabla IV.A.7 se muestra el contenido de agua, T_g, área del pico endotérmico y fracción cristalina de los sistemas de trehalosa expuestos a 22, 43 y 75% H.R.. Debe señalarse que el área de los picos endotérmicos de la Fig.IV.A.20 varía con la cantidad de azúcar cristalino presente en el sistema pero también con la cantidad de muestra en la cápsula, por lo tanto para poder compararlos se calcula el calor liberado (o área del pico) por gramo.

Tabla IV.A.7: *Contenido de agua, T_g, área del pico endotérmico y fracción cristalina obtenidos para sistemas de trehalosa liofilizados y expuestos durante 7 días a 22, 43 y 75 H.R.*

H.R. %	Fracción en masa de agua (W)	T_g, (°C)	Área del pico endotérmico (J/g)	Fracción cristalina
22	0.051	50	_	_
43	0.10	13	95	0.49
75	0.11	_	139.5	1

En las matrices humidificadas a 43 y 75% H.R., la cantidad de agua (ver Tabla IV.A.7) y la movilidad ($T-T_g$ > 40°C) fueron suficientes para permitir la cristalización del dihidrato en una proporción alta (´fracción cristalina 0.49 y 1, respectivamente). La cristalización del azúcar condujo probablemente a la rápida inactivación de la enzima observada en estos sistemas (Fig. IV.A.19). En la Figura IV.A.22 se muestra una interpretación esquemática del efecto que

tendría la cristalización del azúcar sobre la desnaturalización proteica o estabilidad enzimática.

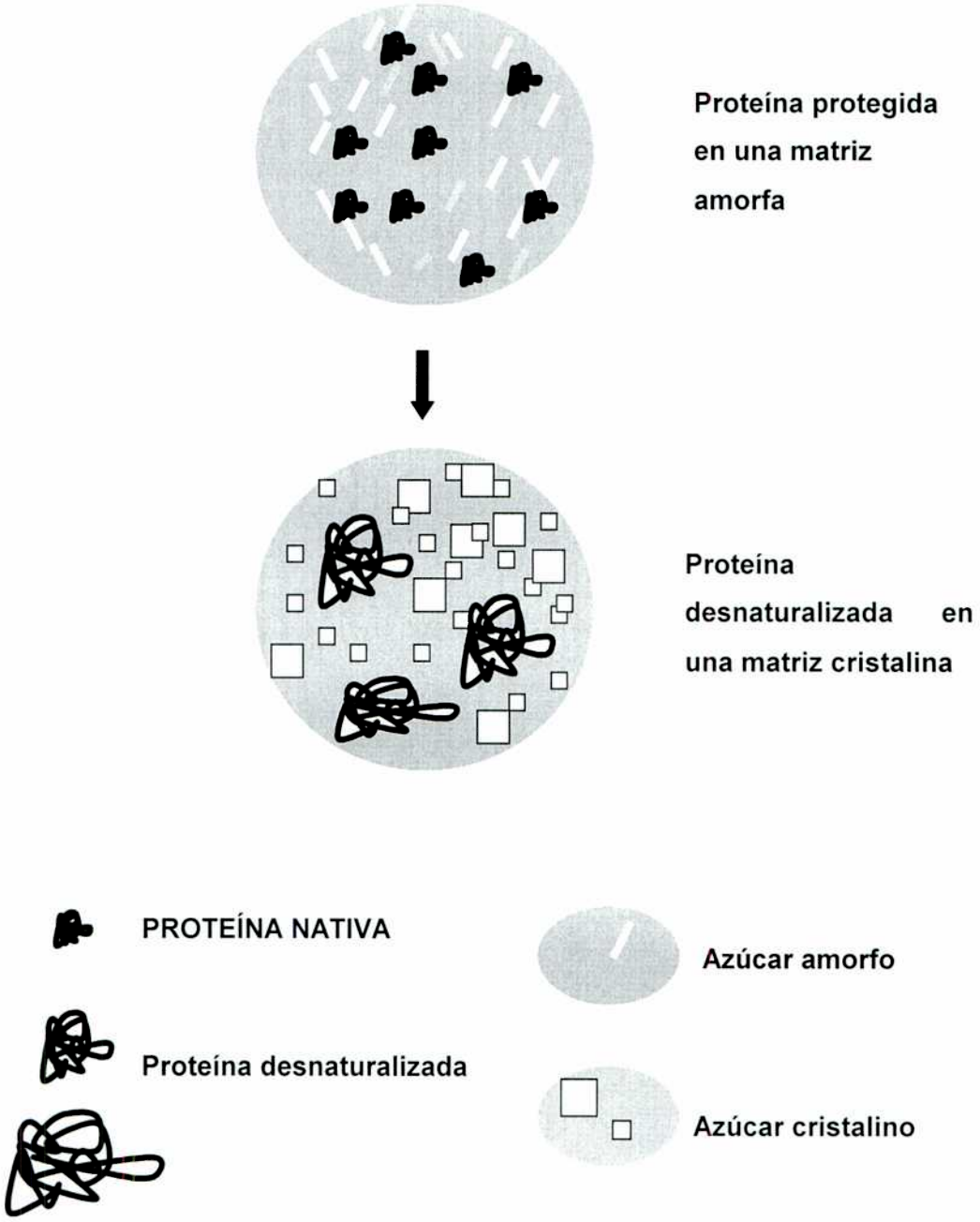


Figura IV.A.22: *Representación esquemática del efecto de la cristalización de azúcares sobre el deterioro de proteínas en sistemas deshidratados (Buera, 2001).*

En los sistemas deshidratados, los grupos oxhidrilo del azúcar deben formar uniones puente de hidrógeno con sitios hidrofílicos de la proteína para evitar de este modo la desnaturalización de la estructura proteica (Carpenter y col., 1987; Carpenter y Crowe, 1988). Cuando el azúcar cristaliza dicha interacción se pierde quedando la proteína excluída de la región cristalina y concentrada en la fase amorfa restante. De este modo además de perder en gran parte la estabilización provista por la interacción con el azúcar, la estructura proteica se ve afectada negativamente por cambios en el pH, concentración de grupos reactivos y fuerza iónica.

Cardona y col. (1997) asociaron también la inactivación de la enzima invertasa en matrices de trehalosa con la cristalización del azúcar. Sun y Davidson (1998) estudiando la estabilidad de la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa encontraron que la mezcla glucosa/trehalosa ofreció una mejor protección a la enzima que la mezcla glucosa/sacarosa y atribuyeron el efecto al menor grado de cristalización observado en la mezcla glucosa/trehalosa. Suzuki y col. (1997), analizaron la estabilidad de varias enzimas deshidratadas en presencia de azúcares y asociaron también el efecto estabilizante con la naturaleza amorfa de la matriz.

Distintos autores observaron que otras reacciones como pardeamiento no enzimático, actividad enzimática, ruptura de liposomas, hidrólisis ácida de sacarosa y oxidación de lípidos encapsulados se aceleran al ocurrir la cristalización de la matriz de azúcar (Karmas y Karel, 1994; Kouassi y Roos, 2000; Sun y Leopold, 1997; Schebor, 2001; Labrusse y col., 1992, respectivamente).

La mayor estabilidad de la enzima lactasa observada en los sistemas expuestos a 22% H.R. y almacenados a 45 y 57°C (Fig. IV.A.19 a y b) probablemente se deba a que la trehalosa no habría cristalizado en ninguna de sus formas. Como dihidrato no puede cristalizar debido a la falta de agua y si bien podría cristalizar en forma anhidra, el valor de la variable ($T-T_g$) almacenando tanto a 45 como a 57°C es pequeño (0 y 12°C respectivamente) y por lo tanto el tiempo de cristalización en estas condiciones de baja movilidad molecular sería muy largo, mucho mayor que el tiempo del experimento. Almacenando a 80°C la enzima fue poco estable a cualquiera de las humedades relativas estudiadas. En los sistemas expuestos a 22% H.R. probablemente la cristalización de la forma anhidra pudo haber ocurrido debido a la mayor movilidad del sistema ($T-T_g$= 35°C). Esto no pudo corroborarse por calorimetría diferencial de barrido porque el cristal anhidro funde aproximadamente a 200°C y a esta temperatura tan alta puede producirse descomposición del material. Independientemente de la cristalización del azúcar en la matriz, a 80°C, la temperatura *per se* podría ser el factor determinante de la inactivación de la enzima. En la Figura IV.A.23 se comparó el efecto protector de trehalosa y rafinosa en sistemas que fueron expuestos a humedades relativas crecientes y posteriormente almacenados 3 horas a 70°C. Se observa que la matriz de rafinosa, al igual que la de trehalosa, perdió su efecto protector al aumentar el contenido de agua del sistema. Sin embargo se observó mayor estabilidad de la enzima en rafinosa en el rango de H.R. 33-43%. Este comportamiento diferencial se relacionó con la cantidad de agua que cada azúcar requiere para cristalizar. La rafinosa cristaliza como pentahidrato a partir de 52% H.R. (que corresponde a una W= 0.15) y por lo

tanto puede proteger a humedades algo mayores que la trehalosa, ya que se extiende el rango de humedades relativas en el que el sistema permanece amorfo.

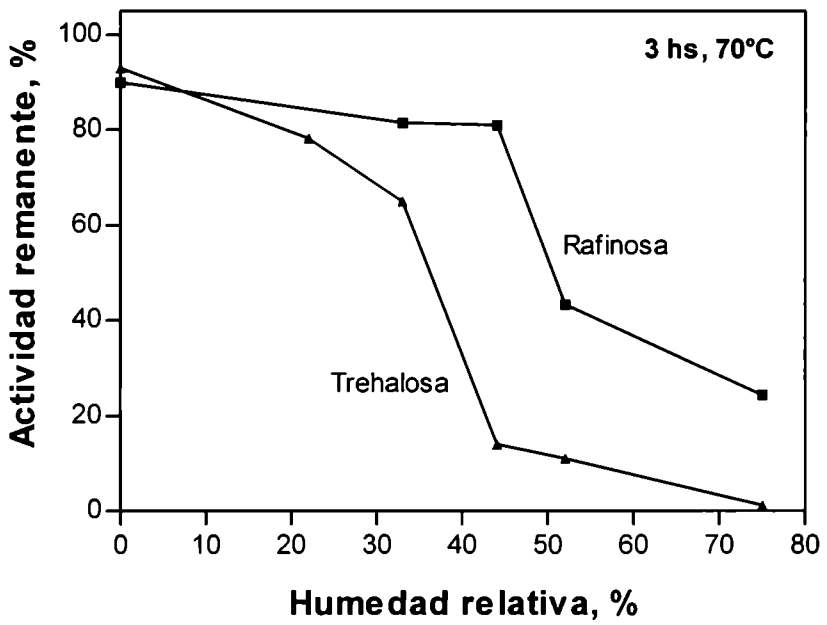


Figura IV.A.23: *Actividad remanente de lactasa en matrices cristalizables en función de la humedad relativa a la cual se humidificaron los sistemas.*

En la Figura IV.A.24 se muestra la estabilidad en matrices de trehalosa y de rafinosa humidificadas a 43% H.R. en función del tiempo de almacenamiento a 70°C. Se observa que si bien la rafinosa ofreció mayor protección a tiempos cortos (3 horas a 70°C) (Fig. IV.A.23), la enzima fue poco estable en ambos azúcares a partir de las 5 horas de almacenamiento.

El mayor tamaño de la molécula de rafinosa respecto a trehalosa sería una desventaja en relación con el volumen libre de la matriz que forma (Ding y

col., 1996), pero existen algunas razones por las cuales el azúcar rafinosa podría ser más efectivo como protector de biomateriales que la trehalosa. Si bien los valores de T_g de ambos azúcares son similares a igual contenido de agua (Saleki-Gerhardt y col., 1995; Wolkers y col., 1998), la rafinosa forma cristales pentahidrato cuando cristaliza. Gaffney y col. (1988) sugirieron además, que podría ser más efectiva para formar uniones puente de hidrógeno con biomoléculas. Sin embargo, debe destacarse que en las matrices de rafinosa equilibradas a 43% H.R. y tratadas más de 5 horas a 70°C se observó formación de color pardo/amarillento mientras que no se observó desarrollo de color en la matriz de trehalosa aún luego de 8 días de almacenamiento a 70°C. Schebor y col. (1997) encontraron que la rafinosa fue menos efectiva que la trehalosa para estabilizar a la enzima invertasa en sistemas deshidratados almacenados a temperaturas altas (mayores que 100°C) y relacionaron este comportamiento con la estabilidad química de los azúcares ya que observaron pardeamiento en la matriz de rafinosa y no en la de trehalosa luego del tratamiento térmico. Estos autores observaron que la trehalosa equilibrada a 22% H.R. y almacenada a 45°C fue estable a la hidrólisis, mientras que rafinosa comenzó a hidrolizarse en las mismas condiciones (Schebor y col., 1999).

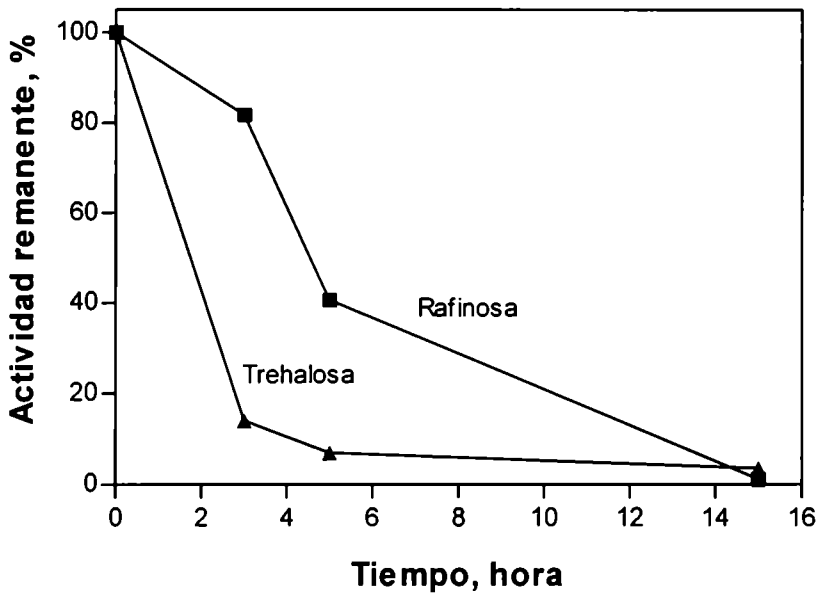


Figura IV.A.24: *Estabilidad de lactasa en matrices de trehalosa y rafinosa humidificadas a 43% H.R. y almacenadas a 70°C.*

Los resultados obtenidos muestran que la estabilidad química del azúcar es un aspecto importante a considerar, ya que si bien la rafinosa resultó superior a la trehalosa para estabilizar a la enzima lactasa en sistemas humidificados entre 33 y 52% H.R., éste efecto se vio disminuído cuando las condiciones de almacenamiento (tiempo y temperatura) favorecieron la hidrólisis de la rafinosa y el consecuente pardeamiento no enzimático de la matriz.

IV.A.3. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA ESTABILIDAD DE β-GALACTOSIDASA EN POLÍMEROS Y EN AZÚCARES.

En la Figura IV.A.25 (a, b y c) se comparó el patrón de estabilidad de lactasa a distintos tiempos en función de la variable ($T-T_g$) en matrices poliméricas y en azúcares almacenados a varias temperaturas. En la Figura IV.A.25.a se muestra la actividad remanente a un tiempo corto de almacenamiento (1 hora). En este caso, la estabilidad de la enzima a temperaturas relativamente bajas (37/45°C) fue alta tanto en los polímeros como en los azúcares estudiados, aún a valores de ($T-T_g$) >> 0. Si bien en las matrices con ($T-T_g$) < 0 la pérdida de actividad a cualquiera de las temperaturas fue baja, para valores de ($T-T_g$) > 0 el patrón general de estabilidad fue muy dependiente de la temperatura de almacenamiento, observándose a 80°C una disminución importante de la actividad remanente en todos los sistemas, y para cada sistema mayor pérdida al aumentar el valor de ($T-T_g$).

En la Figura IV.A.25.b, se muestra la estabilidad de la enzima en los distintos sistemas luego de 24 horas de almacenamiento. La estabilidad fue elevada también a temperaturas bajas en la mayoría de las matrices. El efecto de la temperatura se extendió a valores de ($T-T_g$) < 0. A temperaturas altas (70/80°C) la actividad remanente fue prácticamente nula incluso en matrices que se encontraban en estado vítreo en esas condiciones. Sólo a temperaturas de almacenamiento intermedias la estabilidad dependió de las características propias de cada matriz y se observó cierta relación con la

variable ($T-T_g$). La trehalosa se apartó del patrón general observado, ya que ofreció buena protección a 70°C en estado vítreo pero en condiciones sobreenfriadas la estabilidad disminuyó mucho aún a 45°C. Este comportamiento evidencia (como se observó en la Figura IV.A.19) la importancia de mantener la estructura amorfa de la matriz (los sistemas de trehalosa que estaban en condiciones sobreenfriadas a 45°C, son sistemas con un contenido de agua suficiente para que se forme el cristal dihidrato) .

Fig.IV.A.25.a

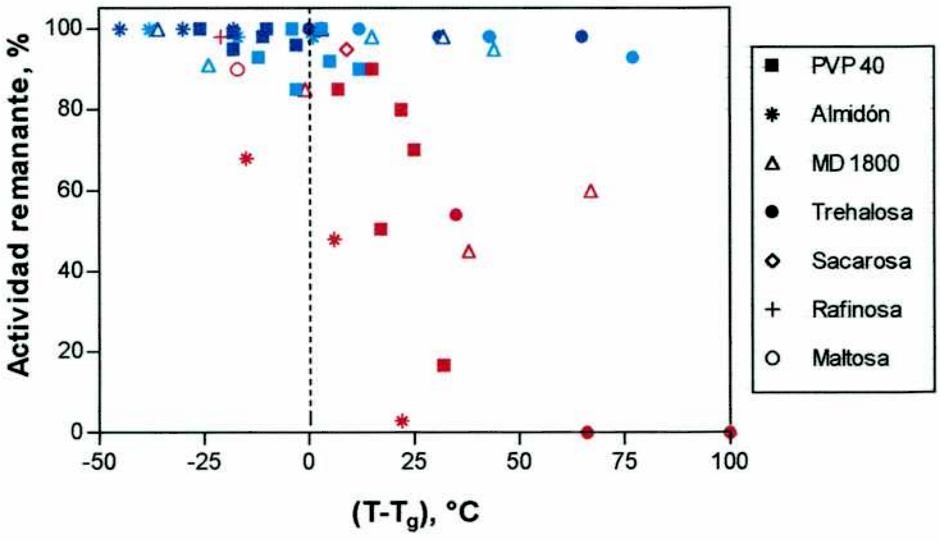
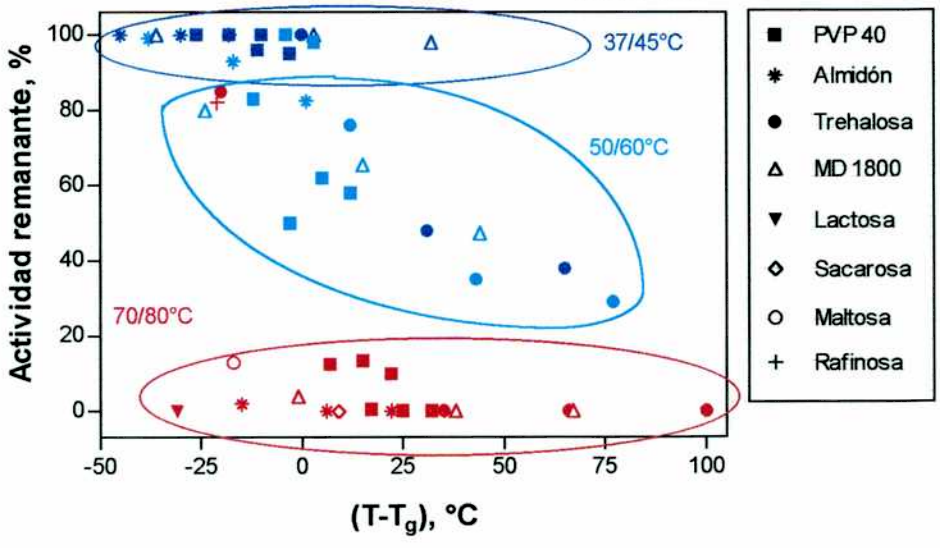


Fig. IV.A.25.b



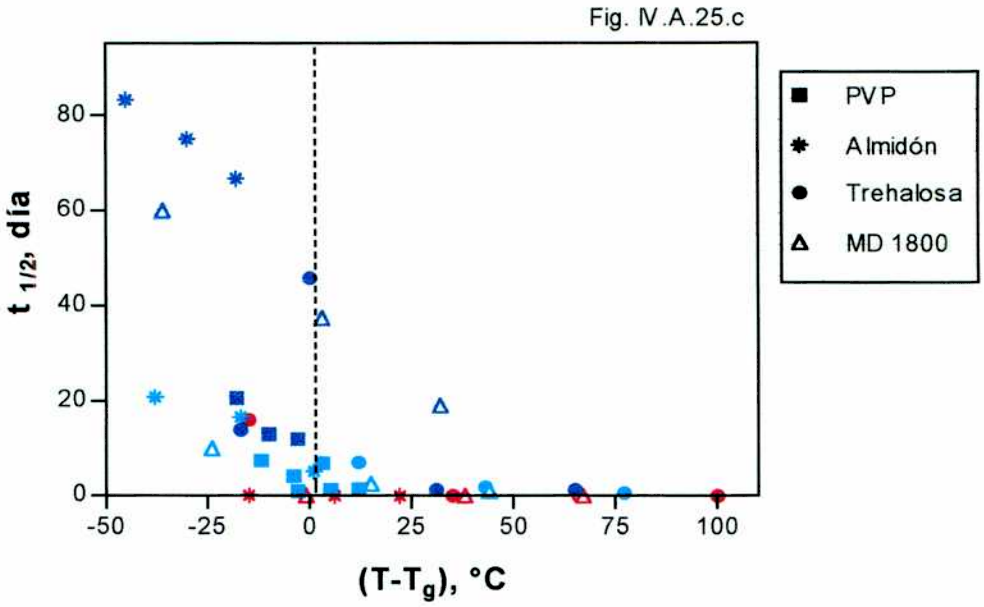


Figura IV.A.25: *Estabilidad de la enzima lactasa en función de la variable (T-Tg) en matrices poliméricas y en azúcares almacenados a varias temperaturas. a) Actividad remanente luego de 1 hora de almacenamiento; b) actividad remanente luego de 24 horas de almacenamient; c) Tiempo de vida media de la enzima. ▬ 37-45°C, ▬ 50-60°C; ▬ 70-80°C.*

En la Figura IV.A.25.c se graficó el tiempo de vida media de la enzima en las distintas matrices en función de (T-Tg). El $t_{1/2}$ permite representar el patrón de estabilidad a tiempos más largos ya que es el tiempo al cual se perdió un 50% de actividad enzimática en todos los sistemas analizados. El gráfico muestra una mayor dependencia de los datos globales con (T-Tg), pero se observa igualmente que el $t_{1/2}$ disminuyó marcadamente en sistemas vítreos por efectos no relacionados con Tg sino con la temperatura de almacenamiento y la composición de la matriz (en la Fig. IV.A.25.c. los valores de $t_{1/2}$ muy pequeños (del orden de minutos a pocas horas) se observan como valores cercanos a cero por efecto de la escala).

La Fig. IV.A.25 (a, b y c) muestra entonces que la variable ($T-T_g$) no define la estabilidad de la enzima en estos sistemas, pero el estado vítreo de la matriz permite retrasar los efectos negativos que producen el tiempo o la temperatura de almacenamiento. Rossi y col. (1997) trabajando con matrices en estado líquido-sobreenfriado ($T > T_g$), no encontraron ninguna relación entre la T_g de las matrices empleadas y la estabilidad de la enzima *Eco*RI durante el almacenamiento; por ejemplo el sistema de sacarosa ofreció mejor protección a la enzima que los sistemas de maltosa, lactosa, maltodextrina o PVP, aunque tiene una T_g menor.

En la Figura IV.A.26 se comparó la estabilidad de lactasa en polímeros y azúcares deshidratados que fueron almacenados distintos tiempos a 70°C. La línea punteada une los puntos correspondientes a matrices de maltosa, maltodextrinas y almidón que constituyen, como se mencionó previamente, una serie homóloga. Estos resultados muestran principalmente el efecto del tiempo de tratamiento térmico y el efecto de la masa molar. A tiempos cortos (Figura IV.A.26.a) la estabilidad de la enzima fue similar en las distintas matrices a excepción de lactosa, que como se discutió previamente en la Fig. IV.A.18, no ofreció protección a la enzima. Al aumentar el tiempo de almacenamiento (Figura IV.A.26.b) se observó que la estabilidad en trehalosa o rafinosa fue mayor que la que podría esperarse si se comparan con la estabilidad observada en sistemas con valores de T_g mayores.

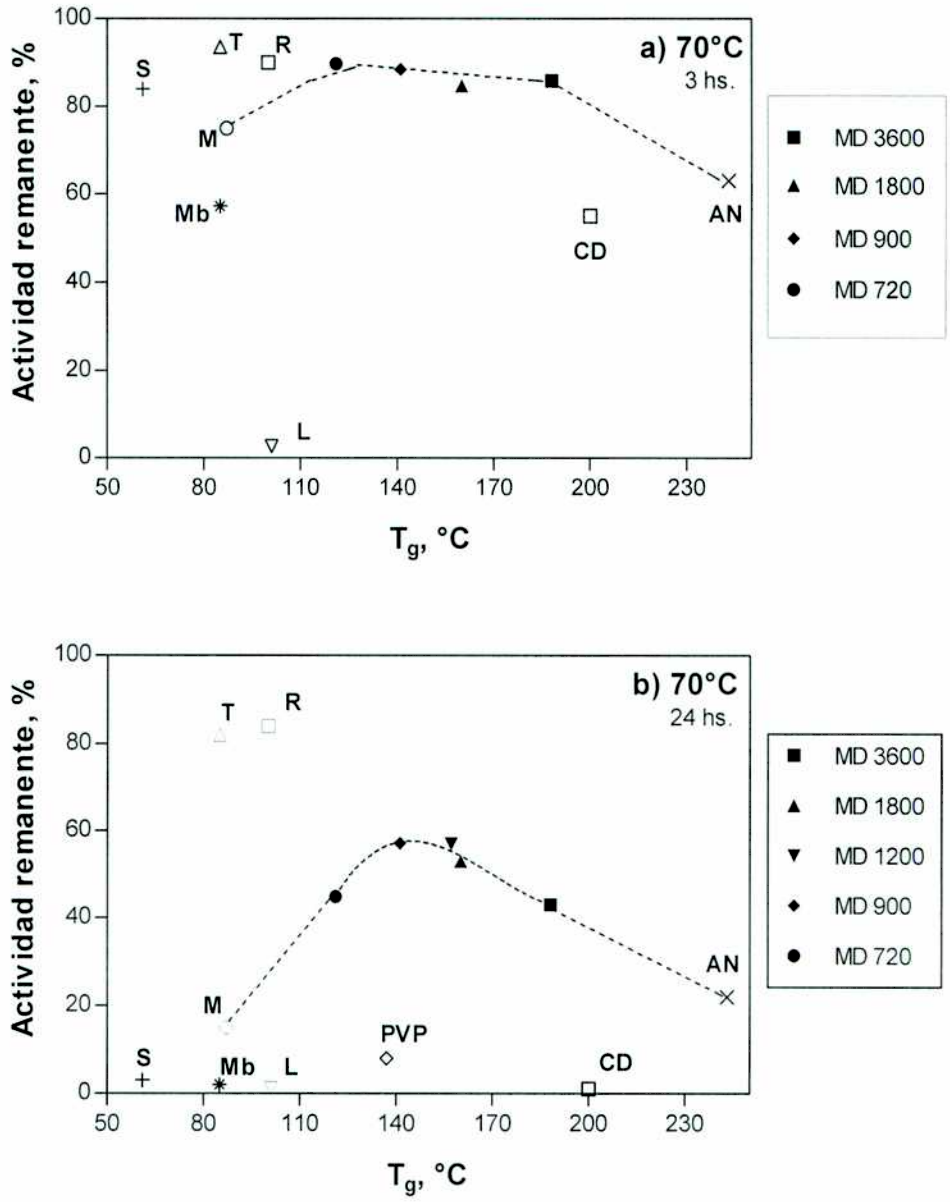


Figura IV.A.26: Estabilidad de la enzima lactasa en función de la variable T_g en matrices poliméricas y en azúcares almacenados (a) 3 horas) y (b) 24 horas a 70°C.

Otros autores observaron también que hidratos de carbono como maltodextrina o PVP fueron menos efectivos que la trehalosa para estabilizar membranas y proteínas en estado vítreo (Crowe y col., 1994; Schebor y col., 1996; Cardona y col., 1997). Según Crowe y col. (1994), las matrices de maltodextrina y PVP tendrían menor capacidad para preservar proteínas y membranas debido a que son poco efectivas para formar uniones puente de hidrógeno. Bieganski y col. (1998) compararon la viabilidad luego del secado de un retrovirus en sistemas modelo de azúcares y el polímero dextrano. Encontraron que a pesar del alto valor de T_g del dextrano, éste no fue eficiente para proteger al retrovirus de su inactivación luego del secado, mientras que sí lo fue el disacárido trehalosa. Carpenter y Crowe (1989) y Allison y col. (1999) demostraron que se requiere de una interacción directa (puente de hidrógeno) durante el secado entre el agente protector y la estructura proteica a estabilizar. El azúcar trehalosa es un efectivo dador y aceptor de uniones puentes de hidrógeno, tiene el mayor potencial (entre los disacáridos) para formar puentes de hidrógeno con biomoléculas (Franks, 1994) y menor volumen libre que favorece el empaquetamiento (Hemminga y van den Dries, 1997).

La estabilidad de la enzima lactasa en maltosa, maltodextrinas y almidón (línea punteada en la Figura IV.A.26.b) mostró un máximo que se correspondió con las maltodextrinas de masa molar intermedia. Probablemente ésto se deba a que estas matrices, comparadas con maltosa, tienen oligosacáridos no reductores que serían necesarios para estabilizar la enzima, y una masa molar que les permite cierta interacción con la proteína. La masa molar del almidón es mayor que cualquiera de los demás sistemas

estudiados, con lo cual tiene menor capacidad para interactuar con la proteína, y por otro lado mayor volumen libre y movilidad que afectan negativamente la estabilidad en sistemas deshidratados. Además la estructura semicristalina del almidón nativo contribuye a disminuir su capacidad para formar uniones de hidrógeno. Burin y col. (2001) observó que en condiciones de ($T-T_g$) similares la actividad de la enzima β-galactosidasa se desarrolló más rápido en almidón nativo que en almidón gelatinizado, indicando que el grado de cristalinidad de la matriz o la microstructura del sistema influyen también sobre la actividad enzimática. La matriz de β-ciclodextrina, como se discutió en la sección IV.A.1.2, no tiene la posibilidad de interactuar con la enzima ni de generar una matriz capaz de inmovilizarla por empaquetamiento.

Los resultados resultados obtenidos muestran que la estabilidad enzimática en matrices deshidratadas depende no sólo de la movilidad molecular de la matriz (determinada por T_g) sino también de otros factores como temperatura de almacenamiento, poder reductor, cristalinidad, masa molar y conformación o estructura molecular de la matriz.

IV.A.4. DIAGRAMAS DE ESTADO Y ESTABILIDAD ENZIMÁTICA.

En los experimentos realizados se analizó la estabilidad de la enzima lactasa en matrices con igual contenido de agua y distintas temperaturas de almacenamiento, o bien en matrices almacenadas a igual temperatura pero que habían sido expuestas a distintas humedades relativas y por lo tanto diferían en el contenido de agua. El efecto de las distintas variables en relación con la T_g de la matriz se analizó en esta sección representando los resultados en un diagrama de estado. Los mapas de estabilidad basados en la temperatura de transición vítrea definen un límite entre una región donde la movilidad molecular es baja y existen impedimentos cinéticos para llegar a la condición de equilibrio ($T-T_g < 0$), y otra región en la cual la movilidad molecular está aumentada y los cambios físicoquímicos no tendrían obstáculos para producirse (Levine y Slade, 1991, 1992).

En la Figura IV.A.26 se muestran las curvas de T_g de los diagramas de estado para las distintas matrices estudiadas (PVP, maltodextrina, almidón y trehalosa) y se graficaron en líneas punteadas las curvas de T_g de la enzima pura. Los valores de T_g para PVP 40 y almidón se obtuvieron de Buera y col. (1992) y Zeleznak y Hoseney (1987), respectivamente. En cada figura se representaron las distintas condiciones de contenido de agua de la matriz y temperatura de almacenamiento analizadas, indicando en cada caso la estabilidad de lactasa como tiempo de vida media ($t_{1/2}$). Los valores de $t_{1/2}= 0$, corresponden a tiempos muy cortos (del orden de minutos).

Fig. IV.A.27.a

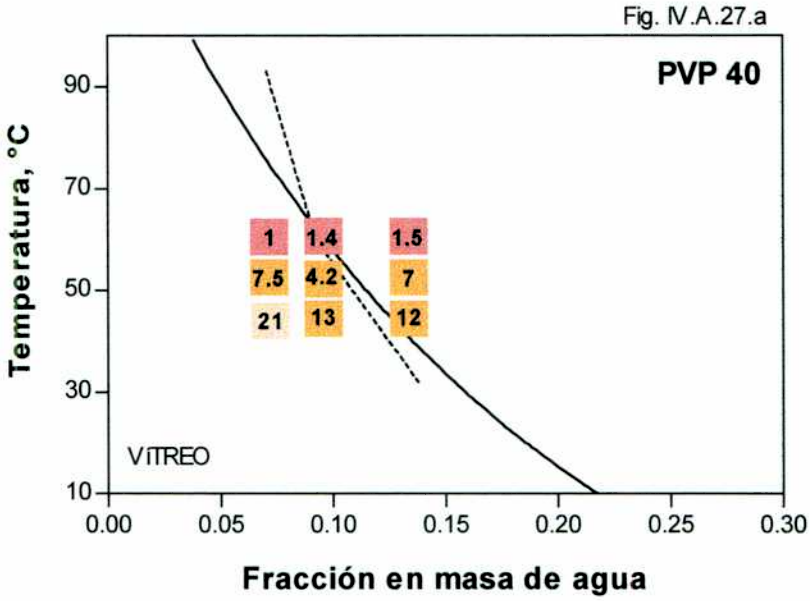
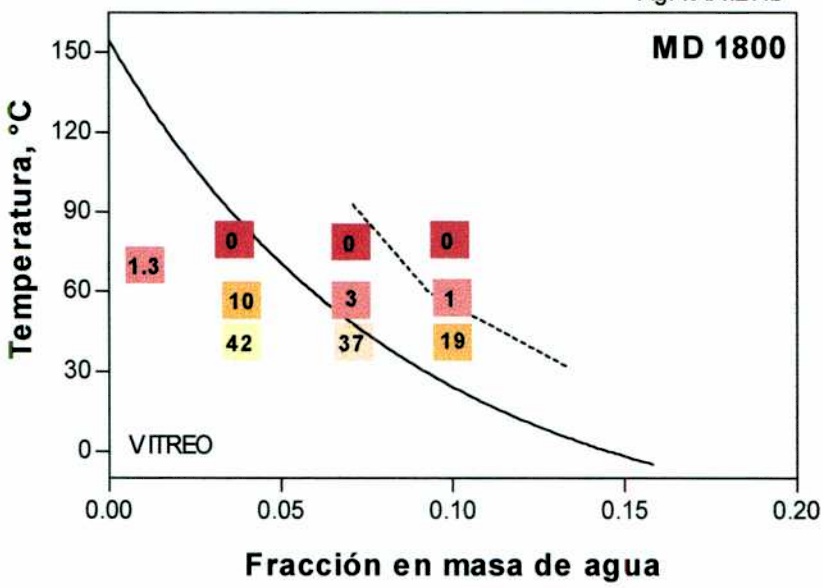
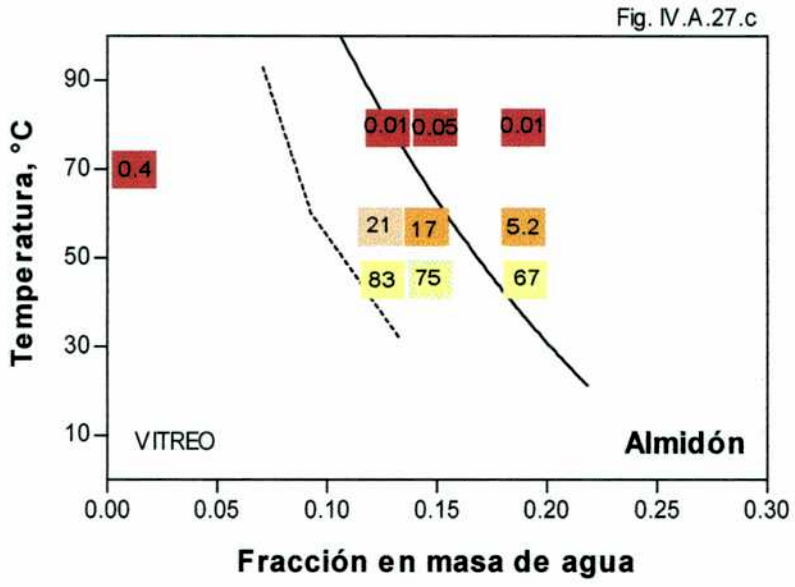


Fig. IV.A.27.b





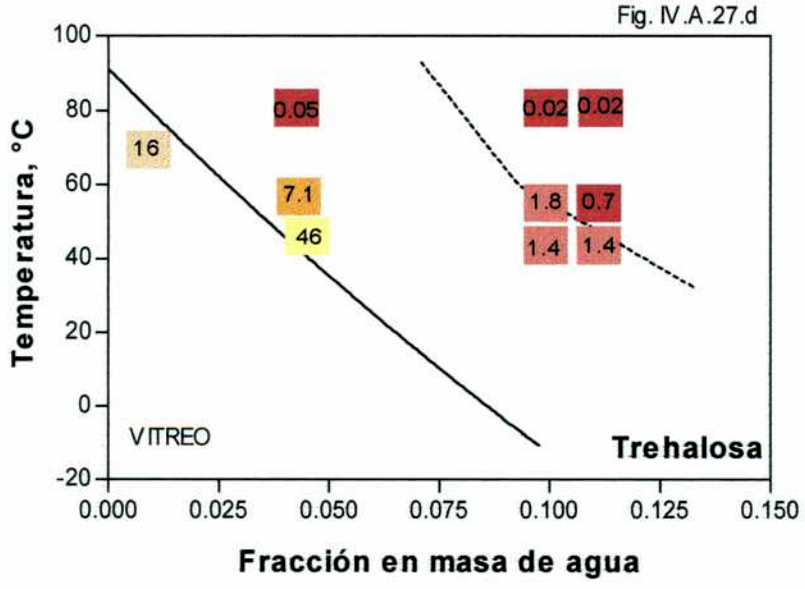


Figura IV.A.27: *Diagramas de estado correspondientes a matrices de (a) PVP 40, (b) maltodextrina, (c) almidón, (d) trehalosa. En cada gráfico se representaron las distintas condiciones (contenido de agua de la matriz y temperatura de almacenamiento) analizadas. Se indica para cada condición, el tiempo de vida media dela enzima en días obtenido (■ 0-1; ■ 1-5, ■ 5-20, ■ 20-40, ■ 40-60). En líneas punteadas se indica la T_g de la enzima dializada.*

En las matrices poliméricas se observa que el tiempo de vida media disminuyó marcadamente en condiciones vítreas tanto por incremento del contenido de agua a una dada temperatura o por aumento de la temperatura de almacenamiento a igual contenido de agua del sistema. En estado vítreo, la estabilidad de la enzima fue mayor en trehalosa ya que se observó que en sistemas de bajo contenido de agua (W= 0-0.05) y almacenados a 70°C, el $t_{1/2}$ fue superior en esta matriz. En condiciones sobreenfriadas la estabilidad en trehalosa fue buena sólo a bajas temperaturas y contenidos de agua. Al aumentar el contenido acuoso, la cristalización de la trehalosa se ve favorecida (como dihidrato) y por lo tanto la enzima fue poco estable. A 80°C, el efecto de la temperatura *per se* fue importante aún a humedades bajas. A temperaturas bajas, el almidón fue el que ofreció mayor protección aún en sistemas muy húmedos. Esto podría deberse a interacciones de la matriz con el agua, de la enzima con la superficie de los gránulos de almidón. El alto valor de T_g del almidón podría favorecer en estas condiciones de alta humedad.

Se realizó un análisis estadístico ("Stepwise linear regresion analysis", Statistix analytical software para windows) para evaluar cuál era la variable estudiada (temperatura, contenido de agua o T_g de las matrices) que tenía mayor influencia sobre la estabilidad de la enzima ($t_{1/2}$). El programa realiza una serie repetitiva de pasos en los cuales compara el ajuste de las variables con la variable dependiente y elimina en cada paso aquella variable que introduce mayor diferencia entre valores calculados y experimentales en el análisis, el proceso se realiza hasta que se evalúan todas las combinaciones

posibles. De esta manera, el mejor coeficiente de correlación se obtuvo para la variable temperatura (r^2= 0.7159) para un $p < 0.05$.

Es importante notar que en este trabajo los análisis se enfocaron al estudio de las propiedades físicas de la matriz en la cual la enzima está encapsulada o inmovilizada. La movilidad molecular de la enzima podría estar o no acoplada a la movilidad molecular de la matriz. Si la enzima y la matriz constituyeran fases diferentes, podría ocurrir por ejemplo que una fase estuviese vítrea y la otra en estado sobreenfriado dependiendo del valor de T_g de cada componente. Por lo tanto, la inactivación enzimática podría estar relacionada con la Tg de la propia enzima más que con la movilidad de la matriz. La concentración de la enzima en las matrices estudiadas fue muy baja como para poder detectar sus transiciones por DSC. Los valores de T_g se determinaron para la enzima lactasa dializada pura y fueron 93, 60 y 32°C para 22, 33 y 43% H.R., respectivamente, se muestran las curvas correspondientes como líneas punteadas en los diagramas de la Figura IV.A.27. En el caso de que hubiera separación de fases, la transición vítrea de la enzima y de la matriz ocurriría a temperaturas cercanas, para las matrices de PVP 40 (Fig. IV.A.27.a). En la matriz de almidón la T_g de la enzima cae por abajo del valor de T_g de la matriz, y los valores de $t_{1/2}$ obtenidos para la enzima indican que el almidón tendría efecto protector aún cuando la enzima estuviera en condiciones de tener alta movilidad (Fig. IV.A.27.c). En las matrices de MD 1800 y trehalosa (Fig. IV.A.27 b y d) la curva de T_g de la enzima cae en ambos casos por arriba de la curva de T_g de las matrices. Se observa que a las temperaturas de almacenamiento más bajas, la estabilidad disminuyó mucho al aumentar el contenido acuoso aunque la enzima estaría

en esas condiciones, todavía en estado vítreo. Es decir, aún en el caso extremo de que la enzima y la matriz se comportaran totalmente en fases separadas, esto no invalida las conclusiones obtenidas. Por otro lado, Schebor (2000) observaron que la actividad de una enzima invertasa comercial deshidratada tal cual (sin incluir en una matriz) disminuyó gradualmente al aumentar la temperatura, hubo pérdida de actividad estando la enzima en estado vítreo y no observaron cambios importantes en el patrón de pérdida de actividad a temperaturas cercanas a la T_g de la proteína.

IV.A.5. CONCLUSIONES DE LA SECCIÓN IV.A.

⇨ En solución acuosa La enzima lactasa fue totalmente inestable al proceso de liofilización. La adición de polímeros (como PVP, maltodextrina, almidón) o azúcares a la solución, permitió evitar la inactivación de la enzima durante la deshidratación.

⇨ La temperatura, el contenido de agua y el valor de ($T-T_g$) en los rangos estudiados, efectaron la estabilidad de la enzima. De ellos, la temperatura fue el factor que más correlacionó con la pérdida de actividad. Los modelos de Arrhenius y VTF resultaron adecuados para describir la dependencia de la velocidad de inactivación enzimática con la temperatura en matrices poliméricas.

⇨ En los sistemas deshidratados la estabilidad enzimática se vio afectada por los siguientes factores:

- Interacciones moleculares con la matriz: Los azúcares no reductores trehalosa y rafinosa en estado amorfo ofrecieron mayor protección que las matrices poliméricas de T_g más elevada, lo cual sugiere que habría un mecanismo de protección específico, no relacionado con el estado físico del medio pero sí con interacciones intermoleculares.

- Reactividad química del azúcar: Los disacáridos reductores no ofrecieron protección, probablemente porque pueden reaccionar a través de Maillard con la proteína afectando su conformación y actividad catalítica.

- Propiedades microestructurales del sistema: Determinadas por un conjunto de factores como T_g, grado de empaquetamiento y masa molar de las moléculas que constituyen la matriz.

- Propiedades supramoleculares: La cristalización de la matriz de azúcar afectó negativamente la estabilidad de la enzima.

Los factores mencionados, tienen efectos interdependientes y son aspectos importantes a considerar para definir la estabilidad térmica de enzimas en sistemas con bajo contenido acuoso.

IV.B. ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LA EFICIENCIA DE LOS AZÚCARES COMO PROTECTORES ENZIMÁTICOS EN SISTEMAS SOBREENFRIADOS.

Como se observó en la sección IV.A.2.2, la cristalización del azúcar que constituye la matriz amorfa, afectó negativamente la estabilidad de la enzima. Recientemente otros autores asociaron también la inactivación enzimática con la cristalización del azúcar utilizado como agente estabilizante (Cardona y col., 1997; Suzuki y col., 1997; Sun y Davison, 1998). Hay evidencias que muestran que en sistemas biológicos como levaduras, semillas y embriones, la cristalización de los azúcares protectores está naturalmente retrasada/inhibida por la presencia de polímeros, otros azúcares, proteínas, etc. (Koster, 1991; Williams, 1994; Sun y Leopold, 1997; Buitink y col., 2000). El retraso/inhibición de la cristalización de azúcares en sistemas sobreenfriados, permitiría extender el rango de aplicación de los mismos como agentes protectores. En particular, en el presente trabajo se estudiaron propiedades específicas de los sistemas amorfos, el impacto de la cristalización sobre la estabilidad enzimática y se analizaron estrategias, diferentes a la vitrificación, para retrasar/inhibir la cristalización de azúcares en sistemas sobreenfriados.

IV.B.1. EMPLEO DE MATRICES COMBINADAS POLÍMERO/AZÚCAR.

En la Figura IV.B.1 se comparó la estabilidad de la enzima lactasa en trehalosa (matriz cristalizable) y en maltodextrinas de diferentes masas molares

(matrices no cristalizables) que fueron liofilizadas, humidificadas a distintas humedades relativas y luego almacenadas 24 horas a 57°C. Si bien en sistemas deshidratados se observa que la estabilidad de la enzima en las maltodextrinas fue buena, la protección ofrecida por la matriz de trehalosa fue superior, recuperándose más del 95% de actividad enzimática luego del tratamiento térmico. En los sistemas humidificados a 33% H.R. la protección fue similar en las maltodextrinas y en trehalosa observándose (como se mostró también en las Figs. IV.A. 10 y 11) que el aumento de la masa molar de las maltodextrinas (y en consecuencia de la T_g de la matriz) no tuvo un efecto importante sobre la resistencia térmica de la enzima como podría esperarse en base al aspecto físico (vítreo o sobreenfriado) de los diferentes sistemas. A 75% H.R. si bien todos los sistemas estaban colapsados, la estabilidad de lactasa fue mayor en las maltodextrinas que en trehalosa.

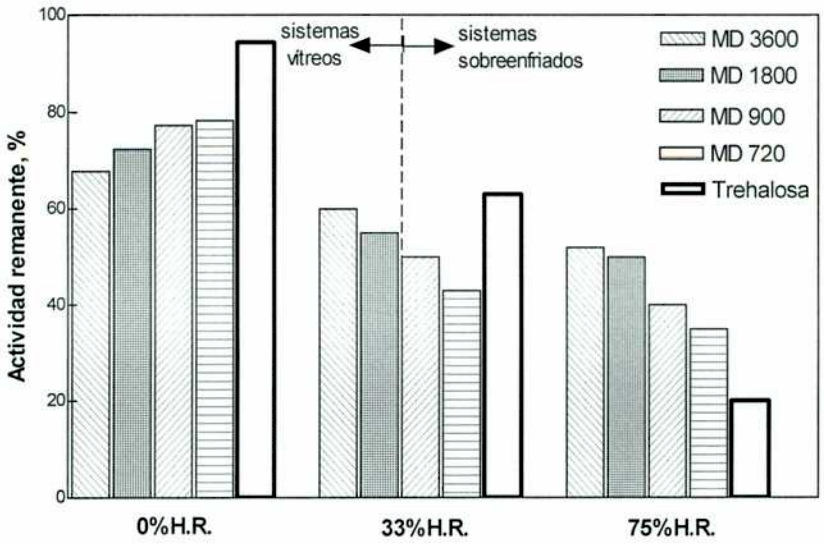


Figura IV.B.1: *Actividad remanente de lactasa en maltodextrinas de diferentes masas molares en comparación con la estabilización de la enzima en trehalosa. Los sistemas se liofilizaron, se deshidrataron sobre un agente*

desecanre ("0" % H.R.) o se humidificaron a distintas H.R., y posteriormente se almacenaron 24 horas a 57°C.

En la Figura IV.B.2 se comparó también la estabilidad de la enzima en matrices de maltodextrina (MD 1800) y de trehalosa humidificadas a distintas humedades relativas pero almacenadas en este caso a menor temperatura (45°C). Esta temperatura tuvo poco efecto sobre la estabilidad de la enzima en MD 1800 pero fue suficiente para que se produzca inactivación en la matriz de trehalosa a partir de 43% H.R. ($T-T_g > 30$). Se observa claramente que 43% H.R. es una humedad relativa crítica para la estabilidad de la enzima en trehalosa, ya que corresponde, como se mencionó anteriormente (ver Fig IV.A.20 y Tabla IV.A.7), a un contenido de agua de la matriz (W= 0.1) que favorece la cristalización del azúcar. En una matriz no cristalizable como la maltodextrina, la estabilidad de la enzima disminuye gradualmente al aumentar la humedad relativa a la cual se humidifican los sistemas, no observándose una caída brusca en la estabilidad como en trehalosa. En la Fig. IV.B.1, las diferencias de estabilidad a 75% H.R. en matrices de maltodextrina y trehalosa fueron menos evidentes porque hubo mayor inactivación en las maltodextrinas por efecto de la mayor temperatura de almacenamiento. Cardona y col. (1997) analizando la estabilidad de la enzima invertasa en matrices liofilizadas de maltodextrina y de trehalosa observaron el mismo patrón de estabilidad que el observado en el presente trabajo para lactasa.

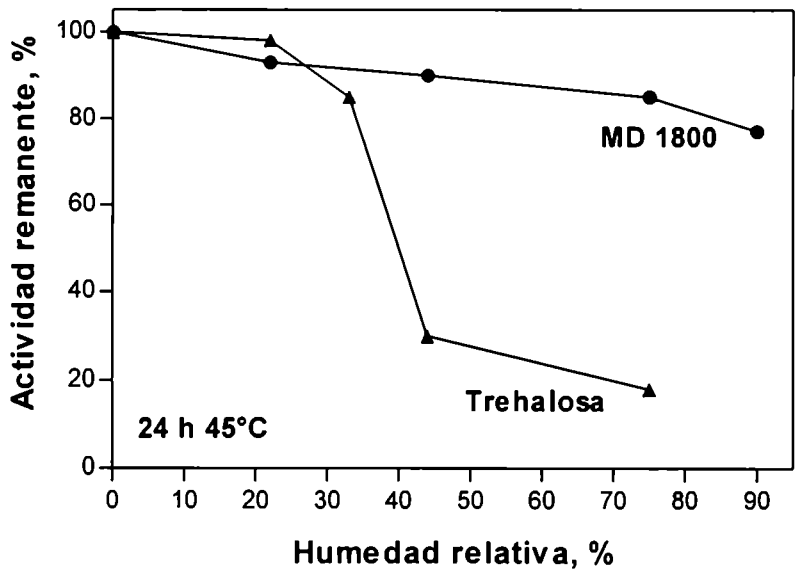


Figura IV.B.2: *Actividad remanente de lactasa en matrices de maltodextrina (MD 1800) (matriz no cristalizable) y en trehalosa (cristalizable) humidificadas a distintas humedades relativas y almacenadas 24 horas a 45°C.*

Lodato y col. (1999) analizaron en forma comparativa la estabilidad de levaduras deshidratadas en matrices de maltodextrina y trehalosa equilibradas a distintas humedades relativas. En los sistemas deshidratados el patrón de estabilidad de las levaduras en maltodextrina y en trehalosa fue similar al observado para la enzima lactasa. Sin embargo, a humedades relativas mayores que 22% las levaduras fueron poco estables en maltodextrina, perdiéndose completamente la viabilidad, en ambas matrices, a 57% H.R.. Estos autores tampoco encontraron una relación directa entre el grado de colapso de la matriz externa y la estabilidad de las levaduras. La estabilidad de los microorganismos está relacionada con la integridad tanto de las proteínas como de la membrana celular. La menor capacidad de las maltodextrinas, en

comparación con la matriz de trehalosa o maltosa, para proteger células de levadura se asoció con el hecho de que las maltodextrinas por ser polímeros de alta masa molar, tienen limitaciones para atravesar la pared celular y acceder a la membrana y proteínas de la célula (Lodato y col., 1999). Crowe y col. (1987) mostraron que algunos polímeros (como dextrano y almidón) no interactúan con los grupos polares de los fosfolípidos de las membranas, no disminuyen la temparatura de fusión de las mismas y no protegen liposomas o vesículas durante el secado. La presencia de disacáridos o trisacáridos amorfos durante el secado y almacenamiento de las levaduras parece ser un factor crítico en la protección.

El efecto protector de trehalosa sobre la enzima lactasa se observó en sistemas con bajo contenido acuoso y se relacionó inversamente con el grado de cristalización del azúcar, las maltodextrinas al ser sistemas no cristalizables resultaron ser mejores agentes estabilizantes que trehalosa cuando el contenido de agua de la matriz fue mayor que $W \cong 0.1$. En la práctica, resulta difícil reunir en un único compuesto propiedades como estabilidad física (determinada por el valor de T_g y por el tipo de matriz) y capacidad para formar uniones puente de hidrógeno con grupos polares de la biomolécula a estabilizar. Si bien el valor de T_g aumenta con la masa molar de la matriz, la capacidad para interactuar con otras biomoléculas y el grado de empaquetamiento del sistema disminuyen (Prestrelski y col, 1995; Tanaka y col., 1991). La combinación de disacáridos con polímeros de alto peso molecular permitiría incrementar la T_g de la formulación, comparada con la T_g del disacárido solo, manteniendo las propiedades estabilizantes del azúcar. El desarrollo de matrices combinadas es particularmente importante en la

protección de microorganismos, donde la estabilización depende en gran medida de la presencia de azúcares en estado amorfo. El retraso del proceso de cristalización por adición de compuestos de alto peso molecular ha sido demostrado por Berlin y col. (1973) para lactosa y por Iglesias y Chirife (1978) para sacarosa. Karmas y col (1992), observaron que la cristalización de lactosa se puede retrasar incorporando al sistema amioca (almidón de alta amilosa) o carboximetilcelulosa. Tsourouflis y col. (1976) lograron retrasar el colapso en jugo de naranja deshidratado agregando maltodextrinas y gomas al sistema.

Teniendo en cuenta las evidencias mencionadas se realizaron experimentos empleando mezclas de maltodextrina (MD 1800) con trehalosa y se analizó la estabilidad de lactasa en relación con las características físicas del sistema.

En la Tabla IV.B.1. se muestra el contenido de agua, el valor de T_g y la fracción de azúcar que cristalizó en sistemas liofilizados de trehalosa, MD 1800 y mezclas MD/T (80:20) que fueron humidificadas a 22, 44 y 75% H.R. a 25°C. Las mezclas MD/T presentaron un único valor de T_g que fue intermedio entre los valores obtenidos para las matrices puras de trehalosa o maltodextrina humidificadas a la misma humedad relativa. La observación de un valor único de T_g en los sistemas combinados indica que los componentes son miscibles entre sí en las condiciones analizadas.

Tabla IV.B.1. *Contenido de agua, T_g y fracción cristalina en matrices de maltodextrina, trehalosa y MD/T (80:20) liofilizadas y humidificadas a distintas humedades relativas.*

Matriz	H.R. %	W	T_g (°C)	Fracción cristalina
MD 1800	22	0.039	81	_
	43	0.065	42	
	75	0.099	13	_
Trehalosa	22	0.057	50	_
	43	0.102	13	0.68
	75	0.110	_	1
MD/T (80:20)	22	0.046	63	_
	43	0.100	44	
	75	0.120	-20	_

En los sistemas mezcla MD/T (80:20) el azúcar no cristalizó durante la humidificación a 25°C (Tabla IV.B.1). En mezclas MD/T (50:50) se observó que la cristalización se inhibió a 43% H.R. pero a 75% H.R. la fracción cristalina fue de 0.32. En sistemas MD/T humidificados a 43% H.R. el retraso/inhibición de la cristalización podría deberse tanto al incremento del valor de T_g en presencia de la maltodextrina que permite que el sistema se mantenga en estado vítreo durante la humidificación, o bien a efectos relacionados con la modificación del ambiente y las condiciones que favorecen la cristalización del azúcar (posible hidratación preferencial de la maltodextrina, interacciones polímero-azúcar probablemente restringen la orientación espacial de las moléculas de azúcar). Sin embargo a humedades mayores (75% H.R.) el valor de T_g de la mezcla es muy bajo y la maltodextrina probablemente inhiba o retrase la

cristalización por mecanismos no relacionados con la T_g, ya que a esta humedad tan alta y a 25°C, la matriz se encuentra claramente en estado sobreenfriado.

En la Figura IV.B.3 se comparó la estabilidad térmica de lactasa en los sistemas descriptos en la Tabla IV.B.1 en función del tiempo de almacenamiento a 45°C. Se observa que en los sistemas humidificados a 22% H.R., en los cuales la trehalosa no estaba cristalizada (Tabla IV.B.1), la estabilidad de la enzima fue similar en maltodextrina o trehalosa, siendo algo mayor la protección en la mezcla MD/T. En los sistemas de trehalosa humidificados a 43 y 75% H.R. el azúcar había cristalizado (parcial o totalmente dependiendo de la H.R.) durante la humidificación y por lo tanto la enzima se inactivó rápidamente durante el tratamiento térmico. La presencia de maltodextrina retrasó/inhibió la cristalización de trehalosa en los sistemas combinados (Tabla IV.B.1) y permitió extender el efecto protector de trehalosa a humedades relativamente altas (43 y 75% H.R.).

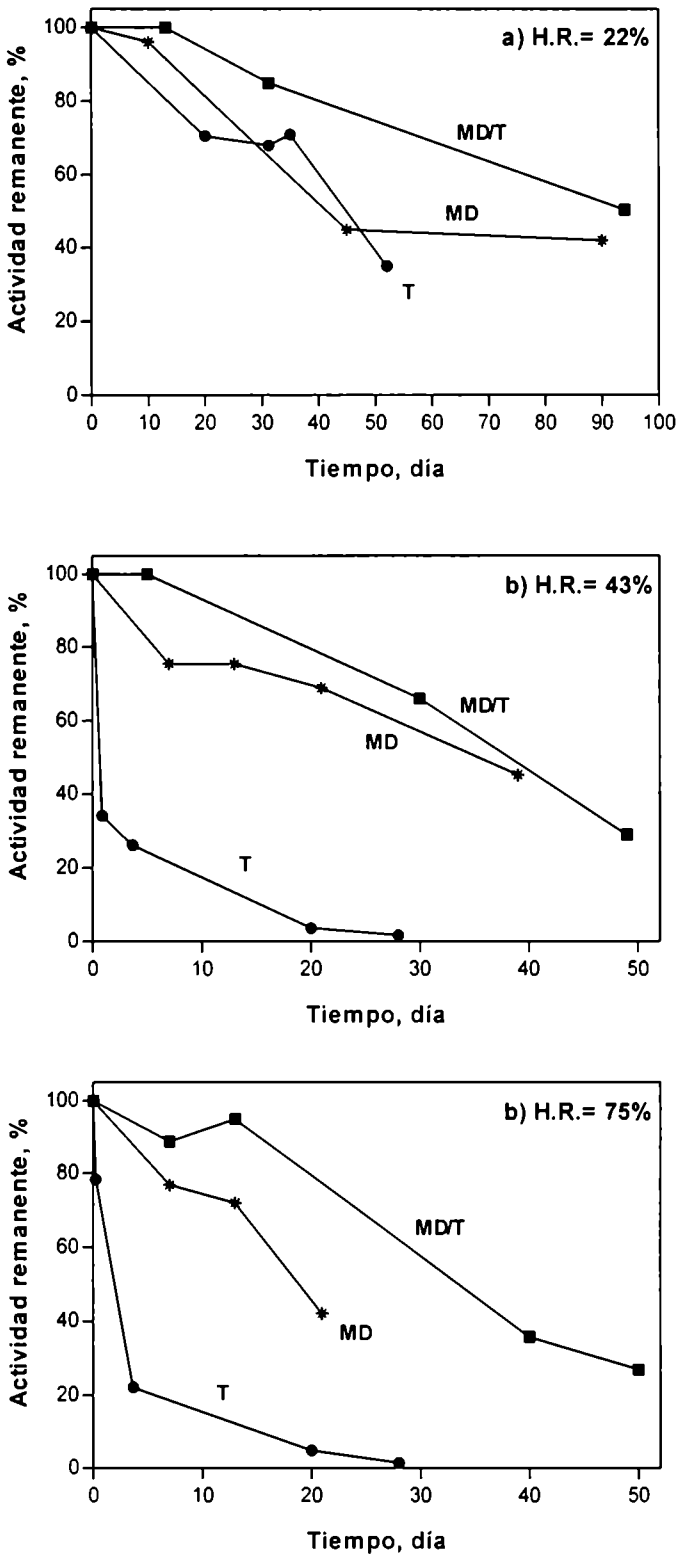


Figura IV.B.3: *Actividad remanente de lactasa en matrices de maltodextrina (MD 1800), trehalosa (T) y mezclas MD/T liofilizadas y humidificadas a (a) 22), (b) 43 y (c) 75% H.R. en función del tiempo de almacenamiento a 45°C.*

En la Figura IV.B.4 se muestra el efecto de la temperatura de almacenamiento sobre el tiempo de vida media de la enzima en maltodextrina (MD 1800), trehalosa y sistemas combinados MD/T (50:50) humidificados a 75% H.R. Almacenando a 45°C, la estabilidad de la enzima en maltodextrina fue buena en comparación con la matriz de trehalosa, observándose un efecto sinérgico importante en la mezcla MD/T. Si bien la estabilidad en cualquiera de los sistemas disminuyó marcadamente con el aumento de la temperatura de almacenamiento (57°C), el $t_{1/2}$ en la matirz combinada MD/T siguió siendo aproximadamente diez veces mayor que en los sistemas puros.

La protección diferencial observada en sistemas combinados MD/T, sin embargo, no se puede generalizar a la estabilización de otros biomateriales ya que, por ejemplo Lodato y col. (1999) observaron que en sistemas MD/T (80:20) humidificados a 33% H.R. la presencia de maltodextrina afectó negativamente la estabilidad de levaduras respecto de aquellas en trehalosa pura. No sólo la presencia sino también, una concentración crítica de disacáridos (trehalosa o maltosa) en la matriz externa fueron factores determinantes de la viabilidad.

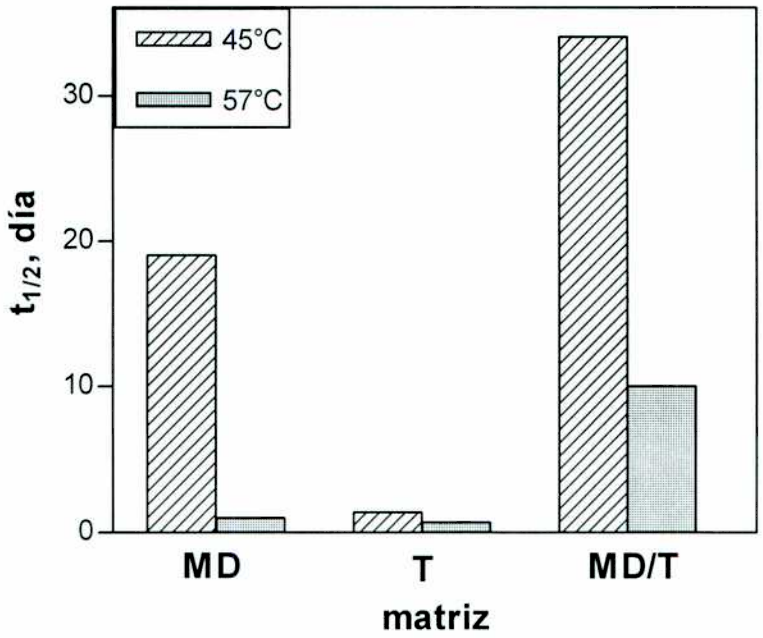


Figura IV.B.4: *Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre el tiempo de vida media de lactasa en MD 1800, trehalosa y mezclas MD/T (50:50) liofilizadas y humidificadas a 75% H.R..*

IV.B.2. EMPLEO DE MATRICES COMBINADAS FORMADAS POR DOS AZÚCARES.

IV.B.2.1. Matrices de sacarosa co-liofilizadas con rafinosa o trehalosa.

Disacáridos como trehalosa o sacarosa y oligosacáridos como rafinosa, estaquiosa y verbascosa cumplen un papel importante en la tolerancia de levaduras, esporas, crustáceos, nematodos y cierta variedad de semillas a la deshidratación (Aguilera y Karel, 1997). En particular, la presencia de varios azúcares en semillas, embriones y tejidos de ciertas plantas se relacionó con la necesidad de mantener una estructura vítrea para preservar la viabilidad en condiciones extremas. Algunos autores (Roos y Karel, 1991b; Karmas y col., 1992; Saleki-Gerhardt y Zografi, 1994) observaron que la cristalización de un dado azúcar se puede retrasar por incorporación de diferentes azúcares en la matriz. En este sentido se analizó la eficiencia de matrices formadas por mezclas de azúcares (sacarosa/rafinosa, sacarosa/trehalosa,) para su uso potencial como agentes protectores de enzimas en relación con las características físicas del sistema. Se realizaron estudios de cristalización por DSC y se analizaron los posibles mecanismos involucrados en el retraso/inhibición de la cristalización de sacarosa en presencia de otro azúcar.

En la Figura IV.B.5 se muestra el efecto de matrices combinadas (S/R y S/T) y de la concentración de sólidos (en las soluciones previo a la liofilización) sobre la estabilidad de lactasa a 70°C en sistemas humidificados a 33% H.R. y

25°C. En todos los sistemas estudiados (tanto sistemas puros como sistemas mezcla), la estabilidad de la enzima aumentó al aumentar la proporción de sólidos en la matriz. Por otro lado, las mezclas de sacarosa con rafinosa o trehalosa, mejoraron la estabilidad de la enzima con respecto a la obtenida en la matriz pura de sacarosa.

En la Figura IV.B.6 se compararon distintos tiempos de almacenamiento a 70°C sobre la estabilidad de la enzima en las matrices constituídas por azúcares puros o mezclas, humidificadas a 33% H.R. A tiempos cortos (3 horas), se podría predecir que las mezclas S/T y S/R protegen tanto o más que los sistemas de trehalosa o rafinosa puros. Sin embargo, luego de almacenar 13.5 horas, se observó una disminución importante de la estabilidad enzimática en todas las matrices. Las mezclas fueron menos efectivas que trehalosa o rafinosa siendo la protección en sacarosa casi nula. La matriz de sacarosa mostró un color amarillento luego de 13.5 horas a 70°C que indica hidrólisis, al menos parcial del azúcar con el consecuente desarrollo de la reacción de Maillard. En las mezclas no se observó pardeamiento.

La cristalización de azúcares amorfos es un fenómeno dependiente del tiempo, sujeto a variables dinámicas. Las diferencias de estabilidad observadas entre matrices puras o combinadas y en el patrón de estabilidad a distintos tiempos de almacenamiento, se realacionó con una cristalización diferencial y dependiente del tiempo de sacarosa en las mezclas, y con un menor efecto de la reacción de Maillard en estos sistemas. En este sentido se evaluaron propiedades físicas de los sistemas como T_g y grado de cristalización utilizando calorimetría diferencial de barrido.

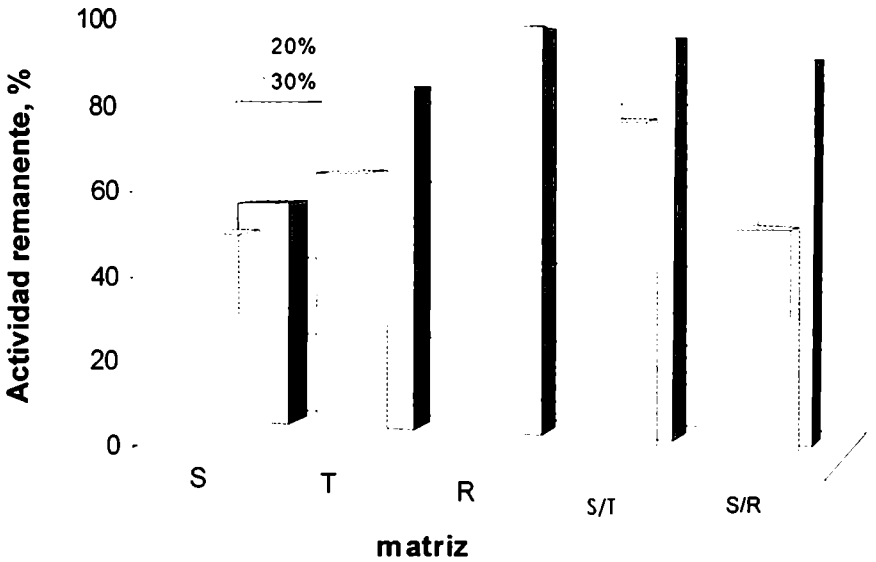


Figura IV.B.5: *Efecto del contenido de sólidos previo a la liofilización de la matriz, sobre la estabilidad de lactasa en sistemas humidificados a 33% H.R. y almacenados 3 horas a 70°C. Los sistemas se obtuvieron por liofilización de soluciones conteniendo 20 o 30% de sólidos.* Las mezclas S/T o S/R al 20% se prepararon en proporción 50:50, las mezclas conteniendo 30% de sólidos se prepararon en proporción (35:65).

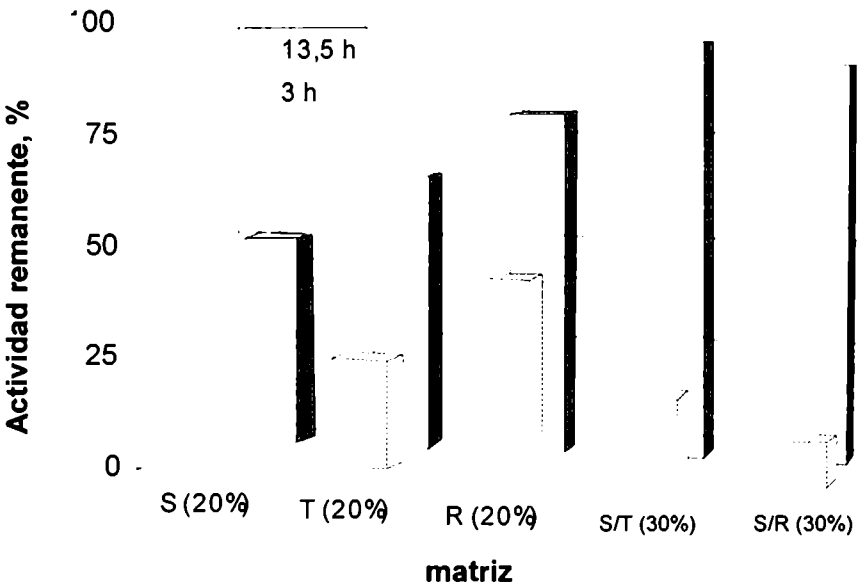


Figura IV.B.6: *Efecto del tiempo de almacenamiento a 70°C sobre la estabilidad de lactasa en matrices constituídas por azúcares puros o mezclas, humidificadas a 33% H.R. Los sistemas combinados se prepararon en proporción 35:65 (tienen igual cantidad de sacarosa que el sistema puro, la cantidad de sólidos totales se modificó por el agregado de rafinosa o trehalosa).*

En la Tabla IV.B.2 se muestran los valores de T_g determinados para sistemas liofilizados de sacarosa, trehalosa, rafinosa y mezclas S/R y S/T (en distintas proporciones) que fueron expuestos a distintas humedades relativas. Se observa que a cualquiera de las H.R. estudiadas los valores de T_g obtenidos para trehalosa o rafinosa son similares, y mayores en ambos casos que la T_g determinada para sacarosa. A 33% H.R. no se observó T_g en sacarosa pura lo cual indica que el azúcar cristalizó en una alta proporción durante la humidificación 25°C. Los valores obtenidos están de acuerdo con los informados por otros autores (Roos, 1993; Saleki-Gerhardt y col., 1995; Gabarra y Hartel, 1998; Kedward y col, 1998). Las mezclas S/R y S/T a 33% H.R. presentaron una T_g, que si bien fue menor que la de rafinosa o trehalosa pura, indica que estos sistemas, a diferencia de la sacarosa, se encontraban en estado amorfo luego de la humidificación. La T_g en las mezclas S/R aumentó muy poco al aumentar la proporción de rafinosa en la matriz.

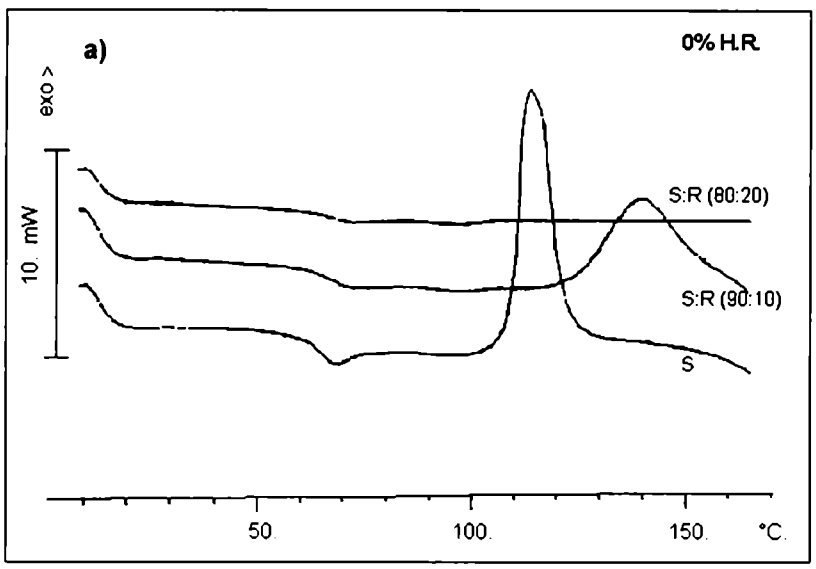
Tabla IV.B.2: Valores de T_g determinados por DSC para sistemas de sacarosa, rafinosa, trehalosa y mezclas S/R o S/T que contenían la enzima y fueron expuestos durante una semana a distintas humedades relativas o sobre desecante.

	T_g, °C		
Matriz	**"0" % H.R.**	**22% H.R.**	**33% H.R.**
Sacarosa	61.6°C	24	_
Rafinosa	87	43	32
Trehalosa	90	50	37.8
S/R (90:10)	63.7	22	16.5
(80:20)	63	22.9	17.8
(60:40)	68	25.4	22.5
(50:50)	67	26	24
S/T (50:50)	65	26.3	25

Como se observó en la Tabla IV.B.2, la incorporación de rafinosa o trehalosa a la matriz de sacarosa no modificó prácticamente la T_g del sistema respecto a la matriz de sacarosa pura. Se evaluó entonces en qué medida dichos azúcares afectaron la cristalización de la sacarosa en diferentes condiciones de humedad y temperatura. Los análisis se realizaron empleando DSC y microscopía óptica, para esta última técnica se usó un microscopio con luz polarizada anexado a una platina con control de temperatura y de velocidad de calentamiento.

La Figura IV.B.7 muestra los termogramas dinámicos obtenidos por DSC para sistemas liofilizados de sacarosa y mezclas de sacarosa con rafinosa

deshidratados y humidificados a 22% H.R.. A humedades relativas mayores (33% H.R.) la sacarosa cristalizó durante la humidificación a 25°C (no se observó T_g ni cristalización del azúcar en el termograma luego de la humidificación). En los sistemas de la Fig. IV.B.7, la rafinosa no puede cristalizar debido a la falta de agua y los eventos exotérmicos observados corresponden a la cristalización de sacarosa. Los termogramas muestran que la adición de un 10% (p/p) de rafinosa, retrasó significativamente la temperatura de cristalización de la sacarosa (Fig. IV.B.7 a y b). En sistemas con más de un 10% (p/p) de rafinosa la cristalización de sacarosa no ocurrió en el rango de 0 a 220°C (la muestra estaba amarronada luego del calentamiento ya que a estas temperaturas tan altas se aceleran recciones de pardeamiento y descomposición que interfieren para evaluar cristalización/fusión de azúcares). En presencia de rafinosa no sólo se retrasó la cristalización de sacarosa sino que el azúcar cristalizó en menor proporción durante el calentamiento dinámico (el ΔH_c calculado para sacarosa fue de 91 y 85 J/g para sistemas expuestos a "0" y 22% H.R., respectivamente, mientras que en la mezcla S/R (90:10) las entalpías de cristalización fueron 47.1 y 45.6 J/g). Es importante destacar que tanto en los sistemas deshidratados como humidificados, la cristalización se retrasó/inhibió en muestras que tienen el mismo valor de T_g.



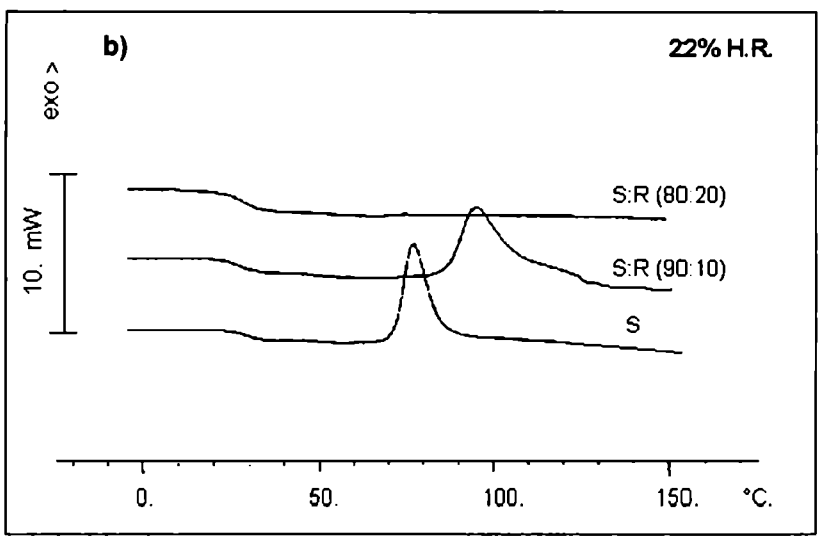


Figura IV.B.7: *Termogramas dinámicos obtenidos por DSC para sistemas liofilizados (a) deshidratados o (b) humidificados a 22% H.R., de sacarosa y mezclas de sacarosa con rafinosa en distintas proporciones.*

El estudio de cinéticas de cristalización a través de mediciones isotérmicas en el DSC es una técnica ampliamente usada en la ciencia de polímeros (Auer y col., 1994; Chan e Isayev, 1994; Chan y col., 1995) pero que ha sido empleada con menor frecuencia para estudiar compuestos de bajo peso molecular como por ejemplo disacáridos (Roos y Karel, 1990; Elamin y col., 1995).

En la Figura IV.B.8 se muestran los termogramas isotérmicos obtenidos por DSC a 95°C para sistemas dehidratados de sacarosa y mezclas S/R (90:10). Se observa que el pico exotérmico de cristalización obtenido para el azúcar puro es mucho más alto y angosto que el pico obtenido para la mezcla.

Una aproximación al entendimiento de los mecanismos de cristalización involucrados, en particular en los sistemas mezcla estudiados, puede obtenerse calculando el exponente *n* de la ecuación llamada de Avrami o Johnson-Mehl-Avrami Kolmogorov (JMAK) (sección I.B.5.2, Eq. I.4). La ecuación JMAK es válida no sólo para crecimiento lineal (por ejemplo para tasa de crecimiento constante) sino también para las etapas iniciales del crecimiento controlado por difusión. Esta ecuación permitió describir adecuadamente las transformaciones que ocurren en una gran variedad de procesos en estado sólido (Graydon y col., 1994). El parámetro *n* de la ecuación JMAK es función del número de dimensiones en que se produce el crecimiento del cristal, y refleja el tipo de nucleación (heterogenea u homogenea) y el mecanismo de crecimiento (fibrillas, esferas, etc) (Graydon y col., 1994). Para realizar el análisis cinético se tomó como tiempo cero el final del período de inducción y se graficó para los sistemas deshidratados de sacarosa y S/R (90:10) la fracción cristalina (α) (calculada a partir de la integración de los

picos isotérmicos de cristalización(sección III.I.3)) en función del tiempo de calentamiento a 95°C (Figura IV.B.9). La forma doble logarítmica o lineal de la ecuación JMAK (sección I.B.5.2, Eq. I.5) (gráfico inserto Fig. IV.B.9) se usó para calcular los parámetros K_c y n asociados a la cinética de cristalización a 95°C de los sistemas de sacarosa y mezclas S/R (90:10) deshidratados. Los parámetros n y K_c se calcularon a partir de los valores de pendiente y ordenada al origen respectivamente, obtenidos del gráfico. La ecuación JMAK describió adecuadamente (r^2>0.98) los valores experimentales. Los valores de entalpía calculados para la cristalización total de sacarosa en los distintos sistemas fueron del orden de 70-90 J/g. Se observa que la sacarosa pura cristalizó completamente antes de los 10 min de calentamiento, mientras que en la mezcla S/R (90:10) la cristalización se completó luego de 2 horas. Los análisis isotérmicos demostraron también que la rafinosa modifica de algún modo la cinética de cristalización de sacarosa.

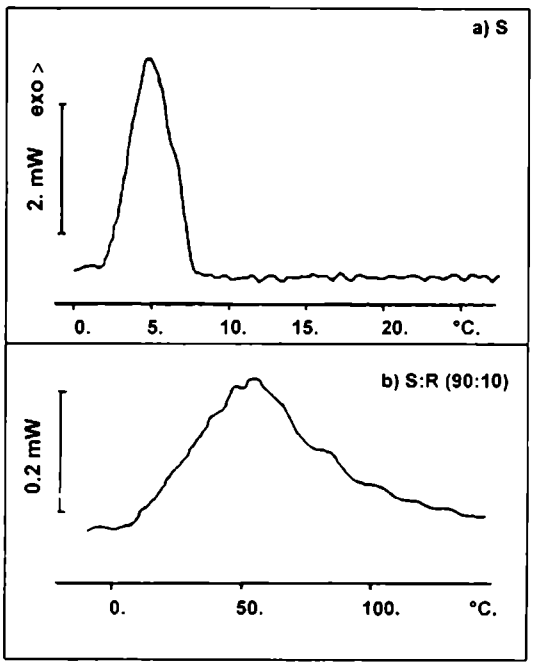


Figura IV.B.8: *Termogramas isotérmicos obtenidos por DSC a 95°C para sistemas deshidratados de (a) sacarosa y (b) mezclas S/R (90:10).*

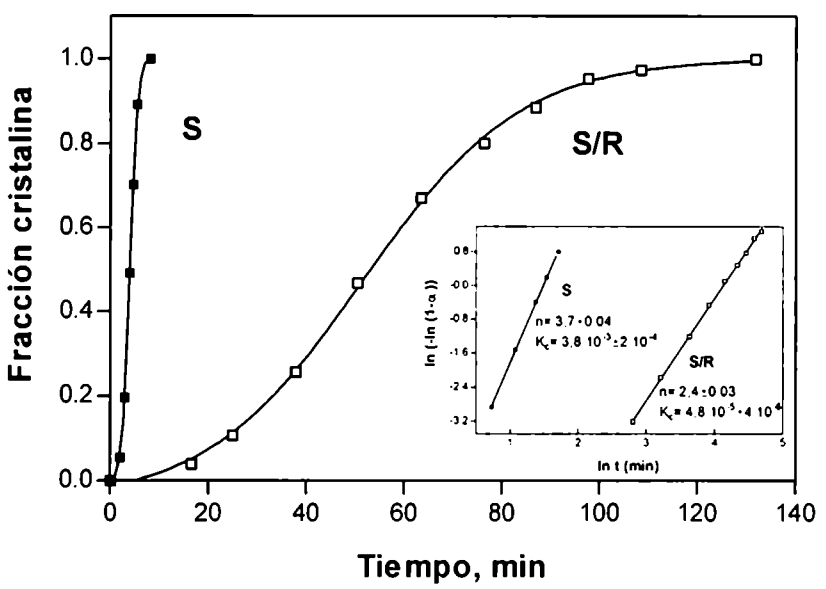


Figura IV.B.9: *Fracción cristalina determinada por DSC en función del tiempo de calentamiento a 95°C para sistemas anhidros de sacarosa y S/R (90:10). En el gráfico inserto se empleó la ecuación lineal de JMAK para calcular los parámetros K_c y n asociados a la cinética de cristalización a 95°C. Las curvas sigmoideas se modelaron con la ecuación JMAK, los puntos corresponden a los datos experimentales.*

En la Fig. IV.B.9 (gráfico inserto) se observa que tanto el valor del índice de Avrami como el de la constante de cristalización fueron mayores en sacarosa que en la mezcla. Kedward y col. (1998) informaron también un *n*= 4 para la cristalización de sacarosa anhidra a 97°C.

Graydon y col. (1994) observó una dependencia importante del exponente *n* tanto con la altura como con el ancho del pico exotérmico. En el presente trabajo, un *n* mayor (como lo es el *n* obtenido para sacrosa pura respecto a la mezcla) se relacionó con una mayor altura y menor ancho del pico (Fig. IV.B.8). Estos resultados coinciden con las observaciones realizadas por Graydon y col. (1994) estudiando aleaciones metálicas amorfas.

Distintos autores encontraron que los valores del exponente *n* son mayores al aumentar el número de dimensiones en que se produce el crecimiento del cristal. Para varias condiciones de transformación, se observó que cuando el crecimiento está controlado por difusión, el valor de *n* se reduce en un factor de 0.5 respecto al valor obtenido para el caso de crecimiento libre (Avrami, 1940; Doremus, 1985; Chvoj y col., 1991). Los valores de *n*= 4, obtenidos en este trabajo para sacarosa, indican nucleación heterogénea y desarrollo de cristales en forma de esfera a partir de núcleos aislados. Para la mezcla S/R (90:10) se obtuvo un *n* menor (n= 2.5) que indica una tasa de nucleción más elevada al comienzo que disminuye con el tiempo.

Gabarra y Hartel, (1998) estudiaron el efecto de la incorporación de polímeros de glucosa de distinta masa molar obtenidos de jarabe de maíz sobre la T_g y cristalización de sacarosa liofilizada. Observaron que el agregado de cualquiera de las fracciones en un 10-20% (p/p) interfirió con la cristalización de la sacarosa amorfa sin un efecto considerable sobre la T_g de la

mezcla. Las fracciones que tenían una combinación de azúcares de alta masa molar promedio resultaron más efectivas para retrasar/inhibir la cristalización de sacarosa que las fracciones con mayor masa molar pero menor proporción de azúcares.

Se han propuesto dos mecanismos de cristalización para sacarosa amorfa a temperaturas mayores que T_g: a) Nucleación primaria heterogénea seguida de crecimiento del cristal (Saleki-Gerhardt y Zoografi, 1994); b) Crecimiento de núcleos pre-existentes (sin formación de nuevos núcleos). Este último mecanismo fue propuesto por varios autores ya que la liofilización generalmente produce un sólido con un mayor grado de pequeñas zonas de orden, comparada con el enfriamiento rápido del fundido (Mathlouthi y col., 1986). Mathlouthi (1995) observó usando microscopía electrónica la presencia de núcleos cristalinos o microcristales en la matriz de sacarosa amorfa. Hay dos eventos que serían importantes en la cristalización de sacarosa amorfa: difusión en la superficie de la molécula de azúcar y la incorporación de la unidad de crecimiento a la estructura cristalina. Los compuestos de alto peso molecular aumentan la viscosidad y seguramente afectan la incorporación de la molécula de azúcar en la superficie del cristal. Los azúcares pequeños afectarían este último proceso en mayor medida ya que pueden encajar más fácilmente en la superficie cristalina que los azúcares más grandes.

La cinética de cristalización de sacarosa en la mezcla S/R (90:10) se analizó a temperaturas entre 95 y 110°C (Figura IV.B.10). El análisis de cinéticas de cristalización por DSC resulta práctico cuando el proceso tiene lugar en períodos cortos (segundos minutos). A temperaturas menores que 95°C la cristalización es demasiado lenta y se obtienen picos exotérmicos muy

aplastados, mientras que a temperaturas mayores que 110°C, la cristalización es instantánea y conduce a errores en la determinación por DSC. Se calcularon los parámetros de JMAK para cada temperatura y se compararon con los obtenidos por Kedward y col. (1998) para sacarosa a distintas temperaturas, trabajando en las mismas condiciones que en el presente estudio (Tabla IV.B.3). Para la constante de cristalización en S/R (90:10) se determinó un error relativo del 8-15%.

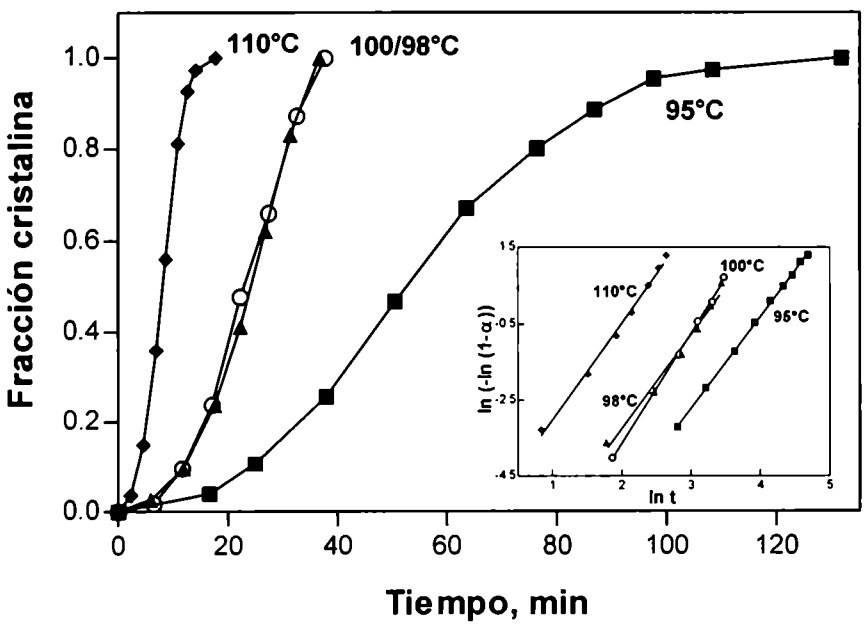


Figura IV.B.10: *Fracción cristalina determinada por DSC en función del tiempo de calentamiento a varias temperaturas para mezclas anhidras S/R (90:10). En el gráfico inserto se aplicó la ecuación lineal de JMAK para calcular los parámetros K_c y n.*

Tabla IV.B.3: Parámetros de Avrami para sistemas anhidros de sacarosa y S/R (90:10) a diferentes temperaturas de calentamiento.

	S/R (90:10) [a]			Sacarosa [b]	
T (°C)	*n*	K_c (min^{-n})	T (°C)	*n*	K_c (min^{-n})
95	2.4±0.02	$4.88x10^{-5}$	95	3.7[a]	$3.8x10^{-3}$ [a]
98	2.4±0.15	$2.75x10^{-4}$	97	4	$2.77x10^{-2}$
100	2.5±0.15	$9.11x10^{-4}$	102	3.1	$6.15x10^{-1}$
110	2.5±0.08	$3.93x10^{-3}$	107	3.3	$2.85x10^{-1}$
			112	3.1	1.44
			117	3.2	1.8
			122	2.8	2.84

[a] Presente trabajo, [b] Kedward y col., 1998.

Se observa que en los sistemas mezcla los valores de *n* no variaron con la temperatura en el rango analizado mientras que para sacarosa se observó una disminución del valor de *n* al aumentar la temperatura de calentamiento. Kedward y col. (1998) sugirieron un cambio del mecanismo de cristalización de sacarosa a altas temperaturas. La constante de cristalización K_c fue de uno a dos órdenes menor en la mezcla respecto al azúcar puro.

Para la mezcla S/R (90:10), si bien la cinética de cristalización se analizó a cuatro temperaturas, se estimaron los coeficientes de Arrhenius, WLF y VTF (Eqs. (I.8), (I.11) y (I.17), sección I.B.7) para tener un valor orientativo (el error relativo estimado fue del 13 al 20%). Para sacarosa se calcularon los coeficientes a partir de los datos experimentales obtenidos por Kedward y col.

(1998). Los coeficientes obtenidos para cada sistema se muestran en la Tabla IV.A.4.

Tabla IV.B.4: Coeficientes de Arrhenius, WLF y VTF, estimados para la cristalización de sacarosa en matrices anhidras de sacarosa y mezclas S/R (90:10).

Sistema	Arrhenius	WLF	VTF
Sacarosa	E_a: 161.5 KJ/mol	C_1: 5.55 C_2: 50	B: 2632±368
S/R (90:10)	E_a: 272 KJ/mol	C_1: 8.48 C_2: 50	B: 4315±800

Para WLF el valor del coeficiente C_2 (50K) fue cercano al valor"universal" (51.6K) para cualquiera de los sistemas debido a las premisas y aproximaciones del método de variables reducidas empleado (Peleg, 1992). Los valores obtenidos para C_1 fueron un orden de magnitud menores que el valor "universal" 17.44 y similares a los valores determinados para inactivación enzimática (Tabla IV.A.4). Los valores de E_a indicaron que la cristalización de sacarosa en la mezcla fue más dependiente de la temperatura. En la Bibliografía no se encontró información en relación con los valores de E_a asociados a la cinética de cristalización de azúcares.

El grado de cristalización de los sistemas se analizó también en forma comparativa empleando microscopía óptica con luz polarizada (M.O.).

Iluminando con luz polarizada, los cristales tienen la característica de ser birrefringentes y de colores brillantes. La preparación de las muestras se llevó a cabo como se describió en la sección III.J. En la Figura XX se muestran imágenes de cristales de rafinosa obtenidos a partir de una solución sobresaturada del azúcar o a partir de una matriz amorfa.

En la Figura IV.B.11 se muestra una secuencia de fotos obtenida para sistemas liofilizados de sacarosa y mezclas S/R (50:50) humidificados a 33% H.R. y calentados en una platina térmica a 75°C. La sacarosa, antes del tratamiento, se encontraba claramente en estado sobreenfriado, mientras que la mezcla S/R estaba en estado vítreo. El calentamiento en la platina condujo a la cristalización completa de sacarosa, mientras que en el mismo lapso de tiempo (30 minutos) la mezcla S/R se mantuvo sin cristalizar. Como se observó anteriormente, este efecto no pudo atribuirse a un aumento de la temperatura de transición vítrea de los sistemas combinados, ya que el valor de T_g obtenido para la mezcla S/R (50:50) a 33% H.R. (T_g= 24°C) fue bajo, y por lo tanto a 75°C el sistema estaría claramente en condiciones en las que la cristalización debería ser rápida ($T-T_g > 50$°C).

En la Figura IV.B.12 se muestran fotos obtenidas para sistemas liofilizados de sacarosa, rafinosa y mezclas S/R (50:50) humidificados a 52% H.R. y calentados a 75°C. Se observa que la sacarosa cristalizó completamente durante la humidificación y la rafinosa mostró cristalización incipiente. Durante el tratamiento térmico posterior se observó un aumento del número, tamaño y definición de los cristales de rafinosa. Sin embargo, en la mezcla S/R (50:50) sólo se observaron algunos cristales aislados cuyo número y tamaño no varió durante el tiempo de calentamiento. La cristalización también se vio

retardada/inhibida en mezclas de S/T equilibradas a 43% H.R. y calentadas a 80°C (Figura IV.B.13).

Estos resultados mostraron que el ratraso/inhibición de la cristalización en mezclas de azúcares, pudo verificarse tanto por DSC como por microscopía óptica con luz polarizada.

El efecto de rafinosa o trehalosa sobre la cristalización de sacarosa, no estuvo relacionado con un aumento de T_g, con la consecuente reducción de la movilidad molecular del medio, sino más bien con interferencias causadas por interacciones entre moléculas en la superficie del cristal en crecimiento.

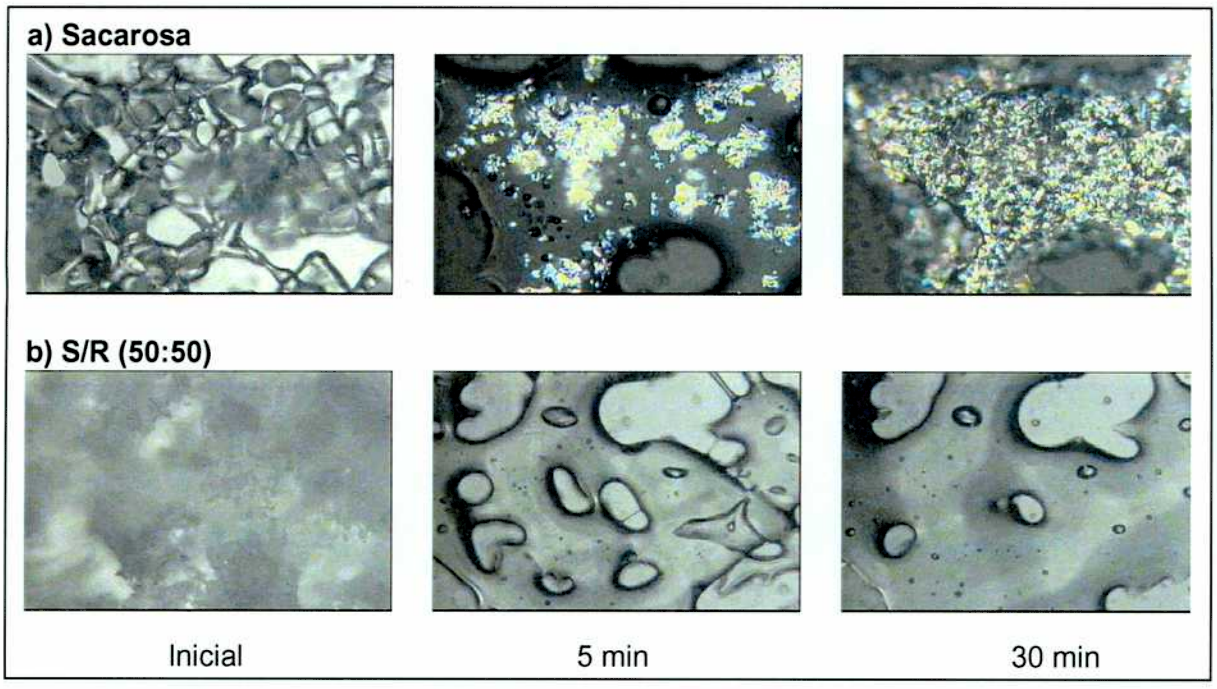


Figura IV.B.11: *Microscopía óptica con luz polarizada de azúcares (a) sacarosa, (b) S/R (50:50) liofilizados y humidificados 24 horas a 33% H.R. Calentamiento: 10°C/min hasta 75°C.*

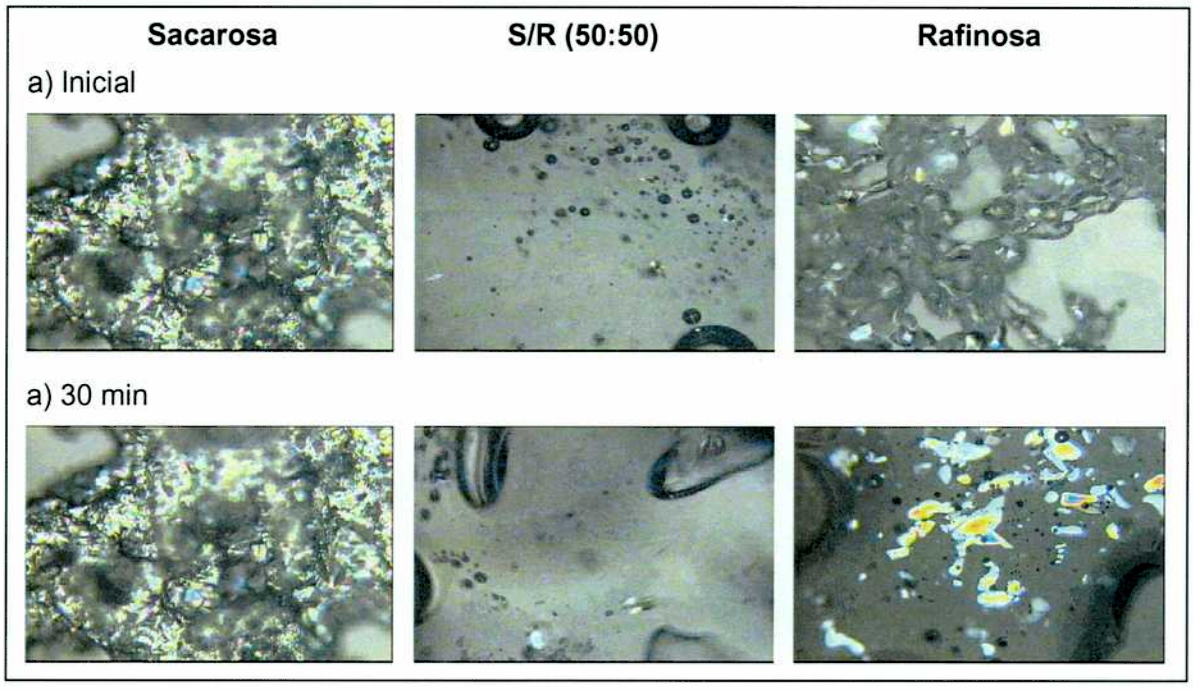


Figura IV.B.12: *Microscopía óptica con luz polarizada de azúcares (a) sacarosa, (b) S/R (50:50) y (c) rafinosa, liofilizados y humidificados 24 horas a 52% H.R. Calentamiento: 10°C/min hasta 75°C.*

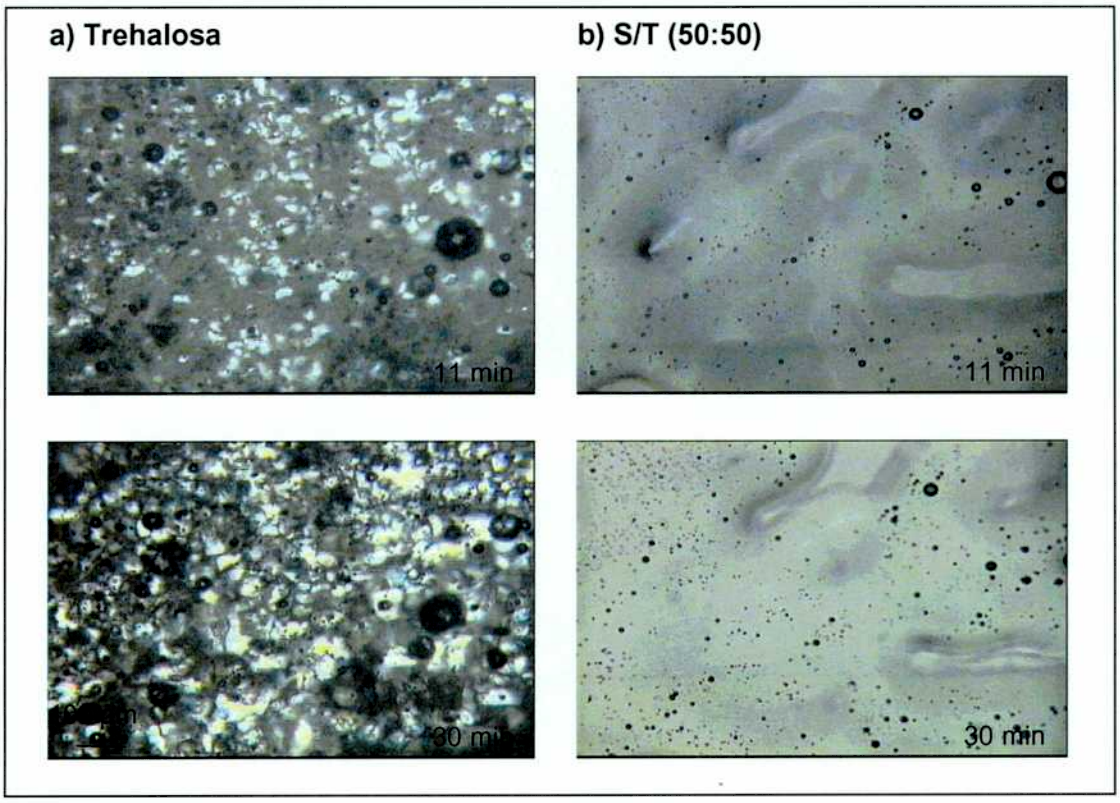


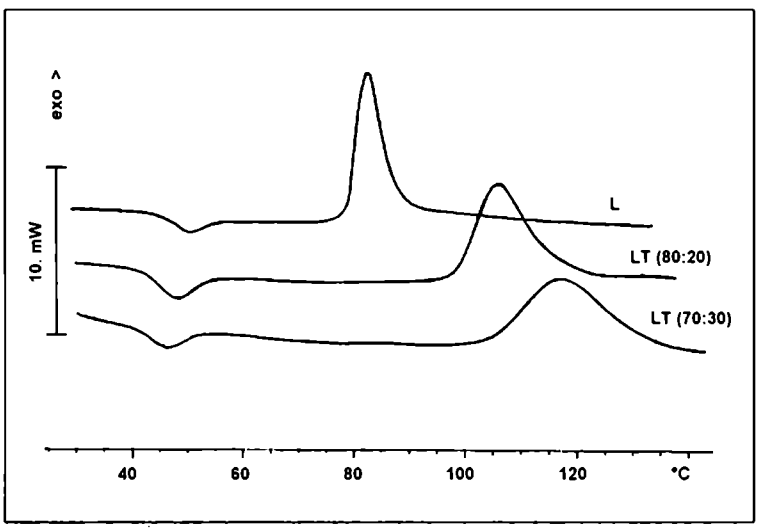
Figura IV.B.13: *Microscopía óptica con luz polarizada de azúcares (a) trehalosa y (b) S/T (50:50) liofilizados y humidificados 24 horas a 52% H.R. Calentamiento: 10°C/min hasta 80°C.*

IV.B.2.2. Matrices de lactosa co-liofilizadas con trehalosa.

La lactosa es un disacárido de gran importancia práctica en la industria tanto de alimentos como de productos farmacéuticos. Por lo tanto el entendimiento de sus transiciones de fase es de gran utilidad para poder predecir la estabilidad en diferentes condiciones (temperatura, contenido de agua del producto, tiempo de almacenamiento). La cristalización del azúcar en sistemas amorfos es un punto importante ya que puede afectar significativamente la vida útil del producto. Es necesario conocer no sólo los factores que afectan la cristalización, sino también la cinética del proceso en distintas condiciones. Los alimentos y preparados farmacéuticos que contienen lactosa son generalmente sistemas muy complejos, por lo tanto el estudio de sistemas modelo para evaluar la aplicabilidad de diferentes ecuaciones teóricas permitiría predecir el comportamiento individual de cada componente para luego tratar de entender el proceso en el sistema completo.

En este trabajo se estudiaron transiciones de estado y de fase como T_g y cristalización en sistemas modelo de lactosa y lactosa co-liofilizada con trehalosa usando DSC. Los resultados se compararon con estudios realizados por M.O. Como en las secciones IV.A.1.1. y IV.B.2.1, se aplicaron los modelos de Arrhenius, WLF y VTF para describir la dependencia de la cinética de cristalización en cada matriz con la temperatura.

En la Figura IV.B.14 se muestran los termogramas obtenidos por DSC para sistemas liofilizados de lactosa y de lactosa en presencia de trehalosa que fueron expuestos a 33% H.R..



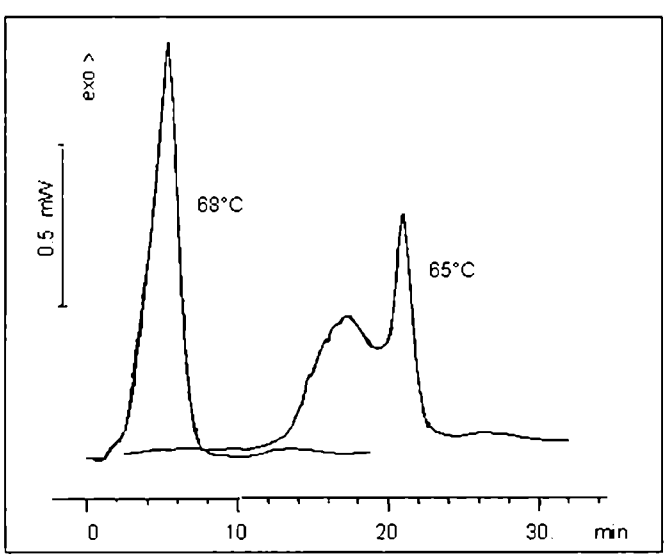


Figura IV.B.14: *Termogramas obtenidos por DSC para sistemas de lactosa y mezclas L/T (80:20) humidificados a 33% H.R. a) Termograma medido en forma dinámica para lactosa y mezclas L/T (80:20). b) Termogramas obtenidos en forma isotérmica para sistemas de lactosa.*

Las temperaturas de transición vítrea (T_g) y las temperaturas de cristalización (T_c) se determinaron a partir de los termogramas dinámicos (Fig. IV.B.14 a). Las cinéticas de cristalización se determinaron por mediciones isotérmicas (Fig. IV.B.14 b). Tanto para lactosa pura como para las mezclas se observó en algunos termogramas isotérmicos un hombro u ondulación en el pico exotérmico de cristalización que no se observó en ninguna de las determinaciones dinámicas. Esto se puede atribuir a que la lactosa tiene distintas formas cristalinas (α-lactosa monohidrato y β-lactosa monohidrato). La lactosa cristalizaría inicialmente como α-lactosa y luego como β-lactosa (Kedward y col., 2000).

En la Figura IV.B.15 se graficaron los valores de T_g y temperaturas de cristallización determinados por DSC para sistemas liofilizados de lactosa y lactosa con distintas proporcinones de trehalosa que fueron expuestos a 0, 33 y 43% H.R.. Las temperaturas de transición vítrea obtenidas para las muestras de lactosa están de acuerdo con los valores informados previamente por otros autores (Roos y Karel, 1991a, 1992; Kedward y col., 2000). En sistemas deshidratados de trehalosa pura no se observó cristalización, debido a que la trehalosa no cristaliza en ausencia de agua en el rango de temperaturas analizado (0-130°C). Por lo tanto, los eventos de cristalización observados en los termogramas para los sistemas anhidros lactosa/trehalosa, se atribuyeron a la cristalización de lactosa. En los sistemas expuestos a humedades relativas de 43%, la trehalosa podría cristalizar como dihidrato, ya sea durante la humidificación a 25°C o durante el calentamiento dinámico en el DSC. Sin embargo, en ningún caso se observó el pico endotérmico de fusión característico del dihidrato a 100°C. Estos resultados indicaron que también a

43% H.R. las cristalizaciones observadas en los termogramas corresponden al disacárido lactosa y además que la cristalización de trehalosa se vio retrasada/inhibida en presencia de lactosa. En la Fig. IV.B.15 se observa, al igual que en los sistemas S/R discutidos previamente, que para las distintas humedades analizadas, los valores de T_g de las muestras de lactosa que contenían hasta un 40% p/p de trehalosa fueron similares a los valores obtenidos para lactosa pura. Las temperaturas de cristalización deteminadas en forma dinámica para sistemas de lactosa anhidros o humidificados aumentaron linealmente con la adición de trehalosa. Se observa además que al aumentar la humedad relativa a la cual se expusieron cualquiera de las mezclas, los valores de T_g y T_c disminuyen. Los resultados de la Fig. IV.B.15 muestran que si bien la incorporación de trehalosa no modificó los valores de T_g de las muestras de lactosa, la temperatura a la cual se inició la cristalización en las determinaciones dinámicas (que puede ser considerada como la temperatura de cristalización instantánea) aumentó significativamente. Por lo tanto, la trehalosa interfiere con el proceso de cristalización de lactosa a través de mecanismos que serían similares a los discutidos en la sección previa IV.B.2.1 para las mezclas S/R .

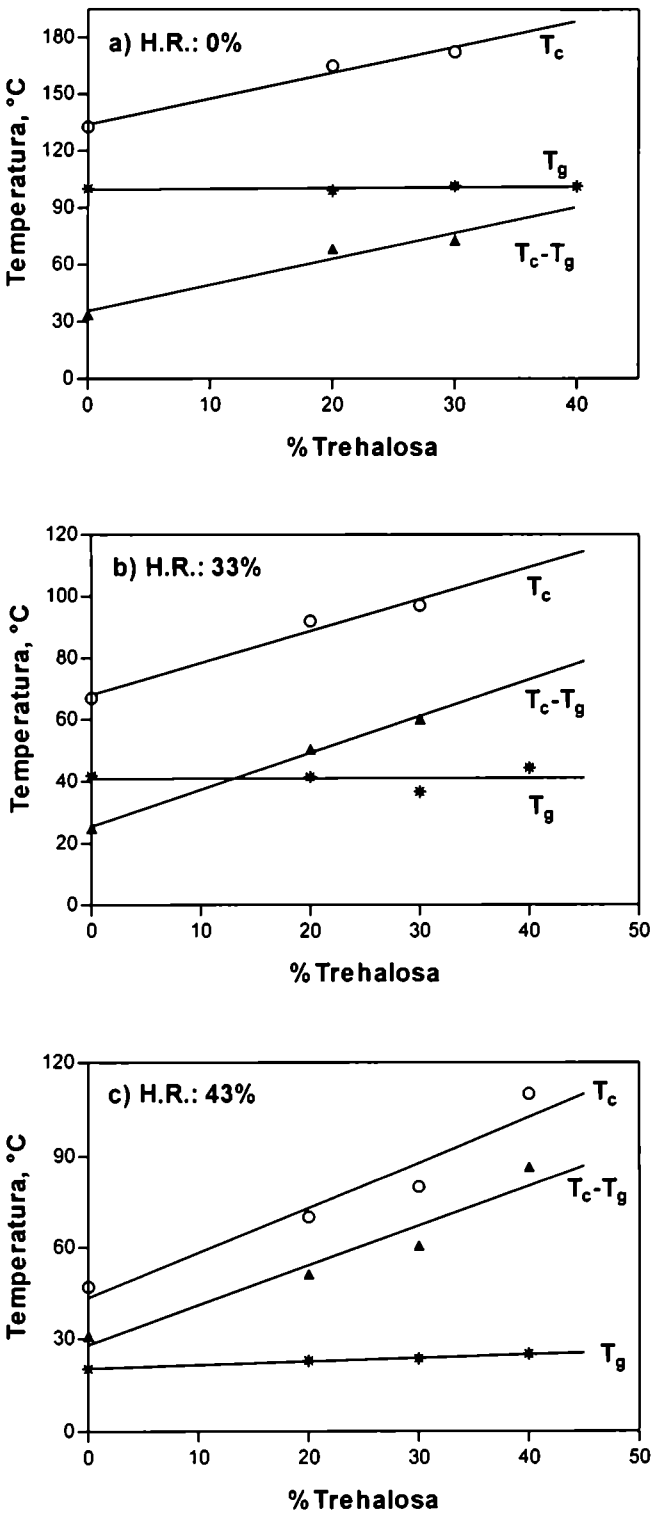


Figura IV.B.15: *Temperaturas de transición vítrea (T_g) y de cristalización (T_c) determinadas por DSC para sistemas liofilizados de lactosa y lactosa en presencia de distintas proporciones de trehalosa que fueron expuestos a (a)"0", (b) 33 y (c) 43% H.R..*

Como se mencionó en la sección IV.2.1, la ecuación de Avrami o JMAK permite una buena descripción de la cinética de transformaciones que ocurren en condiciones isotérmicas. Las mediciones isotérmicas de los sistemas estudiados presentaron diferentes tiempos de inducción dependiendo de la temperatura. Se tomó como tiempo cero para el análisis cinético el final del período de inducción y se graficó para los sistemas de lactosa y L/T (80:20) humidificados a 33% H.R. la fracción cristalina en función del tiempo (Figura IV.B.16). Las matrices de lactosa se analizaron en un rango de temperaturas comprendido entre 50 y 70°C, las mezclas L/T se analizaron entre 75 y 95°C. En los sistemas estudiados, a temperaturas menores que la temperatura inferior seleccionada, los tiempos de cristalización serían demasiado largos, mientras que a temperaturas mayores que el límite superior correspondiente, la cristalización es instantánea y no puede evaluarse por DSC. Los valores de entalpía calculados para la cristalización total de lactosa en los distintos sistemas en las condiciones estudiadas fueron del orden de 30-50 J/g y no mostraron relación con la temperatura.

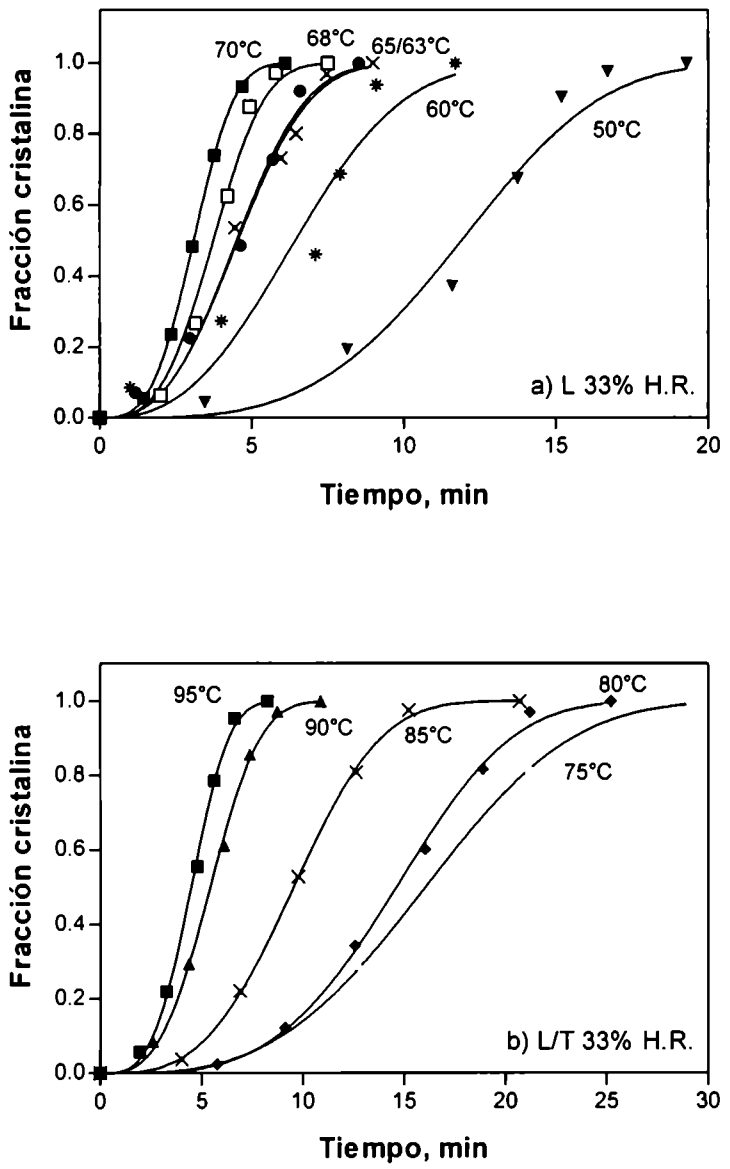


Figura IV.B.16: *Cinética de cristalización, determinada a partir de mediciones isotérmicas obtenidas por DSC, de sistemas de (a) lactosa y (b) L/T (80:20) humidificados a 33% H.R. Las curvas se obtuvieron aplicando la ecuación de JMAK, los puntos corresponden a los datos experimentales.*

Para evaluar en qué medida el mecanismo de cristalización de lactosa se modificaba en presencia de trehalosa se calcularon, utilizando la ecuación de Avrami linealizada (Eq. I.5, sección I.B.5.2), los parámetros K_c y n que se tomaron como valores iniciales para aplicar una correlación no lineal empleando la acuación (Eq. I.4, sección I.B.5.2), los valores resultantes se detallan en la Tabla IV.B.5. En la Fig. IV.B.16 se observa que las curvas teóricas se ajustaron bien a los datos experimentales (r^2>0.98) aún en los casos en los que se observaron ondulaciones en los picos de cristalización isotérmicos. En este último caso se realizó la integración en el tiempo de la misma manera que para las curvas simétricas.

Tabla IV.B.5: Parámetros de Avrami obtenidos a partir de los datos esperimentales para sistemas de lactosa y mezclas L/T (80:20) humidificados a 33% H.R. y calentados a diferentes temperaturas.

Lactosa			L/T (80:20)		
$T-T_g$ (°C)	n	K_c ($1/min^n$)	$T-T_g$ (°C)	n	K_c ($1/min^n$)
14,3	3,6	7,71E-05	39,3	3,2	9,07E-05
24,3	2,6	4,92E-03	44,3	3,4	9,10E-05
27,3	2,8	9,53E-03	49,3	3,2	4,84E-04
29,3	2,8	9,96E-03	54,3	3,2	3,18E-03
32,3	3,2	1,02E-02	59,3	3,4	3,98E-03
34,3	3,3	0,01612			

Tanto para lactosa como para L/T (80:20), los valores de K_c aumentaron al aumentar el parámetro ($T-T_g$). En particular un n= 3, que es cercano al valor

que se obtuvo para los sistemas analizados, indica un crecimiento esférico a partir de núcleos aislados (Christian, 1975). En la tabla IV.B.5 se observa también que los valores obtenidos para el índice de Avrami fueron independientes tanto de la composición del sistema como de la temperatura de cristalización isotérmica. El análisis a través de los parámetros JMAK se realizó en estos sistemas sólo como una aproximación ya que en los sistemas con cristalización múltiple o interconversión de formas cristalinas, como pueden ser los de lactosa mostrados en la Fig. IV.B.14.b, su aplicación no es del todo adecuada pero permite obtener una evaluación global del proceso (Kedward y col., 2000).

En la Figura IV.B.17 se muestra el tiempo medio de cristalización ($\tau_{1/2}$) (calculado utilizando la Ec. I.6, sección II.B.5.2) vs la temperatura de almacenamiento isotérmico para sistemas de lactosa y mezclas L/T (80:20) humidificados a 33% H.R.. Se puede ver que para obtener un valor de $\tau_{1/2}$ similar en ambos sistemas, la temperatura de calentamiento para la mezcla debe ser aproximadamente 30°C mayor que para lactosa pura. Como se observó en las mediciones dinámicas (Fig. IV.B.14.a y IV.B.15), la presencia de trehalosa retrasó la cristalización isotérmica de lactosa sin modificar el valor de T_g del sistema. Arvanitoyannis y Blanshard (1994) también observaron tiempos medios de cristalización mayores en sistemas amorfos lactosa/sacarosa. Este efecto fue interpretado por estos autores como consecuencia de un aumento del valor de T_g (y por lo tanto una disminución de movilidad) de los sistemas mezcla respecto a sacarosa pura. Sin embargo, en este trabajo el retraso de la cristalización de lactosa observado en presencia de trehalosa no se relacionó con un aumento del valor de T_g de las mezclas (Fig. IV.B.15.b). Esto indica que

debe haber otros factores involucrados (termodinámicos, geométricos, cinéticos) que modifican de algún modo el ambiente molecular en los sistemas combinados y afectan en consecuencia la nucleación y/o el crecimiento de los cristales.

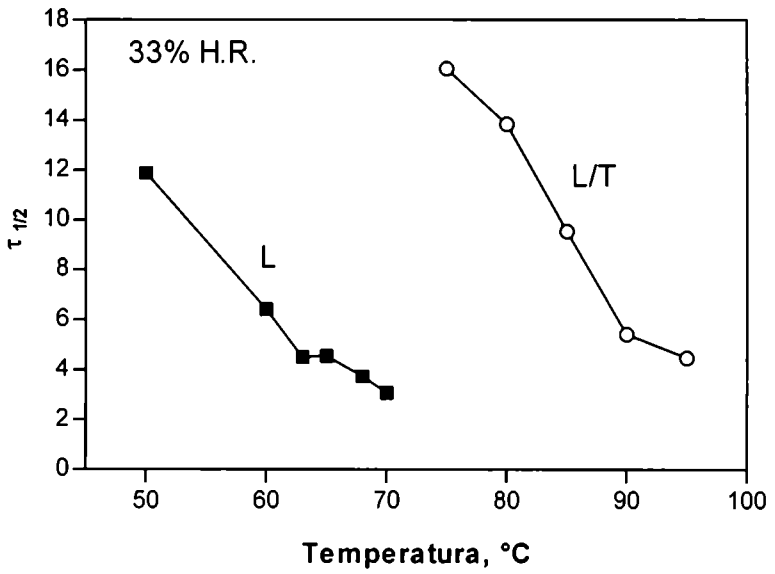


Figura IV.B.17: *Tiempo medio de cristalización ($\tau_{1/2}$) vs la temperatura isotérmica de calentamiento para sistemas de lactosa y L/T(80:20) humidificados a 33% H.R..*

La dependencia de los tiempos de cristalización con la temperatura se analizó, como en las secciones previas, aplicando los modelos de Arrhenius, WLF y VTF. En la Figura IV.B.18 se graficaron para lactosa y L/T (80:20) los datos experimentales y los ajustes obtenidos a partir de la linealización de los diferentes modelos. Se observa que en el rango de temperaturas analizado, los tres modelos describieron adecuadamente los datos experimentales.

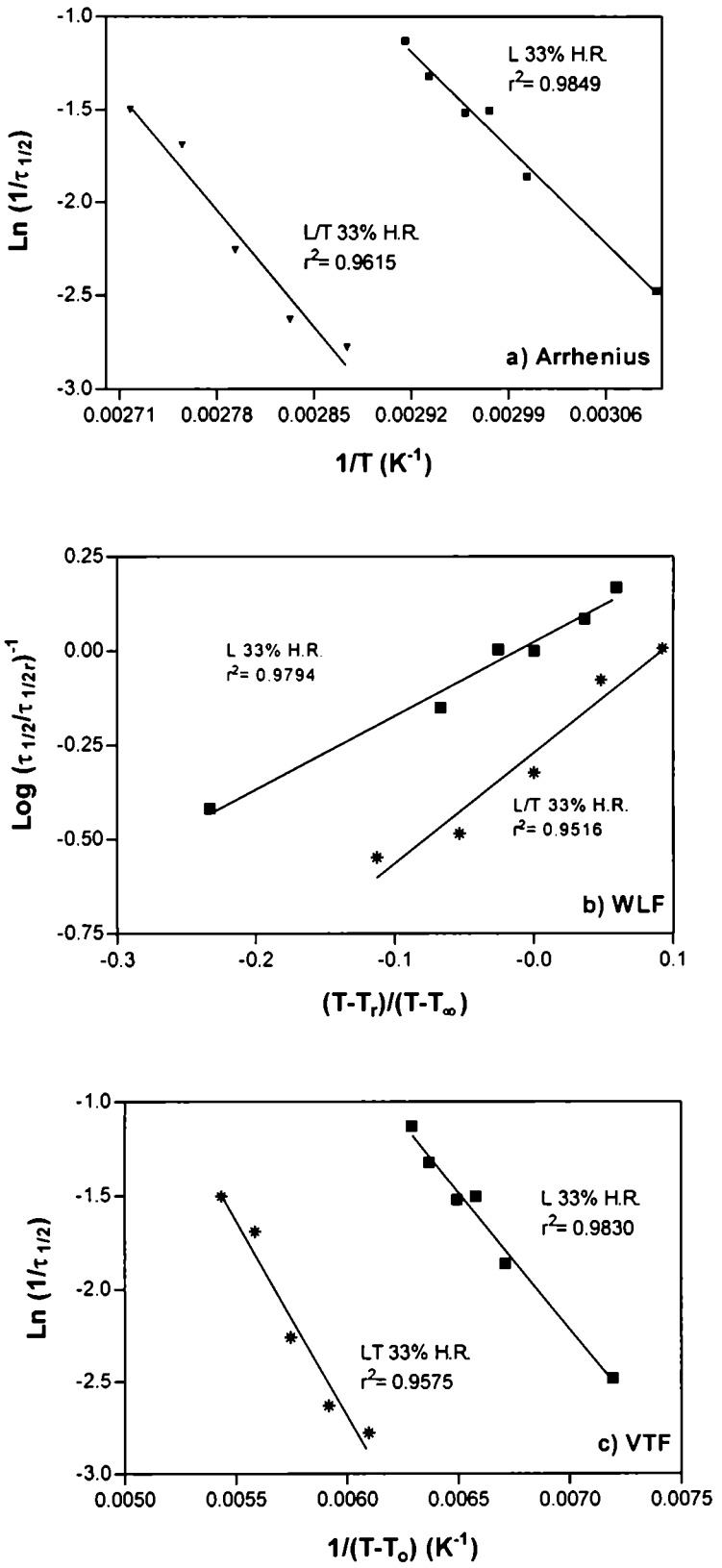


Figura IV.B.18: *Valores experimentales y ajustes obtenidos a partir de la linelización de los modelos de a) Arrhenius, b) WLF, c) VTF, para sistemas liofilizados de lactosa y L/T (80:20) humidificados a 33% H.R..*

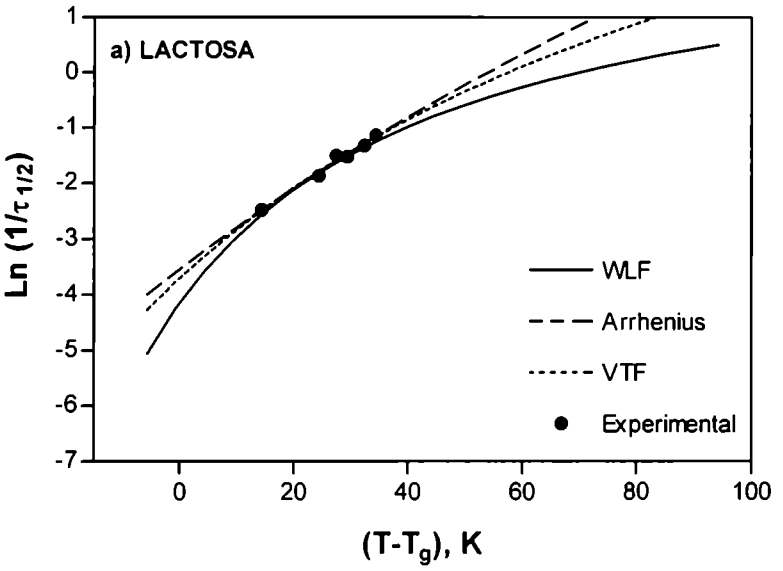
En la Tabla IV.B.6 se muestran los coeficientes calculados para cada modelo a partir de las ecuaciones linealizadas (el error relativo estimado fue del 6 al 12%).

Tabla IV.B.6: Coeficientes calculados a partir de la representación gráfica de las ecuaciones linealizadas de Arrhenius, WLF y VTF, para sistemas liofilizados de lactosa y L/T (80:20) humidificados a 33% H.R..

Sistema	Arrhenius	WLF	VTF
Lactosa	E_a: 61.1 KJ/mol	C_1: 3.09 C_2: 50	B: 1465
L/T (80:20)	E_a: 74.3 KJ/mol	C_1: 5.78 C_2: 50	B: 2105

Las energías de activación, obtenidas a partir del modelo de Arrhenius, fueron del orden de 60 a 75KJ/mol. El valor del parámetro B obtenido para el modelo VTF fue del orden del valor informado por Parker y Ring (1995) para viscosidad de sacarosa a distintas temperaturas. El valor del coeficiente C_2 (50K) fue cercano al valor"universal" (51.6K), como se mencionó anteriormente debido a las premisas y aproximaciones del método de variables reducidas empleado (Peleg, 1992). Los valores obtenidos para C_1 (aproximadamente 3 y 6) fueron, como se observó también para el análisis realizado en la sección IV.A.1.1 y IV.B.2.1 un orden de magnitud menores que el valor "universal" 17.44.

En la Figura IV.B.19 se graficaron los tres modelos estudiados y los datos experimentales en función del parámetro ($T-T_g$).



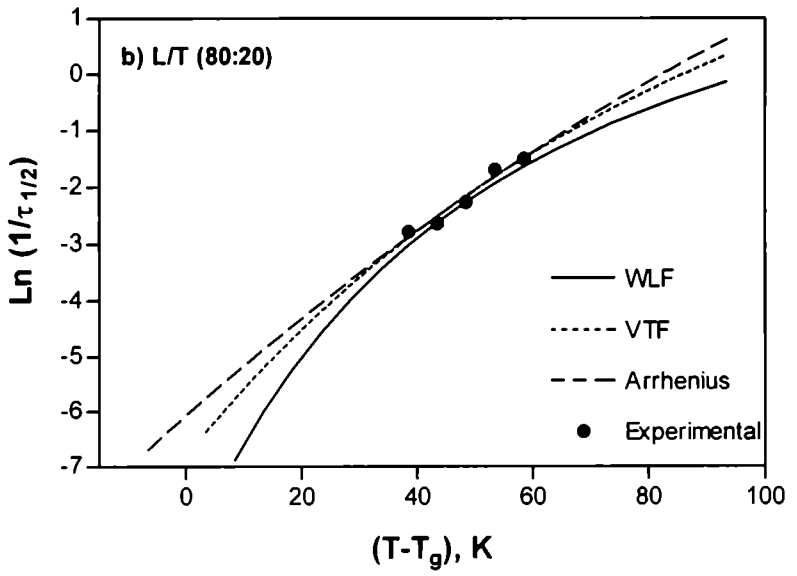


Figura IV.B.19: *Datos experimentales y curvas de predicción obtenidas por Arrhenius, WLF y VTF en función del parámetro ($T-T_g$) para sistemas de a) lactosa y b) L/T (80:20) humidificados a 33% H.R..*

En los rangos de temperatura analizados cualquiera de los tres modelos puede utilizarse para describir el comportamiento experimental. Sin embargo no se pueden realizar extrapolaciones fuera del rango de temperaturas para el cual se calcularon los coeficientes correspondientes. El modelo de Arrhenius predice la menor dependencia con la temperatura, mientras que el modelo de WLF (aún con el bajo valor de C_1 respecto del valor "universal") predice mayor dependencia con la temperatura a valores cercanos a la T_g del sistema. Las curvas descriptas por el modelo de VTF predicen valores intermedios en comparación con los modelos de WLF y Arrhenius. Teniendo en cuenta estos resultados, VTF sería el modelo más adecuado para predecir tasas de cristalización si fuera necesario hacer alguna extrapolación. Por otro lado, este modelo describió bien los datos experimentales aún cuando el valor de uno de los coeficientes utilizados para el ajuste (T_o) fue tomado del valor obtenido por Parker y Ring (1995) para la dependencia de la viscosidad de sacarosa con la temperatura. El modelo VTF fue más adecuado que el modelo WLF para describir la dependencia de la viscosidad con la temperatura en el caso de líquidos no poliméricos (Angell y col., 1994). La ecuación VTF podría entonces llegar a emplearse en azúcares como un modelo de aplicación más general para describir los procesos relacionados con la movilidad molecular (viscosidad, difusión) como es el caso de la cristalización en sistemas amorfos.

Además de los modelos analizados, se han descripto otros que podrían utilizarse también para describir la dependencia de tiempos de cristalización con la temperatura. Taborek y col, (1986) encontraron que a temperaturas mayores que 1.2 T_g, la dependencia de la viscosidad de muchos líquidos con la temperatura puede describirse con mayor precisión utilizando el modelo de

la Ley de la Potencia que el modelo de WLF. En particular en este trabajo, la ecuación de la potencia no se pudo aplicar ya que el rango de temperaturas analizado fue menor que 1.2 T_g. El modelo de Lauritzen-Hoffman ha sido empleado por Kedward y col., (2000) para analizar cinéticas de cristalización de lactosa amorfa. Este modelo predice curvas con forma de campana cuando se grafica la inversa del tiempo de cristalización vs temperatura. Sin embargo, como también observaron estos autores, el ajuste a los datos experimentales sólo pudo verificarse para la parte ascendente de la curva. A temperaturas mayores, correspondientes a la parte descendente de la curva predicha por el modelo, los termogramas presentaron comportamientos irregulares que fueron atribuidos a las múltiples formas cristalinas de la lactosa (Kedward y col., 2000). Luego del calentamiento a esas altas temperaturas (T>135°C) se observó descomposición incipiente de la lactosa (las muestras presentaban un color amarillo/pardo) que probablemente contribuye a las irregularidades observadas en los termogramas.

En la Figura IV.B.19 se observa que la cinética de cristalización en sistemas de lactosa y L/T (80:20) humidificados a 33% H.R. sólo se pudo analizar en un rango de temperaturas limitado. De todos modos, las predicciones a mayores temperaturas no serían de interés práctico ya que en esa zona se producen cambios físico-químicos que deterioran la muestra. A temperaturas cercanas al valor de T_g podrían obtenerse datos experimentales. Sin embargo, utilizando calorimetría diferencial de barrido surgen dificultades prácticas debido a que los tiempos de cristalización esperados para valores de $(T-T_g)$ cercanos a cero son demasiado largos.

Paralelamente a los estudios de cristalización realizados por DSC se realizaron observaciones isotérmicas de los sistemas por microscopía óptica con luz polarizada. Mientras el análisis por DSC permite seguir el proceso global de cristalización, el análisis de imágenes por microscopía permitiría obtener además de datos cinéticos, información importante acerca de la homogeneidad/heterogeneidad de la muestra, como así también de la distribución, tamaño, calidad, forma, color, etc. de los cristales en función del tiempo y la temperatura de calentamiento.

En la sección IV.B.2.1 se mostraron imágenes obtenidas con microscopía óptica con luz polarizada para sistemas de sacarosa, rafinosa y mezclas sacarosa/rafinosa que ilustraron los resultados obtenidos por DSC. En esta parte del trabajo se realizaron observaciones microscópicas para los sistemas amofos de lactosa y lactosa en presencia de trehalosa en función del tiempo de tratamiento térmico y se evaluó cuantitativamente el crecimiento de los cristales usando técnicas de análisis por imágen. Se analizó la utilidad de esta metodología para evaluar cinéticas de cristalización de azúcares y se comparó con los resultados obtenidos por DSC.

En La Figura IV.B.20 se muestra a modo de ejemplo una secuencia de imágenes donde se observa la cristalización de lactosa a 70°C a partir del azúcar amorfo (liofilizado y humidificado a 33% H.R.) (la preparación de las muestras se llevó a cabo como se describe en la sección III.J).

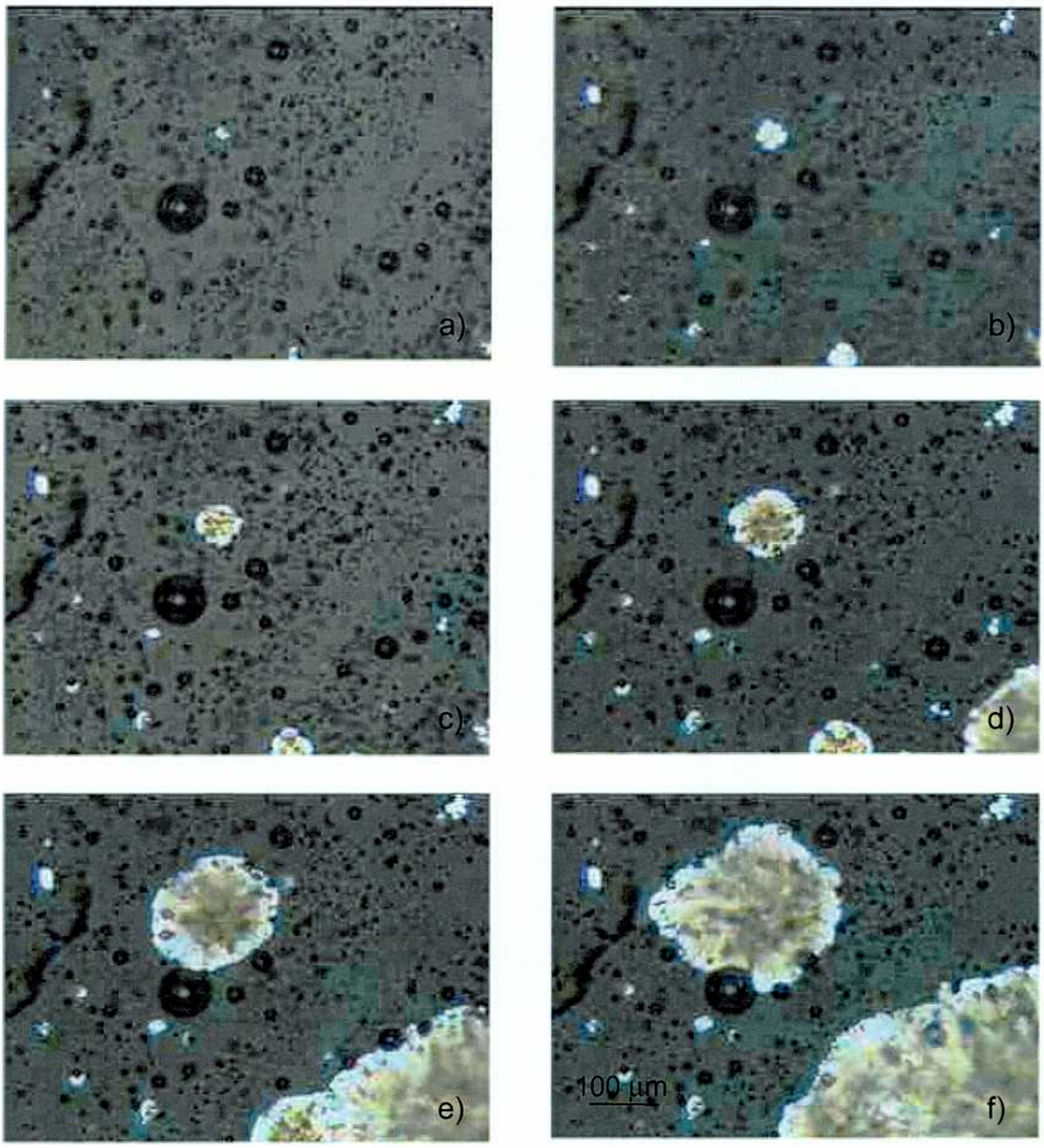
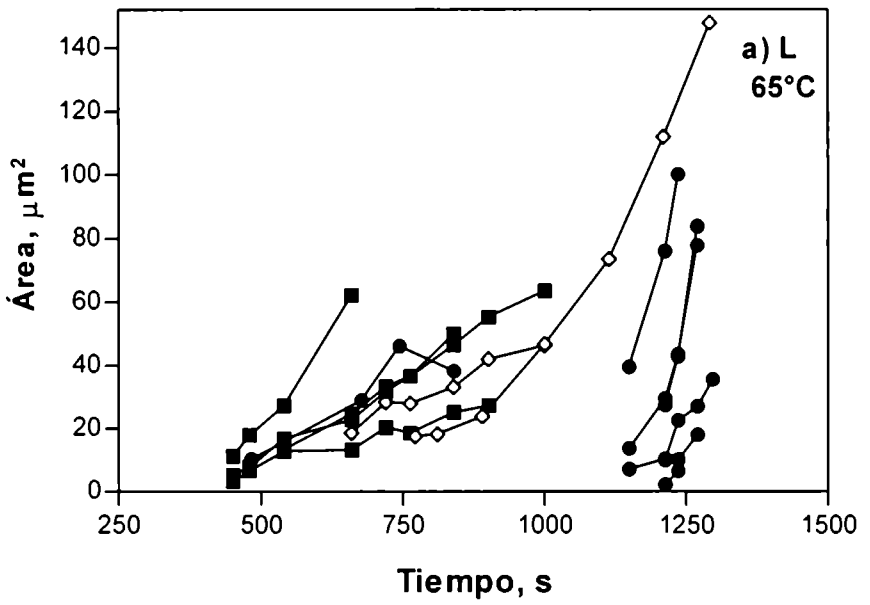


Figura IV.B.20: *Secuencia de imágenes obtenidas por M.O. para la cristalización de lactosa a 70°C a partir del azúcar amorfo (liofilizado y humidificado a 33% H.R.), calentamiento: 50°C/min hasta alcanzar la temperatura isotérmica, a) 360 s, b) 720 s, c) 960, d) 1080 s, e) 1140 s, f) 1170.*

Utilizando la metodología descripta en la sección III.J.1, se evaluó la cinética de cristalización de muestras de lactosa y mezclas L/T (80:20) liofilizadas y humidificadas a 33% H.R. a varias temperaturas (60, 63, 65, 70 y 80°C para lactosa y 70, 80, 90 y 95°C para L/T (80:20)). Se hicieron al menos triplicados para cada condición y se siguió el crecimiento de 1 a 5 cristales por muestra. En las Figuras IV.B.21 y 22 se muestran los resultados obtenidos para lactosa y para la mezcla L/T (80:20) para algunas de las temperaturas estudiadas. En los análisis por DSC, se calculó la fracción cristalina (α) refiriendo la entalpía de cristalización determinada a diferentes tiempos con la entalpía total de cristalización. Sin embargo en los estudios por microscopía se graficó el área de los cristales en función del tiempo ya que surgieron dificultades para definir el área máxima de cristalización. Algunos autores (Aguilera y Soto, 2000) definieron el área máxima de crecimiento de un cristal como la mayor área que puede evaluarse dentro del campo de observación, o bien el área a partir de la cual los cambios de tamaño en el tiempo se hacen muy lentos. Esta última opción sería adecuada para analizar cinéticas iniciales de cristalización pero estudiando azúcares amorfos esta condición sólo podría alcanzarse trabajando a temperaturas cercanas al valor de T_g donde el proceso de cristalización es excesivamente lento. Calentando a temperaturas medias entre T_g y la temperatura de fusión (T_m) se observó el crecimiento rápido de varios cristales a partir de la solución sobreenfriada que luego se fusionaban unos con otros. Por otro lado es importante resaltar que en muchos casos la cristalización se completaba en un sector de la muestra mientras que en otro no había comenzado o era muy lenta y no se completaba en el tiempo de observación.



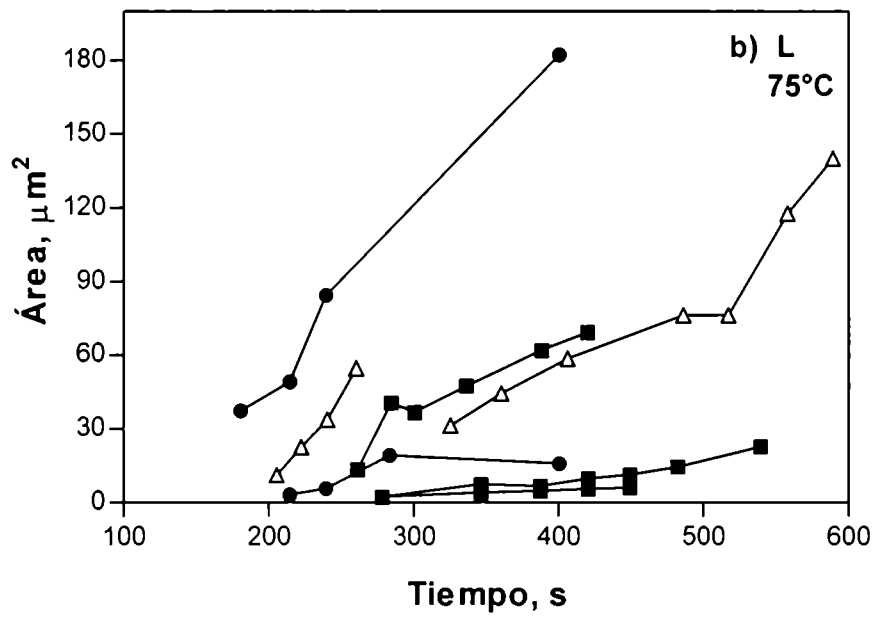


Figura IV.B.21: *Velocidad de crecimiento de cristales individuales en sistemas de lactosa liofilizados y humidificados a 33% H.R. en función del tiempo de calentamiento a (a) 65 °C y (b) 75 °C. Las distintas muestras analizadas se indican con símbolos diferentes, con símbolos iguales se indica el crecimiento de diferentes cristales en una misma muestra.*

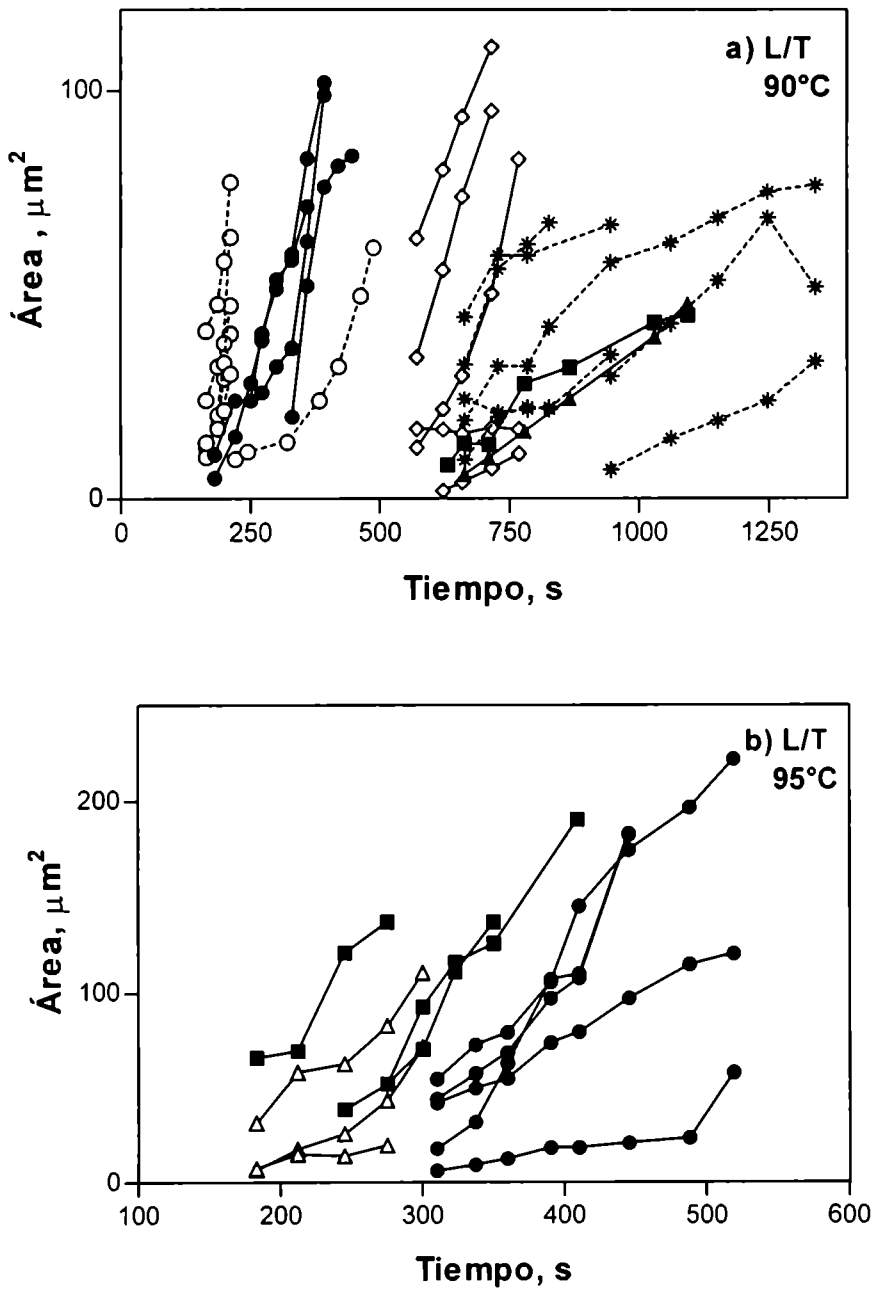
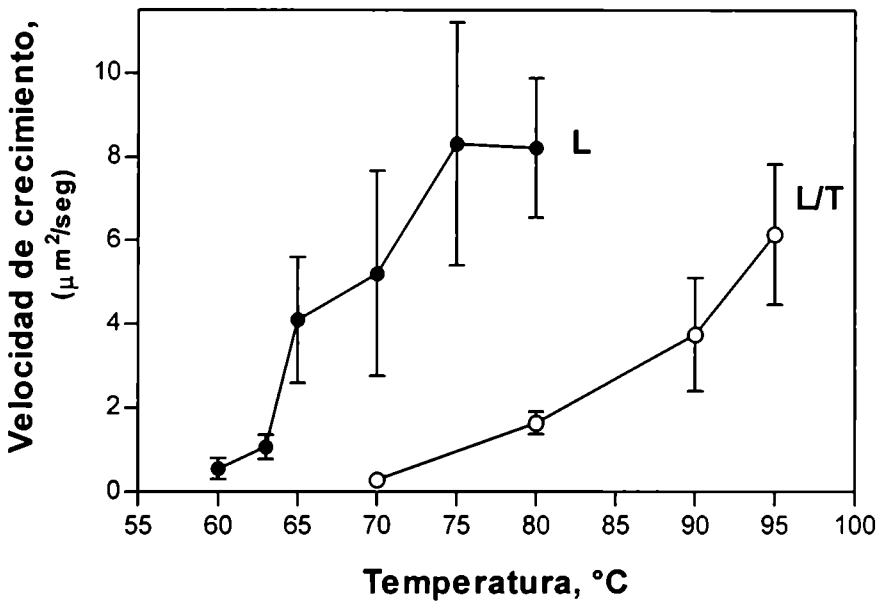


Figura IV.B.22: *Velocidad de crecimiento de cristales individuales en sistemas mezcla L/T (80:20) liofilizados y humidificados a 33% H.R. en función del tiempo de calentamiento a (a) 90°C, (b) 95°C. Las distintas muestras analizadas se indican con símbolos diferentes, con símbolos iguales se indica el crecimiento de diferentes cristales en una misma muestra.*

Las curvas de variación de tamaño de los cristales en función del tiempo (Figs. IV.B.21 y 22) mostraron gran dispersión de los datos tanto de crecimiento como de los tiempos de inducción o inicio de la cristalización en los distintos sistemas y temperaturas analizados. Estos resultados mostraron que la cristalización de lactosa a partir de la matriz amorfa no ocurre de manera uniforme en toda la muestra sino que varía en distintas regiones de la misma muestra. Estas observaciones dan cuenta de heterogeneidades en el sistema que podrían estar relacionadas por ejemplo con una distribución diferencial del agua o distinto grado de empaquetamiento o porosidad en diferentes regiones de la muestra.

Los datos mostrados en las Figs. IV.B.21 y 22 se ajustaron al modelo de regresión lineal (r^2= 0.800-0.998) y se empleó el valor de la pendiente para describir la velocidad de crecimiento en cada caso. Se calculó una pendiente o velocidad promedio para cada condición y se graficaron en función de la temperatura isotérmica de calentamiento y de la composición (Figura IV.B.23), para cada punto se indica el error estimado correspondiente. Si bien se observó en ambos sistemas un aumento de la velocidad media de cristalización con la temperatura, como el error en las determinaciones era grande fue necesario realizar muchas mediciones para poder observar el efecto. La velocidad de cristalización de lactosa en la mezcla fue significativamente menor que en el sistema puro a cualquiera de la temperaturas estudiadas.



Figuras IV.B.23: *Velocidad de crecimiento determinada por M.O. de cristales de lactosa en sistemas liofilizados del azúcar puro y en mezclas L/T (80:20) humidificados a 33% H.R. en función de la temperatura isotérmica de calentamiento .*

En la Figura IV.B.24 se muestran para lactosa y mezclas L/T (80:20) los rangos de tiempo en los cuales se detectó, en distintas muestras o zonas de la misma muestra, el inicio de la cristalización a diferentes temperaturas de calentamiento. A temperaturas entre 70 y 100°C la cristalización comenzó antes de los 6 minutos en cualquiera de los sistemas. Los tiempos de inducción fueron muy variables (principalmente a temperaturas menores que 75°C) y en consecuencia sólo efectos importantes como variaciones de temperatura de por lo menos 10°C o la incorporación de trehalosa al sistema modificaron el inicio de la cristalización en una magnitud que fue detectable a pesar de la dispersión de los datos. Los tiempos de inducción fueron mayores en ambos

sistemas al bajar la temperatura y mayores en la mezcla (principalmente a 70°C) que en el sistema puro.

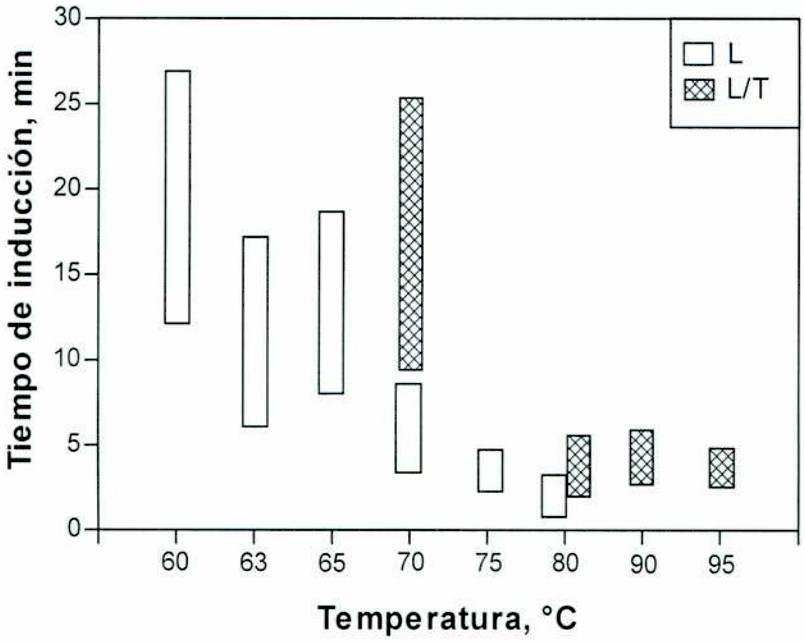


Figura IV.B.24: *Rangos de tiempo en los cuales se detectó el inicio de la cristalización por M.O. a diferentes temperaturas de calentamiento isotérmico en muestras liofilizadas de lactosa y mezclas L/T (80:20) humidificadas a 33%* H.R..

Como en el caso de los resultados obtenidos por DSC, se evaluó el efecto de la temperatura sobre la pendiente o velocidad promedio de crecimiento de los cristales usando los modelos de Arrhenius, WLF y VTF (sección I.B.7). Se ajustaron los datos experimentales a la forma linealizada (r^2= 0.80-0.98) y se estimaron los coeficientes correspondientes (Tabla IV.B.7), el error relativo fue del 20 al 30%.

Tabla IV.B.7: Coeficientes estimados a partir de las ecuaciones de Arrhenius, WLF y VTF linealizadas, para sistemas de lactosa y L/T (80:20) humidificados a 33% H.R., donde se evaluó la cristalización por M.O..

Sistema	Arrhenius	WLF	VTF
Lactosa	E_a: 126.2 KJ/mol	C_1: 8.8 C_2: 50	B: 3097
L/T (80:20)	E_a: 128.45KJ/mol	C_1: 7.35 C_2: 50	B: 3336

Si bien la estimación de los coeficientes utilizando M.O. (Tabla IV.B.7) tiene un error grande (20-30%), se observaron diferencias con respecto a los valores de los coeficientes obtenidos por DSC (Tabla IV.B.6). Se observó que tanto las E_a como los valores de C_1 (modelo WLF) y B (modelo VTF) fueron mayores cuando se estimaron a partir del análisis por microscopía. Esto indica que la velocidad de cristalización analizada por microscopía fue más dependiente de la temperatura de calentamiento isotérmico.

En la Figura IV.B.25 se compararon los datos de tiempo de inicio de la cristalización determinados por M.O. con los tiempos determinados para los mismos sistemas usando DSC. Si bien se trata de técnicas totalmente diferentes, se observa que los valores obtenidos fueron del mismo orden y coincidieron incluso a algunas temperaturas.

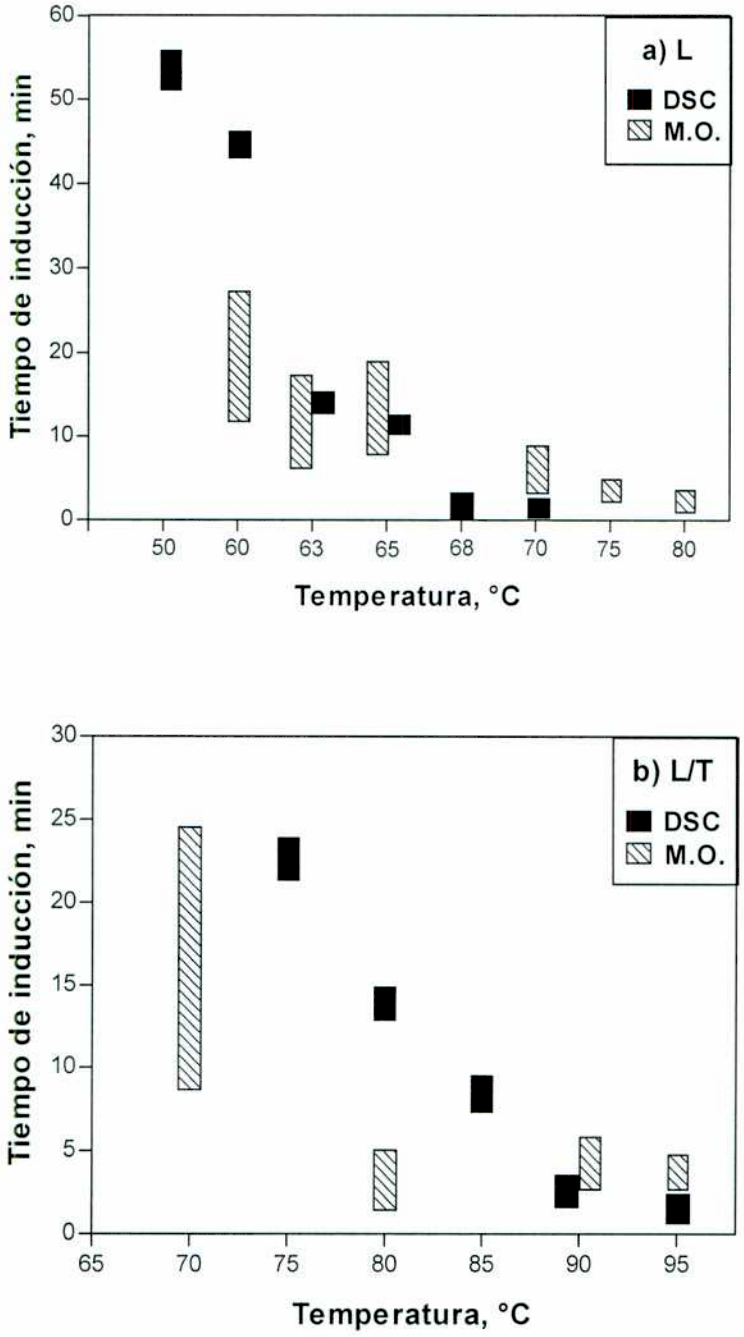


Figura IV.B.25: *Comparación de los rangos de tiempos de inducción de la cristalización determinados por M.O. y por DSC a diferentes temperaturas para sistemas liofilizados de (a) lactosa y (b) mezclas L/T (80:20) humidificados a 33% H.R..*

Empleando DSC se obtuvieron resultados mucho más precisos que por M.O. (Fig. IV.B.25). Tanto en los sistemas de lactosa como en la mezcla, los tiempos de inducción determinados por DSC fueron mayores que por M.O. a bajas temperaturas y menores a altas temperaturas. Esto muestra que la detección del inicio de la cristalización por microscopía fue menos sensible a la temperatura de calentamiento (menor pendiente en los gráficos de la Fig. IV.B.25) que la detección por DSC, a la inversa de lo hallado para la dependencia de la velocidad global de cristalización (para la cual se obtuvieron valores de E_a mayores en las determinaciones realizadas por M.O.). Probablemente a altas temperaturas se forman rápidamente muchos cristales que serían suficientes para ser detectados por DSC, a bajas temperaturas se forman cristales más aislados que crecen lentamente y en consecuencia el DSC tal vez no puede detectarlos hasta que alcanzan un cierto número o tamaño.

En la Figura IV.B.26 se comparó el tiempo necesario para que la lactosa amorfa cristalice completamente en sistemas puros y en sistemas L/T (80:20) empleando DSC y M.O. (la metodología se describe en la sección III.J.1). Se observa que por ambas metodologías se obtuvo un patrón similar donde el tiempo para alcanzar la cristalización completa disminuye al aumentar la temperatura, y la cristalización a una temperatura dada se retrasa en presencia de trehalosa.

Como el tiempo de inducción fue más dependiente de la temperatura para la detección por DSC que por M.O. (Fig. IV.B.25), e inversamente, la velocidad de cristalización global fue más dependiente de la temperatura para M.O. que para DSC (se obtuvieron valores de E_a mayores por M.O. que

por DSC), es probable que en las condiciones analizadas el tiempo para cristalización total determinado por ambos métodos sea parecido por superposición de fenómenos que guardan dependencia opuesta con la temperatura.

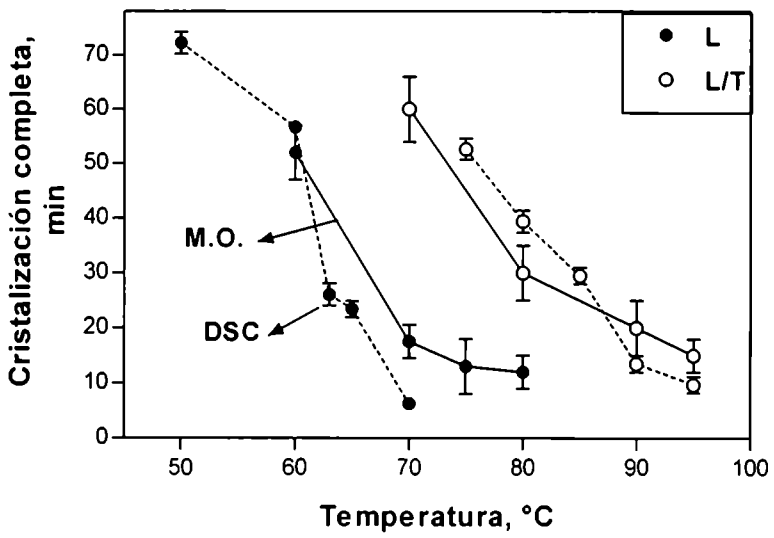


Figura IV.B.26: *Tiempo necesario para que la lactosa amorfa cristalice completamente a diferentes temperaturas en sistemas puros y en mezclas L/T (80:20) humidificados a 33% H.R. empleando DSC y M.O..*

Los análisis por DSC resultaron útiles para estudiar cinéticas de cristalización de azúcares ya que se obtienen datos precisos de temperaturas de cristalización, entalpías de cristalización en el tiempo a diferentes temperaturas, tiempos de inducción, T_g. Sin embargo, con esta técnica se obtiene información acerca del comportamiento global del sistema y no de fenómenos locales o heterogeneidades en la muestra. Los análisis por

microscopía óptica y análisis de imagen constituyen una herramienta útil para estudiar cristalización u otros fenómenos que pueden ocurrir en forma diferencial en regiones distintas de la muestra. En particular se observó que la cristalización de lactosa en sistemas amorfos no fue uniforme observándose en diferentes zonas de la misma muestra distintos tiempos de inducción y distinto grado de cristalización. Esta técnica permite observar el fenómeno directamente y no indirectamente a través de cambios en propiedades mecánicas o térmicas. Como se observó en los resultados presentados en este trabajo las dificultades de la microscopía residen en la gran dispersión de los datos que se obtienen, en los inconvenientes para definir el máximo de cristalización en las evaluaciones cinéticas y en la necesidad de realizar muchas determinaciones para minimizar errores cuando el objetivo es determinar parámetros representativos del proceso global.

La calorimetría diferencial de barrido y el análisis de imágenes por microscopía serían técnicas complementarias que proveen información del fenómeno en estudio a diferentes niveles permitiendo de esta manera alcanzar una comprensión más integral del proceso.

IV.B.3. EMPLEO DE MATRICES COMBINADAS AZÚCAR/SAL.

Existen evidencias que indican que ciertas propiedades físicas de los azúcares se modifican en presencia de sales (Miller y col., 1997, 1998). El efecto de los electrolitos tiene un interés especial debido a que están presentes en todos los sistemas biológicos, afectan la estructura del agua y posiblemente son capaces de interactuar con moléculas biológicas. Por otro lado, Carpenter y col. (1987) demostraron que la incorporación de zinc a mezclas que contenían la enzima fosfofructoquinasa y diferentes azúcares mejoró la estabilización provista por los azúcares durante la liofilización y el almacenamiento. Encontraron que el efecto no era consecuencia sólo de la suma de las capacidades protectoras individuales del azúcar y de la sal ya que no se observó protección incorporando solamente zinc al sistema. Si bien el efecto sinérgico de los azúcares y cationes divalentes sobre la estabilización de proteínas ha sido informado (Carpenter y col., 1987) aún no ha sido explicado. Distintos autores observaron, empleando métodos físicos, la existencia de complejos azúcar-metal en solución y aislaron también complejos de azúcar con derivados de azúcar tanto en estado sólido como cristalino (Cook y Bugg, 1973, Morel-Desrosier y col., 1991, Rongere y col., 1995). Sin embargo todavía no se han realizado estudios acerca del efecto de las sales sobre propiedades físicas en sistemas vítreos o sobreenfriados en relación con la estabilización de biomoléculas.

En esta sección del trabajo se investigó el efecto del agregado de varias sales sobre la eficiencia de matrices sobreenfriadas de trehalosa para preservar la enzima β-galactosidasa y el efecto sobre propiedades ligadas a la estabilidad de materiales biológicos como temperatura de transición vítrea, isotermas de sorción, cristalización de azúcar o agua en el sistema.

IV.B.3.1. Estabilidad enzimática en sistemas liofilizados azúcar/sal.

En la Figura IV.B.27 se muestra el diagrama de estado de sistemas trehalosa-agua y las regiones en las cuales se estudió el efecto de las sales sobre la cristalización de azúcar o de agua y las propiedades de sorción de la matriz. Se indica también la zona en la cual otros autores (Miller y col., 2000) estudiaron el efecto de distintas sales sobre la conductividad de soluciones de azúcar en estado sobreenfriado.

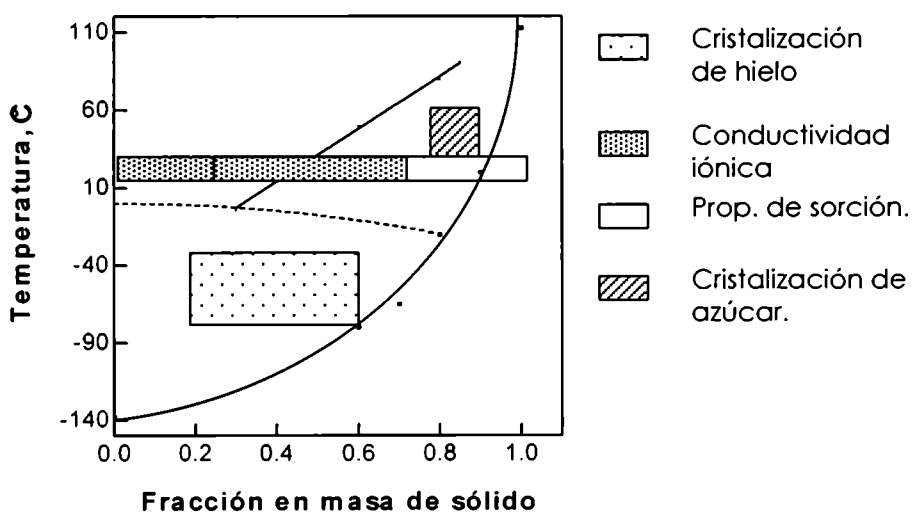


Figura IV.B.27: *Diagrama de estado de trehalosa donde se muestran las regiones en las cuales se investigó el efecto de las sales.*

La estabilidad de la enzima lactasa se estudió en matrices liofilizadas de trehalosa y de trehalosa en presencia de diferentes cloruros (KCl, NaCl, CsCl, $CaCl_2$, $MgCl_2$, $ZnCl_2$) en una relación molar trehalosa/sal (R) de 5.

Se analizó en primer lugar la actividad de la enzima en los sistemas en solución (previo al proceso de liofilización) (Figura IV.B.28). La adición de cloruro de Mg, K, Na o Cs a la solución de trehalosa no modificó significativamente la actividad de la enzima respecto a la observada en el azúcar puro. Sin embargo, se observó inactivación en presencia de $ZnCl_2$ o $CaCl_2$, ya que ambos cationes son inhibidores de la enzima (Guy and Bingham, 1978; Voget y col., 1994).

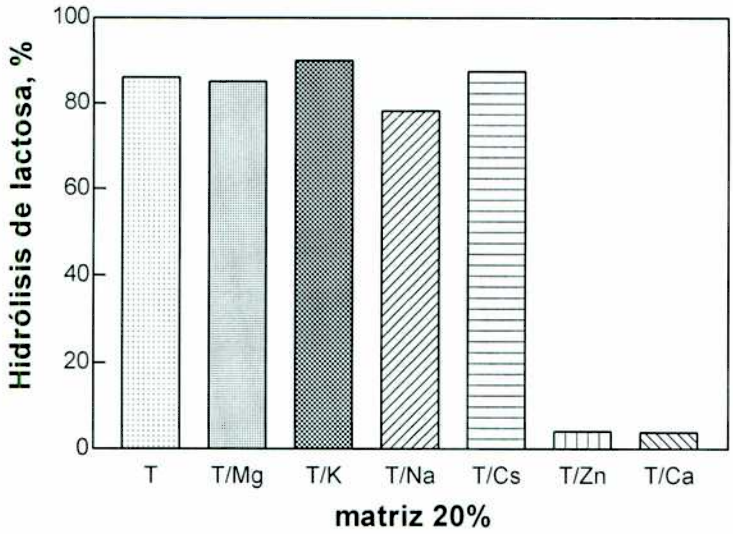


Figura IV.B.28: *Actividad de la enzima lactasa en soluciones de trehalosa y de trehalosa en presencia de distintos cloruros previo al proceso de liofilización. Los sistemas T/Sal se prepararon en relación molar R= 5.*

La Figura IV.B.29 muestra la actividad remanente de lactasa en la matriz pura de trehalosa y en los sistemas combinados trehalosa/sal (T/Sal) luego del proceso de liofilización y humidificación a 43% H.R. (esta humedad relativa se seleccionó por ser la correspondiente a la formación del cristal dihidratado y considerada potencialmente crítica para la estabilidad de la enzima en trehalosa (ver sección IV.A.2.2)). En estas condiciones tampoco se observó un comportamiento diferencial en presencia de las sales, siendo el patrón de estabilidad similar al obtenido para los sistemas en solución (Fig. IV.B.28). La pérdida de actividad de aproximadamente un 25% respecto a la actividad de la enzima en solución se produjo principalmente durante el proceso de liofilización (23-24%), sólo un 1-2% de la actividad enzimática se perdió durante el período de humidificación. La inactivación de la enzima en presencia de $ZnCl_2$ o $CaCl_2$ (observada también en solución) no se pudo revertir con el agregado de una cantidad adecuada de EDTA (agente quelante) al sistema previo a la medición de actividad, y por lo tanto estos cloruros fueron descartados para los estudios de estabilidad. El efecto de los cationes sobre la actividad enzimática depende en gran medida de interacciones específicas con la proteína. En particular se ha observado que el Ca^{2+} y el Zn^{2+} pueden tener efectos estabilizantes o desestabilizantes sobre diferentes enzimas (Carpenter y col., 1987; Chan y col., 1996) o materiales biológicos (Tan y col., 1995).

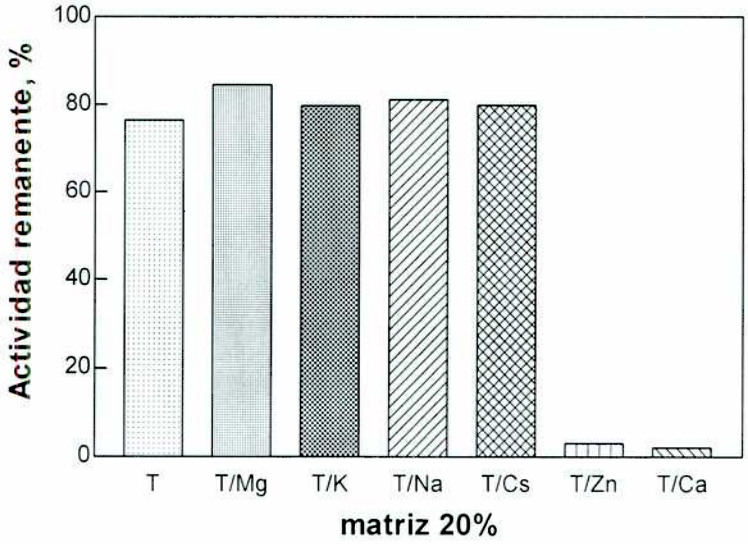


Figura IV.B.29: *Actividad remanente de la enzima lactasa en matrices de trehalosa y de trehalosa en presencia de distintos cloruros (R= 5) luego de liofilizar y humidificar los sistemas a 43% H.R..*

En la Figura IV.B.30 se muestra la influencia de la adición de cloruro de Mg, K, Na o Cs a la matriz de trehalosa sobre la actividad remanente de la enzima, cuando los sistemas humidificados a 43% H.R. fueron tratados térmicamente a 70°C. La incorporación de sales a la matriz de trehalosa retrasó la inactivación térmica de la enzima, siendo el efecto más importante en presencia de KCl o $MgCl_2$. Como en todas las matrices el anión (Cl^-) se mantuvo constante, el comportamiento diferencial observado para las distintas sales se atribuyó al catión. La pérdida del efecto protector de trehalosa a 43% H.R. (observada en la Fig. IV.B.30) fue atribuída en el presente trabajo (sección IV.A.2.2) y por diferentes autores (Suzuki y col., 1997; Cardona y col., 1997) a la cristalización del azúcar. Por lo tanto la mayor estabilidad

observada en los sistemas combinados humidificados podría relacionarse con un retraso o inhibición de la cristalización del azúcar en presencia de la sal, o bien con un efecto específico del catión.

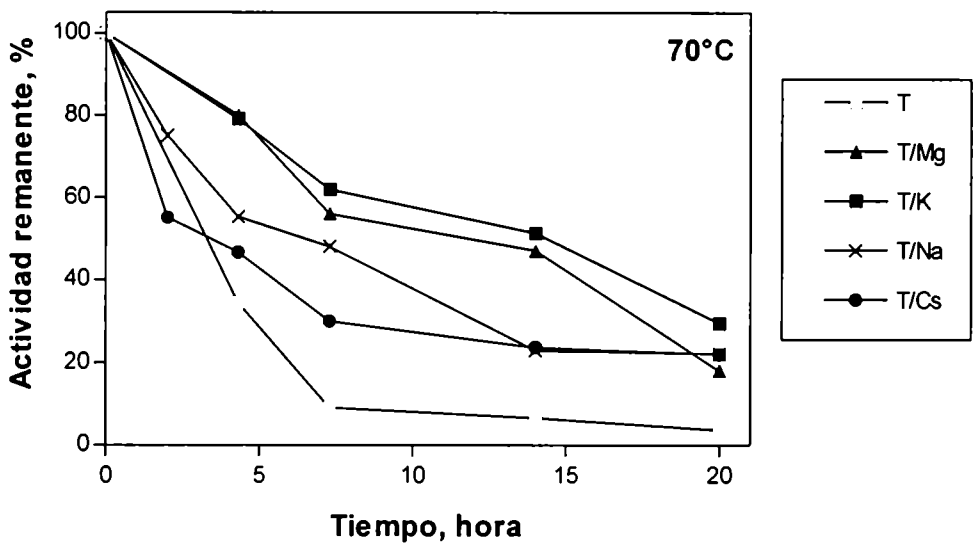


Figura IV.B.30: *Actividad remanente de la enzima lactasa en sistemas de trehalosa y T/Sal (R= 5) humidificados a 43% H.R. en función del tiempo de calentamiento a 70°C.*

Para analizar si interacciones específicas catión-proteína eran responsables de la mayor eficiencia de las mezclas como agentes protectores, se estudió la estabilidad térmica de la enzima en sistemas deshidratados, en condiciones en las que la cristalización de la trehalosa estuviera impedida. En la Figura IV.B.31 se observa que luego del proceso de liofilización y posterior deshidratación sobre un agente desecante el contenido de agua de las matrices combinadas T/Mg fue mayor que el determinado para la matriz de trehalosa sola, siendo el contenido acuoso aún mayor al aumentar la

proporción de $MgCl_2$ en la matriz. Por lo tanto los sistemas que contenían $MgCl_2$ fueron deshidratados en estufa de vacío (ver sección III.H) luego de la liofilización para que el contenido acuoso fuera similar al de trehalosa (W < 0.03).

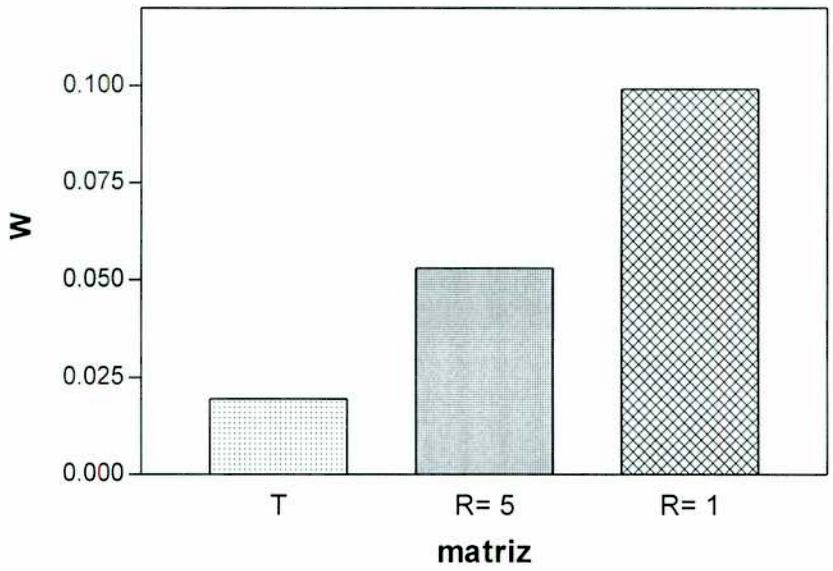


Figura IV.B.31: *Fracción en masa de agua (W) de sistemas de trehalosa y de trehalosa en presencia de $MgCl_2$ liofilizados y mantenidos una semana en desecante.*

En la Figura IV.B.32 se muestra la estabilidad de la enzima a 70°C en los sistemas deshidratados. En estas condiciones cualquier efecto sería independiente de la cristalización del azúcar ya que la temperatura es baja para que cristalice la trehalosa en forma anhidra y no hay agua disponible para que se forme el dihidrato. Se observa que la estabilidad en estas matrices fue similar en trehalosa y en trehalosa en presencia de $MgCl_2$, por lo tanto el

efecto estabilizante de los sistemas combinados observado a 43% H.R. estaría más relacionado con modificaciones a nivel de propiedades físicas de la matriz de azúcar en presencia de la sal que con efectos específicos catión-proteína. Teniendo en cuenta esta hipótesis, la mayor estabilidad enzimática observada en los sistemas trehalosa/sal se analizó en relación con la posible modificación de propiedades físicas como temperatura de transición vítrea, cristalización de azúcar o agua en el sistema y propiedades de sorción.

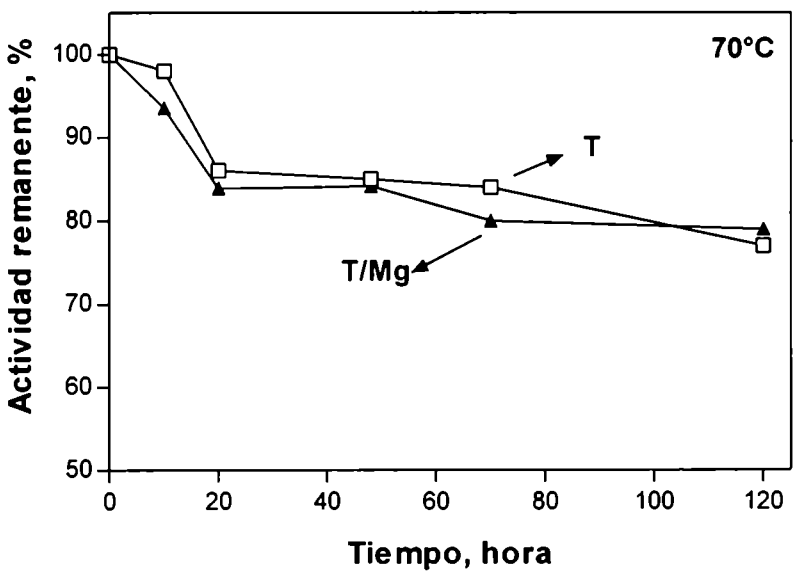


Figura IV.B.32: *Actividad remanente de la enzima lactasa en función del tiempo de tratamiento térmico a 70°C en sistemas de T y T/Mg (R= 5) deshidratados (W < 0.03).*

IV.B.3.2. Análisis de propiedades físicas en sistemas liofilizados azúcar/sal.

IV.B.3.2.a. Temperatura de transición vítrea y cristalización de azúcar en sistemas liofilizados trehalosa/sal.

En la Figura IV.B.33 se muestran los termogramas obtenidos por DSC para sistemas de trehalosa y trehalosa en presencia de diferentes sales luego de humidificar a 43% H.R. (en esta condición se analizó la estabilidad enzimática en la sección anterior). Para cada sistema se observa el pico endotérmico (de mayor o menor tamaño según el cloruro presente en la matriz) a una temperatura que coincide con la correspondiente a la fusión del cristal de trehalosa dihidrato (ver Fig. IV.A.20). El área del pico endotérmico se usó, como se mencionó anteriormente, para estimar la cantidad de trehalosa cristalina presente (fracción cristalina del sistema) por comparación con el ΔH_f (entalpía de fusión) obtenido para el dihidrato puro de trehalosa (139 J/g medido en las mismas condiciones).

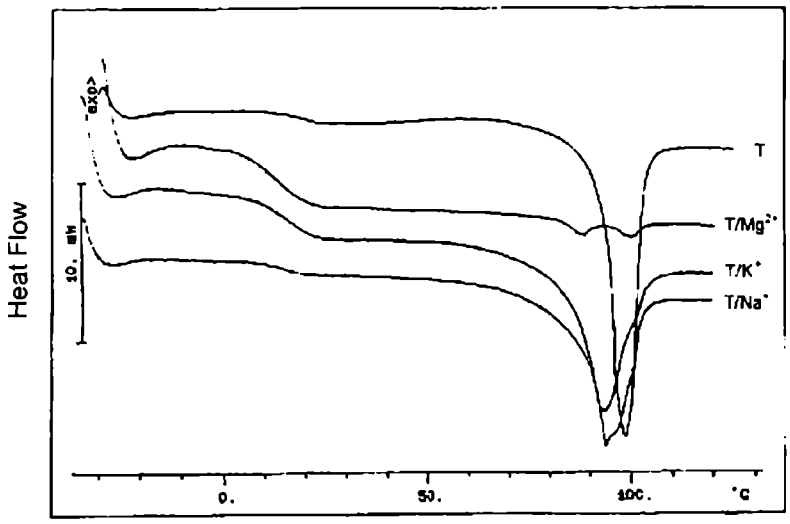


Figura IV.B.33: *Termogramas obtenidos por DSC para sistemas liofilizados de trehalosa-enzima y trehalosa/sal-enzima humidificados a 43% H.R. En cada termograma se observa la transición vítrea y el pico endotérmico de fusion del azúcar.*

En la Tabla IV.B.8 se muestran los valores de temperatura de transición vítrea, área del pico endotérmico de fusión, fracción cristalina y contenido de agua determinados para los sistemas liofilizados conteniendo trehalosa-enzima o trehalosa/sal-enzima humidificados a 43% H.R. En cualquiera de estos sistemas, el agua adsorbida ($W \cong 0.1$-0.12) fue suficiente para una cristalización completa del azúcar, ya que la cantidad de agua para formar el dihidrato de trehalosa es $W \cong 0.1$. En los sistemas que contenían sólo trehalosa y la enzima, una proporción alta del azúcar cristalizó durante la humidificación (la fracción cristalina fue 0.61). Sin embargo, la cristalización fue menor en los sistemas combinados trehalosa/sal. En particular, en presencia de $MgCl_2$ la cristalización se inhibió casi totalmente (la fracción cristalina fue 0.03) a pesar de ser éste el sistema con mayor contenido acuoso. Debe señalarse que si bien en algunos

de los sistemas el azúcar cristalizó en una proporción alta durante la humidificación a 43% H.R. y 25°C (Tabla IV.B.8), la actividad de la enzima no se perdió durante la humidificación, sino durante el tratamiento térmico posterior (Fig. IV.B.30)

Tabla IV.B.8: Valores de temperatura de transición vítrea, área del pico endotérmico de fusión, fracción cristalina y fracción en masa de agua (W), obtenidos para los sistemas liofilizados conteniendo trehalosa-enzima o trehalosa/sal-enzima humidificados a 43% H.R.

Matriz	T_g (°C) (± 2)	Area del pico endotérmico, J/g (± 8)	Fracción cristalina	W_T	W_A
T	13	85	0.61	0.102	0.105
T/$MgCl_2$	3.5	4.2	0.03	0.119	0.120
T/$ZnCl_2$	10.4	20.8	0.15	0.099	0.100
T/NaCl	8.4	49.7	0.36	0.093	0.093
T/CsCl	ND	75	0.54	0.093	0.091
T/KCl	8.5	24.5	0.18	0.093	0.092

W_T, fracción en masa de agua total
W_A, fracción en masa de agua de la fase amorfa
ND, no detectada

Aldous y col. (1995) observaron que la cristalización parcial de trehalosa durante el calentamiento en un sistema cerrado, reduce el contenido de humedad de la fase amorfa remanente incrementándose en consecuencia el valor de T_g. Como en este trabajo la cristalización observada (Fig. IV.B.33) ocurrió durante la humidificación a 43% H.R., la fase amorfa tuvo la oportunidad de rehumidificarse. La cantidad de agua asociada a la fase

amorfa (Tabla IV.B.8) se calculó empleando la Eq. (III.1), sección III.D.. Para el caso particular en el que el contenido total de agua de las muestras se acerca a W= 0.1, el contenido de agua asociado a la fase amorfa es también cercano a ese valor. En consecuencia, el agua disponible en la fase amorfa fue también suficiente para formar el dihidrato de trehalosa, pero se verificó que la cristalización no se completó en los sistemas combinados T/Sal aún luego de 60 días de humidificación a 43% H.R. y 25°C. La composición de las muestras, y especialmente las sales presentes, interfirieron con la cristalización del azúcar.

En la Figura IV.B.34 se observa claramente que hubo una relación entre el grado de cristalización de la trehalosa, que dependió de la sal presente en la matriz, y la estabilidad de la enzima lactasa durante el almacenamiento.

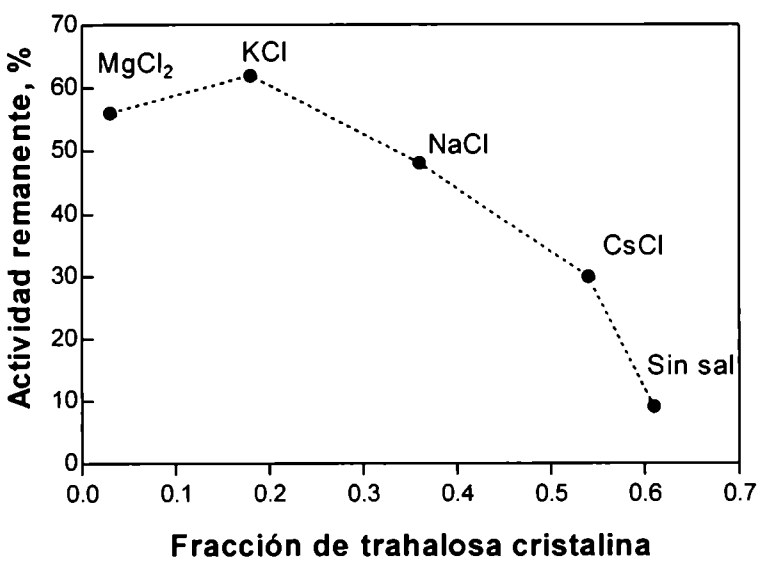


Figura IV.B.34: *Relación entre la fracción de trehalosa que cristalizó en presencia de varias sales (R= 5) en matrices humidificadas a 43% H.R. y la estabilidad de lactasa luego de 7 horas de almacenamiento a 70°C.*

En la Figura IV.B.35 se muestra el patrón de difracción de rayos-X (a) y los termogramas obtenidos por DSC (b) para trehalosa y sistemas combinados T/Mg deshidratados (W < 0.03), en los cuales la estabilidad de la enzima no se vio afectada por la presencia de la sal (Fig. IV.B.32). El valor de temperatura de transición vítrea de estos sistemas fue de 87°C para trehalosa y de 76°C para trehalosa en presencia de Mg^{2+}. Se corroboró por ambos métodos que los sistemas se encontraban en estado amorfo (no cristalino). Estos resultados evidenciaron también la relación entre el efecto estabilizante de las mezclas trehalosa/sal a 43% H.R. y la estructura amorfa (no cristalina) del azúcar.

Es importante mostrar además que en un experimento en el cual se produjo cristalización parcial de la trehalosa durante el proceso de liofilización debido a condiciones operacionales inadecuadas del equipo (pérdida de vacío, mayor temperatura de la placa condensadora) se observó que las muestras que contenían $MgCl_2$ estaban menos cristalizadas. En la Figura IV.B.36 se muestran los análisis realizados por DSC y rayos-X de estos sistemas. Los sistemas combinados presentaron un pico endotérmico menor en el termograma (Fig. IV.B.36.a) y un pico característico menor a $2\theta = 23.6°$ en el difractograma (Fig. IV.B.36.b) que los sistemas puros. Por lo tanto estos resultados son una evidencia más del efecto del $MgCl_2$ sobre la cristalización de trehalosa en sistemas sobreenfriados.

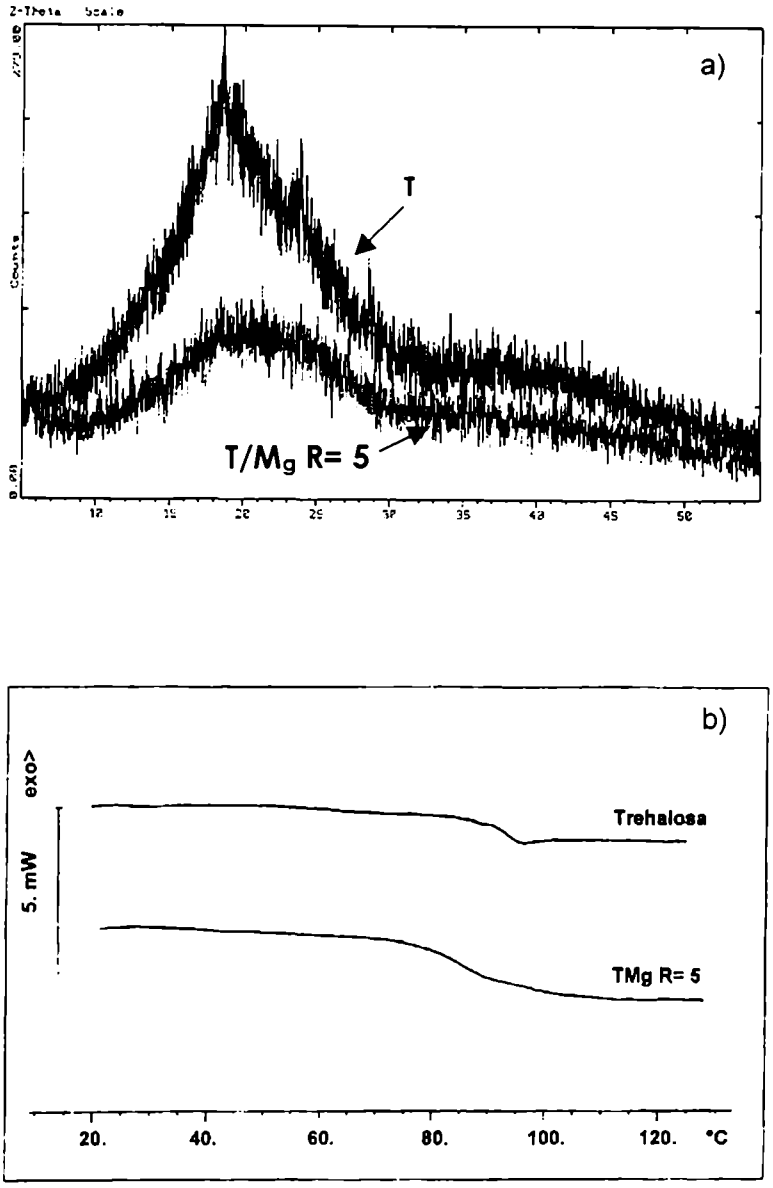


Figura IV.B.35: *(a) Patrón de difracción de rayos-X y (b) termogramas (DSC) obtenidos para sistemas liofilizados de trehalosa y trehalosa en presencia de $MgCl_2$ (R= 5) con una W <0.03.*

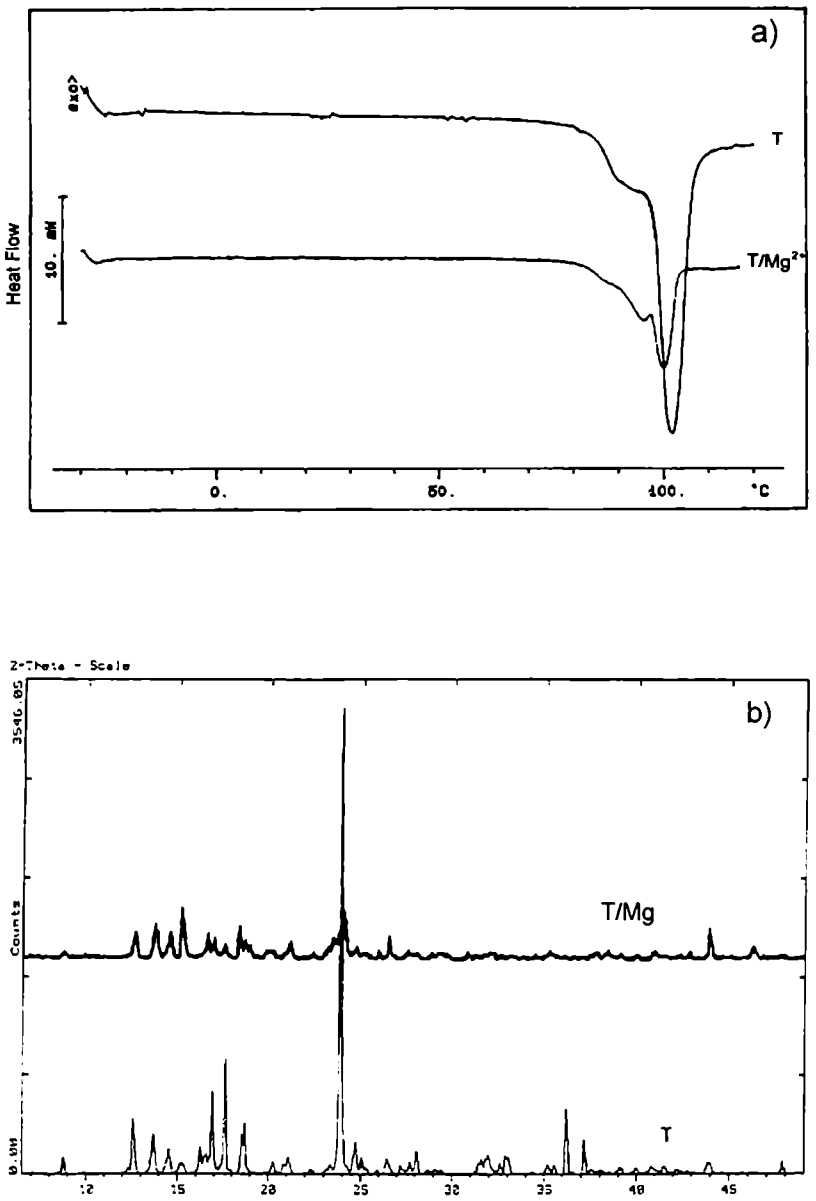


Figura IV.B.36: *(a) Termogramas obtenidos por (DSC) y (b) patrón de difracción de rayos-X determinados para sistemas de trehalosa y trehalosa en presencia de $MgCl_2$ (R= 5) que cristalizaron parcialmente durante el proceso de liofilización.*

La cristalización en sistemas amorfos a temperaturas cercanas a T_g, se considera que está gobernada por el valor de ($T-T_g$) (Roos y Karel, 1991c) ya que esta variable está relacionada con la movilidad molecular. Podría esperarse entonces que la presencia de la sal produjera inhibición de la cristalización por aumentar el valor de T_g. Sin embargo, como se muestra en la Tabla IV.B.8, la menor cristalización del azúcar en presencia de las sales no estuvo asociada a un aumento de la temperatura de transición vítrea del sistema. Los valores de T_g de las matrices combinadas fueron similares a los valores obtenidos para trehalosa pura excepto para T/Mg donde aunque la T_g fue menor debido probablemente al mayor contenido de agua del sistema, la cristalización se inhibió casi totalmente.

Como se observa en la Tabla IV.B.8, los sistemas que contenían $MgCl_2$ retuvieron mayor cantidad de agua que los sistemas de trehalosa o trehalosa en presencia de otras sales. Incluso, como se observó en la Fig. IV.B.31, el contenido de agua de las matrices combinadas T/Mg luego del proceso de liofilización y posterior deshidratación sobre un agente desecante fue mayor que el determinado para la matriz de trehalosa sola. Estos resultados concuerdan con la disminución de T_g observada para dichos sistemas en los termogramas de la Figura IV.B.37 al aumentar la concentración del cloruro en la matriz.

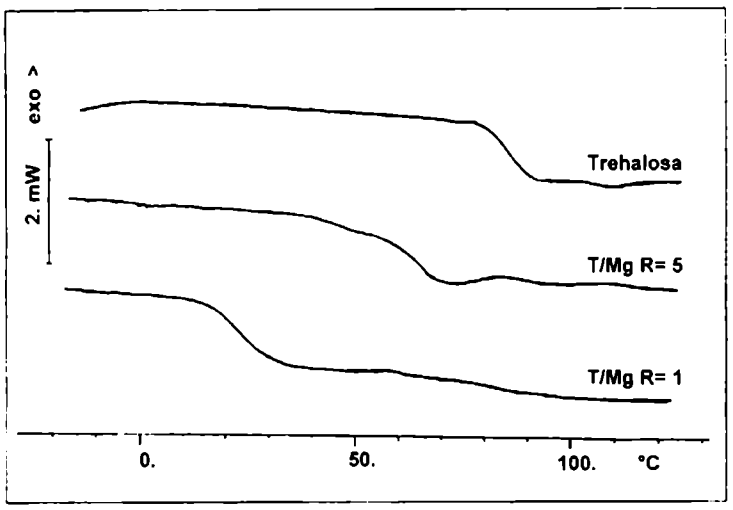


Figura IV.B.37: *Termogramas obtenidos por DSC para sistemas de trehalosa y de trehalosa en presencia de $MgCl_2$ liofilizados y mantenidos una semana en desecante.*

El mayor contenido de agua de los sistemas que contenían $MgCl_2$ luego de la liofilización se relacionó con posibles interacciones de la sal con el agua.

El efecto de las sales sobre la cinética de cristalización de trehalosa se estudió durante el almacenamiento de los sistemas a 43% H.R. y 25°C (Figura IV.B.38). Estas condiciones aseguran la cantidad de agua ($W \approx 0.1$) y la movilidad ($T-T_g = 15°C$) suficientes para que se forme el cristal dihidratado. Se observó un patrón de cristalización similar hasta los 6 días de almacenamiento, que fue el tiempo al cual todas las muestras alcanzaron aproximadamente una fracción en masa de agua de 0.1. La cristalización observada antes de dicho tiempo se atribuyó a una distribución heterogénea del agua en la matriz. Luego de los 6 días, la cristalización avanzó rápidamente en todos los

sistemas hasta alcanzar un valor constante que, para trehalosa pura, corresponde a la cristalización completa del azúcar. La cristalización de trehalosa en la fase amorfa no sólo tiene restricciones cinéticas (es decir que se requieren temperaturas mayores que el valor de T_g del sistema para observar cristalización en el tiempo del experimento), sino que también requiere la cantidad de agua necesaria para formar el dihidrato. Cuando la matriz alcanza el agua suficiente, la T_g del sistema es de aproximadamente 10°C (Tabla IV.B.8) y por lo tanto es esperable que a 25°C la cristalización se complete en el tiempo del experimento. En la Fig.IV.B.38 se observa que si bien la trehalosa pura cristalizó completamente a los 22 días, el grado de cristalización del azúcar fue menor en los sistemas que contenían sales. En presencia de NaCl o KCl la fracción cristalina fue de aproximadamente 0.8 luego de 23 días. $MgCl_2$ o $CaCl_2$ fueron los cloruros que afectaron en mayor medida el grado de cristalización final del azúcar. En particular en presencia de $MgCl_2$ se alcanzó un 50% de cristalización en relación con el sistema puro y es importante destacar que no avanzó aún luego de 90 días de almacenamiento.

Los datos de la Figura IV.B.38 se analizaron usando la ecuación JMAK (Eq. (I.4), sección I.B.5.2). Se estimaron los parámetros K_c y n para tener un valor orientativo ya que se contaba con pocos datos y consecuentemente aumenta el error en la determinación de los parámetros. Para la constante de cristalización K_c *en* trehalosa pura o en presencia de cualquiera de las sales, se obtuvieron valores que oscilaron de 0.02 a 0.08. Estos resultados indican que no hubo diferencias importantes en la velocidad de cristalización isotérmica en las distintas matrices. Para trehalosa pura se obtuvo un valor de n cercano a dos

(n= 1.9±0.3) que indica, un crecimiento inicial en dos dimensiones, con una alta tasa de nucleación al comienzo que disminuye con el tiempo (Avrami, 1940; Doremus, 1985; Chvoj y col., 1991). En las matrices combinadas el n se redujo en un factor de 0.5 respecto a trehalosa pura (n= 0.9-1.1±0.3) lo cual indica un mayor control difusional del crecimiento en presencia de las sales. En los sistemas T/Sal, además de la tasa de nucleación elevada en las primeras etapas, el aumento del control difusional probablemente restringe el crecimiento de los cristales una vez alcanzado cierto grado de cristalización en la muestra (esto se manifiesta en la Fig.IV.B.38 como un *plateau* a diferente grado de cristalización según la sal).

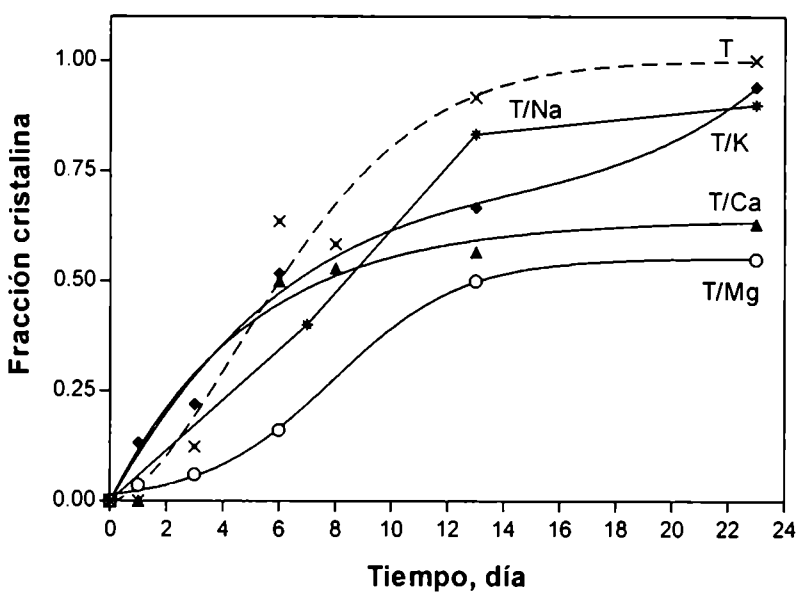


Figura IV.B.38: *Fracción cristalina de trehalosa en sistemas puros y en mezclas trehalosa/sal (R= 5) en función del tiempo de almacenamiento a 43% H.R. y 25°C.*

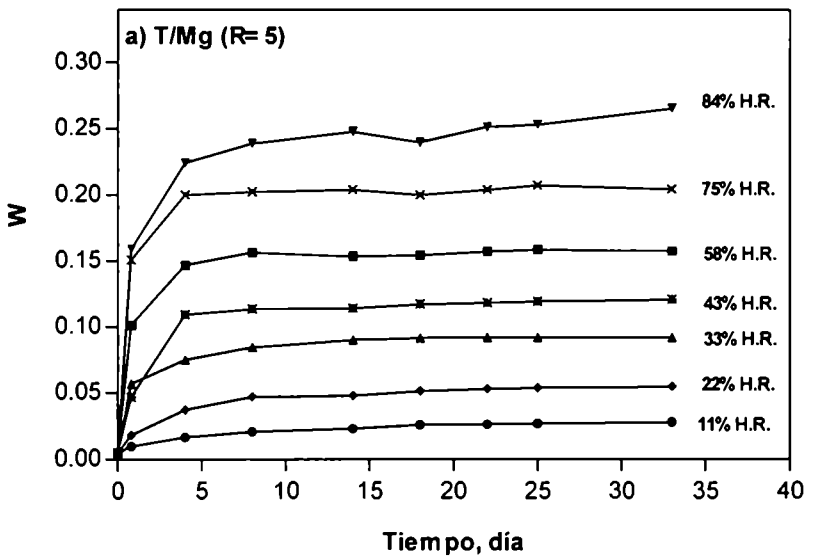
Miller y col. (2000) estudiaron el efecto de algunas sales sobre la conductividad eléctrica de soluciones líquidas y sobreenfriadas de trehalosa en un rango amplio de viscosidades (ver Fig. IV.B.27). La ley de Walden (Miller y col., 2000) establece que el producto ($\Lambda\eta$) (donde Λ, es la conductividad y η, la viscosidad) se mantiene constante al variar la viscosidad del sistema. Miller y col. (2000) observaron una desviación a la ley de Walden en sistemas azúcar-sal y la relacionaron con la presencia de heterogeneidades estructurales en el sistema que serían inducidas por una solvatación preferencial de los iones. El ambiente que rodea a los iones sería más rico en agua y en consecuencia la viscosidad local menor que la viscosidad global. Resultados obtenidos paralelamente por simulación dinámica molecular (Miller y col., 2000) demostraron que el tiempo de residencia del agua en la superficie de solvatación de iones sodio en soluciones acuosas de trehalosa es mayor que el tiempo de residencia del agua en la superficie correspondiente al disacárido. Por lo tanto mientras la movilidad de los iones aumenta debido a una menor viscosidad local, la movilidad de las moléculas de azúcar se reduciría debido a una mayor viscosidad del ambiente que las rodea. Esta situación también puede describirse en términos de heterogeneidades espaciales dinámicas encontradas por diferentes técnicas en líquidos sobreenfriados (Ediger, 2000). La dinámica de regiones separadas por unos pocos nanometros, puede diferir en varios órdenes de magnitud. En los sistemas azúcar-sal-agua, probablemente se producen heterogeneidades dinámicas que no afectan la temperatura de transición vítrea del sistema, que es el resultado de relajaciones a nivel supraestructural, y estarían generadas por fenómenos que ocurren a un nivel molecular. El efecto debería ser más pronunciado para

aquellos iones con mayor capacidad para interactuar con el agua. El retraso de la cristalización observado en soluciones acuosas de trehalosa conteniendo sales podría atribuirse a heterogeneidades locales que posiblemente afecten el mecanismo de nucleación.

IV.B.3.2.b. Isotermas de adsorción de agua en sistemas liofilizados azúcar/sal.

En la sección IV.B.3.1 y IV.B.3.2.a se observó que las matrices de trehalosa que contenían $MgCl_2$ retuvieron más agua que el sistema puro luego de la liofilización y de la humidificación a 43% H.R.. Probablemente interacciones del ión con el agua o del ión con el azúcar modificaron el contenido acuoso final del sistema. Se analizó el efecto de distintas concentraciones de $MgCl_2$ y de diferentes sales sobre las propiedades de sorción de trehalosa en el rango de 11 a 84 % H.R.. Para que el contenido acuoso inicial de los sistemas (luego de la liofilización) fuera homogéneo y menor que W= 0.03, se realizó una deshidratación en estufa de vacío a 90°C en todos los casos.

La Figura IV.B.39 muestra la cinética de adsorción de agua a 25°C de los sistemas combinados T/Mg en proporciones molares R= 5 (Fig. IV.B.39.a) y R= 1 (Fig. IV.B.39.b). Se observa que para R= 5 el contenido acuoso de equilibrio a cualquiera de las H.R. se alcanzó a partir de los 6-7 días de exposición, mientras que al aumentar la proporción de $MgCl_2$ en la matriz (R= 1) el contenido acuoso de equilibrio a 75 y 84% H.R. se alcanzó recién a partir de los 15 días.



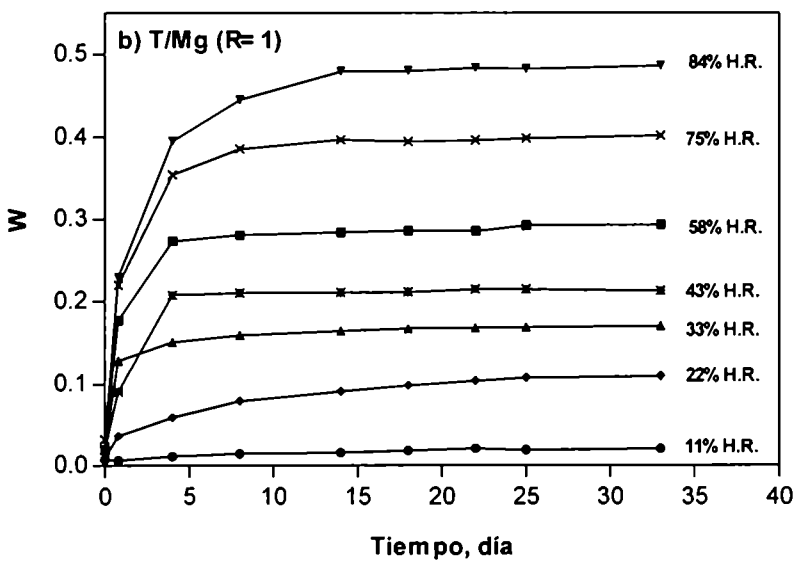


Figura IV.B.39: *Cinética de adsorción de agua a 25°C de sistemas combinados T/Mg en relación molar (a) R= 5 y (b) R= 1.*

En la Figura IV.B.40, se compara la isoterma de adsorción de agua a 25°C obtenida para trehalosa pura con la de trehalosa en presencia de dos concentraciones de $MgCl_2$.

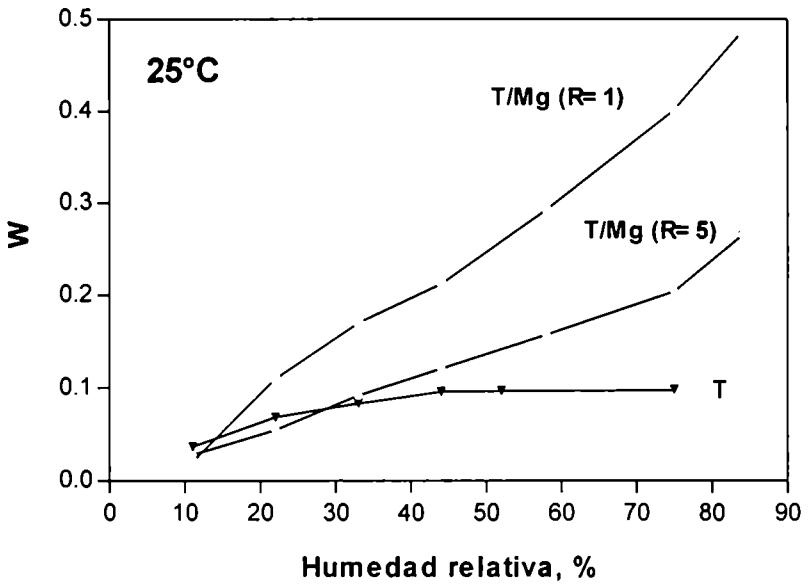


Figura IV.B.40: *Isotermas de adsorción de agua a 25°C obtenidas para sistemas amorfos de trehalosa y T/Mg en proporciones molares R= 5 y R= 1.*

La isoterma obtenida para trehalosa amorfa (Fig. IV.B.40), muestra que la adsorción de agua aumentó con la humedad relativa, observándose a partir de 43% H.R., un *plateau* que se corresponde con la cristalización del azúcar (estos resultados están de acuerdo con determinaciones previas realizadas en este trabajo por DSC (Fig. IV.B.33, Tabla IV.B.8)). La isoterma obtenida para trehalosa está de acuerdo con datos publicados por otros autores (Iglesias y col, 1997). Los sistemas combinados retuvieron mayor

cantidad de agua que la trehalosa pura para cualquiera de las humedades relativas estudiadas, siendo aún mayor el contenido acuoso en los sistemas T/Mg de R= 1. Sin embargo, las mezclas no mostraron un *plateau* a partir de 43% H.R., lo cual está reflejando lo observado en la sección previa de que la presencia de la sal inhibió/retrasó la cristalización del azúcar. La Figura IV.B.41 muestra el termograma obtenido para la matriz combinada T/Mg de R= 1 humidificada a 43% H.R. Si bien el contenido de humedad de este sistema fue significativamente mayor que el de trehalosa o T/Mg de R= 5, la cristalización del azúcar se inhibió totalmente (ausencia de pico endotérmico de fusión en el termograma). Este efecto, sin embargo, no mejoró la estabilidad de la enzima. En T/Mg de R= 1 la estabilidad enzimática se perdió durante la humidificación a 43% H.R. (W≅ 0.10-0.12) probablemente debido a efectos tóxicos del $MgCl_2$ a altas concentraciones (Figura IV.B.42).

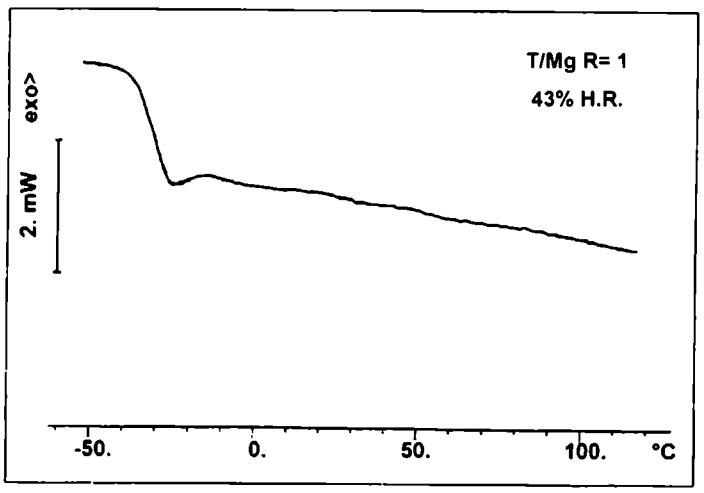


Figura IV.B.41: *Termograma obtenido por DSC para la matriz combinada T/Mg (R= 1) humidificada a 43% H.R..*

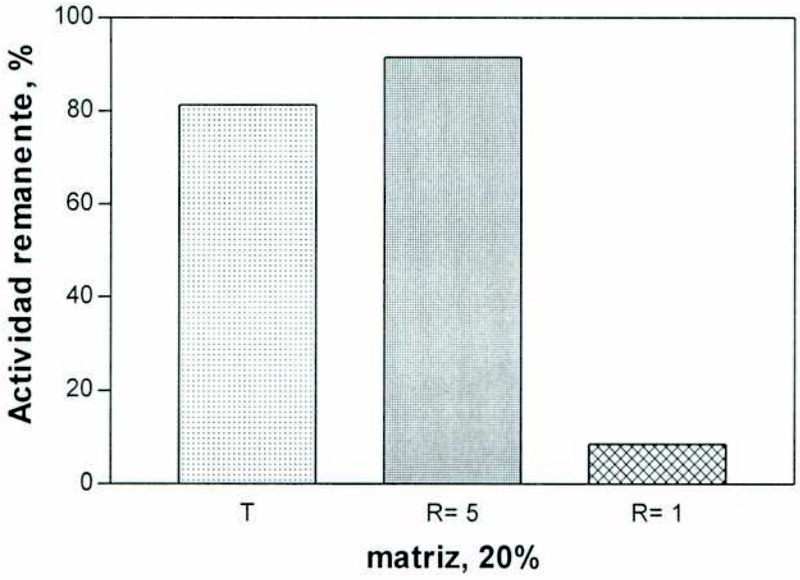


Figura IV.B.42 *Efecto de la concentración de $MgCl_2$ en la matriz de trehalosa sobre la actividad remanente de la enzima lactasa luego de la humidificación de los sistemas a 43% H.R. (W= 0.10-0.12).*

En la Figura IV.B.43 se muestra comparativamente el efecto de la incorporación de KCl, NaCl o $MgCl_2$ (R= 5) sobre las propiedades de sorción de trehalosa. En presencia de KCl o NaCl se observó que si bien la cinética de adsorción fue más lenta que en trehalosa pura hasta 43% H.R., ambos cloruros presentaron un *plateau* (a diferencia de los sistemas T/Mg) que se correspondió con la cristalización casi completa del azúcar observada a tiempos largos en estas matrices en la Figura IV.B.38. Es importante destacar que la adsorción de agua depende de la relación carga/radio del catión, siendo el orden: $Mg^{+2} > Na^{+} > K^{+}$, principalmente a humedades relativas mayores que 60%.

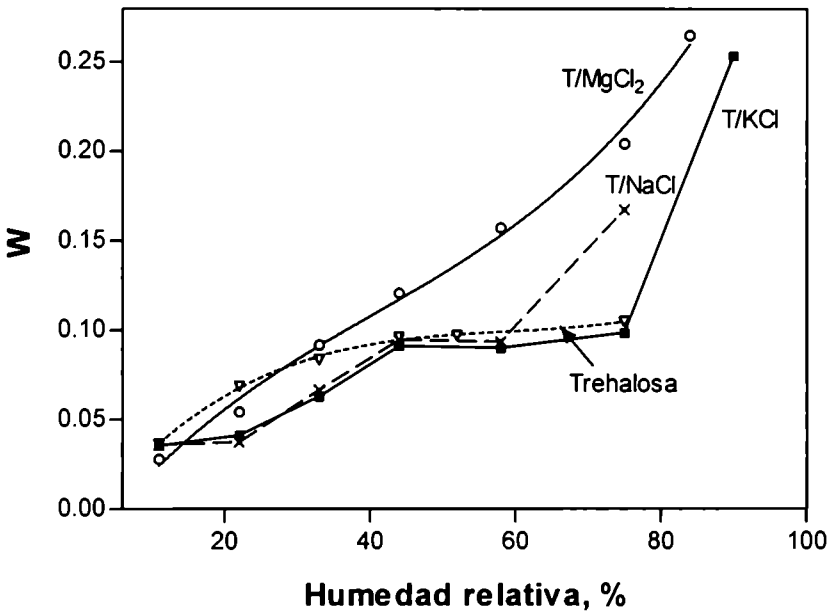


Figura IV.B.43: *Isotermas de sorción de agua a 25°C de trehalosa y mezclas T/Sal (R= 5).*

En la Figura IV.B.44 se compararon las isotermas obtenidas en este trabajo para trehalosa y trehalosa en presencia de $MgCl_2$, con la isoterma correspondiente a la solución de $MgCl_2$ pura, que fue modelada por Corti (2001) utilizando valores de coeficientes osmóticos informados en la bibliografía para soluciones acuosas de diferentes sales a 25°C (Robinson y Stokes, 1955; Goldberg y Nuttall, 1978) y utilizando diferentes modelos semiempíricos (Stokes y Robinson, 1948; Cohen y col., 1987; Pitzer, 1973). El contenido de agua en el caso de la mezcla T/Mg R= 5, se graficó como moles de agua por moles totales de soluto (círculos abiertos) o bien como moles de agua por moles de sal (círculos negros). Se observa que la cantidad de agua adsorbida por la mezcla T/Mg R= 5 es intermedia en relación con la cantidad

de agua adsorbida por los sistemas binarios puros, azúcar-agua y sal-agua. Si se asume que la sal adsorbe toda el agua, y se grafican los moles de agua adsorbidos por mol de sal (círculos negros en la Fig. IV.B.44), se observa que se obtienen valores similares a los del sistema binario sal-agua.

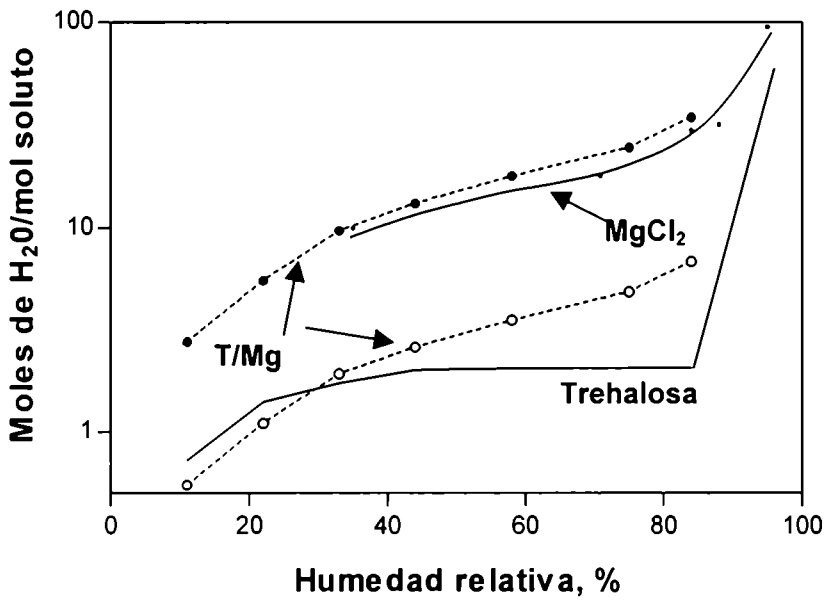


Figura IV.B.44: *Isotermas de sorción de agua a 25°C para trehalosa, para la mezcla T/Mg (R= 5) y para $MgCl_2$ (esta última modelada por Corti, 2001). La isoterma para T/Mg se calculó en moles de agua por mol de sal (•) y en moles de agua por mol de soluto total (o).*

IV.B.3.2.c. Temperatura de transición vítrea y cristalización de agua en sistemas trehalosa/sal sobresaturados por congelación.

En la sección IV.B.3.1 y IV.B.3.2.b se observó que el contenido de agua de las matrices combinadas T/Mg fue mayor que el determinado para la matriz de trehalosa pura como consecuencia de una mayor retención de agua durante la liofilización (Fig. IV.B.31) como así también de una mayor adsorción durante la humidificación (Fig. IV.B.40).

La menor eficiencia del proceso de liofilización en presencia de $MgCl_2$ se relacionó con un posible efecto de la sal sobre la cristalización del agua durante la congelación de las muestras. Para evaluar con más profundidad este punto, se analizaron (a través de DSC) características físicas como temperatura de transición vítrea y formación de hielo en soluciones sobreenfriadas de trehalosa en presencia de varias sales.

En la Figura IV.B.45 se muestran los valores de temperatura de transición vítrea en función del contenido acuoso para sistemas de trehalosa y trehalosa en presencia de $MgCl_2$ y NaCl en diferentes proporciones molares. En el gráfico se incluyeron datos determinados en este trabajo y datos obtenidos por Miller y col. (1997). Los valores de T_g para sistemas con W de 0 a 0.1 se obtuvieron a partir de muestras liofilizadas que fueron expuestas a distintas humedades relativas (0-84% H.R.). Los valores de T_g para sistemas con $W > 0.1$ se obtuvieron a partir de soluciones que fueron congeladas rápidamente para evitar que se produjera cristalización de hielo o agua durante el enfriamiento. Se observa que los valores de T_g no se modificaron en presencia de las sales y

se ajustaron a la curva correspondiente a la trehalosa pura en todo el rango de humedades analizado. Her y col. (1995), obtuvieron también una curva de T_g única en función del contenido acuoso para sistemas de sacarosa en agua y sacarosa en presencia de NaCl con R= 10. Se sabe que los azúcares pueden formar complejos con iones metálicos a través de los grupos oxhidrilo del azúcar. La formación de complejos tiende a producir un aumento de viscosidad y del valor de T_g (Her y col., 1995). En este trabajo no se observó mayor T_g en los sistemas conteniendo sales y en un análisis realizado por rayos-X no se detectaron estructuras cristalinas diferentes a la correspondiente a la trehalosa dihidrato.

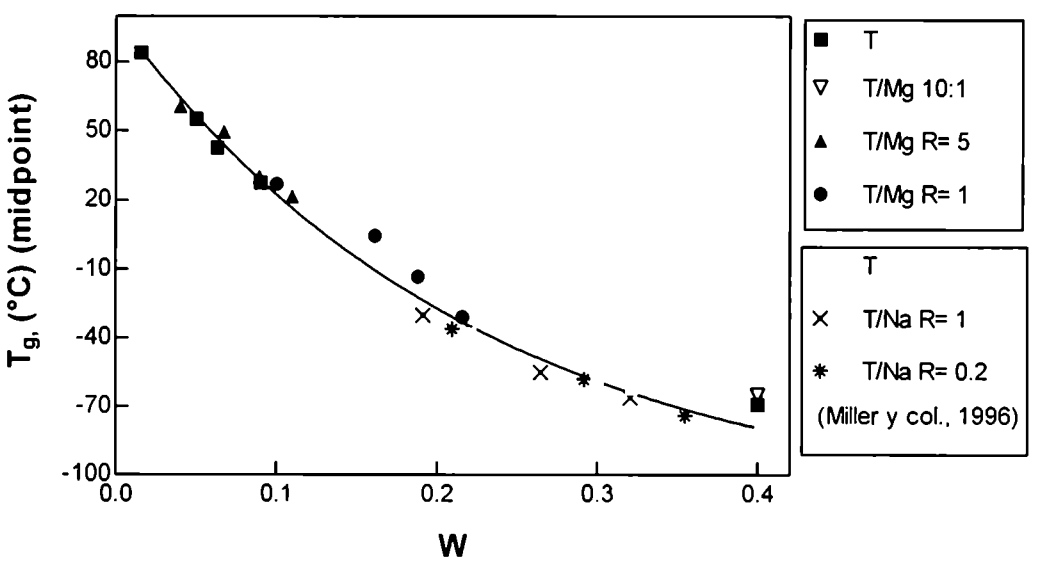


Figura IV.B.45: *Curva de temperatura de transición vítrea en función de la fracción en masa de agua (W) para sistemas de trehalosa y trehalosa en presencia de $MgCl_2$ o NaCl en diferentes proporciones molares. En el gráfico se incluyeron datos determinados en este trabajo y datos obtenidos por Miller y col., (1997) para sistemas T/Na.*

En la Figura IV.B.46 se observa el efecto del $MgCl_2$, NaCl y KCl sobre la temperatura de transición vítrea y la formación de hielo en soluciones de trehalosa o trehalosa/sal en relación molar (R= 10) y W= 0.4. Se trabajó con soluciones con bajo contenido de agua para evitar que cristalice agua o azúcar durante el enfriamiento rápido de los sistemas (de 25°C a -150°C) previo a la medición dinámica en el DSC, de este modo todos los sistemas evaluados se encontraban amorfos y con el mismo contenido de agua. Los termogramas que se muestran en la Fig.IV.B.46 muestran que la presencia de las sales no modificó la temperatura de transición vítrea de los sistemas (como se observó también en la Fig. IV.B.45) cuyo valor fue aproximadamente de –72° en todos los casos. Los valores de T_g obtenidos en este trabajo para W= 0.4 están de acuerdo con los valores informados por Miller y col. (1997) para trehalosa y cercanos a los valores determinados por Roos y Karel (1991d) para sistemas con W= 0.35. La temperatura de cristalización de hielo (T_c) aumentó en los sistemas de trehalosa en presencia de NaCl y KCl, y no pudo observarse en presencia de $MgCl_2$. Miller y col. (1997) observaron que la adición de NaCl retrasó la cristalización de hielo en soluciones de trehalosa sin afectar significativamente el valor de T_g. Debe destacarse que los valores de temperatura de cristalización obtenidos a partir de los termogramas dinámicos dependen de la velocidad de calentamiento de la muestra en el DSC. Para una velocidad de calentamiento constante, como la empleada en los termogramas dinámicos de la Fig. IV.B.46 (10K/min), la T_c obtenida es directamente proporcional al tiempo de cristalización y un valor de T_c mayor puede interpretarse como mayor tiempo requerido para cristalizar. Se observó además que en presencia de las sales disminuyó el área del pico exotérmico lo

cual indica que en estos sistemas se formó menos hielo durante el calentamiento dinámico que en el sistema que contenía sólo trehalosa. La cantidad de hielo formado durante la medición en presencia de diferentes sales siguió el orden $MgCl_2$ < NaCl < KCl. La temperatura de cristalización de hielo tiende a aumentar en los sistemas conteniendo sales. Cuando T_c se aproxima a la temperatura de fusión del hielo (T_m), la cristalización global detectada puede disminuir debido a que se produce simultáneamente fusión de hielo, o bien la cristalización se retrasa tanto que llega a la temperatura de fusión sin haber cristalizado, y ya después no puede hacerlo, como en el caso de los sistemas con $MgCl_2$. Es interesante destacar que el efecto de las distintas sales sobre la cristalización de hielo siguió el mismo orden que el observado para las propiedades de sorción (Fig.IV.B.43). El incremento del valor de T_c en presencia de las sales probablemente esté relacionado con interacciones agua-ión que se tornan críticas en las condiciones estudiadas donde las restricciones cinéticas para la formación de hielo son importantes.

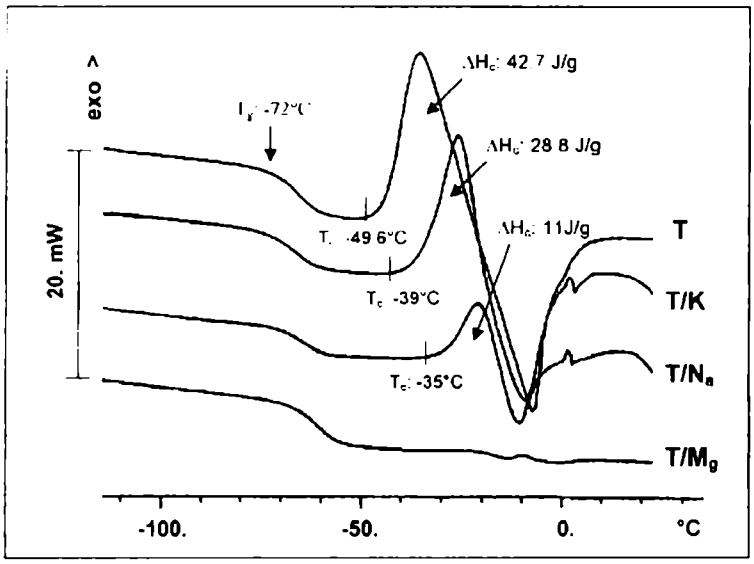


Figura IV.B.46: *Termogramas obtenidos por DSC para soluciones de trehalosa pura y trehalosa en presencia de $MgCl_2$, NaCl o KCl en proporción molar T/Sal R= 10 y W= 0.4.*

En la Figura IV.B.47 se observa que el efecto del $MgCl_2$ sobre la cristalización en soluciones de trehalosa W= 0.4 varía con la concentración de sal presente.

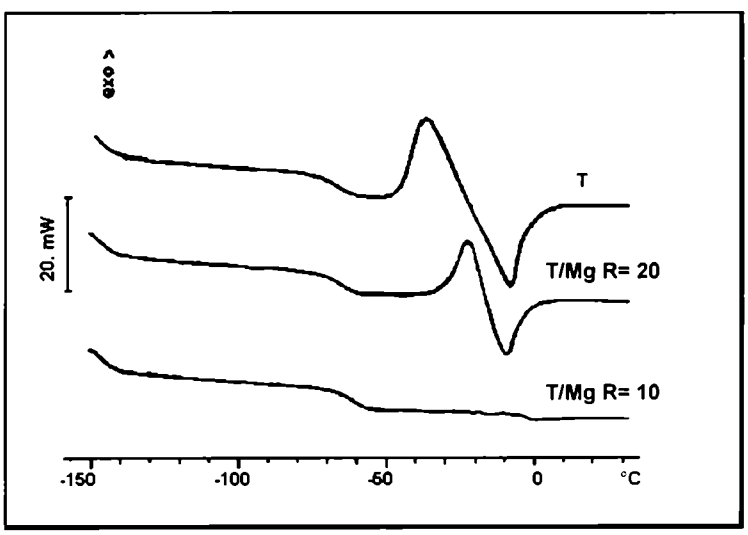


Figura IV.B.47: *Termogramas obtenidos por DSC para soluciones de trehalosa y T/Mg en distintas proporciones molares y W= 0.4.*

En la Figura IV.B.48 se muestra el efecto de la concentración de $MgCl_2$ (R= 5 a 0.5) sobre la formación de hielo en soluciones de trehalosa con W= 0.6 que fueron congeladas 24 horas a –26°C. Estas condiciones de concentración y temperatura favorecen la formación de hielo (ver sección I.B.4) y permiten que los sistemas, luego del almacenamiento, alcancen la concentración máxima que pueden alcanzar por congelación. La menor cantidad de hielo formado en los sistemas azúcar/sal condujo a una mayor cantidad de agua asociada a la fase amorfa y en consecuencia a menores valores de T_g. Por lo tanto se estimó la cantidad de hielo formado durante el almacenamiento a –26°C a partir de los valores de T_g, según se describe en la sección III.E. En la Fig. IV.B.48 se observa que la cristalización de hielo dependió también de la relación molar trehalosa/$MgCl_2$ en el sistema.

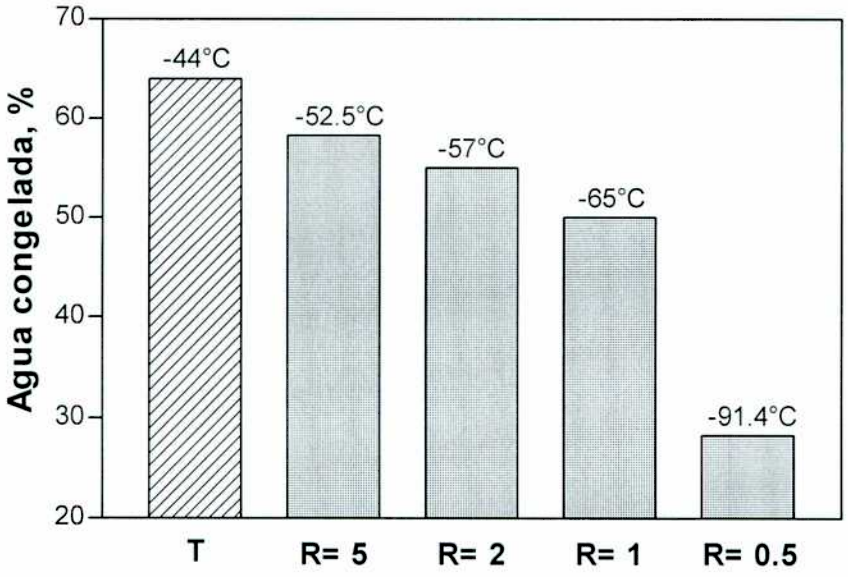


Figura IV.B.48: *Porcentaje de agua congelada en soluciones de trehalosa (W= 0.6) en presencia de distintas proporciones de $MgCl_2$ (R= 5 a 0.5) luego de almacenar 24hs a –26°C. Sobre las barras se indica el valor de T_g correspondiente.*

El efecto de las sales, y particularmente del $MgCl_2$, sobre la cristalización de hielo se analizó con más detalle comparando los resultados obtenidos con el diagrama de fases de trehalosa modificado en presencia de distintas proporciones de $MgCl_2$ (Corti, 2001) (Figura IV.B.49). En la figura se incluye la curva de temperatura de transición vítrea (T_g) y la curva de fusión de hielo (T_m) para trehalosa y T/Mg con R= 1 a 5. La curva de fusión de hielo para trehalosa pura (R= ∞) se obtuvo del trabajo de Miller y col. (1997). Las curvas de fusión para las distintas relaciones molares trehalosa/$MgCl_2$ fueron calculadas por Corti (2001) utilizando datos de bibliografía de coeficientes osmóticos en el punto de congelación (Robinson y Stokes, 1955; Goldberg y Nuttall, 1978).

Utilizando este tipo de diagramas se puede predecir para una cierta condición composición-temperatura si el sistema se encuentra bajo control termodinámico o cinético (ver sección I.B.4). W_g' representa la mínima cantidad de agua asociada a la fase amorfa que se puede alcanzar por congelación de agua en el sistema y T_g' es la temperatura de transición vítrea correspondiente a esa matriz máximamente concentrada.

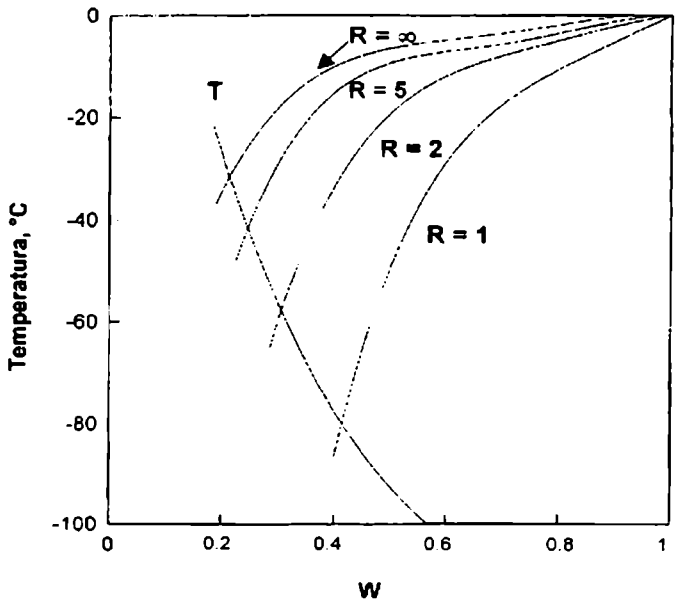


Figura IV.B.49: *Curva de temperatura de transición vítrea para trehalosa pura y curvas de fusión de hielo para soluciones de trehalosa pura (R= ∞) (Miller y col., 1997) y para soluciones de trehalosa en presencia de $MgCl_2$ (R= 1-5) (Corti, 2001).*

La Tabla IV.B.9 muestra los valores de W y T_g para los sistemas de trehalosa y T/Sal (W= 0.6) que fueron congelados 24 horas a –26°C, y los valores de T_g' y W_g'obtenidos por intersección de la curva de fusión con la de T_g.

Tabla IV.B.5: Valores experimentales de W y T_g para los sistemas de trehalosa y T/Sal (W= 0.6) que fueron congelados 24 horas a –26°C, y valores de T_g' y W_g'obtenidos por intersección de la curva de fusión con la de T_g.

Azúcar	R	T_g (°C)	W	T_g' (°C)	W_g'
Trehalosa	∞	-44.0	0.238	-31	0.215
	5	-52.5	0.256	-42	0.225
	2	-57	0.270	-58	0.310
	1	-65	0.305	-80	0.42

Se observó que los valores de T_g de muestras que contenían inicialmente W= 0.8 y que se congelaron 24 horas a -26°C, fueron cercanos (± 2°C) a los mostrados en la Tabla IV.B.9 para sistemas con W= 0.6, ésto indica que el contenido acuosos de la matriz máximamente concentrada es independiente de la concentración inicial del sistema. Las condiciones de temperatura (-26°C) y concentración (W= 0.6-0.8) seleccionadas para el almacenamiento isotérmico de las muestras corresponden a una región en el diagrama de fases en la cual se espera que la formación de hielo ocurra fácilmente. Son condiciones que están a temperaturas mayores pero cercanas a T_g', que corresponden a la zona de máxima formación de hielo (Roos y Karel, 1991d,e). Si bien se requieren varios ciclos de congelación-calentamiento (templado o "annealing") para alcanzar sistemas con la máxima cantidad de agua cristalizada (Levine y Slade, 1988; Roos y Karel, 1991e,f), el enfriamiento lento de las soluciones W= 0.6-0.8 y el almacenamiento a temperaturas donde las restricciones difusionales para la formación de hielo son bajas permitieron obtener sistemas con valores de W cercanos a los valores W_g' teóricos obtenidos por extrapolación (Tabla IV.B.5). Las mayores diferencias se observaron para el sistema T/Mg con R= 1, debido probablemente a que a valores altos de R es mayor el error en la determinación de la curva de temperatura de fusión de hielo correspondiente. Los valores de W_g' encontrados por otros autores para sistemas puros de trehalosa o sacarosa son cercanos a W= 0.2 (Roos y Karel, 1991e; Roos, 1993; Miller y col., 1997), para otros carbohidratos se informaron también valores similares (Hatley y col., 1991; Izzard y col., 1991). Los valores de T_g' publicados para trehalosa se encuentran en el rango -35 a -30°C (Roos, 1993; Miller y col., 1997).

A temperaturas menores que T_g' las restricciones cinéticas son muy altas y controlan la formación de hielo. A medida que la muestra se va calentando la viscosidad disminuye, hasta un punto a partir del cual ya no hay limitaciones cinéticas. A temperaturas mayores que T_g' la velocidad de formación de hielo aumenta, pasa por un máximo y a temperaturas cercanas a T_m disminuye debido a que comienza a producirse fusión del hielo. Como se mostró en este trabajo, la cristalización de agua se retrasó y la T_c aumentó en los sistemas que contenían sales, principalmente $MgCl_2$. En la Figura IV.B.46 se observa que la T_m disminuye en presencia de $MgCl_2$. En la Fig.IV.B.49 se puede ver que en presencia de $MgCl_2$ los valores de T_g' disminuyen mientras que los valores de W_g'aumentan respecto a los valores correspondientes al azúcar puro. Esto implica que la cantidad de agua líquida remanente en la matriz sobreenfriada (exculída del hielo) es mayor en los sistemas que contienen sales que en los que contienen sólo trehalosa. La fracción en masa de agua de la fase amorfa, W_g', aumenta hasta valores tan altos como 0.42 para R= 1 (Tabla IV.B.9), con lo cual la cristalización de hielo no puede ocurrir como se observó en la Fig. IV.B.16. Si hubiera un efecto de inhibición de la cristalización de hielo se esperaría que $W > W_g'$. Por lo tanto este análisis concuerda con los resultados de la Fig. IV.B.48 donde se observa que luego del tratamiento isotérmico a -26°C la cantidad de agua cristalizada disminuye al aumentar la proporción de sal. Her y col. (1995) observaron que la T_g' de sistemas de lactosa, sacarosa, dextrano o PVP, disminuyó gradualmente al aumentar la concentración de NaCl en la solución de 0.2 a 2%.

Los termogramas de la Fig.IV.B.46 mostraron que en sistemas azúcar-sal-agua concentrados (W= 0.4) la cinética de cristalización de agua fue sensible

a modificaciones producidas en el ambiente molecular por interacciones con las sales. Como los valores de T_g no se modificaron en presencia de los electrolitos, el compromiso del agua con los iones sería a nivel molecular sin afectar las propiedades macroscópicas o supramoleculares. Estas interacciones moleculares se manifestaron en los termogramas dinámicos (Fig. IV.B.46) en sistemas concentrados donde hay limitaciones difusionales para la formación de hielo. En condiciones de temperatura/tiempo/concentración favorables para la cristalización de hielo, los valores de T_g y la cantidad de hielo que cristalizó luego del tratamiento isotérmico (Fig. IV.B.48) fueron próximos a los valores extrapolados a partir del diagrama de fases (Tabla IV.B.9). Como se observa en la Fig. IV.B.48, el efecto de las sales es tal que provocan disminución de T_g' y aumento de W_g'. En condiciones W= 0.6, las interacciones agua-ión no son lo suficientemente fuertes como para evitar la cristalización de agua en un nivel mayor que el esperado. Flink (1983) sugirió que en sistemas sacarosa-agua con $W < 0.6$, las moléculas de agua están directamente o indirectamente involucradas en la formación de uniones puente hidrógeno con el azúcar, y Hemminga y col. (1993) observaron por ESR un cambio abrupto en la movilidad rotacional de sondas moleculares en sistemas de sacarosa con $W \leq 0.6$. Estas observaciones son una evidencia más de que en las condiciones analizadas en la Fig. IV.B.16 las interacciones agua-azúcar son críticas, y el efecto de las sales se hace evidente.

Los resultados obtenidos mostraron que las interacciones agua-ión se reflejaron en el retraso de la cristalización de hielo observado en sistemas con bajo contenido acuoso ($W \leq 0.4$) pero sin afectar el valor de T_g. Para los mismos

sistemas (R= 10) pero conteniendo mayor cantidad de agua (W= 0.6) el efecto de las sales no fue distinto del esperado en base a las propiedades coligativas.

El aumento del valor de T_g' del sistema (por ejemplo por incorporación de biopolímeros) ha sido una técnica frecuentemente usada para evitar la formación de hielo en aquellas preparaciones que requieren almacenamiento a bajas temperaturas (Levine y Slade, 1988; Slade y levine, 1991). En este trabajo, la inhibición/retraso de la cristalización de hielo en sistemas acuosos azúcar/sal se logró a través de la disminución del punto de congelación por efectos coligativos (disminución de T_m en las mezclas) y disminución del punto de congelación en las proximidades de T_g' con el concomitante aumento de la cantidad de agua asociada a la fase amorfa, W_g.

En la Figura IV.B.50 se muestran resultados puntuales obtenidos para la estabilidad de lactasa en soluciones W= 0.6 de trehalosa y trehalosa en presencia de $MgCl_2$ que fueron congeladas a -26°C.

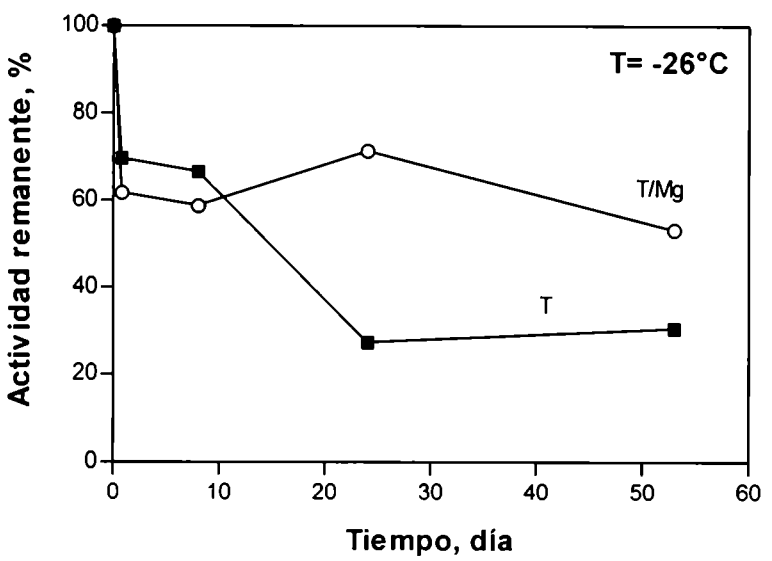


Figura IV.B.50: *Estabilidad de lactasa en soluciones W= 0.6 de trehalosa y trehalosa en presencia de $MgCl_2$ que fueron congeladas a -26°C.*

Se observa que la estabilidad de la enzima fue mayor en los sistemas combinados, probablemente debido a que, como se observó en la Tabla IV.B.5, en presencia de $MgCl_2$ aumenta W_g', con lo cual es mayor la cantidad de agua asociada a la fase amorfa. De esta manera, probablemente se evitan los efectos de cambios de pH o concentración de sólidos que modifican la estabilidad enzimática por concentración de la fase amorfa.

Es importante tener en cuenta en el desarrollo de formulaciones que van a ser congeladas, que las interacciones entre los componentes pueden cambiar sustancialmente las propiedades físicas de la solución congelada y afectar en consecuencia atributos que pueden ser críticos en el almacenamiento del producto congelado final.

IV.B.4. CONCLUSIONES DE LA SECCIÓN IV.B.

⇨ La estabilidad de la enzima β-galactosidasa en sistemas de azúcares sobreenfriados, se relacionó inversamente con el grado de cristalización de azúcar en la matriz.

⇨ El retraso/inhibición de la cristalización de azúcares por adición ya sea de sales u otro azúcar a la matriz, no estuvo relacionada con un aumento de la temperatura de transición vítrea del medio, la T_g de los sistemas mezcla fue similar a la de los azúcares puros y sin embargo el patrón de cristalización fue muy distinto en cada caso. Hay otros factores involucrados, asociados con

la modificación del entorno molecular (por ej. factores termodinámicos, geométricos, interacciones intermoleculares, etc.) que afectan la nucleación y/o el crecimiento de los cristales.

⇨ Los análisis realizados a través de la ecuación JMAK permitieron hipotetizar acerca de los mecanismos de nucleación. Para la mayoría de las mezclas se puede suponer una tasa de nucleación más elevada que en el sistema puro. Sin embargo, en los sistemas trehalosa/sal, además de la tasa de nucleación elevada en las primeras etapas, se obtuvieron valores de *n* muy bajos (n= 0.5) que indicarían un mayor control difusional (probablemente como consecuencia de una solvatación preferencial de los iones) que restringiría el crecimiento de los cristales. En las mezclas azúcar-azúcar o azúcar-polímero, la restricción del crecimiento se asoció con la distorsión del microambiente del azúcar cristalizable por interacciones entre moléculas (interacciones azúcar-excipiente) en la superficie del cristal en crecimiento.

⇨ Las ecuaciones de Arrhenius, WLF y VTF permitieron describir la dependencia de la cinética de cristalización con la temperatura empleando los coeficientes adecuados. El modelo de VTF se propone como el más adecuado para predecir tiempos de cristalización si fuera necesario hacer alguna extrapolación.

⇨ La calorimetría diferencial de barrido y el análisis de imágenes por microscopía óptica, serían técnicas complementarias que proveen información del fenómeno en estudio a diferentes niveles. Emplenado DSC se

obtuvieron resultados precisos acerca del proceso global de cristalización de azúcar. La microscopía, si bien permitió estimar parámetros cinéticos realizando un gran número de determinaciones, fue particularmente útil para detectar heterogeneidades en los sistemas amorfos estudiados.

⇨ En sistemas congelados, las interacciones agua-ión se manifestaron en sistemas con bajo contenido de agua ($W < 0.4$) sin un efecto sobre la T_g de la matriz. Por lo tanto el compromiso del agua con los iones se produjo a un nivel molecular sin afectar propiedades supramoleculares o macroscópicas. Si bien en la literatura se le ha prestado poca atención al efecto de las las sales sobre las propiedades físicas de materiales deshidratados o congelados, el efecto de los electrolitos sobre propiedades termofísicas en sistemas de azúcar es de especial interés debido a que están presentes en gran parte de los sistemas biológicos y tienen gran influencia sobre distintas propiedades del sistema (propiedades de sorción, cristalización de agua o de hielo).

V. Conclusiones

La temperatura de transición vítrea se ha considerado en los últimos años como uno de los factores principales para predecir la estabilidad en alimentos o formulaciones de baja humedad. A partir de los años 80´, muchos investigadores resaltaron la importancia de los estados de no equilibrio en sistemas amorfos y proveyeron un nuevo y valioso concepto para interpretar el comportamiento y estabilidad en dichos sistemas (Slade y levine, 1993; Slade y Levine, 1995).

En este trabajo se analizaron propiedades termofísicas en sistemas amorfos y sobreenfriados (como transición vítrea, cristalización de hielo o azúcar en condiciones de no-equilibrio, propiedades de sorción), en relación con la estabilidad enzimática. A partir de los resultados obtenidos se desprenden las siguientes conclusiones generales:

⇨ La presencia de azúcares y polímeros permitió estabilizar la enzima lactasa durante su deshidratación y almacenamiento.

⇨ La formación de una estructura vítrea no fue condición suficiente para garantizar la estabilidad de la enzima: interacciones moleculares con la matriz, propiedades microestructurales y la reactividad química de los componentes afectaron la resistencia térmica enzimática. La temperatura de tratamiento más que el parámetro ($T-T_g$) sería el factor principal en la inactivación de lactasa en sistemas amorfos.

⇨ Los azúcares trehalosa y rafinosa ofrecieron mayor protección a la enzima aún a altas temperaturas (70°C) y contenido de agua $W < 0.1$. En la zona de bajas temperaturas (45°C), la enzima tuvo una vida media prolongada en matrices de almidón a contenidos de agua elevados $W \approx 0.2$, mientras que a estos valores de contenido acuoso, en el resto de las matrices de un solo componente la actividad enzimática se perdió rápidamente.

⇨ En sistemas de azúcares amorfos no vítreos la estabilidad de la enzima β-galactosidasa se relacionó inversamente con la cristalización de azúcar o de agua en la matriz.

⇨ El uso de excipientes como azúcares, sales o polímeros permitió retrasar la cristalización de azúcares en sistemas sobreenfriados, extendiendo su efecto protector a valores de contenido de agua $W > 0.1$.

⇨ La inhibición o retraso de la cristalización de azúcares por adición ya sea de sales u otro azúcar a la matriz, no estuvo relacionada con un aumento de la temperatura de transición vítrea del medio. La T_g de los sistemas mezcla fue similar a la de los azúcares puros y sin embargo el patrón de cristalización fue muy distinto en cada caso. Hay otros factores involucrados, asociados con la modificación del entorno molecular (por ej. factores termodinámicos, geométricos, interacciones intermoleculares, etc.) que afectan la nucleación y/o el crecimiento de los cristales. Los análisis realizados permitieron hipotetizar acerca de los mecanismos de cristalización involucrados en sistemas combinados:

- Sales: producción de microheterogeneidades locales alrededor de los iones, con compromiso del agua (interacciones agua-sal) que generan zonas de alta velocidad de nucleación y saturación de sitios de crecimiento.

- Polímeros u otro azúcar: distorsión del microambiente del azúcar cristalizable (interacciones azúcar-excipiente).

La vitrificación de azúcares protectores es, posiblemente, la principal estrategia empleada en la naturaleza para evitar la cristalización de estos azúcares por ejemplo en organismos anhidrobióticos. Los estudios de inhibición/retraso de la cristalización de azúcares por adición de sales u otro azúcar, contribuyen con los desarrollos tendientes a lograr formulaciones que estabilicen biomateriales en sistemas amorfos no necesariamente vítreos.

⇨ Tanto la dependencia de la inactivación enzimática como la cristalización de azúcares, se pudo describir, en el rango de temperaturas estudiado, con las ecuaciones de Arrhenius, WLF y VTF, empleando los coeficientes adecuados. Arrhenius y VTF se proponen como los modelos más adecuados para describir la dependencia de la temperatura para ambos fenómenos.

⇨ En sistemas congelados, las interacciones agua-ión se manifestaron en sistemas con bajo contenido de agua ($W < 0.4$) sin un efecto sobre la T_g de la matriz. Por lo tanto el compromiso del agua con los iones se produjo a un nivel molecular sin afectar propiedades supramoleculares o macroscópicas. La selección de mezclas adecuadas azúcar-sal resultaría útil en el desarrollo de

formulaciones para aplicaciones particulares en las cuales se requiera evitar la cristalización de hielo.

⇨ Los azúcares y las sales son componentes importantes presentes en gran parte de las formulaciones farmacéuticas y biomateriales que se estabilizan por secado o congelación. Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron que propiedades de sorción, cristalización de azúcar o de agua se modifican en los sistemas combinados. Es importante destacar que se debe tener especial cuidado cuando se utilizan datos obtenidos para los azúcares puros para predecir características de sistemas complejos. La combinación de los componentes adecuados permite, por otro lado, optimizar la formulación para garantizar la estabilidad de materiales bajo condiciones de almacenamiento dadas, por períodos definidos.

⇨ A partir de los resultados del presente trabajo se puede considerar que se puede estabilizar biomoléculas lábiles en medios sobreenfriados, evitando la cristalización de los azúcares o del agua, conociendo los diagramas de estado y seleccionando los componentes adecuados.

VI. Bibliografía

Ablett, S.; Drake, A.; Izzard, M. y Lillford, P., 1993. Studies of the glass transition in malto-oligomers. Cap. 9. En: "The Glassy State in Foods", pp. 189-206, J.M. Blanshard y P.J. Lillford (Ed.), Nottingham University Press, Loughborough.

Aguilera, J.M. y Karel, M., 1997. Preservation of biological materials under desiccation. Critical Rev. Food Sci. Nutr., 37: 287-309.

Aguilera, J.M. y Soto, G., 2000. Crystallization kinetics of amorphous sugars using polarized light videomicroscopy. En: "8th International Congress on Engineering and Food (ICEF-8)", Puebla, México, 9-13 Apr.

Aldous, B.; Auffret, A. y Franks, F., 1995. The crystallization of hydrates from amorphous carbohydrates. Cryo-Lett., 16: 181-186.

Allison, S.D.; Chang, B.; Randolph, T.W. y Carpenter, J.F., 1999. Hydrogen bonding between sugar and protein is responsible for inhibition of dehydration-induced protein unfolding. Archives of Biochemistry and Biophysics, 365(2): 289-298.

Angell, C.A., 1991. Relaxations in liquids, polymers, and plastic crystals-patterns and problems. J. Non-cryst. Sol., 13: 131-133.

Angell, C.A.; Bressel, R.D.; Green, J.L.; Kanno, H.; Oguni, M. y Sare, E.J., 1994. Liquid fragility and the glass transition in water and aqueous solutions. Journal of. Food Eng., 22: 115-142.

Angyal, S.J., 1973. Complex formation between sugars and metal ions. Pure. Appl. Chem., 35: 131-146.

Arakawa, T. y Timasheff, S.N., 1982. Preferential interactions of proteins with salts in concentrated solutions. Biochemistry, 21: 6536-6544.

Arvanitoyanis, I. y Blanshard, J., 1994. Rates of crystallization of dried lactose-sucrose mixtures. Journal of Food Science, 59(1): 197-205.

Auer, C.; Kalinka, G.; Krause, T.H. y Hinrichsen, G., 1994. Crystallization kinetics of pure and fibre-rein-forced poly(phenylene sulfide). Journal of Applied Polymer Science, 51: 407-413.

Avrami, M. 1939. Kinetics of phase change. I. General Theory. Journal of Chemical Physics, 7: 1103-1112.

Avrami, M.J., 1940. Kinetics of phase change. II. Transformation-time relations for random distribution of nuclei. J. of Chem. Phys., 8: 212-224.

Bell, L., 1995. Kinetics of nonenzymatic browning in amorphous solid systems: distinguishing the effects of water activity and the glass transition. Food Res. Int., 28: 591-597.

Bell, L.N. y Hageman, M., 1996. Glass transition explanation for the effect of polyhydroxy compounds on protein denaturation in dehydrated solids. Journal of Food Science, 61: 372-378.

Bellows, R.J. y King, C.J., 1973. Product collapse during freeze drying of liquid foods. AIChE Symp. Ser., 69(132): 33-41.

Bergmeyer, H.U. y Grassi, M., 1983. Reagents for enzymatic analysis: enzymes α-glucosidase. En: "Methods of Enzymatic Analysis", vol 2, pp. 205-206, H.U. Bergmeyer, (Ed.), Verlag Chemie Gmbh, Weinheim.

Berlin, E.; Anderson, B. y Pallansch, M., 1973. Water sorption by dried dairy products stabilized with carboxymethyl cellulose. J. Dairy Science, 56: 685-689.

Bieganski, R.M.; Fowler, A.; Morgan, J.R. y Toner, M., 1998. Stabilization of active recombinant retroviruses in an amorphous dry state with trehalose. Biotechnol. Prog., 14: 615-620.

Blanshard, J.M. y Franks, F., 1987. Ice crystallization and its control in frozen-food systems. Cap. 4, En: "Food Structure and Behaviour", pp. 51-65, J.M. Blanshard y P. Lillford,. (Eds.), Academic Press, Inc., Orlando, FL.

Buera, M.P., 2001. Specific properties of amorphous sugars in dehydrated systems. Several strategies to delay crystallization. III Congreso Iberoamericano de Tecnología de Alimentos. Valencia, España, marzo de 2001.

Buera, M.P. y Karel, M., 1993. Application of the WLF equation to describe the combined effects of moisture, temperature and physical changes on non-enzymatic browning rates in food systems. J. Food Proces. and Preserv., 17: 31-45.

Buera, M.P. y Chirife, J., 1997. Estabilidad química de alimentos deshidratados y su relación con la transición vítrea. Anales de la Sociedad Científica Argentina, 227: 51-65.

Buera M.P.; Levi, G. y Karel, M., 1992. Glass transition in poly(vinylpyrrolidone): Effect of molecular weight and diluents. Biotechnol Prog., 8: 144-148.

Buitink, J.; Hoekstra, F.A. y Hemminga, M.A., 2000. A critical assessment of the role of oligosaccharides in intracellular glass stability. En: "Seed Biology: Advances and Applications", pp. 461-466, M. Black, K.J. Bradfors and J. Vázquez-Ramos (Eds.) CABI Publishing, NY.

Burin, L; Buera, M.P.; Hough, G. y Chirife, J., 2001. Thermal resistance of β-galactosidase in dehydrated dairy model systems as affected by physical and chemical changes. Food Chemistry, en prensa.

Burke, M., 1985. En: "Membranes, metabolism and dry organisms", pp. 358-363, A. Leopold, (Ed.), Cornell Univ. Press, Ithaca.

Cardona, S.; Schebor, C.; Buera, M.; Karel, M. y Chirife, J., 1997. Thermal Stability of Invertase in reduced-moisture amorphous matrices in realtion to glassy state and trehalose crystallization. Journal of Food Science, 62 (1): 105-112.

Carpenter, J. y Crowe, J., 1988. Modes of stabilization of a protein by organic solutes during desiccation. Cryobiology, 25: 459-470.

Carpenter, J. y Crowe, J., 1989. An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. Biochemistry, 28: 3916-3922.

Carpenter, J.F.; Crowe, L. y Crowe, J., 1987. Stabilization of phosphofructokinase with sugars during freeze drying: characterization of enhanced protection in the presence of divalent cations. Biochim. Biophys. Acta, 923: 109-115.

Cerrutti, P.; Segovia de Huergo, M.; Galvagno, M.; Schebor, C. y Buera, M.P., 2000. Commercial baker´s yeast stability as affected by intracellular content of trehalose, dehydration procedure and the physical properties of external matrices. Appl. Microbiol. Biotechnol., 54: 575-580.

Champion, D.; Hervet, H.; Blond, G. y Simatos, D., 1995. Comparison between two methods to measure translational diffusion of a small molecule at subzero temperature. J. Agric. Food. Chem., 43: 2887-2891.

Chan, T.W. y Isayev, A.I., 1994. Quiescent polymer crystallization: modeling and measurements. Polymer Engineering Science Polymer Eng. Science, 35: 733-740.

Chan, T.W.; Shyu, G.D.; y Isayev, A.I., 1995. Master curve approach to polymer crystallization kinetics. Polymer Engineering Science, 34: 461-471.

Chan, R.K.; Pathmanathan, K. y Johari, G.P., 1986. Dielectric relaxations in the liquid and glassy states of glucose and its water mixtures. J. Phys. Chem., 90: 6358-6362.

Chinachoti, P., 1997. Water migration and food storage. Chapter 9, En: "Food Storage Stability", pp. 245-267, .I.A. Taub y R. P. Singh (Eds), CRC Press. Boca Raton.

Christian, J.W.. 1975. The Theory of Transformations in Metals and Alloys", 2nd Ed. Pergamon Press, London.

Chuy, L. y Labuza, T., 1994. Caking and stickiness of dairy-based food powders as related to glass transition. J. Food Sci., 59: 43-46.

Chvoj, Z.; Sestak J. y Triska, A., 1991. Glasses: Phenomenology of nonisothermal glass-formation and crystallization. En: "Kinetic Phase Diagrams", pp. 169-276, Elsevier, Amsterdam.

Cocero, A. M. y Kokini, J.L., 1991. The study of the glass transition of glutenin using small amplitude oscillatory rheological measurements and diferential scanning calorimetry. J. Rheol., 35: 257-270.

Cohen, M.D.; Flagan, R.C. y Seinfeld, J.HG., 1987. Studies of Concentrated Electrolyte Solutions Using the Electrodynamic Balance. 1. Water Activities for Single-Electrolyte Solutions. J.Phys.Chem., 91: 4563-4574.

Colaço, C.; Sen, S.; Thangavelu, M.; Pinder, S. y Roser, B., 1992. Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology. Bio/Technology, 10:1007-1010.

Colaço, C.; Smith, C.; Sen, S.; Roser, D.; Newman, Y.; Ring, S. y Roser, B., 1994. Chemistry of protein stabilization by trehalose. American Chemical Society, 14: 223-240

Cook, W.J. y Bugg, C.E., 1973. Calcium interactions with D-glucans: crystal structure of α-α trehalose-calcium bromide monohydrate. Carbohydr. Res., 31: 265-275.

Corti, H.R. Comunicación personal.

Cottone, G.; Cardone, L. y Ciccotti, G., 2001. Molecular Simulation of carboxy-myoglobin embedded in a trehalose-water matrix. Biophysical Journal, 80: 931-938.

Crowe, J.H. y Crowe, L.M., 1982. Induction of anhidrobiosis: membrane changes during drying. Cryobiology, 19: 317-328.

Crowe, J. y Crowe, L., 1992. En: "Water and Life", pp. 87-103, Somero, G., Osmond, C. y Bolis, C. (Eds.), Springer-Verlag, Berlin,

Crowe, J.; Crowe, L. y Jackson, S., 1983. Preservation of structural and functional activity in lyophilized sarcoplasmic reticulum. Arch. Biochem. Biophys., 220: 477-484.

Crowe, J.; Crowe, L. y Chapman, D., 1984a. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. Science, 223: 701-703.

Crowe, J.; Crowe, L. y Chapman, D., 1984b. Infrared spectroscopic studies on interactions of water and carbohydrates with a biological membrane. Arch. Biochem. Biophys., 232: 400-407.

Crowe, J.; Crowe, L.; Carpenter, J. y Aurell Wistrom, C., 1987. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. Biochem. J., 242: 1-10.

Crowe, J.; Spargo, B. y Crowe, L., 1989. Preservation of dry liposomes does not require retention of residual water. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 1537-1540.

Crowe, J.; Leslie, S. y Crowe, L., 1994. Is vitrification sufficient to preserve liposomes during freeze-drying?. Cryobiology, 31:355-366.

Crowe, L.; Reid, D. y Crowe, J., 1996. Is trehalose special for preserving dry biomaterials?. Biophysical journal, 71: 2087-2093.

Crowe, J.H., Carpenter, J.F. y Crowe, L.M. 1998. The role of vitrification in anhydrobiosis. Annu. Rev. Physiol. 60, 73-103.

de Graaf, E.; Madeka, H.; Cocero, A. y Kokini, J., 1993. Determination of the effect of moisture on gliadin glass transition using mechanical spectrometry and differential scanning calorimetry. Biotechnol. Prog., 9: 210-213.

Devi, N.A. y Appu Rao, A.G., 1998. Effect of additives on kinetic thermal stability of polygalacturonase II from Aspergillus carbonarius: mechanism of stabilization by sucrose. J. Agric. Food Chem., 46: 3540-3545.

Ding, S.P.; Fan, J.; Green, J.L.; Lu, Q.; Sanchez, E. y Angell, C.A., 1996. Vitrification of trehalose by water loss from its crystalline dihydreate. Journal of thermal Analysis, 47: 1391-1405.

Doremus, R.H., 1985. En: "Rates of Phase Transformations", pp. 24-26, Academic Press, Orlando.

Duckworth, R., 1981. Solute mobility in relation to water content and water activity. En: "Water Activity: Influences on Food Quality", pp. 295-318, R. Rockland y G. Stewart (Eds.), Academic Press, New York.

Duddu, S. y Dal Monte, P., 1997. Effect of glass transition temperature on the stability of lyophilized formulations containing a chimeric therapeutic monoclonal antibody. Pharmaceutical Research ,14: 591-595.

Ediger, M.D., 2000. Annu. Rev. Phys. Chem., 51: 99.

Elamin, A.; Sebhatu, T.; y Ahlneck, C. 1995. The use of amorphous model substances to study mechanicaly activated materials in the solid state. International Jornal of Pharmacy, 119: 25-36.

Fennema, O., 1996. Water and Ice. En: "Food Chemistry", 3rd edition, Fennema, O. (Ed.), Marcel Dekker, New York.

Ferry, J.D.. 1980. Dependence of viscoelastic behavior on temperature and pressure. En: "Viscoelastic Properies of Polymers", pp. 264-272, John Wiley & Sons, New York.

Flink, M.J., 1983. Nonenzymatic browning of freeze-dried sucrose. Journal of Food Science, 48: 539-542.

Flory, P.J., 1953. Principles of polymer chemistry. Ithaca, New York, Cornell University Press.

Fox, T. y Flory, P., 1950. Second-order transition temperatures and related properties of polystyrene. I. Influence of molecular weight. J. Appl. Phys. 21: 5581-591.

Franks, F., 1993. Solid aqueus solutions. Pure and Applied Chemistry, 65: 2527-2537.

Franks, F., 1994. Long term stabilization of biologicals. Biotechnology, 12: 253-256.

Frish, H. y Stern, S., 1983. Diffusion of small molecules in polymers. CRC Critical Reviews in Solid State and Materials Science, 11: 123-187.

Gabarra, P. y Hartel, W., 1998. Corn syrup solids and their saccharide fractions affect crystallization of amorphous sucrose. Journal of Food Science, 63: 523-528.

Gaffney, S.H.; Haslam, E.; Lilley, T.H. y Ward, T.R., 1988. Homotactic and heterotactic interactions in aqueous solutions containing some saccharides. J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1, 84(8): 2545-2552.

Gedde, W.U. 1995. Crystallization kinetics. En: "Polymer Physics", 1ra edición, pp. 169-198, Chapman and Hall (Ed.), London, U.K.

Gerschenson, L.; Bartholomai, G. y Chirife, J., 1981. Structural collapse and volatile retention during heating and rehumidification of freeze-dried tomato juice. J. Food Sci., 46: 152-1556.

Gianfreda, L. y Scarfi, M.R., 1991. Enzyme stabilization: State of the art. Molecular and cellular Biochemistry, 100: 97-128.

Gibson, T.; Higgins, J. y Woodward, J., 1992. Stabilization of analytical enzymes using a novel polymer-carbohydrate system and the production of a stabilized, single reagent for alcohol analysis. Analyst, 117: 1293-1297.

Goff, H. D., 1995. The use of thermal analysis in the development of a better understanding of frozen food stability. Pure Appl. Chem., 67: 1801-1808.

Goldberg, R.N. y Nuttall, R.L.,1978. Evaluated activity and osmotic coefficients for aqueous solutions: the alkaline earth metal halides. J.Phys. Chem.Ref.Data, 7: 263-310.

Gordon, M. y Taylor, J., 1952. Ideal polymers and the second order transitions of synthetic rubbers. I. Non-crystalline copolymers. J. Appl. Chem., 2: 493-500

Graydon, J.W., Thorpe, S.J. y Kirk, V.W., 1994. Determination of the Avrami exponent for solid state transformations from non-isothermal differential scanning calorimetry. Journal of Non-Crystalline Solids, 175: 31-43.

Green, J. y Angell, C., 1989. Phase relations and vitrification in saccharide-water solutions and the trehalose anomaly. J. Phys. Chem., 93: 2880-2882.

Greenspan. L., 1977. Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. J. of Res., 81(A): 89-96..

Gregory, R.B., 1998. Protein hydration and glass transition. En: "The Properties of Water in Foods", ISOPOW 6. Reid, D.S. (Ed). University of California, Davis, USA.

Gupta, M.N., 1991. Thermostabilization of proteins. Biotech. and Applied Biochem., 14: 1-11.

Guy, E.J. y Bingham, E.W., 1978. Properties of ß-galactosidase of Saccharomyces lactis in milk and milk products. J Dairy Science, 61: 147-151.

Hagiwara, T. y Hartel, R.W., 1996. Effect of sweetener, stabilizer, and storage temperature on ice recrystallization in ice cream. J. Dairy Sci., 79: 735-744.

Hancock, B.C. y Shamblin, S.L., 1998. Water vapour sorption by pharmaceutical sugars. Research focus, PSTT, 1(8): 45-351.

Hartel, R., 2001a. Crystal growth. En: "Crystallization in Foods", G.V. Barbosa-Cánovas (Ed.), pp. 192-232, Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland.

Hartel, R., 2001b. Measurement of Crystalline structure in foods. En: "Crystallization in Foods", G.V. Barbosa-cánovas (Ed.), pp. 34-90, Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland.

Hartel, R., 2001c. Nucleation. En: "Crystallization in Foods", G.V. Barbosa-cánovas (Ed.), pp.145-191, Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland.

Hartel, R. y Shastry, A., 1991. Sugar crystallization in food products. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 30: 49-112.

Hatley, R.H.M.; van der Berg, C. y Franks, F., 1991. The unfrozen water content of maximally freeze concentrated carbohydrate solutions: validity of the methods used for its determination. Cryo-Letters, 12: 113-124.

Hemminga, M.A.; Roozen, M.J. y Walstra, P., 1993. Molecular motions and the glassy state. Cap. 7, En: " The Glassy State in Foods", pp. 157-171, J.M. Blanshard y P.J. Lillford. (Eds.), Nottingham University Press, Loughborough.

Hemminga, M.A. y van den Dries, I.J., 1997. Spin label applications to food science. En: "Spin Labeling: The Next Millenium", pp. 1-24, Berliner, L.J. (Ed.).

Her, L.M.; Deras, M. y Nail, S.L., 1995. Electrolyte-induced changes in glass transition temperatures of freeze-concentrated solutes. Pharm. Res., 12(5): 768-772.

Himberg, M.J. y Roos, Y., 1992. Low temperature non-enzymatic browning in amorphous food models., En: "Water in Foods: Fundamental Aspects and their Significance in the Processing of Foods". Proceedings of ISOPOW-V. Simatos, D. (Ed.) Elsevier Applied Science, London.

Hoekstra, F.; Crowe, L. y Crowe, J., 1991. Effect of sucrose on phase behavior of membranes in intact pollen of Typha latifolia L., as measured with Fourier transform infrared spectroscopy. Plant Physiol., 97:1073-1079.

Hori, T.; Fujita, I. y Shimizu, T., 1986. Diffusion of disperse dyes into Nylon 6 above and below the glass transition temperature. J.S.D.C., 102: 181-185.

Huang, V.T.; Hayness, L.; Levine, H. y Slade, L., 1996. Glass transition in starch, gluten and bread as measured dielectric spectroscopy and TMA methods. J. Therm. Anal., 47: 1289-1298.

Iglesias, H. y Chirife, J., 1978. Delayed crystallization of amorphous sucrose in humidified freeze-dried model systems. J. Food Technol., 13: 137-144.

Iglesias, H.A.; Chirife, J. y Buera, M.P., 1997. Water sorption isotherm of amorphous trehalose. J. Sci. Food Agric., 75: 183-186.

Izutsu, K.; Yoshioka, S. y Kogima, S., 1995. Increased stabilizing effects of amphiphilic excipients on freeze-drying of lactate dehydrogenase (LDH) by dispersion into sugar matrices.. Pharmaceutical Research., 12(6): 838-843.

Izzard, M.J.; Ablett, S. y Lillford, P.J., 1991. Calorimetric study of the glass transition occurring in sucrose solutions. En: "Food Polymers, Gels and Colloids", pp. 289-300, E. Dickinson (Ed.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge.

Janecek, S., 1993. Strategies for obtaining stable enzymes. Press Biochemistry, 28: 435-445.

Jouppila, K., 1999. Crystallization of amorphous carbohydrates: studies on lactose and starch. Tesis de Doctorado, Helsinki, Finlandia.

Jouppila, K. y Roos, Y., 1994a. Glass transitions and crystallization in milk powders. J. Dairy Sci. 77: 2907-2915.

Jouppila, K. y Roos, Y., 1994b. Water sorption and time-dependent phenomena of milk powders. J. Dairy Sci., 77: 1798-1808.

Jouppila, K. y Roos, Y.H., 1997. The physical state of amorphous corn starch and its impact on crystallization. Carbohydr. Polym., 32: 95-104.

Jouppila, K.; Kansikas, J. y Roos, Y.H., 1997. Glass transition, water plasticization, and lactose crystallization in skim milk powder. J. of Dairy Science, 80: 3152-3160.

Jouppila, K.; Kansikas, J. y Roos, Y.H., 1998. Crystallization and X-ray diffraction of crystals formed in water-plasticized amorphous lactose. Biotechnology Progress, 14: 347-350.

Kalichevsky, M.T.; Jaroskiewicz, E.M.; Ablett, S.; Blanshard, J.M. y Lillford, P.J., 1992. The glass transition of amylopectin measured by DSC and NMR. Carbohyd. Polymers, 18: 77-88.

Kalichevsky, M.; Blanshard, J.y Marsh, R. D. L., 1993. Applications of mechanical spectroscopy to the study of glass biopolymers and related systems. En: "The Glassy State of Foods", pp. 133-156, J. Blanshard; P., Lillford, (Eds.), Nottingham University Press, England.

Karel, M., 1994. Temperature-dependence of food deterioration processes. J. Food Sci., 58:ii (letters).

Karel, M. y Labuza, T. 1968. Nonenzymatic browning in model systems containing sucrose. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 16: 717.

Karel, M. y Saguy, I., 1991. Effects of water in food systems. En: "Water Relationships in Foods", pp 157-174, Levine, H., Slade, L. (Eds.), Plenum Press, New York,.

Karel, M.; Anglea, S.; Buera, M.P.; Karmas, R.; Levi, G y Roos, Y., 1994. Stability-related transitions of amorphous foods. Thermochimica Acta, 246: 249-269.

Karmas, R., 1994. The effect of glass transition on non-enzymatic browning in dehydrated food systems. Doctor Philosophy Thesis, Rutgers University of New Jersey, New Brunswick, New Jersey, U.S.A..

Karmas, R. y Karel, M. 1994. "The effect of glass transition on Maillard browning in food models" En: Maillard Reactions in Chemistry, Food and Health, pp 182-187, T.P. Labuza, G.A Reinecius, V.M. Monnier, J. O'Brian and J.W. Baynes (Eds.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, England.

Karmas, R.; Buera, M.P. y Karel, M., 1992. Effect of glass transition on rates of non-enzymatic browning in food systems. J. Agric. Food Chem., 40: 873-879.

Katz, E. E. y Labuza, T.P., 1981. Effect of water activity on the sensory crispness and mechanical deformation of snack food products. J. Food Sci., 46: 403-409.

Kedward, C.J., Macnaughtan, W., Blanshard, J.M.V. y Mitchell, J.R., 1998. Crystallization kinetics of lactose and sucrose based on isothermal differential scanning calorimetry. Journal of Food Science, 63(2): 192-197.

Kedward, C.J., Macnaughtan, W. y Mitchell, J.R., 2000. Crystallization kinetics of amorphous lactose as a function of moisture content using isothermal differential scanning calorimetry. Journal of Food Science, 65(2): 324-328.

Kerr, W.L.; Lim, M.H.; Reid, D.S. y Chen, H., 1993. Chemical reaction kinetics in relation to glass transition temperatures in frozen food polymer solutions. J. Sci. Food Agric., 61: 51-56.

Klibanov, A., 1984. Stabilization of enzymes against thermal inactivation. En: "Advances in Applied Microbiology", pp 1-27, Academic Press.

Koster, K.L.. 1991. Glass formation and dessication tolerance in seeds. Plant Physiol. 96: 302-304.

Koster, K. y Leopold, A., 1988. Sugars and desiccation tolerance in seeds. Plant Physiol., 88: 829-832.

Kouassi, K y Roos, Y. H., 2000 . Glass transition and water effects on sucrose inversion by invertase in a lactose-sucrose systems. J. Agric. Food Chem., 48: 2461-2466.

Kovarskii, A.; Placek, J. y Szocs, F., 1978. Study of rotational mobility of stable nitroxide radicals in solid polymers, Polymer, 19: 1137-1141.

Kristjánsson, M. y Kinsella, J.,1991. Protein and enzyme stability: Structural, thermodynamic, and experimental aspects. Adv. Food Nutr Res., 35: 237-316.

Labrousse, S.; Roos, Y. y Karel, M., 1992. Collapse and crystallization in amorphous matrices with encapsulated compounds. Sciences des Aliments, 12: 575-769.

Lapanje, S., 1978. Physicochemical aspects of proteins denaturation. J. Wiley & Sons, New York.

Le Meste, M., 1995. Mobility of small molecules in low and intermediate moisture foods. En: "Food Preservation by Moisture Control", pp. 209-225, G.V. Barbosa-Canovas y J. Welti-Chanes, (Eds.), Technomic, Lancaster, PA.

Le Meste, M.; Voilley, A. y Colas, B., 1991. Influence of water on the mobility of small molecules dispersed in a polymeric system. En: "Water Relationships in Foods", pp. 123-138, Levine, H. y Slade, L. (Eds.), Plenum Press, New York.

Le Meste, M.; Huang, V.; Panama, J.; Anderson, G. y Lentz, R., 1992. Glass transition of bread. Cereal Foods World, 37: 264-267.

Leiras, C., 1992. Estudio de la hidrólisis enzimática de lactosa en suero de queso concentrado, de las variables que afectan su estabilidad microbiológica y de su comportamiento reológico Tesis de Doctorado, UBA, Bs.As.

Leslie, S.; Israeli, B.; Lighthart, J.; Crowe, J. y Crowe, L., 1995. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. Appl. Environ. Microbiol., 61: 3592-3597.

Levine, H. y Slade, L., 1986. Polymer physico-chemical approach to the study of commercial starch hydrolysis products. Carbohyd. Polym., 6: 213-244.

Levine, H. y Slade, L., 1988. "Collapse" phenomena – a unifying concept for interpreting the behaviour of low moisture foods. Cap 9. En: "Food Structure – Its Creation and Evaluation", pp. 149-180, J. M. Blanshard y J. R. Mitchell (Ed.), Butterworths, London.

Levine, H. y Slade, L., 1989. Response to the letter by Simatos, Blond and Le Meste on the relation between glass transition and stability of a frozen product. Cryo-Letters, 10: 347-370.

Levine, H. y Slade, L., 1990. Influences of the glassy and rubbery states on the termal, mechanical, and structural properties of doughs and baked products. Cap. 5. En: "Dough Rheology and Baked Products Texture", pp. 157-330, H. Faridi y J.M. Faubion, (Ed.), AVI, New York.

Levine, H. y Slade, L., 1991. A food polymer science approach to structure property relationship in aqueous food systems: non-equilibrium behavior of carbohydrate-water systems. En: "Water relationships of foods".,pp. 29-101, H. Levine y L. Slade (Eds.), Plenum Press, N.Y.

Levine, H. y Slade, L., 1992a. Another view of trehalose for drying and sabilizing biological materials. Biopharm., 5: 36-40.

Levine, H. y Slade, L., 1992b. Glass transitions in foods, En: "Physical Chemistry of Foods", pp. 83-221, Schwartzberg, H. y Hartel, R. (Eds.), Marcel Dekker, New York,

Lim, M.H. y Reid, D.S., 1991. Studies of reaction kinetics in relation to the T_g of polymers in frozen model systems. En: "Water Relationships in Foods", pp. 103-122, Levine, H. y Slade, L. (Eds.), Plenum Press, New York,.

Lodato, P.; Segovia de Huergo, M. y Buera, M.P., 1999. Viability and thermal stability of a strain of Saccharomyces cerevisiae freeze-dried in different sugar and polymer matrices. Appl. Mic. Biotechnol., 52: 215-220.

Loftsson, T. Y Brewster, M.E., 1996. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. J. of Pharmaceutical Sciences, 85(10): 1017-1025.

Luyet, B. y Rasmussen, D., 1968. Study by differential thermal analysis of the temperatures of instability of rapidly cooled solutions of glicerol, ethylene glycol, sucrose, and glucose. Biodynamica, 10: 167-91.

Mahoney, R.R. y Wilder, T., 1987. Enhance thermostability of lactase (E. coli) in milk. J. of Food Science, 52(6): 1730-1731.

Mahoney, R.R. y Wilder, T., 1989. Stabilization of lactase (E. coli) by milk components and related compounds. J of Food Science, 54: 899-901.

Manning, M.C.; Patel, K. y Borchardt, R.T., 1989. Stability of protein pharmaceuticals. Pharm. Res., 6: 903-918.

Manual Maxilact., 1981. Gist Brocades nv., Holland.

Mathlouthi, M., 1995. Amorphous sugar. En:"Sucrose-properties and Applicattions.", pp. 75-97, M. Mathlouthi y P. Reiser (Eds.), Chapman & Hall, Glasgow, U.K.

Mathlouthi, M.; Cholli, A.L. y Koenig, J.L. 1986. Spectroscopic study of the structure of sucrose in the amorphous state and in aqueus solution. Carbohydrate Res., 147: 1-9.

Metin, S. y Hartel, R. 1998. Thermal analysis of isothermal crystallization kinetics in blends of cocoa butter with milk fat or milk fat fractions. JAOCS, 75(11):1617-1624.

Miller, D.P., Anderson, R.E., and de Pablo, J.J. 1998. Stabilization of lactate dehydrogenase following freeze-thawing and vacuum-drying in the presence of trehalose and borate. Pharm. Res., 15(8): 1215-1221.

Miller, D.P.; Conrad, P.B.; Fucito, S.; Corti, H.R. y de Pablo, J.J., 2000. Electrical conductivity of supercooled aqueus mixtures of trehalose with sodium chloride. J.Phys.Chem.B, 104: 10419-10425.

Miller, D.P., de Pablo, J.J. y Corti, H.R. 1997. Thermophysical properties of trehalose and its concentrated aqueus solutions. Pharm. Res., 14(5): 578-590.

Mizuno, A.; Mitsuiki, M. y Motoki, M., 1998. Effect of crystallinity on the glass transition temperature of starch. J. Agric. Food Chem., 46: 98-103.

Montiel, P.O. 1998. Profiles of soluble carbohydrates and their adaptative role in maritime Antartic terrestrisl arthropods. Polar Biol. 19: 250-256.

Morel-Desrosier, N., Lhermet, C. y Morel, J.P., 1991. Interactions between cations and sugars. Part 6. Calorimetric method for simultaneus determination of the stability constant and anthalpy change for weak complexation. J. Chem. Soc. Faraday Trans. 87(14): 2173-2177.

Mouradian, R.; Womersley, C.; Crowe, L. y Crowe, J., 1984. Preservation of functional activity during long-term storage of a biological membrane. Biochim. Biophys. Acta, 778: 615-617.

Mozhaev, V.V., 1993. Mechanism-based strategies for protein thermostabilization. Tibtech., 11: 88-95.

Mozhaev, V.V.; Melik-Nubarov, N.S.; Segreeva, M.V.; Siksnis, V. y Martinek, K., 1990. Strategy for stabilizing enzymes. Part one: Increasing stability of

enzymes via their multi-point interaction with a support. Biocatalysis, 3: 179-187.

Multon, J. y Guilbot, L., 1975. Water activity in relation to the thermal inactivation of enzymic proteins. En: "Water Relations of Foods"; pp. 379-396, Duckworth, R. (Ed.), Academic Press. New York.

Murray, B.S. y Liang, H.J., 2000. Evidence for conformational stabilization of β-lactoglobulin when dried with trehalose. Langmuir, 16: 6061-6063.

Namiki, M., 1988. Chemistry of Maillard reactions: recent studies on the browning reaction mechanism and the development of antioxidants and mutagens. Adv. Food. Res., 32:116-184.

Nelson, K.A., 1993. Reaction kinetics of food stability: comparison of glass transition and classical models for temperature and moisture dependence. Ph.D. Thesis, University of Minnesota, U.S.A.

Nelson, K. y Labuza, T. 1994. Water activity and food polymer science: implications of state on Arrhenius and WLF models in predicting shelf life. Journal of. Food Engineering, 22: 271-287.

Nicholls, R.; Appelqvist, I.; Davies, A.; Ingman, S. y Lillford, P., 1995. Glass transitions and the fracture behavior of gluten and starches within the glassy state. J. Cereal Sci., 21: 25-36.

Noel, T.R.; Ring, S.G. y Whittam, M.A., 1992. Dielectric relaxations of small carbohydrate molecules in the liquid and glassy states. J. Phys. Chem., 96: 5662-5667.

O'Brien, J., 1996. Stability of trehalose, sucrose and glucose to nonenzymatic browning in model systems. Journal of Food Science, 61: 679-682.

O'Fagain, C.; Sheehan, H.; O'Kennedy, R. y Kilty, C. 1988. Maintenance of enzymic structure. Possible methods for enhancing stability. Process Biochem., 166-171.

Obendorf, R.L., 1997. Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance. Seed Science Research, 7: 63-74.

Ollet, A. L. y Parker, R., 1991. The viscosity of supercooled fructose and its glass transition temperature. J. Texture Studies, 21: 355-362.

Palumbo, M.S.; Smith, P.W.; Strange, E.D.; van Hekken, D.L.; Tunick, M.H. y Holsinger, V.H., 1995. Stability of ß-galactosidase from A. oryzae and K. lactis in dry milk powders. J. of Food Science, 60: 117-119.

Park, Y.K.; De Santi, M.S.S. y Pastore, G.M., 1979. Production and characterization of β-galactosidase from Aspergillus oryzae. J. Food Science, 44(1): 100-103.

Parker, R. y Ring, S.G., 1995. A theoretical analysis of diffusion-controlled reactions in frozen solutions. Cryoletters, 16: 197-208.

Peleg, M., 1992. On the use of WLF model in polymers and foods. Critical Review in Food Science and Nutrition, 32: 59-66.

Pitzer, K.S., 1973. Thermodynamics of electrolytes. I. Theoretical basis and general equations . J. Phys. Chem., 77: 268-281.

Pomeranz, Y., 1985. Functional properties of food components. En: "Enzymes", Cap. 8, pp 325, Academic Press.

Prestrelski, S.J.; Pikal, K.A. y Arakawa, T., 1995. Optimization of lyophilization conditions for recombinant human interleukin-2 by dried-state conformational analysis using fourier-transform infrared spectroscopy. Pharm. Res., 12: 1250-1259.

Prestrelski, S.J.; Tedeschi, N.; Arakawa, T. y Carpenter, J., 1993. Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers. Biophys. J., 65: 661-671.

Roberts, C.J, y Franks, F., 1996. Crystalline and amorphous phases in the binary system water-α,α-trehalose. J. Chem. Soc., Faraday Trans., 92(8): 1337-1343.

Robinson, R.A. y Stokes, R.H., 1955. En: "Electrolyte Solutions", Cap. 2, pp. 33, Butterworths, London.

Roos, Y., 1987. Effect of moisture on the thermal behavior of strawberries studied using differential scanning calorimetry. J. Food Sci., 52: 146-149.

Roos, Y., 1992. Reaction kinetics and thermodynamics in food systems; Part II, Phase transitions and transformations. En: "Handbook of Food Engineering", Lund, D. y Heldman, D. (Eds.), Marcel Dekker, New York.

Roos, Y., 1993. Melting and glass transitions of low-molecular weight carbohydrates. Carbohydrate Res., 238: 39-48.

Roos, Y., 1995. Phase Transitions in Foods. Cap. 2, 5 y 7. S., Taylor (Ed.), Academic Press, Inc., New York.

Roos, Y., 1998a. Role of water in phase-transition phenomena in foods. En: "Phase/State Transitions in Foods", pp. 57-86, Rao, M. Y Hartel, R. (Eds.), Marcel Dekker, New York.

Roos, Y., 1998b. Phase transitions and structure of solid food matrices. Curr. Op. Colloid & Interface Sci., 3: 651-656.

Roos, Y. y Karel, M., 1990. Differential scanning calorimetry study of phase transitions affecting the quality of dehydrated materials. Biotechnology Progress, 6: 59-163.

Roos, Y. y Karel, M., 1991a. Plasticizing effect of water on thermal behavior and crystallization of amorphous food models. J. Food Sci., 34: 324-329.

Roos, Y. y Karel, M., 1991b. Phase transitions of mixtures of amorphous polysaccharides and sugars. Biotechnol. Prog., 7: 49-53.

Roos, Y. y Karel, M., 1991c. Water and molecular weight effects on glass transitions in amorphous carbohydrates and carbohydrate solutions. J. Food Sci., 55(6): 1676-1681.

Roos, Y. y Karel, M.. 1991d. Nonequilibrium ice formation in carbohydrate solutions. Cryo-letters, 12: 367-376.

Roos, Y. y Karel, M.. 1991e. Amorphous state and delayed ice formation in sucrose solutions. International Journal of Food Science and Technology. 26: 553-566.

Roos, Y. y Karel, M.. 1991f. Applying state diagrams to food processing and development. Food Technology, 45: 66-71.

Roos, Y. y Karel, M.. 1992. Crystallization of amorphous lactose. Journal of Food Science, 57: 775-777.

Roos, Y. y Himberg, M., 1994. Nonenzymatic browning behavior as related to glass transition of a food model at chilling temperatures. J. Agric. Food Chem., 42: 893-898.

Roos, Y.; Jouppila, K. y Zielasko, B., 1996a. Nonenzimatic browning-induced water plasticization: Glass transition temperature depression and reaction kinetics determination using differential scanning calorimetry. J. Thermal Anal., 47: 1437-1450.

Roos, Y.; Karel, M. y Kokini, S., 1996b. Glass transitions in low moisture and frozen foods: effects on shelf life and quality. Food Technol., 50: 95-108.

Roos, Y.; Roininen, K.; Jouppila, K. y Tuorila, H., 1998. Glass transition and water plasticization effects on crispness of a snack food extrudate. Int. J. Food Prop., 1: 163-180.

Roos, Y.H.; Jouppila, K. y Söderholm, E.S., 1999. Crystallization of amorphous food components. En: "Water management in the design and distribution of quality foods". Proceedings of ISOPOW-7, Y.H., Roos; R.B. Leslie y P.J. Lillford, (Eds.), Technomic Publishing Co. Inc., Lancaster, USA.

Roos, Y., Levine, H. y Simatos, D., 2000. Question #5, Water Panel, ISOPOW 2000. 8th International Symposium on the Properties of Water. Water Science for Food, Health, Agriculture and Environment. Session IX. Critical issues related to water activity and phase transitions, panel discussion. pp. 20-24.

Rongere, P.; Morel-Desrosiers, N. y Morel, J.P. 1995. Interactions between cations and sugars. Part 8. Gibbs energies, enthalpies and entropies of association of divalent and trivalent metal cations with xylitol and glucitol in water at 298.15K. J.Chem. Soc. Faraday Trans. 91: 2771-2777.

Roser, B., 1991. Trehalose drying: a novel replacement for freeze-drying. BioPharm, 4: 47-53.

Rossi, S.; Buera, M.P.; Moreno, S. y Chirife, J., 1997. Stabilization of the restriction enzyme EcoRI dried with trehalose and other selected glass-forming solutes. Biotechnol. Prog., 13: 609-616.

Ruan, R.R. y Chen, P.L., 1998. NMR and MRI studies of glass transitions in foods and biological materials. En:"Water in foods and biological materials", pp. 253-278, R.R. Ruan y P.L. Chen (Eds.), Technomic Publishing Co. Inc., Lancaster, USA.

Salahas, G.; Peslis, B.; Georgiou, D. y Gavalas, N., 1997. Trehalose, an extreme temperature protector of phosphoenolpyruvate carboxylase from the C4-plant Cynodon dactylon. Phytochemistry, 46: 1331-1334.

Saleki-Gerhardt, A. y Zografi, G. 1994. Non-isothermal and isothermal crystallization of sucrose from amorphous state. Pharm. Res., 11: 1166-1173.

Saleki-Gerhardt, A.; Stowell, J.G.; Byrn, S.R. y Zografi, G., 1995. Hydration and dehydration of crystalline and amorphous forms of raffinose. J. Pharm. Sci., 84: 318-322.

Schebor, C., 2000. Estudios sobre la transición vítrea y la estabilidad de biomateriales de baja humedad. Tesis de Doctorado, UBA, Bs.As..

Schebor, C., 2001. Comunicación personal.

Schebor, C.; Buera, M.P. y Chirife, J., 1996. Glassy state in relation to the thermal inactivation of the enzyme invertase in amorphous dried matrices of trehalose, maltodextrin and PVP. J. Food Engn., 30: 269-282.

Schebor, C.; Burin, L.; Buera, M.P.; Aguilera, J.M. y Chirife, J., 1997. Glassy state and thermal inactivation of invertase and lactase in dried amorphous matrices. Biotechnol. Prog., 13: 857-863.

Schebor, C.; Buera, M. P.; Karel, M.; Chirife, J. 1999. "Color formation due to non-enzymatic browning in amorphous, glassy,anhydrous, model systems". Food Chem., 65: 427-432.

Schoebel, T.; Tannenbaum, S. y Labuza, T., 1969. Reaction at limited water concentration. 1 Sucrose hydrolysis. Journal of Food Science, 34: 324.

Shafizadeh, F. y Susott, R.A. 1973. Crystalline transitions of carbohydrates. J. Org. Chem. 28, 3710-3715.

Simatos, D. y Karel, M., 1988. Characterization of the condition of water in foods: physico-chemical aspects. En: "Food Preservation by Moisture Control", pp. 24-30, Seow, C. (Ed.), Elsevier Applied Science, New York.

Simatos, D. y Blond, G., 1991. DSC studies and the stability of frozen foods. En: "Water Relationships in Foods", pp. 139-155, H. Levine and L. Slade (Eds.), Plenum Press, New York.

Slade, L. y Levine, H., 1987. Structural stability of intermediate moisture foods - a new understanding. En: "Food Structure – Its Creation and Evaluation", pp. 115-147, J.R. Mitchell & J.M.V. Blanshard (Eds.), Butterworths, London.

Slade, L. y Levine, H., 1991. Beyond water activity: recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 30: 115-360.

Slade, L. y Levine, H., 1993. Water and the glass transition-Dependence of the glass transition on composition and chemical structure: special

implication for flour functionality in cookie baking. En: "Water in Foods: Fundamental Aspects and their Significance in the Processing of Foods". Proceedings of ISOPOW-V. Simatos, D. (Ed.) Elsevier Applied Science, London.

Slade, L., Levine, H y Finley, J., 1989. Protein-water interactions: water as a plasticizer of gluten and other protein polymers. En: "Protein Quality and the Effects of Processing", pp. 9-124, Dixon Phillips, R. y Finley, J. (Eds.), Marcel Dekker, New York.

Soesanto, T. y Williams, M.C. 1981. Volumetric interpretation of viscosity for concentrated and dilute sugar solutions. J. Phys. Chem., 85: 3338-3341.

Sperling, L.H., 1986. En:"Introduction to Physical Polymer Science", pp, 224-295, John Wiley & Sons, New York.

Sperling, L.H., 1992. En:"Introduction to Physical Polymer Science", 2nd edition, John Wiley & Sons, New York.

Stokes, R.H. y Robinson, R.A., 1948. Ionic hydration and activity in electrolytes solutions. J. Am. Chem. Soc., 70: 1870-1879.

Storey, B.T.; Noiles, E.E. y Thompson, K.A., 1998. Comparison of glycerol, other polyols, trehalose and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. Cryobiology, 37: 46-58.

Sun, W. y Leopold, C., 1994a. Glassy state and seed storage stability: a viability equation analysis. Annals of Botany, 74: 601-604.

Sun, W. y Leopold, A., 1994b. The role of sugar vitrification and membrane phase transition in seed desiccation tolerance. Physiol. Plant, 90: 621-628.

Sun, W. y Leopold, A., 1997. Cytoplasmic vitrification and survival of anhydrobiotic organisms. Comp. Biochem. Physiol. 117A: 327-333.

Sun, W.Q. y Davidson, P., 1998. Protein inactivation in amorphous sucrose and trehalose matrices: Effects of phase separation and crystallization. Biochimica et Biophysica Acta, 1425: 235-244.

Sun, W.; Leopold, A.; Crowe, L. y Crowe, J., 1996. Stability of dry liposomes in sugar glasses. Biophys. J., 70: 1769-1776.

Sussich, F., Urbani, R., Princivalle, F. and Cesaro, A. 1998. J. Am. Chem. Soc., 120: 7893-7899.

Sutton, R.; Cooke, D. y Russell, A., 1997. Recrystallization in sugar/stabilizer solutions as affected by molecular structure. J. Food Sci., 62: 1145-1149.

Suzuki, T; Imamura, K.; Yamamoto, K. y Okazaki, M., 1996. Stabilizing effect on freeze-dried proteins by amorphous matrices of sugars. Drying '96 – Proceedings of the 10 th International Drying Symposium (IDS 96). Kraków, Poland, vol B:1261-1266.

Suzuki, T.; Imamura, K.; Yamamoto, K.; Satoh, T. y Okazaki, M., 1997. Thermal stabilization of freeze-dried enzymes by sugars. J. Chem. Eng. of Japan., 30: 609-613.

Tan, C.S.; Van Ingen, C.W.; Talsma, H., Van Miltenburg, J.C.; Steffensen, C.L.; Vlug, J.A. y Stalpers, J.A., 1995. Freeze drying of fungi: influence of composition and glass transition temperature of the protectants. Cryobiology, 32: 60-67.

Taborek, P., Kleiman, R.N., Bishop, D.J. 1986. J. Phys. Rev. B. 34.

Tanaka, K., Tadeka, T. y Miyajima, K., 1991. Cryoprotective effect of saccharides on denaturation of catalase by freeze-drying. Chem. Phar. Bull., 39: 1091-1094.

Tanford, C., 1968. Protein denaturation. Advances in Protein Chemistry, 23: 121-282.

Taragano, V. y Pilosof, A.M.R., 2001. Calorimetric studies on dry pectinlyase preparations: impact of glass transition on inactivation kinetics. Biotechnology Progress. En prensa.

Taylor, L.S. y York, P., 1998. Characterization of the phase transitions of trehalose dihydrate on heating and subsequent dehydration. J. Pharm. Sci. 87, 347-355.

Terebiznik, M.R.; Buera, M.P. y Pilosof, A.M.R., 1998. Thermostability and browning development of fungal α-amylase freeze-dried in carbohydrate and PVP matrices. Lebensm. –Wiss. U. –Technol., 31: 143-149.

To, E. y Flink, J., 1978a. "Collapse", a structural transition in freeze dried carbohydrates I. Evaluation of analytical methods. J. Food Technol., 13: 551-565.

To, E.C. y Flink, J.M., 1978b. "Collapse", a structural transition in freeze-dried carbohydrates. II. Effect of solute composition. J. Food Technol., 13: 567-581.

To, E.C. y Flink, J.M., 1978c. "Collapse", a structural transition in freeze dried carbohydrates III. Prerequisite of recrystallization. J. Food Technol., 13: 583-594

Tsourouflis, S.; Flink, J. y Karel, M., 1976. Loss of structure in freeze-dried carbohydrates solutions: Effect of temperature, moisture content and composition. J. Sci. Food Agric., 27: 509-519.

Uritani, M.; Takai, M. y Yoshinaga, J., 1995. Protective effect of disaccharides on restriction endonucleases during drying under vacuum. J. Biochem., 117: 774-779.

van den Berg, C., 1991. Food-water relations: progress and integration, comments and thoughts. En:"Water relationships in Foods", pp, 21-28, Levine, H. Y Slade, L. (Eds.), Plenum Press, New York.

Voget, C.; Flores, M.; Faloci, M. y Ertola, J., 1994. Effects of the ionic environment on the stability of Kluyveromyces lactis ß-galactosidase. Lebensm – Wiss u – Technol., 27: 324-330.

Wang, D.I.C.; Cooney, C.L.; Demain, A.L.; Dunnill, P.; Humphrey, A.E. y Lilly, M.D., 1979. Enzyme kinetics and immobilization. En:"Fermentation and enzyme technology", pp. 311-338, John Wiley & sons, New York, USA.

Weast, R.C.; Astle, M.J.; Beyer, W.H. (Eds.). Handbook of chemistry and Physics, 67th edn., CRC Press, Boca Ratón, FL, 1986-1987.

Whitaker, J.R., 1995. Enzyme action in aqueous systems with special emphasis on intermediate and high moisture foods. En: "Food Preservation by Moisture Control", pp 255-277, Barbosa-Cánovas, G.V., Welti-Chanes, J., (Eds.); Technomic Pub. Co., Inc.: Lancaster, PA.

Whitaker, J.R., 1996. Role of endogenous enzymes in food quality. En: "Food Chemistry", pp 493-494, Fennema, O. (Ed.), Marcel Dekker, New York.

White, G. y Cakebread, S., 1966. The glassy state in certain sugar-containing food products. J. Food Technol., 1: 73.

Whorton, C. y Reineccius, G., 1995. Evaluation of the mechanisms associated with the release of encapsulated flavor materials from maltodextrin

matrices. En: "Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients", pp. 143-160, Risch, S. y Reineccius, G. (Eds.), American Chemical Society, Washington, D.C.

Williams, M., Landel, R.and Ferry, J., 1955. The temperature dependence of relaxation mechanisms in amorphous polymers and other glass-forming liquids. Journal of The Americal Chemical Society, 77: 3701-3707.

Williams, R. 1994. Methods for determination of glass transitions in seeds. Ann. Botany, 74: 525-530.

Wolkers, W.; Oldenhof, H.; Alberda, M. y Hoekstra, F., 1998. Biochim. Biophys Acta, 1379: 83-96.

Wunderlich, B., 1981. The basis of thermal analysis. Cap. 2. En: "Thermal Characterization of Polymeric Materials", pp. 91-234, E.A. Turi, (Ed.), Academic Press, Inc., New York.

Yang, S.; Marchio, J. y Yen, J. 1994. A dynamic light scattering study of β-galactosidase: environmental effects on protein conformation and enzyme activity. Biotechnol. Prog., 10: 525-531.

Zeleznak, K.J. y Hoseney, R.C., 1987. The glass transition in starch. Cereal Chem., 64:121-124.

Índice

I. INTRODUCCIÓN **1**

I.A. ESTABILIDAD DE BIOMATERIALES LÁBILES EN CONDICIONES EXTREMAS DE HUMEDAD Y TEMPERATURA. 1

I.A.1. Estabilidad enzimática 3

I.A.2. Estabilización de enzimas 5

I.A.3. Efecto protector de azúcares y mecanismos involucrados. 6

I.B. SÓLIDOS AMORFOS Y ESTADO VITREO 7

I.B.1. Determinación de la temperatura de transición vítrea 13

I.B.2. Factores que afectan la T_g 16

I.B.2.1. Plastificación por el agua 16

I.B.2.2. Efecto de la estructura y masa molar. 18

I.B.2.3. Transición vítrea de mezclas. 20

I.B.3. Isotermas de sorción de agua y estado físico 22

I.B.4. Diagramas de Estado 24

I.B.5. Cambios físicos relacionados con T_g. 27

I.B.5.1. Cristalización de hidratos de carbono amorfos 28

I.B.5.2. Cinética de cristalización. 33

I.B.6. Cambios químicos relacionados con T_g. 37

I.B.7. Dependencia de cambios físicos y químicos con la temperatura 39

I.B.7.1. Modelo de Arrhenius. 40

I.B.7.2. Modelo de Williams-Landel-Ferry (WLF) 42

I.B.7.3. Modelo de Vogel-Tamman-Fulcher (VTF) 45

I.B.7.4.Comparación de los modelos empleados para evaluar la dependencia de la cinética de procesos con la temperatura. 45

I.B.C. ASPECTOS REMARCABLES SOBRE LOS FACTORES INVOLUCRADOS EN LA ESTABILIDAD DE BIOMOLÉCULAS EN CONDICIONES DE HUMEDAD RESTRINGIDA 47

II. OBJETIVO **51**

III. MATERIALES Y MÉTODOS **53**

III.A. ELECCIÓN DE LOS SISTEMAS MODELO 53

III.B. MATERIALES Y MÉTODOS 53

III.C. PREPARACIÓN DE LOS SISTEMAS MODELO 55
III.C.1. Sistemas líquidos. 55
III.C.2. Sistemas deshidratados. 55
III.C.3. Sistemas congelados. 56
III.D. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE AGUA EN SISTEMAS DESHIDRATADOS 57
III.E. ESTIMACIÓN DE LA CANTIDAD DE AGUA CRISTALIZADA EN SISTEMAS CONGELADOS 58
III.F. TRATAMIENTO TÉRMICO. 59
III.G. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA 60
III.H. ISOTERMAS DE SORCIÓN DE AGUA 62
III.I. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC) 63
III.I.1. Determinación de la temperatura de transición vítrea (T_g). 64
III.I.2. Determinación de temperaturas de cristalización y grado de cristalinidad. 65
III.I.3. Evaluación de cinéticas de cristalización. 66
III.J. MICROSCOPÍA ÓPTICA CON LUZ POLARIZADA (M.O.) 68
III.J.1. Evaluación de cinéticas de cristalización. 69
III.K. CINÉTICA DE PROCESOS Y DEPENDENCIA CON LA TEMPERATURA 71
III.L. DIFRACCIÓN POR RAYOS-X. 71
III.M. TRATAMIENTO DE DATOS. 72

IV. RESULTADOS 73

IV.A. ESTABILIDAD TÉRMICA DE β-GALACTOSIDASA EN MATRICES AMORFAS 73
IV.A.1. Estabilidad térmica de β-galactosidasa en matrices poliméricas deshidratadas. 78
IV.A.1.1. Efectos de la temperatura, el contenido de agua y la T_g. 79
IV.A.1.2. Efectos de la masa molar y de la conformación de la matriz. 96
IV.A.1.3. Relación entre la estabilidad enzimática y el valor de ($T-T_g$). 109
IV.A.2. Estabilidad térmica de β-galactosidasa en azúcares amorfos. 113
IV.A.2.1. Análisis comparativo de la estabilidad de β-galactosidasa en diferentes azúcares. 114

IV.A.2.2. Efecto de la cristalización de trehalosa sobre la capacidad protectora del azúcar....119
IV.A.3. Análisis comparativo de la estabilidad de β-galactosidasa en polímeros y en azúcares....134
IV.A.4. Diagramas de estado y estabilidad enzimática....141
IV.A.5. Conclusiones de la sección IV.A....146
IV.B. ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LA EFICIENCIA DE LOS AZÚCARES COMO PROTECTORES ENZIM{ATICOS....148
IV.B.1. Empleo de matrices combinadas polímero/azúcar....148
IV.B.2. Empleo de matrices combinadas formadas por dos azúcares....159
IV.B.2.1. Matrices de sacarosa co-liofilizadas con rafinosa o trehalosa. 159
IV.B.2.2. Matrices de lactosa co-liofilizadas con trehalosa....181
IV.b.3. Empleo de matrices combinadas azúcar/sal....210
IV.B.3.1. Estabilidad enzimática en sistemas liofilizados azúcar/sal....211
IV.B.3.2. Análisis de propiedades físicas en sistemas liofilizados azúcar/sal....218
IV.B.3.2.a. Temperatura de transición vítrea y cristalización de azúcar en sistemas liofilizados trehalosa/sal....218
IV.B.3.2.b. Isotermas de adsorción de agua en sistemas liofilizados azúcar/sal....230
IV.B.3.2.c. Temperatura de transición vítrea y cristalización de agua en sistemas trehalosa/sal sobresaturados por congelación....237
IV.B.4. Conclusiones de la sección IV.B....249

V. CONCLUSIONES....253

VI. BIBLIOGRAFÍA....257