

Tesis Doctoral

Aspectos físico-químicos de la  
encapsulación de ácidos grasos  
poliinsaturados utilizando polielectrolitos no  
convencionales para el desarrollo de  
alimentos funcionales

Vasile, Franco Emanuel

2016

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Vasile, Franco Emanuel. (2016). Aspectos físico-químicos de la encapsulación de ácidos grasos poliinsaturados utilizando polielectrolitos no convencionales para el desarrollo de alimentos funcionales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n6023\\_Vasile](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6023_Vasile)

Cita tipo Chicago:

Vasile, Franco Emanuel. "Aspectos físico-químicos de la encapsulación de ácidos grasos poliinsaturados utilizando polielectrolitos no convencionales para el desarrollo de alimentos funcionales". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016.

[http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n6023\\_Vasile](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6023_Vasile)



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Industrias

**Aspectos físico-químicos de la encapsulación de ácidos grasos  
poliinsaturados utilizando polielectrolitos no convencionales para el  
desarrollo de alimentos funcionales**

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

**Ing. Franco Emanuel Vasile**

Directores de tesis: Dra. María Florencia Mazzobre

Dra. María Alicia Judis

Consejero de Estudios: Dra. Marcela Patricia Tolaba

Lugar de trabajo:

Laboratorio de Industrias Alimentarias II, Universidad Nacional del Chaco Austral.

Departamento de Industrias y Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias  
Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2016.

## RESUMEN

### ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS DE LA ENCAPSULACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS UTILIZANDO POLIELECTROLITOS NO CONVENCIONALES PARA EL DESARROLLO DE ALIMENTOS FUNCIONALES.

La encapsulación de aceites ricos en ácidos grasos poliinsaturados surge como una estrategia para retardar y/o minimizar el deterioro oxidativo, permitiendo la obtención de ingredientes innovadores. El objetivo del trabajo fue avanzar en la comprensión de la influencia de los factores físico-químicos e interacciones que afectan la estabilidad de ácidos grasos poliinsaturados en cápsulas de polielectrolitos naturales para el desarrollo de alimentos funcionales. En particular, se evaluó el comportamiento de la goma exudada de *Prosopis alba* (GAL) como excipiente no convencional. Se definió el método de extracción y purificación más conveniente, y se profundizó el estudio de su estructura molecular y toxicidad por medio de técnicas *in vivo*. Se evaluó la funcionalidad de la goma en términos de las propiedades de hidratación, emulsificantes, reológicas, antioxidantes y de sorción, encontrándose numerosos puntos de similitud con la goma arábiga. La incorporación de GAL como material de pared en cápsulas de polielectrolitos (alginato, quitosano) confirió mayor estabilidad al aceite y mejores propiedades tecnológicas. El estudio integral de las propiedades físico-químicas, estructurales y de estabilidad de las capsulas permitió avanzar en el conocimiento de las interacciones involucradas. La incorporación de los encapsulados en hamburguesas mejoró las propiedades nutricionales y de estabilidad durante el almacenamiento y cocción. Los resultados advierten la potencial aplicación de GAL en el desarrollo de nuevos sistemas de encapsulación, con los beneficios adicionales que derivan del uso de una fuente autóctona actualmente no utilizada y renovable.

Palabras claves: goma exudada de *Prosopis alba*, gelación iónica, encapsulación, alimento funcional.

## ABSTRACT

### **PHYSICO-CHEMICAL ASPECTS OF POLYUNSATURATED FATTY ACIDS ENCAPSULATION USING UNCONVENTIONAL POLYELECTROLYTES FOR DEVELOPING FUNCTIONAL FOODS.**

The encapsulation of polyunsaturated fatty acids emerges as a strategy to retard and/or minimize oxidative deterioration, allowing obtaining innovative ingredients. The objective of present work was to advance in the comprehension of physicochemical aspects and the interactions affecting the stability of polyunsaturated fatty acids encapsulated in natural polyelectrolyte beads for the development of functional foods. Particularity, the behavior of *Prosopis alba* exudate gum (GAL) as non-conventional excipient was assessed.

Extraction and purification methods were optimized. Studies on molecular structure and *in vivo* toxicity assays were performed. Gum functionality in terms of hydration, emulsification, rheological, antioxidants and sorption properties were evaluated, being many aspects similar to those found for arabic gum. GAL as wall material component in polyelectrolyte beads (alginate and chitosan) improved the fish oil stability and enhanced the technological properties of the capsules. The integral study of physicochemical and structural properties, along with the stability of the beads has led to a better understanding of the involved interactions. The incorporation of the encapsulated fish oil into beef patties allowed to improved nutritional properties and storage stability after cooking and freeze storage. The obtained results highlight the potential application of GAL in the development of new encapsulation systems, with the additional benefits arising from the use of a regional source currently unused and renewable.

Key words: *Prosopis alba* exudate gum, ionic gelation, encapsulation, functional food

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios y a mis padres, por la posibilidad de haber llegado hasta aquí.

A la Dra. Florencia Mazzobre, por la dedicación y esmero con que ha acompañado cada instancia de trabajo, a la distancia y en cada viaje. Por su aporte disciplinar e infinitamente humano.

A la Dra. María Alicia Judis, por haber dotado de estímulo y consejo mi formación profesional. Por haber sido referente e inspiración en el trabajo diario como investigador y docente universitario, y por haberme permitido aprender de su valiosa experiencia.

A CONICET por las becas otorgadas. A la Universidad Nacional del Chaco Austral y a la FCEyN de la Universidad de Buenos Aires por brindarme recursos y el lugar de trabajo.

A la Dra. Pilar Buera, por su visión positiva y alentadora en cada momento. Por haberme dado un lugar en su familia académica y por las oportunidades de crecimiento que enriquecieron mi formación.

A la Bqa. Ana María Romero, por su incalculable generosidad, dedicación y esmero. Por las arduas horas de trabajo experimental, risas, latiguillos y cantos.

A los Dres. Adriana Kolhender, Claudia Quinzio, Miriam Virgolini, Marcela Castro, María Julia Martínez, Karina Martínez y Víctor Pizones Ruiz-Hernestosa, por sus valiosas contribuciones al trabajo experimental.

A Marina Doval, Mario Sturla, Daniel Brachna y Carlos Coman por la generosidad de sus aportes y puntos de vista.

A mis compañeros de Chaco, Ricardo, Ariel, Érica, Vanina, Carina, Carola y Mara por los mates y la paciencia incluso en los días de peor ánimo.

A mis compañeros de Buenos Aires, Leo, Diego, Mario, Vero, Pato, Caro, Cristina, Betty, Silvio, Graciela, Marcela, Natalia, Peggy, Jaime y Abel quienes hicieron de cada visita una anécdota y me hicieron el aguante a la distancia.

A Marcos, Juanma, Santi, Dante y Luis, amigos, evaluadores externos y expertos recolectores de goma.

Y en especial, a quien me vio crecer, disfrutando cada logro y afrontando las dificultades. Por su infinito amor y paciencia. Por ser luz y sostén. Gracias, María Luz.

*A mi familia  
A María Luz, por ser mi complemento.*

## ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN .....	13
I.1 Polielectrolitos naturales .....	13
I.1.1 Goma exudada del algarrobo blanco ( <i>Prosopis alba</i> ) .....	14
I.1.2 Propiedades funcionales de polielectrolitos no convencionales y aplicaciones .....	15
I.2 Importancia de los ácidos grasos poliinsaturados en la alimentación.....	16
I.3 Fundamentos de la encapsulación.....	20
I.3.1 Métodos de encapsulación de aceites ricos en AGPI n3 .....	22
I.3.2 Gelación iónica .....	23
I.3.3 Materiales de pared.....	24
I.3.3.1 Alginato.....	25
I.3.3.2 Quitosano.....	26
I.3.3.3 Combinación de hidrocoloides .....	27
I.4 Alimentos funcionales.....	28
II. OBJETIVOS .....	32
III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	34
III.1 Elección de los sistemas.....	34
III.2 Materiales y sistemas analizados .....	35
III.2.1 Exudados naturales .....	35
III.2.2 Emulsiones y cápsulas de polielectrolitos .....	35
III.2.3 Alimento cárnico (tipo hamburguesa) enriquecido con AGPI n3 .....	35
III.3 Obtención y preparación de los sistemas .....	35
III.3.1 Obtención de la goma exudada de algarrobo blanco ( <i>Prosopis alba</i> ).....	35
III.3.1.1 Purificación de la goma .....	36
III.4 Preparación de emulsiones aceite/goma.....	37
III.5 Preparación de cápsulas de polielectrolitos conteniendo aceite de pescado .....	38
III.5.1 Diagramas de fase GAL-alginato y GAL-alginato-Ca <sup>2+</sup> .....	38
III.5.2 Diagramas de fase GAL-alginato y GAL-alginato-Ca <sup>2+</sup> .....	38
III.5.3 Generación de cápsulas de polielectrolitos.....	39
III.5.4 Secado de las cápsulas .....	40
III.6 Determinaciones realizadas para excipientes (gomas) y/o cápsulas deshidratadas ....	40

III.6.1	Contenido total de carbohidratos.....	40
III.6.2	Nitrógeno total y proteínas.....	40
III.6.3	Contenido de cenizas.....	41
III.6.4	Sodio, Potasio y Calcio.....	41
III.6.5	Contenido de agua.....	41
III.6.6	Actividad de agua.....	41
III.6.7	Polifenoles totales.....	41
III.6.8	Taninos.....	42
III.6.9	Flavonoides.....	43
III.6.10	Color.....	43
III.6.11	Determinación de pH y rotación óptica.....	43
III.6.12	Determinación de monosacáridos por GC-FID/ GC-MS.....	44
III.6.13	Determinación de ácidos urónicos.....	45
III.6.14	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear RMN <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C.....	45
III.6.15	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	45
III.6.16	Estudio preliminar de la toxicidad de la goma: Toxicidad aguda <i>in vivo</i> .....	46
	<i>III.6.16.1 Evaluación de parámetros fisiológicos</i> .....	46
	<i>III.6.16.2 Evaluación de parámetros conductuales</i> .....	47
	<i>III.6.16.3 Estudios histopatológicos</i> .....	48
III.6.17	Propiedades de interacción con el solvente.....	48
	<i>III.6.17.1 Higroscopicidad</i> .....	48
	<i>III.6.17.2 Absorción de agua</i> .....	48
	<i>III.6.17.3 Solubilidad</i> .....	49
III.6.18	Propiedades reológicas.....	49
	<i>III.6.18.1 Reología de dispersiones diluidas</i> .....	49
	<i>III.6.18.2 Reología de dispersiones de concentración media</i> .....	50
	<i>III.6.18.3 Reología de dispersiones concentradas</i> .....	51
III.6.19	Determinación <i>in vitro</i> de la actividad antioxidante.....	51
	III.6.19.1 Capacidad antirradicalaria por el ensayo de ABTS• <sup>+</sup> .....	51
	<i>III.6.19.2 Actividad antirradicalaria por el ensayo del radical OH•</i> .....	52
	<i>III.6.19.3 Ensayo del poder reductor</i> .....	52



III.6.19.4	<i>Actividad quelante de metales</i> .....	53
III.6.20	Propiedades antimicrobianas .....	53
III.6.21	Isotermas de sorción de agua.....	54
III.6.22	Transiciones térmicas por calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	56
III.7	Estudios particulares realizados en emulsiones .....	57
III.7.1	Determinación de las propiedades interfaciales .....	57
III.7.2	Determinación del tamaño de gota de las emulsiones.....	58
III.7.3	Determinación del potencial Z .....	59
III.7.4	Evaluación del índice de cremado (IC) .....	60
III.8	Estudios particulares para sistemas encapsulados.....	60
III.8.1	Evaluación de la retención de aceite en condiciones aceleradas de extracción con solvente .....	60
III.8.2	Microscopía electrónica de barrido (FEG-SEM). .....	60
III.8.3	Aceite superficial (AS).....	61
III.8.4	Aceite encapsulado (AE).....	61
III.8.5	Eficiencia y rendimiento de la encapsulación .....	62
III.8.6	Atributos morfológicos y ópticos por análisis de imagen .....	63
III.8.7	Estabilidad durante el almacenamiento .....	65
III.8.7.1	<i>Extracción de lípidos para análisis de estado oxidativo</i> .....	66
III.8.7.2	<i>Cuantificación de productos de oxidación primaria</i> .....	67
III.8.7.3	<i>Cuantificación de productos de oxidación secundaria</i> .....	68
III.8.7.4	<i>Perfil lipídico (GC-FID) y cambios en el valor nutricional</i> .....	68
III.8.7.5	<i>Estudio de la distribución de aceite durante el almacenamiento</i> .....	69
III.9	Aplicación de los encapsulados para el desarrollo de un producto cárnico enriquecido con AGPI n3 .....	70
III.9.1	Diseño y formulación .....	70
III.9.2	Preparación de las hamburguesas .....	71
III.9.3	Cocción.....	71
III.9.4	Caracterización fisicoquímica .....	72
III.9.5	Evaluación de color y textura .....	72
III.9.6	Evaluación del deterioro oxidativo.....	73

III.10 Análisis de datos .....	73
IV. RESULTADOS y DISCUSIÓN .....	75
IV.1 Caracterización de la goma exudada de <i>Prosopis alba</i> empleada como material de pared .....	75
IV.1.1 Obtención de la goma .....	75
IV.1.2 Evaluación del método de purificación sobre la composición general de la goma .....	77
IV.1.3 Composición y estructura de GAL .....	83
IV.1.3.1 Determinación de monosacáridos neutros .....	83
IV.1.3.2 Determinación de ácidos urónicos .....	85
IV.1.3.3 Resonancia magnética nuclear $^1H$ y $^{13}C$ .....	85
IV.1.3.4 Espectroscopía FTIR .....	88
IV.1.4 Evaluación de la toxicidad <i>in vivo</i> de GAL .....	90
IV.1.4.1 Seguimiento de parámetros fisiológicos y conductuales .....	91
IV.1.4.2 Estudios histopatológicos de órganos del sistema digestivo .....	94
IV.1.5 Evaluación de las propiedades funcionales de GAL en comparación con GA .....	97
IV.1.5.1 Propiedades de interacción con el solvente .....	98
IV.1.5.2 Propiedades reológicas de dispersiones acuosas .....	101
IV.1.5.2.1 Comportamiento reológico de dispersiones diluidas .....	102
IV.1.5.2.2 Comportamiento reológico de dispersiones de concentración media .....	104
IV.1.5.2.3 Comportamiento reológico de dispersiones concentradas .....	108
IV.1.5.3 Propiedades emulsionantes .....	110
IV.1.5.3.1 Actividad y reología interfacial .....	110
IV.1.5.3.2 Determinación del tamaño de partícula e índice de polidispersidad .....	113
IV.1.5.3.3 Potencial Z .....	117
IV.1.5.3.4 Estudio de la estabilidad de las emulsiones al cremado .....	118
IV.1.5.4 Propiedades antioxidantes y antimicrobianas .....	120
IV.1.5.4.1 Identificación y cuantificación de compuestos con potencial actividad antioxidante .....	120
IV.1.5.4.2 Evaluación de la actividad antioxidante .....	123
IV.1.5.4.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana .....	127

IV.1.5.5	<i>Propiedades térmicas y de sorción</i> .....	128
IV.1.5.5.1	Isotermas de sorción .....	128
IV.1.5.5.2	Análisis termodinámico de las isotermas de sorción de agua .....	133
IV.1.5.5.3	Evaluación de la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) .....	135
IV.2	Aprovechamiento de GAL como material de pared para encapsular ácidos grasos poliinsaturados por gelación iónica .....	141
IV.2.1	Estudio de las interacciones GAL-alginato mediante diagramas de fases SOL-GEL .....	142
IV.2.2	Estabilidad de emulsiones GAL-alginato .....	148
IV.2.3	Obtención y caracterización de los sistemas encapsulados .....	152
IV.2.3.1	<i>Efecto de la composición y tipo de secado</i> .....	154
IV.2.3.1.1	Extracción acelerada con solvente .....	154
IV.2.3.1.2	Características morfológicas y microestructurales .....	157
IV.2.3.1.3	Protección por calorimetría diferencial de barrido (DSC) .....	161
IV.2.3.2	<i>Interacciones moleculares por FTIR</i> .....	163
IV.2.3.3	<i>Distribución de aceite, rendimiento y eficiencia de encapsulación después del secado</i> .....	166
IV.2.3.4	<i>Apariencia de los encapsulados</i> .....	171
IV.2.3.4.1	Distribución de tamaño y atributos morfológicos .....	171
IV.2.3.4.2	Propiedades ópticas de los encapsulados .....	174
IV.2.3.5	<i>Efecto del contenido de agua y transición vítrea sobre las características físicas y estabilidad de las cápsulas</i> .....	177
IV.2.3.6	<i>Estabilidad oxidativa del aceite encapsulado con GAL</i> .....	188
IV.2.3.6.1	Evolución de indicadores de oxidación primaria y secundaria durante el almacenamiento en condiciones controladas .....	189
IV.2.3.6.2	Cambios en el perfil de ácidos grasos durante el almacenamiento ..	193
IV.2.3.6.3	Permeación natural de aceite durante el almacenamiento .....	197
IV.3	Aplicación de los encapsulados para el desarrollo de un alimento funcional .....	199
IV.3.1	Efectos de la cocción sobre parámetros físico-químicos y nutricionales de hamburguesas enriquecidas .....	200
IV.3.2	Estabilidad oxidativa por efecto de la cocción .....	204
IV.3.3	Efecto del almacenamiento congelado y cocción .....	210

V. CONCLUSIONES .....	214
VI. BIBLIOGRAFÍA .....	220

# **I. INTRODUCCIÓN**

## I. INTRODUCCIÓN

### I.1 Polielectrolitos naturales en alimentos

Los hidrocoloides comprenden un grupo diverso de compuestos poliméricos hidrofílicos e hidrosolubles, de origen natural o sintético, con variadas estructuras y tamaños moleculares. Esta clasificación incluye a polímeros neutros y polielectrolitos, cuya proporción y distribución de cargas ejercen un impacto importante en las propiedades funcionales de los sistemas a los que se incorpora (reológicas, interfaciales, emulsionantes, etc.) (Williams, 2008). Los hidrocoloides se encuentran entre los ingredientes más utilizados en alimentos y constituyen una parte importante de la dieta diaria en diversos productos como salsas, aderezos, yogures y helados (Li y col., 2016).

La búsqueda de nuevos hidrocoloides para uso alimentario ha motivado el estudio de distintas fuentes naturales, resultando de particular interés, aquellos recursos autóctonos, actualmente subvalorados, cuyo procesamiento permite obtener productos con alto valor agregado (Nussinovitch, 2009). En este contexto, las gomas naturales han cobrado especial relevancia, impulsadas por una creciente demanda de hidrocoloides alternativos a los convencionales, con funcionalidades variadas que permitan su uso en múltiples aplicaciones (Mirhosseini y col., 2012).

Las gomas alimentarias comprenden un grupo diverso de polisacáridos de alto peso molecular, que tienen la capacidad de modificar distintas propiedades de los alimentos (Liu, 2005). Pueden actuar como espesantes, gelificantes, emulsionantes, estabilizantes, reemplazantes de grasas, clarificantes, floculantes, espumantes y fibra dietaria (Li y col., 2016). Esta diversidad en sus propiedades se debe, en gran parte, a las características fisicoquímicas que presentan en relación a estructura (lineales o ramificadas), composición de azúcares y derivados (galactomananos, arabinogalactanos, etc.), capacidad de ionización (neutras o aniónicas), etc., que a su vez están íntimamente ligadas a su origen (naturales, modificadas o sintéticas).

Las gomas naturales pueden ser de origen vegetal, marino y microbiano. Dentro de las gomas vegetales, las gomas exudadas constituyen un grupo importante entre las que se destacan la goma arábiga (*Acacia Senegal*), karaya (*Sterculia urens*), ghatti (*Anogeissus latifolia*) y tragacanto (*Astragalus gummifer* L) (Zuidam y col., 2010). La goma arábiga es

una de las gomas exudadas más estudiadas ya que ha sido utilizada empíricamente con múltiples propósitos industriales (Islam y col., 1997, Williams y col., 2009). La goma arábiga, obtenida a escala industrial de la corteza de *A. Senegal* en varios países de África, ha satisfecho por décadas la demanda a nivel mundial, sin embargo, su escasez periódica e inseguridad en el suministro y precios, conllevan a la búsqueda de otras fuentes botánicas de gomas capaces de remplazarla. Actualmente, representa el 8% del mercado internacional de gomas naturales. En particular Argentina importa anualmente alrededor de 2.500 toneladas de goma arábiga de Sudán (INDEC 1996).

En los últimos años, a partir del creciente interés en el estudio de potenciales sustitutos de la goma arábiga (López-Franco y col., 2009, Mahfoudhi y col., 2014, Sibaja-Hernández y col., 2015) se encontró que los exudados de ciertas especies de *Prosopis*, presentan propiedades funcionales comparables e incluso superiores a ésta. (Vernon-Carter y col., 1998, Orozco-Villafuerte y col., 2003). Estos estudios describen las características y propiedades de gomas exudadas de las especies *Prosopis Juliflora*, *P. glandulosa*, *P. velutina* y *P. leviagata*, comúnmente referidos como goma de mezquite (GM), sin embargo, no se han realizados estudios hasta el momento sobre el exudado de *Prosopis alba*.

### I.1.1 Goma exudada del algarrobo blanco (*Prosopis alba*)

*Prosopis alba*, es una de las especies arbóreas predominantes en la región fitogeográfica del monte chaqueño en el noreste de Argentina (Santos Biloni y col., 1990) (Figura I.1). Popularmente conocido como “algarrobo blanco”, *P. alba* constituye un ícono de gran relevancia económica regional, no sólo debido a su vasta dispersión y abundancia, sino a la utilidad de su madera y de sus frutos, los cuales han sido empleados en la preparación artesanal de alimentos y bebidas como así también para alimentación animal (Dimitri, 2004, Cardozo y col., 2010). Si bien la utilización de la madera representa una importante actividad económica en numerosas comunidades rurales, la tala indiscriminada, ha resultado en una severa deforestación de este recurso. En contraste, el aprovechamiento de productos no maderables de alto valor, constituyen alternativas económicas mucho más acordes con el concepto de desarrollo sostenible. En condiciones de estrés, el árbol secreta en su corteza un exudado o goma de color rojo ámbar que previene la desecación del tejido y evita el ingreso de agentes patógenos. En particular, el exudado gomoso presente en troncos y ramas de *P.*

*alba* es un recurso actualmente poco conocido, y por lo tanto, no aprovechado. Las similitudes encontradas en ciertas propiedades de las gomas exudadas de *Prosopis spp.* y de *Acacia senegal* plantean la posibilidad de utilizar la goma de *P. alba*, como potencial sustituto de la goma arábiga. Por lo tanto, avanzar en el conocimiento de sus propiedades fisicoquímicas y funcionales, permitirá identificar y ampliar sus potenciales aplicaciones.



**Figura I.1.** Árboles de *Prosopis alba* del parque zoológico de la ciudad de Presidencia Roque Sáenz Peña, Provincia de Chaco.

### I.1.2 Propiedades funcionales de polielectrolitos no convencionales y aplicaciones

Las propiedades funcionales características de las gomas exudadas se deben fundamentalmente a la complejidad de su composición y se diferencian entre las distintas gomas por la naturaleza química de sus constituyentes.

Los exudados gomosos están constituidos principalmente por una mezcla de azúcares simples y complejos, oligómeros y polímeros de monosacáridos neutros y ácidos urónicos, que forman estructuras químicas de distinta arquitectura molecular (Zuidam y col., 2010), caracterizados por la presencia de grupos hidrofílicos con gran afinidad por ligar moléculas de agua. Las gomas exudadas presentan así la capacidad de interactuar con el solvente, modificando las propiedades de la fase dispersante, la cual adquiere características intermedias de solución, suspensión y dispersión coloidal (Li y col., 2016). El estudio de las propiedades reológicas constituye así, un parámetro decisivo no sólo en la interpretación de las características moleculares, sino en la predicción de su potencial tecnológico.

Las gomas exudadas tienen además la particularidad de presentar en su composición una fracción proteica que les confiere la capacidad de adsorberse a la interfase aceite-agua y



formar membranas interfaciales. La proporción, distribución y naturaleza de esta fracción determina en gran medida la capacidad emulsionante de la goma (Dickinson, 2003). Además de los componentes mayoritarios, carbohidratos y proteínas, las gomas presentan en menor proporción compuestos fenólicos, flavonoides y taninos, con propiedades antioxidantes y antibacterianas (Verbeken y col., 2003, Nussinovitch, 2009) que amplían y diversifican la funcionalidad de estos aditivos.

Finalmente, la interacción entre los componentes de alto y bajo peso molecular, confiere a las gomas importantes funciones como estabilizantes de los sistemas deshidratados (Zuidam y col., 2010). El estudio de las propiedades de sorción y su relación con la transición vítrea, resultan de interés, especialmente en aquellas aplicaciones donde la estabilidad estructural resulta de gran importancia (Mosquera y col., 2012).

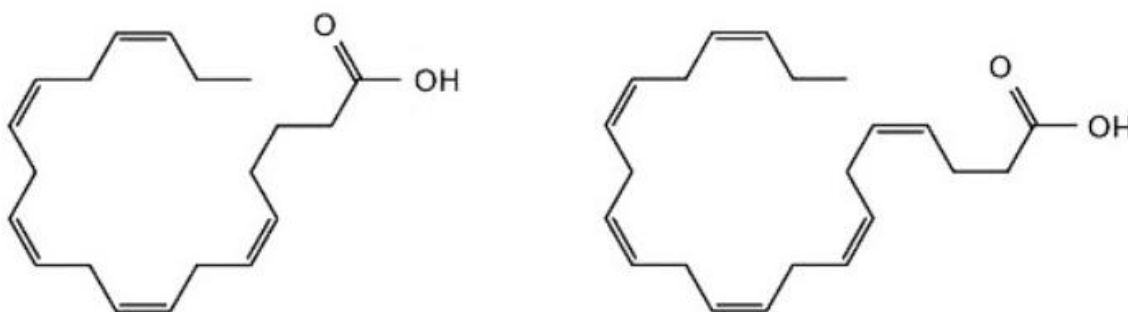
Recientemente, junto con los usos más comunes de los hidrocoloides, se han reportado aplicaciones innovadoras en áreas emergentes y de gran impacto tecnológico como el desarrollo de películas comestibles y sistemas de encapsulación (Li y col., 2016). En particular, como componentes de sistemas de encapsulación, las gomas pueden formar barreras entre el núcleo y su entorno, previniendo la absorción de agua, evitando la oxidación y/o evaporación del activo y modulando la liberación en distintas condiciones (Zuidam y col., 2010).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, resulta de interés caracterizar y evaluar el comportamiento tecnológico de la goma exudada de *P. alba*, no sólo como sustituto de la goma arábiga, usada ampliamente en la industria, sino también como polielectrolito para encapsular y estabilizar compuestos activos sensibles.

## **I.2 Importancia de los ácidos grasos poliinsaturados en la alimentación**

Los ácidos grasos son compuestos orgánicos formados por una cadena alifática y un grupo carboxílico, que normalmente se encuentran unidos a un glicerol, formando mono, di o triglicéridos. Dependiendo de la naturaleza de la cadena hidrocarbonada, los ácidos grasos pueden ser saturados (AGS) o insaturados (AGI), y estos pueden ser monoinsaturados (AGMI) o poliinsaturados (AGPI). A su vez, en función de la posición de la insaturación respecto del extremo metílico, los ácidos grasos se denominan omega 3 (n3) y omega 6 (n6) u omega 9 (n9) (Fennema, 2010).

Muchos ácidos grasos son sintetizados por el organismo, sin embargo, un grupo de ácidos grasos llamados “esenciales” deben ser incorporados necesariamente en la dieta. Por un lado, el ácido linoleico (C18:2, n6) es precursor del ácido araquidónico (C20:4, n6), el cual participa en la síntesis de prostaglandinas, leucotrienos, y lipoxinas, importantes en la regulación de la respuesta celular en procesos inflamatorios e inmunológicos (Ivanov y col., 2015). Por otro lado, el ácido  $\alpha$ -linolénico (C18:3, n3), es precursor biológico de los ácidos eicosapentaenoico (C20:5, n3) EPA, y docosahexaenoico (C22:6, n3) DHA (Figura I.2), ambos importantes componentes estructurales de la membrana celular y precursores de compuestos bioactivos. Sin embargo, debido a que la bioconversión de C18:3 en EPA y DHA es baja, estos también son considerados esenciales (Rubio-Rodríguez y col., 2010).



**Figura I.2** Estructura química de ácidos grasos poliinsaturados eicosapenaenoico (C20:5) EPA (izquierda) y docosahexaenoico DHA (derecha).

En relación al consumo de ácidos grasos, numerosos estudios han informado que la dieta occidental se caracteriza por un predominio de AGS respecto de AGPI, y por un desbalance en favor del consumo de AGPI n6 respecto de los AGPI n3, haciendo que la cantidad media de AGPI n3 en la dieta se encuentre muy por debajo de los niveles recomendados (Rubio-Rodríguez y col., 2010, Arab-Tehrany y col., 2012). Ante esta situación, diferentes organizaciones de la salud han propuesto un aumento en la ingesta de ácidos poliinsaturados y en especial de AGPI n3. La OMS (1994) recomienda una relación n6/n3 de 5:1 o menor, y una relación AGPI/AGS entre 0,4 y 1. El Comité de Orientación Médica de Alimentación y Política de Nutrición (UK) sugiere una ingesta de EPA y DHA de 0,2 g/día o 1,5 g/semana (Kris-Etherton y col., 2000). Recientemente, la European Food Safety Authority (EFSA)

recomendó una dosis diaria de 250 mg de EPA y DHA, y de 2 g de ácido  $\alpha$ -linolénico (Zuidam y col., 2010).

La importancia de la ingesta de AGPI n3, radica en la comprobada evidencia de los efectos benéficos para la salud de estos ácidos grasos, (Rubio-Rodríguez y col., 2010, Arab-Tehrany y col., 2012, Ansorena y col., 2013). El consumo de AGPI n3, se ha relacionado con el desarrollo infantil del cerebro, hígado, ojos (Cheatham y col., 2006) y sistema nervioso (Kolanowski y col., 2006). Diversos estudios epidemiológicos relacionaron dietas ricas en AGPI n3 con el menor riesgo de padecer tumores, cáncer, enfermedades cardiovasculares, artritis, enfermedad autoinmune, diabetes tipo II, hipertensión, trastornos renales y de la piel, y desórdenes inflamatorios, entre otros (Larrieu y col., 2004, Kris-Etherton y col., 2009, Arab-Tehrany y col., 2012). El consumo de AGPI n3 podría ser, por lo tanto, una forma efectiva de prevenir muchas enfermedades.

Considerando los numerosos beneficios que se promoverían al incrementar el consumo ácidos grasos n3, los AGPI se convierten en excelentes candidatos para ser incorporados en matrices alimentarias (Garti y col., 2012). Un mayor contenido de AGPI n3 en los alimentos puede lograrse mediante dos estrategias principales. Por un lado, se puede modificar la alimentación animal (Scheeder y col., 2001, Patiño y col., 2012, Cedres, 2013) y obtener así un aumento natural en el contenido de n3 en productos como carne y leche, entre otros, o bien, incorporando aceites ricos en AGPI n3 en la formulación alimentaria (Rubio-Rodríguez y col., 2010).

En los últimos años, una amplia variedad de alimentos disponibles comercialmente, han sido funcionalizados por adición de ácidos grasos poliinsaturados de diferentes fuentes como lino (Gallardo y col., 2013), canola (Wang y col., 2013), oliva (Calvo y col., 2012) y aceite de pescado (Josquin y col., 2012, Salminen y col., 2013) entre otros. En muchos casos, el aceite de pescado ha sido señalado como una de las fuentes naturales más importante de AGPI n3, especialmente de EPA y DHA (Arab-Tehrany y col., 2012). Se ha utilizado en la preparación de suplementos nutricionales y adicionado a diversos alimentos con fines de fortificación (Vongsvivut y col., 2012). Sin embargo, la naturaleza altamente lipofílica y la baja estabilidad química de estos compuestos resulta no sólo en una escasa absorción y una palatabilidad deficiente, sino también en el deterioro oxidativo de estas sustancias (Shahidi y col., 2005, Jiménez-Colmenero, 2007, Jacobsen y col., 2008) factores que limitan su uso

en alimentos funcionales ya que podrían afectar negativamente las características sensoriales y nutricionales del producto. Esto implica numerosos desafíos tecnológicos tanto en la producción como en el transporte y almacenaje de los alimentos funcionales enriquecidos con AGPI.

La oxidación de aceites ricos en AGPI n3 involucra mecanismos complejos que dependen del tipo de lípidos presentes y del estado en el que se encuentren dispuestos en el alimento (monofásico o heterofásico, en emulsiones o encapsulados), de la concentración de antioxidantes naturales o agregados, así como de la incidencia de factores externos como temperatura, luz, oxígeno y presencia de metales prooxidantes (Fe, Cu, etc.).

En términos generales, la oxidación de aceites ricos en AGPI implica la reacción de los ácidos grasos insaturados con el oxígeno del aire. Durante la reacción se producen compuestos intermediarios (hidroperóxidos y radicales libres) que se descomponen en aldehídos y cetonas. En las primeras etapas de la reacción tiene lugar la acumulación de productos intermediarios altamente reactivos que reaccionan con otros ácidos grasos, retroalimentando la reacción en cadena que evoluciona por mecanismos radicalarios, en un fenómeno conocido como “autooxidación” (Shahidi y col., 2005, Kolanowski y col., 2007). La oxidación de lípidos es una de las mayores causas de reducción de la vida útil de los alimentos y disminución en la aceptabilidad por parte de los consumidores (Arab-Tehrany y col., 2012). No sólo disminuye el valor nutricional (pérdida de ácidos grasos esenciales y vitaminas liposolubles) sino que además conlleva a la formación de productos potencialmente tóxicos (radicales libres, aldehídos reactivos, etc.) y generación de sabores y aromas desagradables (Zuidam y col., 2010), entre otros. Por tanto, la estabilización de lípidos frente a la oxidación surge como prerrequisito clave para el desarrollo exitoso de alimentos fortificados (Jacobsen y col., 2008).

Actualmente, existen distintas estrategias para estabilizar y/o incorporar aceites ricos en AGPI n3. En este contexto, la encapsulación y microencapsulación de aceites, se ha planteado como una alternativa innovadora para aumentar la estabilidad de AGPI n3, enmascarar sus atributos sensoriales, controlar su liberación en el organismo y garantizar su biodisponibilidad, permitiendo así la fortificación de alimentos de consumo masivo (Polavarapu y col., 2011, Calvo y col., 2012, Gallardo y col., 2013). La encapsulación ofrece un amplio rango de oportunidades para la industria de los alimentos, especialmente en el área

de la innovación y formulación de nuevos productos (Ansorena y col., 2013), permitiendo así la fortificación de alimentos con ingredientes sensibles (Arab-Tehrany y col., 2012). A su vez, la oxidación y el estudio de los fenómenos oxidativos en los sistemas de encapsulación resultan muy complejos debido a que a las variables normalmente implicadas en la oxidación lipídica (grado de insaturación, oxígeno, luz, temperatura, prooxidantes y antioxidantes), se suman otros factores como tipo y concentración de los componentes de la matriz encapsulante, método de secado, interacciones fisicoquímicas con el aceite, tamaño de partícula, distribución lipídica, actividad de agua, etc., los cuales dependerán en gran parte, del procedimiento de encapsulación elegido (Dobarganes y col., 2003, Drusch y col., 2009).

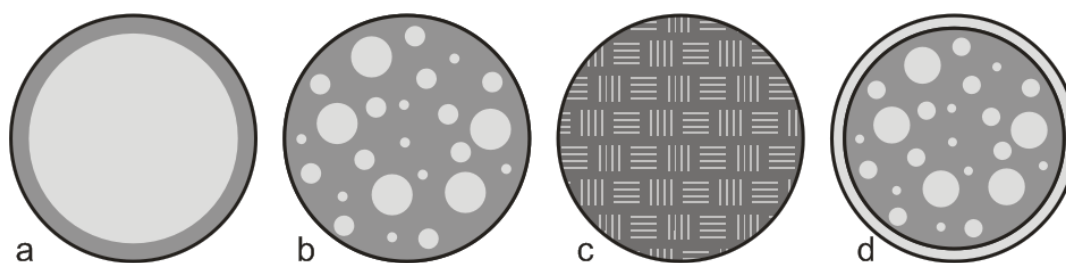
### **I.3 Fundamentos de la encapsulación**

En términos generales, la encapsulación consiste en atrapar sustancias sólidas, líquidas o gaseosas dentro de pequeñas estructuras (Desai y col., 2005, Zuidam y col., 2010). Las sustancias encapsuladas se denominan frecuentemente “núcleo”, “agente activo”, “relleno” o “fase interna”, mientras que las sustancias utilizadas como agentes encapsulantes se denominan “cubierta”, “membrana”, “coraza”, “fase externa”, “material de pared” o “matriz” (Zuidam y col., 2010, Nedovic y col., 2011). En relación al desarrollo de alimentos e ingredientes funcionales, las sustancias encapsuladas incluyen lípidos, ácidos grasos, fitoesteroles, pigmentos, vitaminas, péptidos, antioxidantes, minerales y células probióticas, entre otras. En cuanto a los materiales encapsulantes, comúnmente se emplean biomoléculas (polisacáridos, proteínas y lípidos) de grado alimentario, biodegradables, inertes frente al activo y preferentemente de bajo costo (Nedovic y col., 2011).

Uno de los principales propósitos de la encapsulación es aumentar la protección del compuesto activo durante el procesamiento y almacenamiento. El material encapsulante debe ser capaz de crear una barrera física que evite la exposición de la sustancia que se desea proteger a factores del entorno como humedad, oxígeno, calor, luz u otros componentes del alimento que afecten su estabilidad (Zuidam y col., 2010, Nedovic y col., 2011). Por otro lado, la encapsulación permite la liberación del activo en condiciones controladas. La sustancia de interés puede ser liberada en diferentes etapas del procesamiento, almacenamiento y/o consumo, en forma retardada o sostenida en el tiempo. En función del objetivo que se plantee, los mecanismos de liberación pueden activarse por efectos de la

temperatura, solvente (por disolución), acción mecánica (presión o cizalla), pH o enzimas (ej. tracto gastrointestinal: estómago, intestino grueso o intestino delgado) (Garti y col., 2012). Además, la encapsulación puede utilizarse para mejorar las propiedades fisicoquímicas del activo: permite enmascarar sabores, colores y olores desagradables, reducir la volatilidad, mejorar las propiedades de solubilidad y aumentar la biodisponibilidad (Zuidam y col., 2010, Nedovic y col., 2011). Puede usarse también como método para transformar un líquido en un sólido particulado y en este sentido, mejorar el transporte, manipulación y dosificación del agente activo lo cual constituye un importante beneficio para la industria de alimentos (Desai y col., 2005).

En función de la estructura de los encapsulados se distinguen dos tipos principales: de tipo reservorio y tipo matriz. Las estructuras del tipo reservorio, también denominadas “cápsulas” están formadas por una coraza y un único núcleo. Una variante de este sistema consiste en las estructuras de poli o multinúcleo, en que el activo se encuentra disperso en pequeños reservorios. Por otro lado, en los sistemas de tipo matriz, el activo se encuentra disperso homogéneamente dentro del material encapsulante. También existen sistemas compuestos donde la matriz o estructura multinúcleo se encuentra recubierta por una cubierta o coraza y en este caso se denominan sistemas de “multipared” o “multicapa” (Zuidam y col., 2010) (Figura I.3).



**Figura I.3** Encapsulados de tipo reservorio (a), multinúcleo (b), matriz (c) y estructura de multicapa (d).

A su vez, dependiendo del tamaño, los sistemas de encapsulación pueden clasificarse en cápsulas (0,001 a 3 mm), microcápsulas (0,1 a 1  $\mu\text{m}$ ) o nanocápsulas (1 a 100 nm).

Tanto la morfología como el tamaño resultan fuertemente condicionados por el método de encapsulación. En términos generales, los procesos de encapsulación comúnmente utilizados en la protección de ingredientes alimenticios pueden clasificarse en:

- Métodos físicos: secado por atomización, secado por congelamiento/enfriamiento, cubierta en lecho fluidizado, extrusión, co-cristalización, liofilización, etc.
- Métodos químicos: polimerización interfacial, inclusión molecular, etc.
- Métodos fisicoquímicos: coacervación simple y compleja, separación por fase orgánica, atrapamiento en liposomas, gelación iónica, etc.

Numerosas técnicas de encapsulación se han descrito en virtud de la naturaleza del activo, las propiedades físico-químicas del material soporte y la escala de procesamiento. El método de encapsulación y los materiales de pared resultan interdependientes. A su vez, el diseño y composición del sistema de encapsulación dependerá del activo que se desea proteger, la funcionalidad deseada del encapsulado y su comportamiento en el alimento en que se ha propuesto su aplicación (Nedovic y col., 2011, Garti y col., 2012).

### **I.3.1 Métodos de encapsulación de aceites ricos en AGPI n3**

La encapsulación de lípidos puede lograrse por diferentes procesos físicos y químicos tales como, emulsificación, secado por aspersion, encapsulación en liposomas, encapsulación molecular en ciclodextrinas, coacervación, gelación iónica, co-extrusión, entre otros (Augustin y col., 2010). Normalmente, la encapsulación de aceites implica en primera instancia la preparación de una emulsión en una dispersión acuosa de los materiales encapsulantes. La formación de una emulsión estable es esencial para lograr una encapsulación exitosa. El sistema podrá luego deshidratarse (por atomización, liofilización, secado al vacío, lecho fluidizado, etc.) a fin de obtener un sólido particulado (Dobarganes y col., 2003, Augustin y col., 2010).

Actualmente, el secado por aspersion es el método de encapsulación de lípidos más comúnmente utilizado (Drusch y col., 2009, Augustin y col., 2010, Aghbashlo y col., 2012). Este procedimiento presenta un alto rendimiento, es flexible, continuo, económico y el equipamiento requerido se encuentra disponible en la industria de alimentos (Augustin y col., 2010, Nedovic y col., 2011). Sin embargo, este método presenta varias limitaciones. Entre las más importantes se destaca una reducida capacidad de carga de aceite, una alta proporción de aceite superficial (o no encapsulado) y la inclusión de aire durante las etapas de emulsión que lleva a que la partícula se expanda durante la etapa de atomización resultando en una estructura hueca (Kralovec y col., 2012). En particular, se observó que la estabilidad

oxidativa de aceite de pescado encapsulado por secado por atomización resultó incluso menor que la del aceite libre (Kolanowski y col., 2006). La menor estabilidad oxidativa de las muestras secadas por atomización se atribuye principalmente a las altas temperaturas utilizadas durante el proceso (Dobarganes y col., 2003, Botrel y col., 2014) y al área superficial de las micropartículas que favorece la exposición al oxígeno del aire (Aghbashlo y col., 2012).

Recientemente, se propusieron otras tecnologías para la encapsulación de aceites como alternativas al secado por atomización usado tradicionalmente (Abang y col., 2012, Calvo y col., 2012, Wang y col., 2013). En especial, hay un creciente interés en el desarrollo de sistemas biopoliméricos preparados a partir de proteínas y polisacáridos, mediante procesos económicos y simples. En este contexto, se ha propuesto utilizar la gelación iónica para encapsular y estabilizar compuestos sensibles como los AGPI n3, ya que puede realizarse en condiciones moderadas (temperatura ambiente) (Peniche y col., 2004, Chan, 2011, Li y col., 2011, Abang y col., 2012).

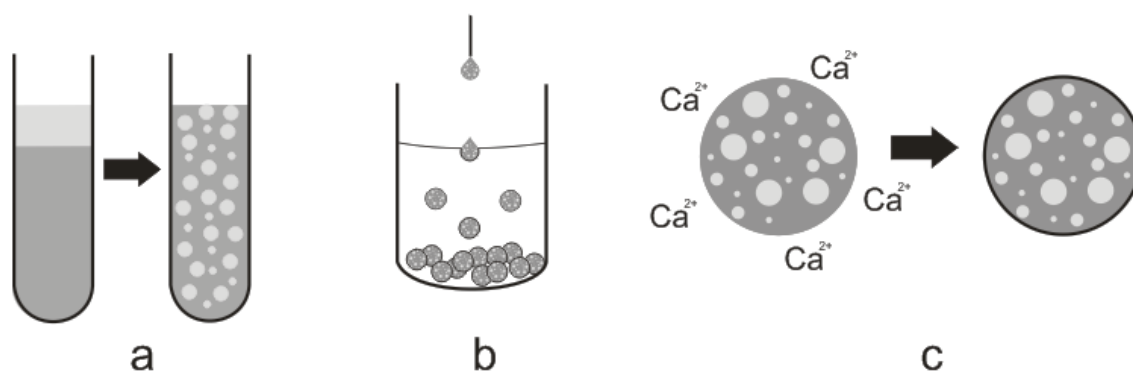
### I.3.2 Gelación iónica

La encapsulación por gelación iónica se basa en atrapar el activo de interés en una matriz polimérica que se genera por entrecruzamiento de las cadenas un polielectrolito cargado negativamente (comúnmente alginato) en presencia de cationes divalentes (normalmente  $\text{Ca}^{2+}$ ) (Zuidam y col., 2010). Esta técnica requiere en primer lugar la dispersión del activo en una suspensión acuosa del biopolímero o agente gelificante (Figura I.4a). El proceso de gelificación se induce por la presencia del catión, el cual actúa de puente uniendo distintas cadenas del hidocoloide (Garti y col., 2012). Estas interacciones conducen a la formación de una red compleja, cuyas características dependen de la forma en que se introduce el agente de entrecruzamiento pudiendo resultar en un proceso de gelación *interna* o *externa* (Zuidam y col., 2010). La *gelificación interna*, requiere la liberación controlada del ion (generalmente  $\text{Ca}^{2+}$ ) desde una fuente inactiva ( $\text{CaCO}_3$ , Ca-EDTA, citrato de Ca) que se mezcla inicialmente con la suspensión del polielectrolito. Posteriormente, modificando el pH se promueve la liberación y distribución homogénea del catión. En el proceso de *gelificación externa*, la solución conteniendo el hidocoloide se introduce por goteo en una solución iónica. En este caso, el catión difunde hasta la superficie de la gota produciendo en la interfase un



reordenamiento estructural de las cadenas del polielectrolito, resultando en un material sólido con características de gel (Rehm, 2009). Conforme el catión difunde hacia el centro de la gota, el polímero migra hacia la superficie estableciéndose un gradiente de concentración que disminuye hacia el interior de la cápsula. La formación de una corteza de mayor densidad contribuye a reducir la porosidad, aunque la gelificación en el centro puede resultar dificultada.

El proceso de gelificación externa ha dado origen al método de encapsulación por inyección o extrusión, también descrito como “método del goteo” (Figura I.4 b), en el que el activo se dispersa inicialmente en la suspensión de alginato, y posteriormente es introducido en la solución iónica por medio de un dispositivo extrusor (aguja) de tamaño definido y a una velocidad de goteo controlada. Las partículas de gel son retenidas durante un cierto tiempo en la solución gelificante (maduración), favoreciendo la consolidación de estructuras firmes.



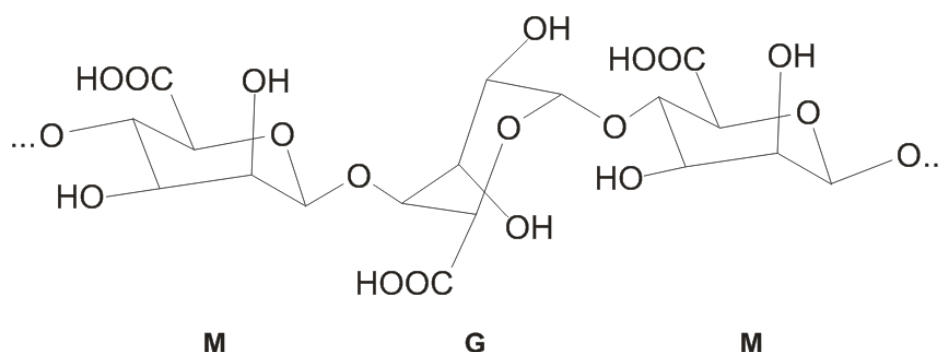
**Figura I.4** Esquema gráfico de gelación iónica externa para la encapsulación de activos lipofílicos (aceite). Emulsión (a). Goteo (b). Formación de cápsulas por gelación iónica (c).

### I.3.3 Materiales de pared

Diferentes polielectrolitos se han utilizado en procesos de gelación iónica siendo el alginato el más empleado en la industria de los alimentos (Rehm, 2009). La preparación de sistemas mixtos con agregado de otros hidrocoloides (gomas, almidones, etc.) (Pongjanyakul y col., 2007, Córdoba y col., 2013, Wang y col., 2013) y estructuras de multicapa (quitosano, etc.) (Peniche y col., 2004) permite modular las propiedades físico-químicas y estructurales de los encapsulados, y lograr procesos de encapsulación más eficientes, tanto para la protección y como para la liberación del principio activo (Li y col., 2011).

### I.3.3.1 Alginato

Comercialmente, el alginato se presenta como una sal sódica del ácido algínico, proveniente de algas marrones (*Phaeophyceae*) y ciertos microorganismos (*Azotobacter* y *Pseudomonas*) (Rehm 2009). El ácido algínico es un polisacárido lineal poliiónico e hidrofílico compuesto de dos unidades monoméricas de ácido  $\beta$ -D-manopiranosilurónico (M) y ácido  $\alpha$ -L-glucopiranosilurónico (G) organizadas en regiones homogéneas o heterogéneas. Los segmentos que contienen sólo unidades de D-manopiranosil se denominan bloques-M y por su configuración  ${}^4C_1$ , adoptan estructuras de cintas planas. Por otro lado, los segmentos que contienen sólo unidades de L-glucopiranosil, se denominan bloques-G y por su configuración  ${}^1C_4$ , adoptan conformaciones plisadas o corrugadas (Figura I.5).

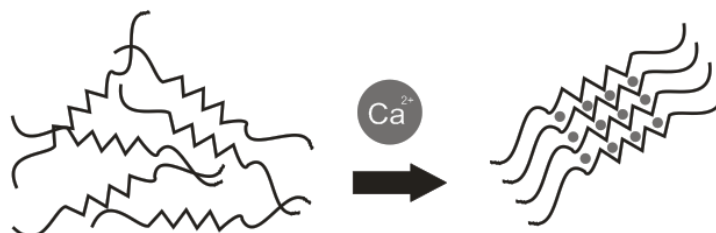


**Figura I.5** Estructura química del ácido algínico. M= ácido  $\beta$ -D-manurónico, G = ácido  $\alpha$ -L-glucurónico.

En presencia de cationes divalentes, normalmente  $\text{Ca}^{2+}$ , el ácido algínico forma geles estables e insolubles. Inicialmente, la gelación involucra a las porciones extendidas de dos cadenas con residuos G que dejan huecos donde se ubican los cationes  $\text{Ca}^{2+}$ , que por interacción electrostática mantiene juntas las cadenas del polisacárido en la formación de una estructura denominada “caja de huevos” (Grant y col., 1973). Cada ion  $\text{Ca}^{2+}$  se coordina con nueve átomos de oxígeno y se genera así una red tridimensional de alginato de calcio (Figura I.6) (Pongjanyakul y col., 2007).

La habilidad del alginato de atrapar iones es la característica básica que controla la formación del hidrogel. La cinética de gelación puede ser afectada por la temperatura, por la concentración de alginato y del ion, así como por el método utilizado para inducir la gelación.

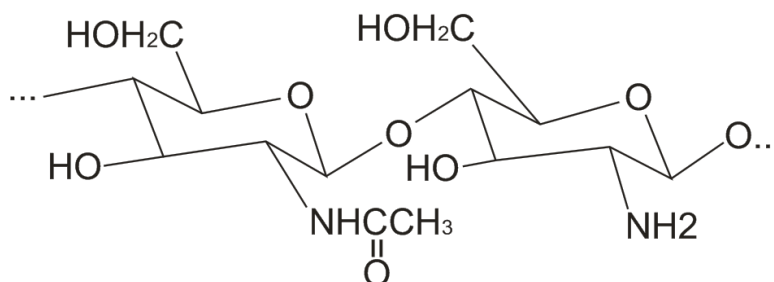
Además de las propiedades gelificantes, estabilizantes y espesantes, el alginato posee excelentes propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad y mucoadhesividad, razones por la que resulta de gran interés como agente encapsulante para la industria alimentaria (Çetinus y col., 2009, Rehm, 2009).



**Figura I.6** Formación de la red de alginato- $\text{Ca}^{2+}$ .

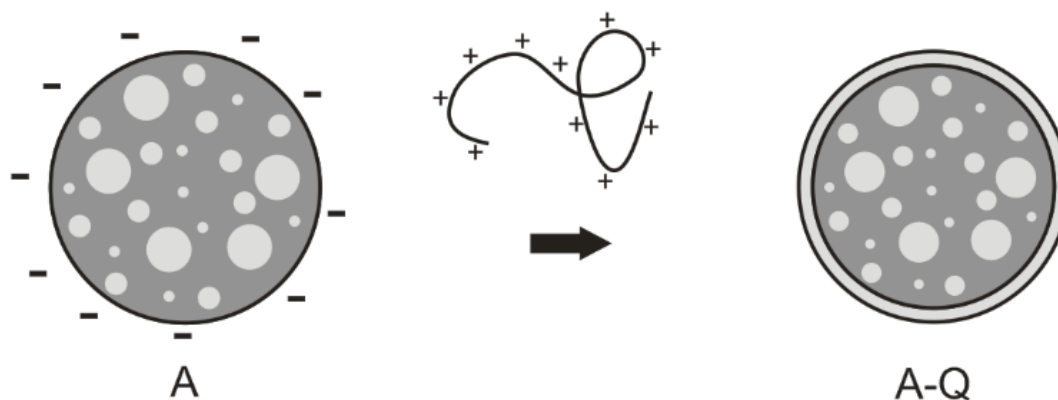
### 1.3.3.2 Quitosano

El quitosano es un copolímero lineal formado por unidades de N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina unidas por uniones  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4). Es un derivado N-desacetilado de la quitina, y debido a que la desacetilación nunca es completa, presenta grupos aminos cargados positivamente, que lo convierten en un polisacárido policationico (Bhattacharai y col., 2011). Esta propiedad le permite al quitosano formar complejos por interacción iónica con polielectrolitos cargados negativamente tales como el alginato. La interacción alginato-quitosano, ha sido bien documentada en relación a la preparación de sistemas de encapsulación. El uso conjunto de estos biopolímeros abre la posibilidad de regular la liberación, reducir la permeabilidad y mejorar las propiedades mecánicas de los encapsulados y de protección del activo (Peniche y col., 2004, Bhattacharai y col., 2011).



**Figura I.7** Estructura química del quitosano.

La porosidad de las cápsulas de alginato- $\text{Ca}^{2+}$  resulta muchas veces problemática para aquellas aplicaciones en las que el activo requiere una alta retención y protección frente al oxígeno (Peniche y col., 2004, Gal y col., 2007, Nayak y col., 2012). En este sentido, la adsorción electrostática de una capa de quitosano sobre la superficie de cápsulas de alginato- $\text{Ca}^{2+}$  surge como una estrategia interesante (Figura I.8) (Peniche y col., 2004, Bhattarai y col., 2011).



**Figura I.8** Esquema gráfico de la adsorción electrostática de quitosano sobre cápsulas de alginato- $\text{Ca}^{2+}$  (A) para la formación de estructura recubierta de alginato-quitosano (A-Q).

El recubrimiento con quitosano se ha propuesto para aumentar la densidad de polímeros en la superficie de la cápsula y limitar así la difusión del activo (Peniche y col., 2004, Garti y col., 2012). La adsorción de quitosano sobre la superficie de las cápsulas se basa en la disponibilidad de cargas negativas presentes en las moléculas de alginato (Li y col., 2007). En condiciones de pH adecuado, el quitosano ( $\text{pK}_a \approx 6,5$ ) presenta grupos  $\text{NH}_3^+$  capaces de interactuar con los grupos  $\text{COO}^-$  del alginato, remanentes a la formación de complejos carboxilato de calcio.

### 1.3.3.3 Combinación de hidrocoloides

Limitaciones asociadas a la permeabilidad de la estructura y al control de la liberación del activo, llevaron a la introducción de distintos hidrocoloides como componentes funcionales en cápsulas de alginato- $\text{Ca}^{2+}$ . Wichchukit y col. (2013) incorporaron proteínas de suero lácteo (WPI) como componente del material de pared en cápsulas de polielectrolitos conteniendo riboflavina. Estos autores, encontraron que la introducción de WPI favoreció la integridad estructural de los encapsulados y moduló la cinética de liberación del activo. Pongjanyakul

y col. (2007) utilizaron goma xántica para mejorar la estructura cápsulas de alginato conteniendo Diclofenac. Estos autores, informaron que la introducción de la goma aumentó la eficiencia de atrapamiento del activo así como la capacidad de hinchamiento y absorción de agua, a la vez que disminuyó la velocidad de liberación. Córdoba y col. (2013) utilizaron almidón de maíz como agente de relleno en cápsulas de alginato-Ca<sup>2+</sup> conteniendo extractos de yerba mate. Encontraron que la incorporación de almidón aumentó la retención de activo y postergó su liberación en condiciones gastrointestinales.

En todos los casos, la incorporación de hidrocoloides y agentes de relleno, condujo a una modificación de las propiedades físico-químicas de los encapsulados. El entendimiento de las interacciones moleculares entre los biopolímeros, resulta por tanto, clave en el diseño racional de ingredientes funcionales. En el presente trabajo, la introducción de la goma exudada de *P. alba*, como material de pared en sistemas de gelación iónica requerirá una caracterización inicial del hidrocoloide y evaluación del efecto de su incorporación sobre la estructura de la matriz, propiedades fisicoquímicas y estabilidad de los encapsulados.

### I.4 Alimentos funcionales

Un alimento funcional es todo aquel (natural o procesado) que contiene uno o más compuestos específicos con la capacidad de influir en la salud y bienestar de los consumidores. Estos compuestos pueden ser adicionados, removidos, mejorados o modificados naturalmente en un alimento para proveer beneficios a la salud, principalmente en las etapas tempranas de desarrollo y crecimiento, para la regulación de procesos metabólicos, defensa contra el estrés oxidativo, prevención de patologías cardiovasculares y gastrointestinales, rendimiento cognitivo y mental y estado físico (Tur y col., 2016a).

El desarrollo de productos alimenticios funcionales resulta ser cada vez más desafiante para la industria alimentaria, ya que estos deben cumplir con la expectativa del consumidor quien demanda productos simultáneamente sabrosos y saludables (Shah, 2007).

En la industria cárnica, el desarrollo de alimentos funcionales constituye una excelente oportunidad para la diversificación de productos (Olmedilla-Alonso y col., 2013) y una estrategia para la captación de un mercado creciente (Arihara, 2006, Olmedilla-Alonso y col., 2013). La funcionalización de productos cárnicos se ha orientado a mejorar la calidad y la

imagen de los productos cárnicos mediante el aumento de propiedades beneficiosas para la salud (Arihara, 2006, Jiménez-Colmenero, 2007, Zhang y col., 2010).

Se reconoce que la carne vacuna constituye una de las principales fuentes de proteínas alimentarias de alto valor biológico y de valiosos micronutrientes tales como minerales (hierro) y vitaminas (B12 y ácido fólico), cuya biodisponibilidad es mayor que en otros alimentos (Arihara, 2006, Bilek y col., 2009). A pesar de ello, la carne y productos elaborados en base de carne, pueden contener grandes cantidades de grasas saturadas, sal, colesterol y, en algunos, casos sales de cura (nitritos y nitratos) (Ansorena y col., 2013). Los consumidores son cada vez más conscientes de los efectos que estos compuestos ejercen en la salud, principalmente en la obesidad y en el padecimiento de enfermedades cardiovasculares (Fernández-Ginés y col., 2005, Olmedilla-Alonso y col., 2013), entre otros riesgos. Por esta razón la industria cárnica ha orientado su atención a la elaboración de productos más saludables (Kralovec y col., 2012, Olmedilla-Alonso y col., 2013).

Las estrategias orientadas a mejorar el perfil nutricional de los productos cárnicos consisten principalmente en el aumento natural o introducción de compuestos beneficiosos para la salud, y por otro, la disminución de aquellos menos saludables (Fernández-Ginés y col., 2005, Ansorena y col., 2013). Con esta finalidad, diversos trabajos han reportado la incorporación de aceites vegetales (Valencia y col., 2008), aceites marinos (Salcedo-Sandoval y col., 2015), extractos naturales, vegetales, harinas (Bilek y col., 2009) y fibras, a productos cárnicos crudos, cocidos y/o fermentados para mejorar sus propiedades nutricionales (Zhang y col., 2010).

La incorporación de aceites ricos en ácidos grasos poliinsaturados en reemplazo parcial de grasas saturadas, es una de las modificaciones más frecuentes (Jiménez-Colmenero, 2007, Valencia y col., 2008). Con este propósito, aceites vegetales ricos en ácido  $\alpha$ -linolénico (C18:3, n3) y aceites marinos, ricos en ácidos grasos n3 de larga cadena, han sido los ingredientes tradicionalmente utilizados (Jiménez-Colmenero, 2007, Ansorena y col., 2013). Más recientemente, se ha propuesto la introducción de aceites pre-emulsionados adicionados con antioxidantes para el control de la oxidación lipídica (Salcedo-Sandoval y col., 2015). En efecto, minimizar el impacto en las propiedades sensoriales, aumentar en la estabilidad oxidativa y garantizar la biodisponibilidad de los lípidos de alto valor nutricional, resultan

los principales desafíos (Ansorena y col., 2004, Pelsler y col., 2007, Salcedo-Sandoval y col., 2015).

En este contexto, la introducción de AGPI n3 encapsulados en cárnicos podría resultar una alternativa útil para el enriquecimiento (Pelsler y col., 2007, Salcedo-Sandoval y col., 2015). La adición de compuestos bioactivos a productos cárnicos es aún objeto de estudio (Ansorena y col., 2013). El enriquecimiento exitoso por incorporación de encapsulados en los productos alimenticios es una tarea difícil (Garti y col., 2012), debido a que cada alimento plantea condiciones específicas respecto a sus propiedades fisicoquímicas ( $a_w$ , pH, fuerza iónica, metales, etc.), condiciones de procesamiento (reducción de tamaño, calentamiento, etc.) y almacenamiento (refrigeración, congelación, etc.) (Salcedo-Sandoval y col., 2015).

La popularidad del consumo de hamburguesas y medallones de carne, ofrece una gran oportunidad para el desarrollo de una estrategia exitosa de enriquecimiento dietario con ácidos grasos n3. Sin embargo, como se ha descrito, la introducción de aceites ricos en AGPI n3 aumenta la susceptibilidad a los fenómenos oxidativos, a la acumulación de sustancias potencialmente tóxicas y de sabores y aromas desagradables. El enriquecimiento de estos productos con aceite de pescado encapsulado pretende no sólo obtener alimentos con un adecuado valor nutricional, sino además postergar los fenómenos oxidativos confiriéndole a los productos funcionales una extendida vida de anaquel (Salcedo-Sandoval y col., 2015).

## **II. OBJETIVOS**



## II. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL:

El objetivo general del trabajo fue avanzar en la comprensión de la influencia de los factores físico-químicos e interacciones que afectan la estabilidad de ácidos grasos poliinsaturados en cápsulas de polielectrolitos naturales para el desarrollo de alimentos funcionales. En particular, se caracterizó el comportamiento de la goma exudada de *Prosopis alba* (GAL), un recurso autóctono actualmente desaprovechado, como excipiente no convencional para su incorporación en sistemas de encapsulación y sistemas alimenticios.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ✓ Evaluar el efecto de distintos métodos de purificación de la goma exudada de *Prosopis alba* de la región centro-chaqueña sobre la composición y propiedades físico-químicas del exudado, en comparación con la goma arábiga comúnmente utilizada en alimentos.
- ✓ Estudiar las propiedades funcionales de la goma que permitan concluir sobre su aplicabilidad como excipiente en sistemas de encapsulación, ingredientes o alimentos. En particular, se estudiarán las propiedades de hidratación, reológicas, emulsionantes, antioxidantes, térmicas y de sorción.
- ✓ Evaluar la funcionalidad de la goma como componente de material de pared para mejorar la estabilidad oxidativa de compuestos lipídicos sensibles (aceite de pescado) encapsulados por gelación iónica en matrices compuestas alginato-quitosano.
- ✓ Estudiar la estabilidad oxidativa del aceite de pescado encapsulado en matrices de polielectrolitos conteniendo GAL, en relación con las características fisicoquímicas y estructurales de las cápsulas.
- ✓ Evaluar la posible incorporación de los encapsulados como ingrediente para enriquecer con AGMI n3 productos cárnicos tipo hamburguesa.

# **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### III.1 Elección de los sistemas

Se propuso obtener y caracterizar la goma exudada de *Prosopis alba* (GAL) con el fin de aprovechar un recurso natural autóctono actualmente desaprovechado. Se trata de una especie arbórea nativa, y cultivada en plantaciones destinadas a su protección de distintas localidades de la Provincia del Chaco. Darle valor agregado a este recurso podría redundar en beneficios económicos y nuevas oportunidades para el desarrollo económico local. El aprovechamiento de este recurso requiere, por tanto, estandarizar un método de recolección, purificación y conservación, así como un estudio profundo de sus propiedades fisicoquímicas, estructurales, funcionales y toxicológicas, que permitan evaluar la aplicación potencial de la goma en sistemas alimentarios. Los estudios de propiedades químicas y funcionales se realizaron en comparación con la goma arábica, obtenida del árbol de *Acacia* dada la similitud botánica de las especies productoras (López-Franco y col., 2012). Se propuso utilizar la goma exudada de *Prosopis alba* (GAL) como ingrediente funcional en polvo o como componente de material de pared en sistemas de encapsulación por gelación iónica.

Se utilizó aceite de pescado como compuesto activo debido a su alto valor nutricional (más del 35% de ácidos grasos poliinsaturados, AGPI), lo cual justifica su incorporación en alimentos saludables. Dada la susceptibilidad de este aceite a los fenómenos oxidativos, la estabilización por encapsulación constituye una alternativa interesante. En particular la gelación iónica tiene la ventaja de ser un proceso a temperatura ambiente, sencillo y de bajo costo. La goma exudada de *Prosopis alba* se utilizó en matrices compuestas de alginato y quitosano, ambos polielectrolitos naturales comúnmente utilizados en el diseño de cápsulas preparadas por gelación iónica.

Los encapsulados conteniendo aceite rico en AGPI n3 y GAL como material de pared, se utilizaron en la preparación de productos cárnicos tipo hamburguesas. Se evaluó si la encapsulación del aceite y la presencia de GAL permiten mejorar el valor nutricional y la estabilidad oxidativa del producto enriquecido.

### III.2 Materiales y sistemas analizados

#### III.2.1 Exudados naturales

- Goma exudada de *Prosopis alba* (GAL)
- Goma arábiga (GA), del árbol de *Acacia*, SIGMA (pureza>95%), comúnmente utilizada en la industria de alimentos.

#### III.2.2 Emulsiones y cápsulas de polielectrolitos

- Compuesto activo: Aceite comercial de pescado, cordialmente provisto por la firma GHION, Mar del Plata Argentina.
- Materiales de pared:
  - Goma exudada de *Prosopis alba*
  - Alginato (A), Algogel 6020, P.M. = 135 kDa
  - Quitosano (Q), Sigma-Aldrich, P.M. = 190–310 kDa, con un grado de desacetilación de 75–85%.
  - Cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) (Cicarelli S.A., Argentina), P.M. = 111 g/mol.

#### III.2.3 Alimento cárnico (tipo hamburguesa) enriquecido con AGPI n3

Se elaboraron hamburguesas a base de carne vacuna (*gluteus medius*) con una combinación de cortes de cerdo (tocino), aceite de pescado (libre o encapsulado) y sal.

### III.3 Obtención y preparación de los sistemas

#### III.3.1 Obtención de la goma exudada de algarrobo blanco (*Prosopis alba*)

La goma exudada de *Prosopis alba* se recolectó manualmente de árboles nativos y árboles protegidos en plantaciones de varias localidades de la región central de la provincia del Chaco, Argentina. Las muestras se extrajeron en los períodos de sequía de las estaciones de verano e invierno de 2012-2013.

Cada árbol productor de goma, así como el material obtenido del mismo, fue codificado para poder verificar la identidad botánica de la especie antes de realizar el acopio de materia

prima. Con esta finalidad, se construyó un herbario constituido por hoja, flor, y fruto de cada espécimen. La identificación botánica se realizó en el IBONE (Instituto Botánico del Nordeste, CONICET) Provincia de Corrientes, a cargo del Ing. Roberto Vanni (especialista en *Prosopis spp.*). Una vez confirmada la identidad de las especies se obtuvieron aproximadamente 900 g de muestra, los cuales se conservaron en un envase hermético al abrigo de la luz. Debido a que las condiciones y modo de extracción afectan la composición del material, se procedió a purificar la muestra para disponer así de un material de composición constante y homogénea para trabajar.

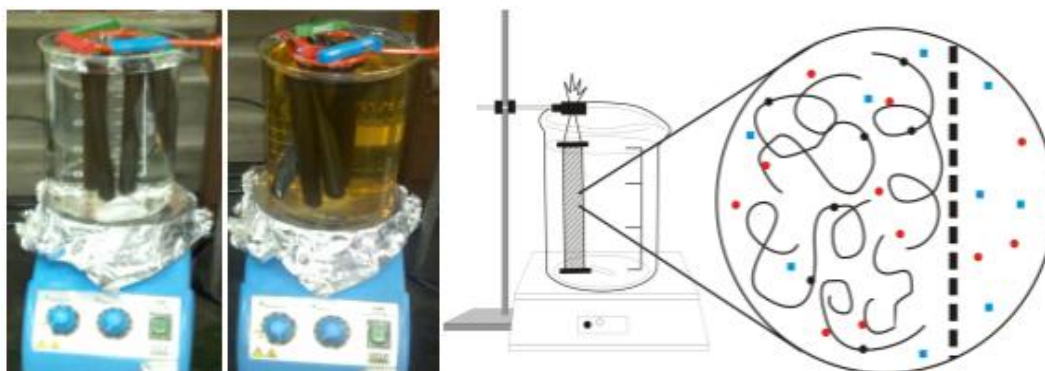
### ***III.3.1.1 Purificación de la goma***

Los exudados obtenidos se fragmentaron y se disolvieron en agua bidestilada en una concentración 20% p/v. La hidratación de los exudados en agua condujo a una suspensión heterogénea, la fracción insoluble contenía principalmente restos de corteza, insectos, y partículas de polvo, y el sobrenadante era de color marrón oscuro y opalescente. El porcentaje de material insoluble varió significativamente entre los lotes de muestra, ya que depende de la forma de recolección, así como de las condiciones ambientales durante el proceso de exudación. La suspensión se trató térmicamente (60 min, 75°C), para reducir la carga microbiana y detener la actividad enzimática (Beristain y col., 2002). Luego se clarificó por filtración utilizando mallas de distintas tramas y finalmente papel de filtro Whatman No. 4. Las soluciones filtradas se congelaron (-40°C) y posteriormente se liofilizaron (48 h a una presión de 0,02 mmHg, en un liofilizador Rificor, Modelo L-I-E300-CRT, Buenos Aires, Argentina). La muestra deshidratada se conservó en envases herméticamente sellados y en la oscuridad hasta su utilización. La muestra deshidratada se purificó además por dos métodos comúnmente empleados en la obtención de gomas exudadas: diálisis y precipitación alcohólica. Por lo tanto se obtuvieron muestras con distinto grado de purificación:

a. **Goma filtrada (F-GAL)**

b. **Goma filtrada + diálisis (D-GAL):** Las muestras preparadas por filtración y deshidratadas por liofilización, se suspendieron en agua bidestilada en una relación 1:10 y se agitaron durante 2 h. La suspensión se sometió a un proceso de diálisis que permite separar sustancias de bajo PM (Orozco-Villafuerte y col., 2003, López-Franco y col., 2012). Para

ello se utilizaron membranas tubulares de corte de peso molecular (MWCO) de 10 KDa. La diálisis se realizó en agua destilada, agitación moderada y recambios sucesivos durante 48 h. Finalizado el proceso, la solución dializada se congeló a  $-40^{\circ}\text{C}$  y se liofilizó en las condiciones descritas previamente. La muestra deshidratada se conservó en envases herméticamente sellados y en la oscuridad hasta su utilización.



**Figura III.1** Esquema gráfico del proceso de diálisis.

c. **Goma filtrada + precipitación alcohólica (P-GAL):** Las muestras preparadas por filtración y deshidratadas por liofilización, se suspendieron en agua bidestilada en una relación 1:10 y se agitaron durante 2 h. Luego se añadieron 8 volúmenes de etanol absoluto en forma progresiva favoreciendo la homogenización del medio. La suspensión inicialmente traslúcida resultó en una dispersión blanquecina que posteriormente se centrifugó (3000 rpm, 10 min) para separar el sobrenadante. El precipitado, compuesto principalmente por la fracción insoluble en etanol, se deshidrató por liofilización en las condiciones antes descritas. La muestra deshidratada se conservó en envases herméticamente sellados en la oscuridad hasta su caracterización.

### III.4 Preparación de emulsiones aceite/goma

Se prepararon suspensiones acuosas de GAL y GA en concentraciones 2 y 5% p/v. Las gomas se dispersaron en agua bidestilada, agitando durante 24 h para lograr una completa hidratación. La fase oleosa (aceite de pescado) (1 g) se pre-emulsionó junto con la suspensión acuosa de GAL o GA (9 g) en tubos plásticos de 50 ml empleando un agitador Ultra-turrax

T18 (Staufen, Germany), a velocidad media durante 2 minutos y posteriormente a 20.000 rpm durante 3 minutos.

### III.5 Preparación de cápsulas de polielectrolitos conteniendo aceite de pescado

#### III.5.1 Diagramas de fase GAL-alginato y GAL-alginato-Ca<sup>2+</sup>

Con el fin de evaluar las interacciones de GAL-alginato se construyó un diagrama de fases para estudiar la influencia de las concentraciones relativas de ambos polímeros en el estado físico de la mezcla. Se prepararon suspensiones de alginato y GAL en agua bidestilada a distintas concentraciones de acuerdo con un planteamiento de red simple (Correa, 2003). Las suspensiones se dejaron reposar durante toda la noche para garantizar la hidratación plena de los hidrocoloides. La caracterización de los sistemas se realizó en forma observacional luego de mantener los sistemas 24 h a 25 °C. Se definió como *SOL* a los sistemas que conservaron la fluidez, y *GEL* a aquellos cuyo flujo resultó fuertemente impedido. Las regiones *SOL* y *GEL* se delimitaron por curvas que separan en forma equidistante los puntos (concentraciones) examinados experimentalmente.

Siguiendo la misma metodología, se evaluó la influencia de distintas concentraciones de GAL y de CaCl<sub>2</sub> para que se forme un gel. Para ello se construyó un diagrama bidimensional a concentración de alginato constante (1 % p/v) y distintas concentraciones de GAL (0,5 – 4 % p/v) y CaCl<sub>2</sub> (rango 0,5 – 2,5 % p/v) (Mestdagh y col., 1999, Correa, 2003). La caracterización de los sistemas (*SOL*, *GEL* y presencia de *SINÉRESIS* (solución en la matriz sólida) se realizó en forma observacional, inmediatamente después de su preparación y luego de 24 h a 25 °C. Las distintas regiones se delimitaron por curvas que separan en forma equidistante los puntos (concentraciones) examinados experimentalmente.

#### III.5.2 Diagramas de fase GAL-alginato y GAL-alginato-Ca<sup>2+</sup>

Previo a la generación de cápsulas, se prepararon emulsiones conteniendo el compuesto activo a encapsular (aceite de pescado) en soluciones acuosas de alginato o alginato en presencia de GAL o GA. La composición de la emulsión se determinó en base a resultados obtenidos a partir de diagramas de fase (ver sección III.5.1):

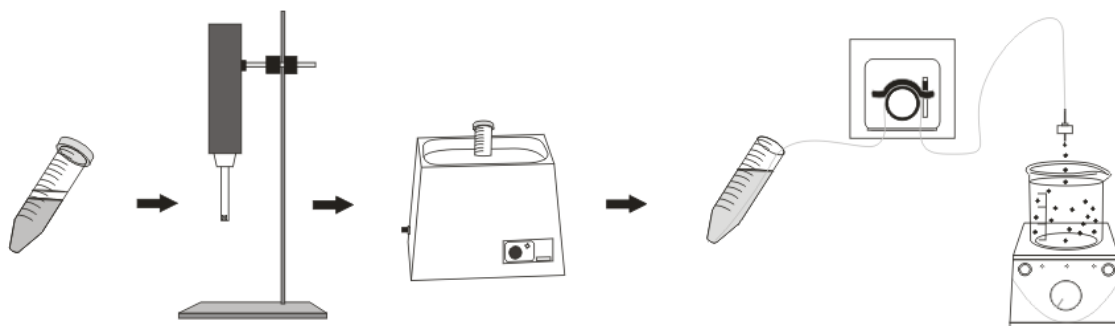
- Emulsión 1: aceite 10% p/p, alginato 1% p/p y agua 89% p/p.

- Emulsión 2: aceite 10% p/p, alginato 1% p/p, GAL 2 % p/p y agua 87% p/p.

Los hidrocoloides se filtraron previo a la preparación (para eliminar impurezas que pudieran obstruir el sistema de generación de cápsulas) y se dispersaron en agua bidestilada, agitando durante 24 h para lograr una completa hidratación. La fase oleosa (1 g) se pre-emulsionó junto con la suspensión de polielectrolitos (alginato o alginato-goma) (9 g), en tubos plásticos de 50 ml empleando un agitador Ultra-turrax T18 (Staufen, Germany), a velocidad media durante 2 minutos y posteriormente a 20.000 rpm durante 3 minutos. Finalmente la emulsión obtenida se colocó en un baño de ultrasonido para eliminar posibles burbujas de aire.

### III.5.3 Generación de cápsulas de polielectrolitos

Las cápsulas se generaron por goteo utilizando una bomba peristáltica (Boading Longer Precision Pump Co, Ltd, China) ajustada a  $9 \pm 0,1$  rpm y manguera de silicona de (d.i. 1 mm, d.e. 3 mm) provista con aguja (d.i. 0,25 mm), la cual se dispuso a 6 cm de la superficie de la solución de  $\text{CaCl}_2$  (2% p/v). El baño gelificante, se mantuvo refrigerado en baño de hielo y con agitación moderada. Luego de la última gota se continuó con agitación durante 10 minutos adicionales. Seguidamente, las cápsulas se filtraron al vacío y se enjuagaron con solución de  $\text{CaCl}_2$ , como paso previo a su introducción en 10 ml de solución de quitosano (1% p/v en HCl 0,1 M) en que se mantuvieron por 10 minutos en baño de hielo con agitación moderada. Finalmente las cápsulas se separaron por filtración, se lavaron con agua bidestilada y se dispersaron en placas plásticas para su deshidratación. En la Figura III.2 se ilustra el sistema de preparación empleado:



**Figura III.2** Esquema de preparación de cápsulas de aceite de pescado por gelación iónica.



### III.5.4 Secado de las cápsulas

- Secado al vacío: las cápsulas se deshidrataron a 30 °C en estufa de vacío 700 mbar durante 24 h, con sílica como agente desecante.
- Liofilización: las cápsulas se congelaron a -18 °C por 24 h y se liofilizaron durante 48 h.

Luego del secado, las cápsulas se conservaron en atmósfera de N<sub>2</sub>, en viales sellados a temperatura de congelación (-18 °C), o bien se equilibraron en atmosfera de HR controlada a diferentes actividades de agua ( $a_w$ ).

### III.6 Determinaciones realizadas para excipientes (gomas) y/o cápsulas deshidratadas

#### III.6.1 Contenido total de carbohidratos

La determinación de carbohidratos totales se realizó por el método colorimétrico descrito por Dubois (Dubois y col., 1956) comúnmente usado en el estudio de la composición de gomas exudadas (Orozco-Villafuerte y col., 2003, Román-Guerrero y col., 2009). La cuantificación se realizó utilizando glucosa como estándar (0,005 - 0,01 mg/ml), a partir de una curva de calibración que resultó  $y=10,476x$  ( $R^2=0,99$ ). Los resultados se expresaron como % glucosa en b.s..

#### III.6.2 Nitrógeno total y proteínas

El contenido de nitrógeno total se determinó por el método de Kjeldahl en un digestor y destilador ICESA (Buenos Aires, Argentina) y el contenido de proteínas se calculó utilizando un factor de conversión de 6,25 según lo propuesto por Anderson and Farquar (1982) para exudados de *Prosopis spp*. Los resultados se expresaron como % de nitrógeno en b.s. y % de proteína en b.s..

### III.6.3 Contenido de cenizas

El contenido de materias inorgánicas se cuantificó en términos de la cantidad de cenizas remanentes al proceso de calcinación a 550°C durante 3 h en horno mufla. El contenido de materias inorgánicas se calculó como mg de ceniza/g de goma b.s..

### III.6.4 Sodio, Potasio y Calcio

La determinación de sodio, potasio y calcio, se realizó por fotometría de llama según el método oficial 956.01 AOAC, 1998. Los resultados se expresaron como mg de catión/ g de goma b.s..

### III.6.5 Contenido de agua

El contenido de agua de gomas y cápsulas se determinó por diferencia de pesos antes y después de deshidratar las muestras a 105°C hasta peso constante. Los resultados se expresaron dependiendo del sistema en estudio en base húmeda (% b.h.) y/o en base seca (% b.s.).

$$H, \% \text{ b. h.} = \frac{g \text{ de agua}}{g \text{ de cápsulas}} * 100\% \quad (1)$$

$$H, \% \text{ b. s.} = \frac{g \text{ de agua}}{g \text{ de sólidos secos}} * 100\% \quad (2)$$

### III.6.6 Actividad de agua

La medición de la actividad de agua de gomas y cápsulas se realizó a 25°C utilizando un equipo marca Aqualab (Decagon Devices, Inc, USA) que determina el punto de rocío del sistema.

### III.6.7 Polifenoles totales

El contenido de polifenólicos totales se determinó por el método colorimétrico de Folin-Cicolteau descrito por Shen y col. (Shen y col., 2009) con ligeras modificaciones (Shen y col., 2009). Una alícuota (1,0 ml) de solución de muestra (o estándar) se mezcló con 9 ml de

agua y 0,5 ml del reactivo de Folin-Cicolteau (Sigma Aldrich). La mezcla de reacción se neutralizó con 1 ml de solución saturada de carbonato de sodio (20% p/v) y luego se incubó por 60 min a temperatura ambiente. La absorbancia de la solución se midió espectrofotométricamente a 765 nm. La cuantificación de polifenólicos totales se realizó a partir de una curva de calibración utilizando ácido gálico como estándar. Los resultados se expresaron en equivalentes de ácido gálico (curva de calibración  $y=7,785x$ ;  $R^2=0,993$ ) o en equivalentes de ácido tánico ( $y=6,153x$ ;  $R^2=0,992$ ).

### III.6.8 Taninos

El contenido de taninos totales presentes en la muestra se cuantificó usando dos aproximaciones. Por un lado, se aplicó el método colorimétrico propuesto por Anderson y Weiping (1989b) para la cuantificación directa de taninos en exudados gomosos (soluciones al 2% p/v), utilizando ácido tánico como estándar para el trazado de la curva de calibración. Esta técnica se ha reportado por varios autores en la investigación y caracterización de exudados gomosos. Brevemente, 5 ml de una solución de la muestra (o estándar) se mezcló con 20  $\mu$ L de solución de cloruro férrico (9% p/v). Luego de agitar, la absorbancia de las muestras se determinó a 430 nm.

Por otro lado, la cantidad de taninos se cuantificó en forma indirecta de acuerdo con el método propuesto por von Martius y col. (2012), por el cual, concentración de taninos se calcula como la diferencia en el contenido de polifenólicos, antes y después de precipitar a los taninos presentes en solución con gelatina. Con esta finalidad, 2 ml de solución de goma se mezclaron con 1 ml de solución de gelatina (2,5% p/v, preparada en solución saturada de NaCl y disuelta por calentamiento). Adicionalmente, se adicionaron 7 ml de solución ácida de NaCl, preparada por disolución de 2,5 ml de  $H_2SO_4$  (c) en solución saturada de NaCl. La muestra se agitó suavemente durante 15 min a temperatura ambiente. Finalmente, la mezcla se centrifugó a 3000 rpm por 10 min. Una alícuota de 1 ml se extrajo del sobrenadante y se sometió al ensayo de Folin-Cicolteau descrito previamente. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

El contenido de taninos condensados o pro-antocianidinas se determinó siguiendo el método descrito por Cardozo y col. (2010). Brevemente, 1,2 ml de solución de n-butanol-HCl (95:5) y 40  $\mu$ l de reactivo de hierro (sulfato férrico amónico al 2% en HCl 2 N) se

adicionaron a 200-400  $\mu$ l de solución de muestra o de estándar. La mezcla reaccionante se mantuvo a 100°C por 50 min en tubos sellados. Transcurrido el calentamiento, se dejaron enfriar y la absorbancia se leyó a 550 nm. La concentración de taninos condensados se calculó a partir de una curva de calibración realizada con taninos de quebracho. Los resultados se expresaron como mg de tanino de quebracho equivalente/ g de goma b.s.. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

### III.6.9 Flavonoides

El contenido de flavonoides totales se determinó por el método descrito por Shen y col. (Shen y col., 2009) con modificaciones menores. Alícuotas de 0,1 ml de solución de goma diluida (o de estándar) se mezclaron con 0,3 ml de NaNO<sub>2</sub> (5% p/v) y se incubaron durante 6 min. Luego se adicionó 0,3 ml de AlCl<sub>3</sub> (10% p/v) y se dejó reaccionar por 5 min. Finalmente se agregó 2 ml de NaOH (1M) y 2,4 ml de agua bidestilada. La absorbancia de las muestras se leyeron a 428 nm. La concentración de flavonoides se calculó a partir de una curva de calibración ( $y= 1,139x$ ;  $R^2=0,9997$ ) trazada utilizando quercetina como estándar. Los resultados se expresaron como mg de quercetina equivalente/ 100 g de goma seca.

### III.6.10 Color

El color de las muestras se midió utilizando un espectrofotómetro Evolution 600 UV-Vis (Thermo Scientific, Waltham, USA) equipado con esfera integradora de reflectancia difusa DRA-EV-600. Los parámetros CIE L\* (luminosidad), a\* (grado de rojo) y b\* (grado de azul) se obtuvieron por integración de la reflectancia espectral obtenida en el rango de 220 - 850 nm, con ángulo de observación de 2° e iluminante D65. Las muestras se colocaron sobre soportes de igual transparencia y dimensión. La corrección de la línea de base se realizó utilizando el estándar de reflectancia difusa Spectralon (Thermo scientific, Waltham, USA).

### III.6.11 Determinación de pH y rotación óptica

El pH de soluciones de goma preparadas al 5% p/v se determinó empleando un pHímetro ORION 525 a 25°C. La rotación óptica de soluciones de goma se determinó en un Polarímetro ATAGO POLAX-D a 25°C.

### III.6.12 Determinación de monosacáridos por GC-FID/ GC-MS

La determinación de los monosacáridos que componen la goma exudada de *Prosopis alba* (GAL) y la goma arábica comercial (GA) usada con fines comparativos, se realizó por cromatografía de gases de los alditoles peracetilados, obtenidos por hidrólisis ácida, reducción y acetilación de las fracciones de polisacáridos.

Hidrólisis. Aproximadamente 1-3 mg de goma se hidrolizaron por calentamiento a 121°C con TFA 2 M (0,5 ml) durante 2 h en vial con cierre a rosca de teflón. Luego se llevó a sequedad bajo corriente de aire seco. El hidrolizado se disolvió en agua y nuevamente se llevó a sequedad hasta evaporar el ácido totalmente.

Reducción y acetilación. La mezcla de monosacáridos se disolvió en agua (3 ml) y se redujo con NaBH<sub>4</sub>, dejando reaccionar durante toda la noche, según el procedimiento propuesto por Lindberg (1972). Posteriormente, se agregó resina Amberlite IR 120 plus (H<sup>+</sup>) para eliminar el exceso de agente reductor y descationizar. La mezcla se filtró y se evaporó a sequedad. El borato residual se eliminó como borato de metilo por agregado de metanol y evaporación a sequedad (5 x 0,5 ml). Se dejó en desecador con vacío durante una noche y los alditoles así obtenidos se acetilaron con anhídrido acético (0,2 ml) y piridina (0,2 ml) calentando 45 minutos a 100°C. La solución se enfrió y se extrajo con cloroformo-agua 1:1 (5 ml). La fase acuosa se separó y reextrajo con cloroformo (2 ml). Los extractos clorofórmicos combinados se lavaron con una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (3 x 2 ml) y finalmente con agua (2 x 2 ml). El extracto clorofórmico, secado con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anh), se evaporó a sequedad y el residuo obtenido se disolvió en 20 µl de cloroformo inmediatamente antes de inyectar en el cromatógrafo gaseoso.

El análisis de los derivados acetilados se realizó en un cromatógrafo de gases Shimadzu GC17A equipado con detector de llama y columna capilar de sílica SP-2330 (0,25 mm diámetro interno, 30 m de longitud; 0,20 mm de espesor de film). Se utilizó N<sub>2</sub> como gas transportador a una velocidad de flujo de 1 ml min<sup>-1</sup> y relación de 100:1. La temperatura del horno se ajustó en 200 °C, luego hasta 230 °C, 5°C min<sup>-1</sup> y se mantuvo durante 5 minutos.

La identificación de los alditoles acetilados se llevó a cabo por comparación con los tiempos de retención de una mezcla de alditoles peracetilados de glucosa, galactosa, manosa,

rhamnosa y arabinosa). Adicionalmente se confirmó la identidad por GC-MS en un cromatógrafo Shimadzu QP5050A, con He como gas transportador; el espectro de masa se registró entre 30 y 500 uma.

### III.6.13 Determinación de ácidos urónicos

La determinación del contenido de ácidos urónicos se realizó según el método de carbazol descrito por Randall y col. (1989). Se adicionó la solución de goma (1 ml; 0,2 mg/ml) a una mezcla de ácido sulfúrico concentrado con tetra borato de sodio en baño de hielo (0,025 M; 2,5 ml). Después de mezclar vigorosamente, las soluciones se calentaron a 85 °C durante 30 minutos y se enfriaron en baño de hielo. Posteriormente se agregó una solución de carbazol (0,2 ml; 0,125 % p/p en etanol), calentando a 85°C durante 15 minutos. Una vez a temperatura ambiente, Finalmente, se enfriaron a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 528 nm. La cantidad de ácido urónico se determinó a partir de una curva de calibración usando ácido D-glucurónico (0,02 – 0,1 mg/ml) como estándar, la cual resultó  $y=9,036x$  ( $R^2=0,998$ ).

### III.6.14 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear RMN $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$

El estudio de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se realizó en un espectrómetro Bruker AMX 500. Para ello, muestras de GA y GAL (aproximadamente 15 mg) se disolvieron en 0,6 ml de  $\text{D}_2\text{O}$  en tubos de 5 mm de diámetro interno. Los espectros 125.7-MHz  $^{13}\text{C}$ , con RMN  $^1\text{H}$  desacoplado se registraron a 25°C.

### III.6.15 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Se obtuvieron los espectros FTIR para caracterizar la goma exudada de *P. alba* y para la goma arábica comercial usada como referencia. Esta técnica se utilizó también para evaluar las interacciones fisicoquímicas entre el activo y los polielectrolitos de la matriz encapsulante. Los análisis se realizaron en un equipo FTIR NICOLET iS5 (Thermo Scientific, Madison, USA) equipado con un sistema de reflectancia total atenuada (ATR) NICOLET iD3 (Thermo Scientific, Madison, WI, USA), de simple reflexión, con cristal de ZnSe y ángulo de incidencia de 45°. Los espectros se tomaron en modo reflexión entre 600

y  $4000\text{ cm}^{-1}$ , adquiriéndose un promedio de 64 barridos con resolución de  $1\text{ cm}^{-1}$ . El análisis de los espectros se realizó utilizando el software OMNIC Thermo Scientific (Madison, WI, USA). Las muestras se colocaron directamente sobre el accesorio ATR, sin manipulación extra.

### **III.6.16 Estudio preliminar de la toxicidad de la goma: Toxicidad aguda *in vivo***

Con el fin de evaluar la inocuidad de la goma exudada de *Prosopis alba*, se realizó un estudio de toxicidad aguda *in vivo*, similar a los realizados para evaluar la toxicidad de otros hidrocoloides (Vernon-Carter y col., 2000, Schmitt y col., 2008, von Müller y col., 2009). Este estudio se realizó en colaboración con el Instituto de Farmacología Experimental de la Universidad de Córdoba (UNC-CONICET). El ensayo consistió en la administración de una única dosis por intubación intragástrica, a ratas Wistar macho de 70 días de edad (peso promedio 310 g) y evaluación de parámetros fisiológicos y conductuales. Las medidas se realizaron inmediatamente después de la administración y durante los 14 días posteriores con el objeto de evaluar la reversibilidad (desaparición de signos de toxicidad), persistencia, o aparición de toxicidad a lo largo del tiempo.

Tomando como referencia el estudio de toxicidad de la goma arábica realizado por Schmitt y col. (2008), se fijó una dosis de 1 g de goma/kg de peso corporal. Con esta finalidad, se administraron 0,5 ml de una solución de goma preparada al 20% p/v, por cada 100 g de peso corporal. La dosis fue suministrada por intubación intragástrica a un grupo de animales  $n=8$  (experimental, GE). Simultáneamente se monitoreó el comportamiento de un grupo con igual número de animales, a los que se les administró agua destilada por el mismo método (grupo control, GC).

#### **III.6.16.1 Evaluación de parámetros fisiológicos**

Se registró la cantidad de alimento consumido (g), líquido ingerido (ml) y el peso corporal (g) de los individuos de ambos grupos (GE y GC) durante seis días previos a la administración y durante 14 días posteriores. Las medidas se realizaron en forma diaria a la misma hora.

**III.6.16.2 Evaluación de parámetros conductuales**

Se evaluó la actividad locomotora en términos de la actividad basal determinada en actógrafos automatizados. Estos dispositivos (Figura III.3) consisten en cajas rectangulares (30x19x46 cm) equipadas con dos fotocélulas de rayos infrarrojos localizados a 3 cm por encima del piso. La interrupción de cualquier haz de luz (rayo infrarrojo) debido al movimiento horizontal de los animales se contabiliza como una cuenta de actividad (cuentas horizontales). La información resultante se analizó con el software provisto por el equipo.

Cada animal fue testeado individualmente el día de la administración y al día 14, entre las 9 y las 18 h, en una habitación especialmente acondicionada, libre de ruido e iluminada con un tubo de luz fluorescente de 350-400 lux de intensidad. Las cuentas de actividad, se registraron 30 min antes de la administración y durante los 60 min posteriores, en intervalos de 10 min y se expresaron como número de cuentas/10 min.

Para una adecuada interpretación de los resultados, los animales se colocaron en los actógrafos durante 30 min, previo a la administración, con el objeto de habituarlos al nuevo ambiente, lo cual normalmente genera un incremento de la actividad locomotora por la naturaleza exploratoria de los roedores. Una vez habituados, cualquier efecto que se observe luego de la administración de la droga puede interpretarse como consecuencia de la administración y no debido al estrés que le produce al animal enfrentarse a un nuevo ambiente. Es importante mencionar que la propia administración (en este caso intubación intragástrica) genera una respuesta en los animales que puede manifestarse como un leve incremento de su actividad locomotora.



**Figura III.3** Actógrafos automatizados para registro de la actividad locomotora.



### ***III.6.16.3 Estudios histopatológicos***

Se realizó la observación de hígado, riñón e intestino en n=4 animales de cada grupo, sacrificados a las tres horas posteriores a la administración. Las muestras se fijaron por inmersión en formol (4% v/v) durante 4 días. Al segundo día se cortaron en bloques más pequeños para facilitar el taqueo. Posteriormente, se los colocó en solución de sacarosa al 30% (crioprotector) durante 3 días a 4°C y luego se hicieron cortes de 10 µm de espesor en criostato (Leica). Se colocaron los cortes en un portaobjetos, previamente tratado con gelatina (1% p/v) para favorecer la adhesión de los cortes. Las muestras se tiñeron con hematoxilina-eosina para su posterior observación microscópica. Este ensayo se realizó a 7 y 14 días después de haberse realizado la administración en n=4 animales de cada grupo.

### **III.6.17 Propiedades de interacción con el solvente**

#### ***III.6.17.1 Higroscopicidad***

La higroscopicidad de la goma exudada de *P. alba* purificada y de la goma arábiga, ambas liofilizadas, se evaluó de acuerdo con el método de Cai y col. (2000) con ligeras modificaciones. Aproximadamente 0,1 g de muestra se colocó en un ambiente de 75% HR (solución sobresaturada de NaCl) durante 7 días a 25°C. La higroscopicidad se midió como los gramos de agua adsorbida por 100 g de sólidos secos (g de agua adsorbida/100 g goma b.s.).

#### ***III.6.17.2 Absorción de agua***

La cinética de absorción de agua se determinó para muestras liofilizadas de GAL purificada y para GA comercial también, liofilizada. Se utilizó un dispositivo descrito por Torgersen y Toledo (1977), que consiste en una pipeta graduada de 1 ml (1 en 100) conectada por un tubo de goma a un filtro jeringa sobre el cual se colocó un papel de filtro como soporte. La pipeta se dispuso en forma horizontal a la misma altura que el papel de filtro. A través del filtro se llenó la pipeta y el tubo conector con agua bidestilada y seguidamente se colocó el papel de filtro dejándolo embeber con el agua. El contenido de agua se ajustó extrayendo

agua desde la superficie del filtro con un papel absorbente hasta ajustar el menisco a la marca 0 en la pipeta.

Una cantidad conocida de muestra (~ 0,1 g) se esparció sobre la superficie del papel de filtro saturado en agua. Luego se registró el desplazamiento del menisco en la pipeta en función del tiempo. Los datos experimentales se ajustaron al modelo descrito por Pilosoff y col. (1985):

$$q = \frac{Qt}{(B + t)} \quad (3)$$

Donde  $q$  es la cantidad de agua absorbida al tiempo  $t$ ,  $Q$  es la máxima cantidad de agua absorbida en el equilibrio,  $B$  es el tiempo requerido para absorber  $Q/2$ . La constante de velocidad específica de absorción de agua se calculó como  $(QB)^{-1}$ . Las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se corrigieron considerando las pérdidas por evaporación.

### **III.6.17.3 Solubilidad**

La solubilidad de GAL y GA liofilizadas se evaluó de acuerdo con el método propuesto por (Cano-Chauca y col., 2005) con ligeras modificaciones. Aproximadamente 0,4 g de muestra se agitó en 10 ml de agua bidestilada por 5 min usando un agitador orbital. La solución fue luego centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos. Una alícuota de 8 ml del sobrenadante se transfirió a crisoles previamente deshidratados y pesados y se deshidrató a 105°C durante 24 h. La solubilidad (%) se calculó como el porcentaje del sobrenadante deshidratado en relación a la cantidad de polvo inicialmente añadido.

### **III.6.18 Propiedades reológicas**

#### **III.6.18.1 Reología de dispersiones diluidas**

El estudio de la viscosidad de dispersiones de GAL y GA diluidas se realizó por viscosimetría capilar. Se prepararon soluciones de GAL y GA cuyas concentraciones variaron en el rango de 1 – 4% p/v utilizando NaCl (0,1 M) como disolvente. La viscosidad se evaluó determinando el tiempo que le toma a la solución fluir entre dos marcas de un capilar. Se utilizó para ello un instrumento Cannon-Fenske termostatzado a 25 °C. El uso de

soluciones salinas como disolvente evita el incremento de la viscosidad observado a bajas concentraciones de polielectrolitos. Conforme aumenta la dilución del polielectrolito en agua desionizada, aumenta el grado de disociación. Los contra iones de las polisales forman una atmósfera iónica que expanden la estructura molecular y aumenta la viscosidad. En presencia de sales, este efecto es más débil, y el polielectrolito se comporta como una molécula neutra.

Los tiempos registrados (s) se transformaron en viscosidad cinemática (cSt/s) multiplicando por la constante del viscosímetro a 25°C ( $k=0,004422 \text{ St/s}^2$ ) y la viscosidad dinámica o absoluta (g cm/s) se calculó en términos del producto de la viscosidad cinemática por la densidad ( $\text{g/cm}^3$ ) de cada solución.

En forma complementaria, se determinaron las densidades de las soluciones utilizando un medidor de tubo vibratorio (DS 7000, Krüss Optronic) para muestras líquidas a 25°C.

Se calculó la viscosidad dinámica del solvente ( $\eta_s$ ) y de las soluciones ( $\eta$ ). A partir de las mismas se calculó la viscosidad específica  $n_{sp} = (\eta - \eta_s)/\eta_s$  y la viscosidad relativa  $\eta_r = \eta/\eta_s$ . Dos aproximaciones se utilizaron para el cálculo experimental de la viscosidad intrínseca. Por un lado la ecuación de Huggins (ecuación 4) y la ecuación de Kramer (ecuación 5):

$$\eta_{red} = \eta_{sp}/c = [\eta] + k_1[\eta]^2 c \quad (4)$$

$$\eta_{inh} = \ln(\eta_r)/c = [\eta] + k_2[\eta]^2 c \quad (5)$$

La viscosidad intrínseca se calculó como la intersección de ambas funciones con el eje de las ordenadas ( $C=0$ ). Donde  $\eta_{inh}$  es la viscosidad inherente y  $\eta_{red}$  es la viscosidad reducida.

### **III.6.18.2 Reología de dispersiones de concentración media**

Las propiedades de flujo de soluciones de GAL y GA a 5, 10 y 20 % p/v, se determinaron en un viscosímetro Brookfield (DV-LVT) con geometría cono-plato S41 a 25°C. Las curvas de flujo se trazaron en el rango de velocidades de cizallamiento de 1 a 25 rpm. Los datos experimentales se ajustaron a la ley de Ostwald-de Waele (ley de la potencia).

$$\tau = K\dot{\gamma}^n \quad (6)$$

Donde  $\tau$  es el esfuerzo de deformación,  $\dot{\gamma}$  es el gradiente de deformación,  $n$  es el índice de flujo y  $K$  ( $\text{Pa s}^n$ ) es el índice de consistencia. Los resultados se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar de al menos dos duplicados. En todos los casos el error relativo fue menor que el 10%.

### **III.6.18.3 Reología de dispersiones concentradas**

El estudio del comportamiento reológico de dispersiones de GAL y GA a 40% p/v, se realizó utilizando un reómetro TA Instruments AR1000 en modo rotacional (New Castle, DE197020), con geometría cono-plato (40 mm, 2°), accionado a través del software TA Instrument- Water LLC 109 Lukens Drive. Se registró la variación de los módulos dinámicos  $G'$  y  $G''$  en el rango de frecuencias de 0,01-10 Hz, por aplicación de un esfuerzo de 0,1 Pa. Este esfuerzo se determinó en base a la determinación del rango de viscoelasticidad lineal, entre 0,01 y 100 Pa a frecuencia constante de 1Hz y a 25 °C. En estas condiciones la deformación resultante tiene una relación lineal con el esfuerzo aplicado y el sistema no sufre cambios estructurales, permaneciendo el módulo complejo  $G^*$  constante.

## **III.6.19 Determinación *in vitro* de la actividad antioxidante**

### **III.6.19.1 Capacidad antirradicalaria por el ensayo de ABTS•<sup>+</sup>**

Aproximadamente 0,038 g de ABTS (Sigma) se disolvió en 10 ml de persulfato de amonio la noche previa a la determinación. La solución se conservó al abrigo de la luz y a temperatura ambiente. Inmediatamente antes de cada ensayo, se diluyó 1 ml de la solución concentrada de ABTS en 9 ml de agua bidestilada. La dilución se ajustó hasta lograr una absorbancia cercana a 0,7 medida a 734 nm. Se registró la absorbancia inicial ( $A_0$ ). La decoloración de la muestra se monitoreó con el programa cinético de recolección de datos y los perfiles se ajustaron a modelos de decaimiento exponencial de segundo orden en Graph-Pad Prism 5.0. La absorbancia en el equilibrio se obtuvo del análisis de regresión no lineal ( $A_{inf}$ ) y ambos valores se utilizaron para calcular el porcentaje de actividad anti radicalaria (%AAR) de acuerdo con:

$$\%AAR = \left( \frac{A_0 - A_{inf}}{A_0} \right) * 100\% \quad (7)$$

Donde  $A_0$  es la absorbancia inicial,  $A_{inf}$  es el valor de absorbancia en equilibrio. Finalmente, el %AAR se representó en función de la concentración de las soluciones de goma.

### **III.6.19.2      *Actividad antirradicalaria por el ensayo del radical OH•***

La capacidad atrapadora de radicales hidroxilos se midió utilizando una modificación del método descrito previamente por Kunchandy y col. (1990). Soluciones stock de EDTA (1 mM),  $FeCl_3$  (1 mM), ácido ascórbico (1 mM),  $H_2O_2$  (10 mM) y desoxirribosa (36 mM), se prepararon en agua bidestilada. El ensayo se realizó en un tubo de ensayo por adición de 0,1 ml de EDTA, 0,1 ml de  $FeCl_3$ , 0,1 ml de  $H_2O_2$ , 0,1 ml de desoxirribosa, 1 ml de la solución de la muestra en agua bidestilada, 0,5 ml de buffer fosfato (50 mM, pH 7,4) y 0,1 ml de ácido ascórbico en esta secuencia. La mezcla se incubó a 37°C por una hora tapada con parafilm. Aproximadamente 1 ml de la solución incubada se transfirió a otro tubo al cual se adicionó 1 ml de ácido tricloroacético (10%) y 1 ml de ácido tíobarbitúrico (0,5%) preparado en 0,025 M NaOH para desarrollar el compuesto coloreado con absorbancia a 532 nm. La capacidad atrapadora de radicales hidroxilos se expresó como el porcentaje de inhibición de la degradación de la desoxirribosa y se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\%inhibición\ de\ OH\bullet = \left( \frac{A_0 - A}{A_0} \right) * 100\% \quad (8)$$

Donde  $A_0$  es la absorbancia del blanco (con agua en lugar de la solución de goma) y  $A$  es la absorbancia de la mezcla en presencia de la solución de goma. A los efectos de evitar interferencias con trazas de metales, todo el material de vidrio se lavó previamente con solución de HCl al 30% v/v.

### **III.6.19.3      *Ensayo del poder reductor***

Se midió el poder reductor de las muestras de acuerdo con el método de Oyaizu ampliamente referenciado en la literatura (Alam y col., 2013, Mitic y col., 2013). Brevemente, 1 ml de muestra o de solución de estándar, se mezcló con 1 ml de buffer fosfato (0,2M, pH 6,8) y 1 ml de ferricianuro de potasio (10%). La mezcla reaccionante se dejó reposar por 20 minutos a 50°C. Luego de enfriar, se agregó 1 ml de TCA (10% p/v) y el

precipitado se separó por centrifugación a 3000 rpm durante 10 min. A 1 ml del sobrenadante se agregó 1 ml de agua y 0,5 ml de  $\text{FeCl}_3$  (0,1 % p/v). Se agitó la mezcla reaccionante y 15 min después se midieron sus absorbancias a 700 nm. Se trazó una curva de calibración con ácido ascórbico (AA) como estándar. Los resultados se expresaron como mg de mg de ácido ascórbico equivalente/g de goma b.s..

### III.6.19.4 Actividad quelante de metales

La actividad quelante de metales se midió de acuerdo con el método descrito por Dinis y col. (1994) con ligeras modificaciones. Aproximadamente 0,5 ml de muestra o de solución estándar, se mezclaron con 2,4 ml de agua bidestilada y 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (2 mM). Luego de incubar la mezcla a temperatura ambiente por 5 minutos, se adicionó 100  $\mu\text{l}$  de ferrozina (5 mM) y se dejó reposar por 10 min. La absorbancia se midió a 562 nm. Se construyó una curva de calibración con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como estándar (30–50 ppm). La habilidad quelante se expresó como porcentaje de inhibición del complejo  $\text{Fe}^{2+}$ -ferrozina de acuerdo con:

$$(\%I) = \left[ 1 - \frac{A_1}{A_0} \right] \times 100 \quad (9)$$

Donde  $A_0$  es el blanco de reactivo,  $A_1$  es la absorbancia del estándar o de la muestra. Los resultados se expresaron como mg EDTA equivalente/100 g de goma b.s..

### III.6.20 Propiedades antimicrobianas

Se evaluó la actividad antimicrobiana de soluciones de GAL y GA (10% p/v) preparadas con agua estéril y posteriormente autoclavadas a 121°C por 15 minutos. Se utilizaron microorganismos comúnmente presentes en alimentos, entre ellos *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* y *Lactobacillus curvatus* ACU-1. *L. innocua* se cultivó en BHI y se incubó a 30°C por 12 h. *S. aureus* se cultivó en BHI y se incubó a 37°C por 12 h. *Lactobacillus curvatus* ACU-1 se cultivó en MRS y se incubó a 30°C por 12 h. Luego de la incubación, los cultivos se inocularon en placas de agar BHI previamente preparado y solidificado. El estudio de la actividad antimicrobiana se realizó utilizando la técnica de difusión en agar. Se realizaron pocillos en el medio solidificado en los que se incorporó una

alícuota (20 ul) de las soluciones de goma. Como control se utilizó agua estéril en lugar de soluciones de goma. El efecto bactericida de las soluciones de goma se determinó evaluando del diámetro del halo de inhibición.

### III.6.21 Isotermas de sorción de agua

Se obtuvieron la isotermas de sorción de agua a distintas temperaturas (10, 25 y 35°C) siguiendo el método isopiéstico descrito por (Lang y col., 1981). Se colocaron aproximadamente 100 mg de muestra en viales (3 ml de capacidad) por triplicado, en cámaras herméticas con distintas humedades relativa, HR (10 – 85 %), controladas por medio de sales sobresaturadas (LiCl, KCH<sub>3</sub>COO, MgCl<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NaNO<sub>2</sub>, NaCl, KCl y KNO<sub>3</sub>) de acuerdo a lo indicado por Greenspan (1977) y corregidas utilizando medidor de actividad de agua. Se determinó la variación de peso de las muestras en función del tiempo y se consideró que alcanzaron el equilibrio cuando los cambios fueron menores a ± 0,001 g. Una vez equilibradas, se determinó el contenido de agua de las muestras equilibradas por deshidratación a 105°C hasta peso constante como se detalla en el punto III.6.5.

Los datos experimentales se ajustaron al modelo de Guggenheim-Anderson-de Boer, GAB (ecuación 13) y al modelo generalizado de D´arcy y Watt, GDW (ecuación 14) de acuerdo con:

$$He = \frac{m_o C K a_w}{(1 - K a_w)(1 - K a_w + C K a_w)} \quad (10)$$

$$He = \frac{m K' a_w}{(1 + K' a_w)} \cdot \frac{1 - k(1 - w) a_w}{1 - k a_w} \quad (11)$$

Donde *He* es el contenido de agua en el equilibrio, *a<sub>w</sub>* es la actividad acuosa, *m<sub>o</sub>* es la contenido de agua de monocapa, *C* es la constante cinética relacionada a la sorción de la primera capa, *K* es la constante cinética relacionada a la sorción de multicapa, *m* es la concentración de sitios activos primarios de la superficie, *K'* y *k* son las constantes cinéticas relacionadas a la sorción de los sitios primarios y secundarios, respectivamente y *w* es el parámetro que determina la relación de moléculas de agua unidas a sitios primarios de adsorción que se convierten en sitios secundarios de adsorción.

Para modelar las curvas de sorción de agua de encapsulados conteniendo aceite se utilizó el modelo de BET.

$$He = \frac{m_o C a_w}{(1 - a_w)[1 + (C - 1)a_w]} \quad (12)$$

Donde  $He$  es el contenido de agua en el equilibrio,  $a_w$  es la actividad acuosa,  $m_o$  es el contenido de agua de monocapa y  $C$  es la constante cinética relacionada a la sorción de la primera capa,

La correlación de los datos experimentales a los modelos propuestos se realizó por técnicas de regresión no lineal utilizando el programa GraphPad versión 4 (GraphPad, Software Inc., San Diego California, USA). El ajuste de los modelos se evaluó y comparó en términos del coeficiente de regresión ( $R^2$ ), la desviación estándar del error (DEE) (ecuación 13) y el módulo de desviación relativo medio (E) (ecuación 14). El DEE indica la habilidad de ajuste de un modelo al conjunto de datos. Cuanto menor sea el DEE, mejor es la habilidad de ajuste del modelo. Por otro lado, se asume que un valor E menor a 5% indica un buen ajuste. Cuanto menor sea el valor de E, mejor es la bondad del ajuste.

$$DEE = \sqrt{\frac{\sum(M_i - M_{Ei})^2}{df}} \quad (13)$$

$$E = \frac{100}{n} \sum \frac{|M_i - M_{Ei}|}{M_i} \quad (14)$$

Donde  $M_i$  es el contenido de agua en la observación  $i$  (g de agua adsorbida/g sólido seco),  $M_{Ei}$  es la humedad predicha a la misma observación,  $df$  son los grados de libertad (número de observaciones menos el número de constantes del modelo),  $n$  es el número de observaciones.

Del estudio de sorción a diferentes temperaturas, se calculó para algunos sistemas el calor isostérico de sorción o entalpía diferencial neta de acuerdo con:

$$q_{st} = -R \left[ \frac{d(\ln a_w)}{d(1/T)} \right]_m \quad (15)$$



Donde  $q_{st}$  es el calor isostérico de sorción (kJ/mol), T es la temperatura absoluta (K) y R es la constante universal de gases (8,314 J/molK). El valor  $q_{st}$  se obtiene a partir de la pendiente de la curva que resulta de representar:

$$\ln a_w = -\frac{q_{st}}{RT} - \frac{S_d}{R} \quad (16)$$

Donde  $S_d$  (J/mol·K) es la entropía diferencial del agua adsorbida y es proporcional al número de sitios de sorción disponibles, correspondientes a un específico nivel de energía. Adicionalmente, el calor total de sorción ( $Q_{st}$ ) se calculó de acuerdo con:

$$Q_{st} = q_{st} + \lambda_{vap} \quad (17)$$

Donde  $\lambda_{vap}$  es el calor de vaporización del agua pura e igual a 44.09 kJ/mol (Cassini y col., 2006).

### III.6.22 Transiciones térmicas por calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se utilizó un equipo de calorimetría diferencial de barrido (DSC) (Mettler TA 4000, Columbus, Ohio, USA) a los efectos de evaluar la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) en muestras equilibradas a distintas  $a_w$ . El análisis de los termogramas se realizó con el procesador TC11 TA y GraphWare TA72. El instrumento se calibró para el ajuste de la temperatura, flujo de calor y entalpía de fusión con agua destilada (p.f. 0,0°C;  $\Delta H = 6,013 \text{ kJ mol}^{-1}$ ), indio (p.f. 156,6°C;  $\Delta H = 3,28 \text{ kJ mol}^{-1}$ ), plomo (p.f. 327,5 °C;  $\Delta H = 4,799 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) y zinc (p.f. 419,6°C;  $\Delta H = 7,32 \text{ kJ mol}^{-1}$ ). Los ensayos se realizaron en cápsulas de aluminio de 40  $\mu\text{L}$  (Mettler) herméticamente cerradas, conteniendo entre 5 – 15 mg de muestra.

- Temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ):

Se determinó para GAL y GA comercial liofilizadas y para los sistemas encapsulados estudiados, equilibrados a distintas HR Cada muestra se sometió a un programa de calentamiento de -50 a 150 °C a una velocidad de 10°C  $\text{seg}^{-1}$  (método dinámico). Como referencia, se utilizó una cápsula vacía sellada herméticamente. El ensayo se realizó con atmósfera de nitrógeno gaseoso como purga evitar condensaciones en el sensor del equipo).

La  $T_g$  se determinó como el inicio (*onset*) de la discontinuidad observada en las curvas de flujo de calor versus temperatura. Las mediciones se realizaron al menos por duplicado.

Los datos de  $T_g$  y contenido de humedad de las muestras se ajustaron a la ecuación de Gordon y Taylor (1952), de acuerdo con:

$$T_{g\ mix} = \frac{w_s T_{gs} + k_{GT} w_w T_{gw}}{w_s + k_{GT} w_w} \quad (18)$$

Donde  $w_s$  es la fracción másica del sólido,  $w_w$  es la fracción másica del agua,  $T_{gs}$  es la temperatura de transición vítrea del sólido anhidro,  $T_{gw}$  es la temperatura de transición vítrea del agua (-135°C),  $T_{g\ mix}$  es la temperatura de transición vítrea del sistema y  $k_{GT}$  es la constant de Gordon y Taylor.

- Estabilidad térmica del activo (aceite de pescado):

Se utilizó calorimetría diferencial de barrido como método rápido para evaluar la estabilidad del aceite de pescado encapsulado en matrices de distinta composición y secadas por distintos métodos. En este caso, las muestras se colocaron en cápsulas pinchadas, en ausencia de corriente de  $N_2$ , y se sometieron a un calentamiento dinámico (10 °C/min) en el rango de temperaturas de 40 a 240 °C. El inicio de la oxidación se observó como un aumento marcado en el flujo de calor debido a la naturaleza exotérmica de las reacciones de oxidación. La temperatura de inicio de la reacción oxidativa se tomó como la intersección de la línea de base extrapolada y la línea tangente al comienzo del pico exotérmico. Todas las mediciones se realizaron por duplicado.

### III.7 Estudios particulares realizados en emulsiones

#### III.7.1 Determinación de las propiedades interfaciales

La actividad interfacial de GAL y GA se caracterizó midiendo la tensión interfacial en sistemas aceite/agua (o/w). Los estudios se realizaron usando el aceite tal cual, sin purificación previa, para evaluar así el comportamiento de la goma en la emulsión real, que se utilizó luego como material a estabilizar por encapsulación. Las propiedades interfaciales de suspensiones acuosas de goma preparadas al 2 y 5% p/v, conteniendo aceite de pescado

(1% p/p) se evaluaron utilizando un tensiómetro interfacial de gota (PAT-1, SINTERFACE Technologies, Berlin, Germany) como se ha descrito previamente en la literatura (Bellesi y col., 2014, Pizones Ruiz-Henestrosa y col., 2014, von Staszewski y col., 2014). Se midió la variación de la tensión dinámica interfacial ( $\sigma$ ) en la interfase agua/aceite en el tiempo, luego de formar una gota (12  $\mu$ l) de la suspensión acuosa de hidrocoloide en una cubeta termostatzada ( $20,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ ) de vidrio, que contenía el aceite. La silueta de la gota se capturó y digitalizó por medio de una cámara digital. Las imágenes se registraron en el tiempo y posteriormente se ajustaron a la ecuación de Young-Laplace a fin de obtener la tensión interfacial con una exactitud de  $\pm 0,1$  mN/m.

En forma simultánea, se analizó la reología interfacial de los films formados en la interfase o/w por aplicación de una deformación dilatacional sinusoidal (compresión y expansión con frecuencia de 50 mHz y amplitud de deformación del 3%) (Bellesi y col., 2014, Pizones Ruiz-Henestrosa y col., 2014, von Staszewski y col., 2014). Aunque sólo se presenta el valor del módulo dilatacional interfacial (E), también se evaluaron la elasticidad y la viscosidad interfacial, a fin de caracterizar las propiedades viscoelásticas de los films en la interfase. Todos los experimentos se realizaron al menos por duplicado.

### **III.7.2 Determinación del tamaño de gota de las emulsiones**

La distribución del tamaño de gota en emulsiones preparadas con GAL y GA en presencia del aceite de pescado a encapsular (ver sección III.4), se determinó por dispersión estática de luz utilizando un equipo Mastersizer 2000 equipado con una unidad de dispersión Hydro 2000MU (Malvern Instruments, Worcestershire, United Kingdom). La velocidad de la bomba se ajustó a 1800 rpm. Se utilizó el índice de refracción ( $n_D=1,479$ ) y el parámetro de absorción (0,001), ambos evaluados para el aceite utilizado como fase dispersa.

El tamaño de la gota se informó como diámetro de Sauter o  $D_{3,2}$  (ecuación 19) y como diámetro de De Broucker o  $D_{4,3}$  (ecuación 20).

$$D_{3,2} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2} \quad (19)$$

$$D_{4,3} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \quad (20)$$

Donde  $n_i$  es el número de partículas de diámetro  $d_i$  (Galazka y col., 1996, Leroux y col., 2003).

El  $D_{3,2}$  proporciona una medida del diámetro medio de la mayoría de las gotas. El  $D_{4,3}$  se relaciona con los cambios en el tamaño de la gota involucrados en los procesos de desestabilización por ser más sensible a la agregación de las gotas de aceite (Galazka, Dickinson et al. 1996, (Relkin y col., 2005).

El índice de polidispersidad se calculó de acuerdo con:

$$\text{Índice de polidispersidad} = (D_{0,9} - D_{0,1})/D_{0,5} \quad (21)$$

Donde  $D_{0,1}$ ,  $D_{0,5}$  y  $D_{0,9}$  son los diámetros al 10%, 50% y 90% of de la distribución acumulada de volumen, respectivamente. El tamaño de gota e índice de polidispersidad se informan como el promedio y la desviación estándar de duplicados, haciendo diez lecturas por cada duplicado.

### **III.7.3 Determinación del potencial Z**

Se realizaron para emulsiones conteniendo 2 y 5% de la goma exudada de GAL y GA, y aceite de pescado. Las medidas de potencial Z se realizaron en un instrumento de dispersión dinámica de luz (Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments, Worcestershire, United Kingdom). El potencial Z se evaluó a partir de la movilidad electroforética de las partículas. La conversión de la movilidad electroforética en potencial Z se realizó por medio de la ecuación de Henry (ecuación 21) (Hunter, 2001):

$$U_e = 2\varepsilon\zeta f(Ka) / 3\eta \quad (22)$$

Donde  $U_e$  es la movilidad electroforética,  $\varepsilon$  es la constante dieléctrica,  $\eta$  es la viscosidad de la muestra y  $f(Ka)$  es la función de Henry.

Las emulsiones se diluyeron previamente 1:100 con agua bidestilada y posteriormente se colocaron en celdas capilares descartables (DTS1060, Malvern Instruments, Worcestershire, United Kingdom). Para cada ensayo se reportó el valor promedio y la desviación estándar de los duplicados con cinco lecturas realizadas por cada duplicado.

### III.7.4 Evaluación del índice de cremado (IC)

La estabilidad de las emulsiones o/w conteniendo GAL o GA se determinó en términos de la tendencia a la separación gravitacional de fases (Acedo-Carrillo y col., 2006, Khan y col., 2015). Para ello, se transfirieron 10 ml de cada emulsión a una probeta graduada inmediatamente después de su preparación y se almacenó durante dos días a 25°C. El índice de cremado (IC), se evaluó en términos de la variación relativa de la altura de la capa de fase cremada (superior) superior respecto del volumen total de emulsión, y se monitoreó en función del tiempo. El índice de cremado se calculó de acuerdo con:

$$CI = (V_s/V_e) * 100\% \quad (23)$$

Donde  $V_s$  es el volumen, de la fase cremada superior y  $V_e$  es el volumen total de la emulsión.

### III.8 Estudios particulares para sistemas encapsulados

#### III.8.1 Evaluación de la retención de aceite en condiciones aceleradas de extracción con solvente

Para evaluar la capacidad de retención del activo de la matriz encapsulante, se estudió la liberación del aceite por extracción acelerada con solvente. La extracción acelerada se realizó removiendo sucesivamente el aceite con n-hexano de cápsulas deshidratadas recientemente preparadas. Se realizaron extracciones sucesivas sobre la misma muestra 5 ml n-hexano, aumentándose progresivamente el tiempo de agitación: 1, 3, 7 y 22 min. El sobrenadante se separó por filtración y el aceite extraído en cada etapa se determinó gravimétricamente, luego de la evaporar el solvente en corriente de  $N_2$  a temperatura ambiente hasta alcanzar peso constante. El aceite extraído se expresó como la masa acumulada de aceite respecto de la masa de cápsulas inicial.

#### III.8.2 Microscopía electrónica de barrido (FEG-SEM).

Se caracterizó la microestructura de las cápsulas de polielectrolitos por observación de la morfología externa e interna con microscopio electrónico de barrido (CARL ZEISS NTS,

modelo SUPRA 40) provisto con cañón de electrones por emisión de campo (FEG-SEM), detector InLes y columna GEMINI® de tercera generación. Para evaluar la morfología interna fue necesario seccionar las cápsulas cuidadosamente con bisturí. Tanto las cápsulas seccionadas como las cápsulas íntegras se sometieron a un proceso de lavado con n-hexano (5 min agitación) para remover el aceite superficial, previo al metalizado. En ensayos exploratorios previos, se observó que el aceite superficial dificultaba la observación. Las imágenes se tomaron a temperatura ambiente, con aumentos de 100x y 2000x, con metalización de las muestras.

### III.8.3 Aceite superficial (AS)

Para determinar el aceite superficial o no encapsulado, se suspendieron las cápsulas (aproximadamente 0,5 g) en 5 ml de hexano y se agitó a velocidad media durante 1 minuto. Se evaporó el solvente en corriente de N<sub>2</sub> a temperatura ambiente y se determinó la masa extraída de lípidos por diferencia de peso antes y después de evaporar el solvente. La cantidad de aceite superficial se expresó como g de aceite/100 g de cápsula y se calculó de acuerdo con:

$$AS = \frac{m_{AS}}{m_C} * 100 \quad (24)$$

Donde,  $m_{AS}$  (g) es la masa del aceite extraído de la superficie,  $m_C$  (g) es la masa de cápsulas. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

### III.8.4 Aceite encapsulado (AE)

El aceite encapsulado, se determinó en cápsulas a las cuales se extrajo previamente el aceite superficial siguiendo el procedimiento descrito en la sección anterior.

La cuantificación del aceite retenido en la estructura interna requirió realizar una hidrólisis ácida de la matriz encapsulante para garantizar su completa extracción. Con esta finalidad, la cuantificación de lípidos totales se realizó por el método AOAC 14.019 (1984), con ligeras modificaciones. Para ello, se adicionaron 1 ml de etanol y 5 ml de HCl (P. A.) a 0,5 g de muestra. Se llevó la muestra a un baño termostático a 80°C y se mantuvo con agitación suave durante 40 minutos. Luego se adicionaron 5 ml de etanol absoluto y se dejó enfriar. A

continuación se incorporaron 12,5 ml de éter etílico y 12,5 ml de éter de petróleo, agitando intensamente durante 60 s entre cada adición de solvente. Posteriormente se dejó reposar la muestra (20 min) y se extrajo la fase etérea superior. La solución extraída se filtró y el sobrenadante se recogió en un envase previamente deshidratado y pesado. Esta extracción se realizó tres veces utilizando 10 ml de una mezcla de dichos solventes. La fase etérea filtrada de cada extracción se recolectó en el mismo recipiente. La cantidad de aceite extraído se cuantificó por evaporación del solvente a 50 °C hasta peso constante. El aceite encapsulado se expresó como g de aceite/ 100 g de cápsulas de acuerdo con la siguiente expresión:

$$AE = \frac{m_{AE}}{m_C} * 100 \quad (25)$$

Donde,  $m_{AE}$  (g) es la masa del aceite encapsulado,  $m_C$  (g) es la masa de cápsulas. Las determinaciones se realizaron por duplicado. Finalmente se calculó el aceite total (AT) como la suma del aceite superficial (AS) y el aceite encapsulado (AE).

### III.8.5 Eficiencia y rendimiento de la encapsulación

Se definió la eficiencia de encapsulación como la cantidad de aceite encapsulado (AE), respecto del aceite total (AT=AS+AE) en 100 g de cápsulas. Este indicador se calculó de acuerdo con:

$$\text{Eficiencia de encapsulación} = \frac{m_{AE}}{m_{AT}} * 100\% \quad (26)$$

Donde,  $m_{AE}$  (g) es la masa del aceite encapsulado,  $m_{AT}$  (g) es la masa de aceite total que resulta de la suma de las fracciones interna (AE) y superficial (AS).

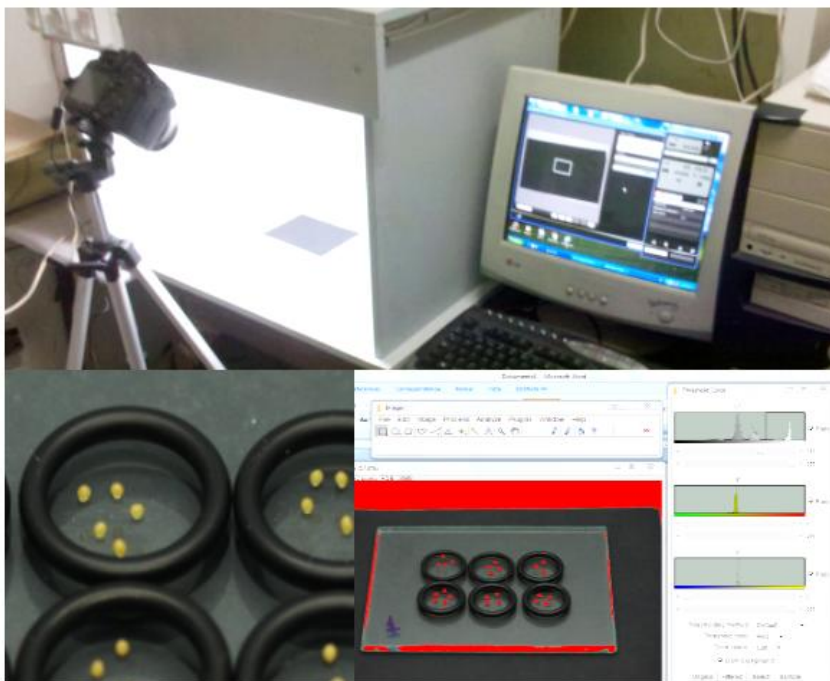
Se definió el rendimiento de la encapsulación como la cantidad de aceite encapsulado (AE), respecto de la cantidad de aceite utilizado en la preparación de la emulsión formadora. Esta determinación permite cuantificar las pérdidas del activo en el proceso de encapsulación. Este indicador se calculó de acuerdo con:

$$\text{Rendimiento de encapsulación} = \frac{m_{AE}}{m_{Ai}} * 100\% \quad (27)$$

Donde  $m_{AE}$  (g) es la masa del aceite encapsulado,  $m_{Ai}$  (g) es la masa de aceite utilizado en la preparación de las cápsulas. Con esta finalidad se hizo un tratamiento cuantitativo de la composición de cada batch de encapsulación (aproximadamente 10 g de emulsión formadora) respecto de las cápsulas obtenidas luego de la deshidratación.

### III.8.6 Atributos morfológicos y ópticos por análisis de imagen

La evaluación de los atributos morfológicos y ópticos, de al menos 30 cápsulas de cada sistema, se realizó por medio de la técnica de análisis de imágenes digitales siguiendo la metodología descrita por Santagapita y col. (2010). Las imágenes se obtuvieron con una cámara Canon Power Shot A70 de 3,2 Mpix (Canon Inc., Malasia) con zoom fijado en 3,0X y lupa binocular (Unitron MS, Unitron Inc., Nueva York, Estados Unidos de América) con aumento 7X. La cámara se dispuso a 45° del plano del objeto y a una distancia de 40 cm del objeto a analizar. Se utilizó un gabinete de interior gris ( $L^*=50$  en la escala CIELAB) con iluminante D65. Las muestras se colocaron sobre placas de vidrio y se tomaron imágenes con fondo blanco y fondo negro:



**Figura III.4** Sistema de visión computarizada para la adquisición de imágenes para evaluar atributos de apariencia de los encapsulados.



El análisis de los parámetros morfológicos se realizó con el programa de licencia libre ImageJ (Santagapita, 2010, Córdoba y col., 2013). Entre los parámetros de tamaño se obtuvieron el diámetro (mm), perímetro (mm) y área (mm<sup>2</sup>). Se evaluaron además los parámetros de forma, circularidad y esfericidad, para cada uno de los sistemas de acuerdo con:

$$Circularidad = 4\pi * \frac{\text{Área}}{\text{Perímetro}^2} \quad (28)$$

$$Esfericidad = \frac{D_{may} - D_p}{D_{may} + D_p} \quad (29)$$

Donde la circularidad toma valores entre 0 y 1, indicando en 1 la existencia de un círculo perfecto. El factor de esfericidad varía desde 0 para una esfera perfecta, a 1 para un objeto alargado.

Las propiedades ópticas se evaluaron utilizando el software Adobe Photoshop Cs 8, para lo cual se obtuvo de cada cápsula las coordenadas de color en el sistema Hunter L a b, las cuales se transformaron en coordenadas del sistema CIE (1974) L\* a\* b\* por medio de las ecuaciones de Papadakis y col. (2000). El análisis de coordenadas cromáticas por procesamiento de imágenes digitales requirió en primera instancia una calibración del sistema. Para ello se compararon las medidas de color por análisis de imágenes digitales de tarjetas de cartón de diferentes colores, sin brillo y opacas, con medidas obtenidas con un fotocolorímetro Minolta CM-508d (Minolta Co. Ltd., Japón).

La traslucidez de las muestras se evaluó en términos del grado de opacidad de cada cápsula, como la relación entre el valor de luminosidad (L\*) determinado con fondo negro y fondo blanco, de acuerdo con la siguiente ecuación (Gutiérrez-López y col., 2015):

$$Opacidad = \frac{L_N^*}{L_B^*} \quad (30)$$

Donde  $L_N^*$  es la luminosidad de la cápsula con fondo negro, y  $L_B^*$  es la luminosidad con fondo blanco. Siendo la opacidad igual a 1 para muestras completamente opacas y 0 para muestras transparentes.

En forma complementaria se realizó el análisis de Kubelka-Munk cuyas variables se calcularon de acuerdo con lo descrito por (Judd y col., 1975):

$$a = \frac{1}{2} \left[ R + \frac{R_0 - R + R_g}{R_0 * R_g} \right] \quad (31)$$

$$b = (a^2 - 1)^{1/2} \quad (32)$$

$$R_\infty = a - b \quad (33)$$

$$K/S = \frac{(1 - R_\infty)^2}{2 * R_\infty} \quad (34)$$

$$S = \frac{1}{b} * \arctan \left[ \frac{(1 - a * R_0)}{b * R_0} \right] \quad (35)$$

$$K = S(a - 1) \quad (36)$$

Donde S es el coeficiente de dispersión, relacionado a las partículas de dispersión en el medio; K es el coeficiente de atenuación, relacionado a la concentración de pigmentos;  $R_\infty$  es la reflectancia de una capa de espesor infinito del material calculado a partir de la reflectancia de la muestra con fondo blanco ( $R$ ), teniendo el fondo blanco una reflectancia conocida ( $R_g$ ), y la reflectancia de una muestra con fondo negro ( $R_0$ ).

### **III.8.7 Estabilidad durante el almacenamiento**

Se evaluó la estabilidad del aceite de pescado en cápsulas con distinta composición y secadas al vacío, determinando la evolución de los productos primarios y secundarios de la oxidación lipídica. Se evaluó como control la estabilidad del aceite de pescado libre (AP), con la misma relación espacio de cabeza/volumen de acuerdo con la metodología propuesta por Sun-Waterhouse y col. (2011).

Se colocó aproximadamente un gramo de cápsulas en viales de vidrio transparentes, que luego se almacenaron durante 37 días en una cámara termostatzada a 30°C y 11 %HR (Relmar, Sáenz Peña, Argentina) con luz fluorescente (OSRAM, modelo L36w/640, Buenos Aires, Argentina). En las condiciones de almacenamiento seleccionadas las cápsulas se

encuentran en estado amorfo y se previenen los cambios estructurales (Drusch, Serfert, Van Den Heuvel & Schwarz, 2006).



**Figura III.5** Estudio de la estabilidad oxidativa en condiciones controladas de almacenamiento (30°C, 11% HR y luz fluorescente).

### *III.8.7.1 Extracción de lípidos para análisis de estado oxidativo*

Para los ensayos de estabilidad oxidativa, los lípidos se extrajeron de los sistemas encapsulados por el método de Bligh & Dyer (1959) con ligeras modificaciones. Se procesaron las cápsulas en presencia de 5,7 ml de metanol, 2 ml de agua ultra pura y 2,35 ml de cloroformo en presencia de un antioxidante sintético BHA (10  $\mu$ l, 30% en etanol) para frenar la oxidación. Luego de homogenizar, se añadieron 3 ml de agua ultra pura y 3,6 ml de cloroformo. La mezcla se transfirió a una ampolla de decantación y se separó y filtró la fase inferior (cloroformo con aceite). El cloroformo se evaporó en corriente de nitrógeno a temperatura ambiente y el aceite extraído se almacenó a -18°C bajo atmósfera de nitrógeno en viales sellados herméticamente a los efectos de prevenir la oxidación de las muestras.

### III.8.7.2 Cuantificación de productos primarios de la oxidación

Se determinó la concentración de productos de oxidación primaria, hidroperóxidos y dienos conjugados, espectrofotométricamente en un Evolution 600 UV-Vis (Thermo scientific, Waltham, USA). El valor de peróxido (VP) se determinó de acuerdo con el método oficial desarrollado por la International Dairy Food, IDF (1991), con ligeras modificaciones. Aproximadamente 0,02 ml del aceite extraído se disolvieron en 9,9 ml de una mezcla cloroformo metanol (70:30) y 0,05 ml de tiocianato de amonio (0,3 g/ml). Se determinó espectrofotométricamente el valor  $E_0$  midiendo la absorbancia del complejo resultante a 501 nm. Luego, se adicionó 0,05 ml de una solución de cloruro ferroso (0,35 g de tetrahidrato de cloruro de hierro (II) en 100 ml de agua y 2 ml de HCl 10 M), y luego de 5 min de reacción se registró el valor  $E_2$  en términos de la absorbancia del complejo férrico de color rojo (III). Los resultados se expresaron como miliequivalentes de oxígeno por kilogramo de aceite de pescado extraído, de acuerdo con:

$$PV = \frac{[E_2 - (E_0 + E_1)]}{55,84 * m_0} \quad (37)$$

Donde,  $E_0$  es la absorbancia a 501 nm de la mezcla de reacción antes de la adición de la solución de hierro (II).  $E_2$  es la absorbancia a 501 nm después de 5 minutos de la adición de la solución de cloruro de hierro (II).  $E_1$  es la absorbancia del blanco de reactivo y  $m_0$  es la masa (g) de la porción de aceite testado.

El valor de dienos se determinó de acuerdo con el método oficial de la AOAC 957.13 (1995). Una alícuota del lípido extraído (aprox. 100 mg) se disolvió en n-hexano en una dilución adecuada y se midió la absorbancia a 233 nm. El contenido de dienos se cuantificó, de acuerdo con:

$$VD, \% = 0,91 * a_2 \quad (38)$$

$$a_{dienes} = a_{233} - a_0 \quad (39)$$

$$a_i = A_i / (b * c) \quad (40)$$

Donde  $b$  es longitud del paso óptico en cm,  $c$  es la concentración de muestra final en g/L, y  $c=0,03$  (valor correspondiente a jabones y ácidos grasos). Sólo se utilizaron valores positivos de  $a$ .

### ***III.8.7.3 Cuantificación de productos secundarios de la oxidación***

Los productos de oxidación secundaria (aldehídos, cetonas y otros compuestos oxidados) reaccionan con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) dando compuestos de condensación coloreados que pueden ser medidos espectrofotométricamente a 530 nm. El valor de TBA se determinó según lo descrito en el método oficial AOAC Cd 19-90 (1993) con ligeras modificaciones. Las muestras oxidadas (1 ml) disueltas en n-butanol, se añadieron a 4 ml de solución de TBA (0,1% en butanol) y se calentaron durante 2 h a 95°C en tubos herméticamente cerrados. Luego se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 530 nm. El valor de TBA se expresó de acuerdo con:

$$\text{valor de TBA} = \frac{f(A - B)}{m} \quad (41)$$

Donde A es la absorbancia de la muestra; B es la absorbancia del blanco de reactivo; f es el factor de dilución y m es la masa del aceite extraído.

En todos los casos se cuidó que la absorbancia del blanco fuera menor a 0,1 para asegurar la ausencia de contaminantes e interferentes.

### ***III.8.7.4 Perfil lipídico (GC-FID) y cambios en el valor nutricional***

La composición en ácidos grasos se determinó por cromatografía de gases (GC) luego de derivatizar los aceites extraídos a metil ésteres de ácido graso (FAME) de acuerdo con el método oficial AOAC 963.33 (2000). Se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent 6850 (Santa Clara, CA) con inyector Split, columna de sílice fundida cubierta con poly(biscano)propil siloxano (60 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y espesor de film de 0,20  $\mu\text{m}$ . SP-2340 Supelco) y detector de ionización de llama (FID). Se utilizó helio como gas carrier a una velocidad de flujo de 0,6 ml/min. La temperatura del inyector se fijó en 260°C. La temperatura inicial del horno se mantuvo a 140°C por 5 min y se aplicó un

gradiente de temperatura de 140 a 240°C con una velocidad de calentamiento de 4°C/min. La identificación de los metil ésteres de ácidos grasos se llevó a cabo considerando el tiempo de retención de estándares de metil ésteres de 37 ácidos grasos (Supelco 37 Componentes FAME Mix, Bellefonte, PA). La integración del área debajo de los picos se realizó utilizando el software Chem Station (Sata Clara, CA). Asumiendo que el contenido de metil ésteres al inicio es cercano al peso de la muestra (100%), el perfil de ácidos grasos al tiempo cero se expresó como porcentaje de metil ésteres del área total del cromatograma. Siguiendo la estrategia reportada por Berdeaux, Marmesat, Velasco y Dobarganes (2012), la composición normalizada de los metil ésteres de ácidos grasos, se transformó en datos cuantitativos considerando que los principales ácidos grasos saturados (C16:0, C18:0) se mantuvieron constantes.

En base a la composición de ácidos grasos de las muestras, se calcularon algunos índices de calidad nutricional de lípidos. Los ácidos grasos saturados (AGS), ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) y ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) se calcularon como la suma de los respectivos ácidos grasos. Se calculó además la relación de ácidos grasos omega-6 respecto de los omega-3 (n6/n3) y los índices de aterogenicidad (IA) y trombogenicidad (IT) de acuerdo a Ulbricht & Southgate (1991):

$$IA = \left[ \frac{C12:0 + (4 * C14:0) + C16:0}{(n3PUFA + n6PUFA + MUFA)} \right] \quad (42)$$

$$IT = \frac{(C14:0 + C16:0 + C18:0)}{[(0.5 * n6PUFA) + (3 * n3PUFA) + \left(\frac{n3PUFA}{n6PUFA}\right)]} \quad (43)$$

Todas las determinaciones se realizaron al menos por duplicado. Los resultados se expresaron como valor promedio ± desviación estándar.

### ***III.8.7.5 Estudio de la distribución de aceite durante el almacenamiento***

Se evaluó la permeación natural del aceite encapsulado a la superficie de las cápsulas durante el almacenamiento en condiciones controladas (25°C, 11% HR y luz fluorescente) determinando la fracción de aceite superficial a distintos tiempos (0, 7, 15, 25 y 37 días), de acuerdo con el método descrito en la sección III.8.3.

### III.9 Aplicación de los encapsulados para el desarrollo de un producto cárnico enriquecido con AGPI n3

Se evaluó el efecto de la incorporación de cápsulas de polielectrolitos conteniendo aceite de pescado en productos cárnicos, como estrategia para el enriquecimiento y protección de la fracción de ácidos grasos saludables. Con esta finalidad se prepararon hamburguesas a base de carne vacuna cuya composición se ajustó de acuerdo con lo establecido en el Código Alimentario Argentino (CAA).

#### III.9.1 Diseño y formulación

Según el Art. 330 del CAA, “Se entiende por Hamburgués o bife a la hamburguesa, al producto elaborado con carne picada, sal, glutamato de sodio y ácido ascórbico. Su contenido de grasa no podrá exceder el 20%. Agentes ligantes o extensores como almidón y soja, así como sales de nitrito y nitrato no están autorizados como ingredientes este producto”. En relación a la adición de ácidos grasos esenciales en el alimentos, el CAA (Capítulo 5, Res. SPReI N° 161/2013 y SAGyP N° 213/2013, Res. GMC N° 01/12), establece que un alimento adicionado en ácidos grasos n3 será FUENTE, cuando contenga al menos 300 mg de ácido alfa-linolénico o al menos 40 mg de la suma de EPA y DHA por cada 100 g o por porción, o bien con ALTO CONTENIDO de ácidos grasos n3 cuando contenga al menos 600 mg de ácido alfa-linolénico o al menos 80 mg de la suma de EPA y DHA por cada 100 g o por porción. Teniendo en cuenta estas especificaciones, se diseñó un producto cárnico dietético y enriquecido a los efectos de cumplir con la denominación de “hamburguesa con alto contenido de AGPI n3”.

La preparación de las hamburguesas enriquecidas con ácidos grasos n3, se realizó en el Laboratorio de Industrias Alimentarias II de la Universidad Nacional del Chaco Austral (Presidencia Roque Sáenz Peña, Chaco, Argentina). Los productos se elaboraron en base a carne vacuna (*gluteus medius*) con una combinación de cortes de cerdo (tocino), aceite de pescado (libre o encapsulado) y sal. El contenido graso total se estandarizó al 10% de la formulación cruda, por incorporación de tocino de cerdo y aceite de pescado (libre o encapsulado). La cantidad de aceite de pescado incorporado (libre o encapsulado) se ajustó para que en el producto cocido, la suma de EPA+DHA sea superior a 80 mg/ producto b.h.,

cumpliendo así con los requisitos requeridos para la denominación “alto contenido” de ácidos grasos n3. La cantidad necesaria de aceite de pescado se determinó en un ensayo exploratorio previo (datos no presentados) donde se evaluó la retención post cocción en las hamburguesas. De esta manera, la cantidad de cápsulas a incorporar en la formulación para que el aporte de EPA y DHA sea uniforme entre los tratamientos, se basó en el contenido de aceite total (encapsulado + superficial) y perfil lipídico de los encapsulados y en las pérdidas post cocción de la hamburguesa.

La cantidad de cloruro de sodio se ajustó al 1,5%. Esta cantidad cumple con lo propuesto en la ley 26.905 “Consumo de sodio - Valores Máximos”, la cual establece para el grupo de chacinados frescos como las hamburguesas, que el máximo contenido de sodio permitido por 100 g del producto es de 850 mg, resultando un máximo de 2,16 g de sal de mesa (NaCl), por cada 100 g de producto.

### III.9.2 Preparación de las hamburguesas

Los tejidos musculares y adiposos se procesaron separadamente utilizándose para ello una picadora de alimentos de laboratorio. La carne picada se mezcló con la sal y se la conservó en condiciones de refrigeración (4°C) un día antes de la preparación, a los efectos de favorecer la extracción y solubilidad de las proteínas miofibrilares.

Los sistemas se formularon ajustándose en casa caso, la proporción de carne (aproximadamente 90%), grasa (8,5 - 9%) y aceite (libre o encapsulado, entre 1- 1,5% de la formulación) de manera que todos los sistemas tuvieran el mismo contenido de grasa (10 %). Los ingredientes se mezclaron y posteriormente se procedió al moldeo de hamburguesas de aproximadamente 100 g en pacas de Petri de 10 cm de diámetro recubiertas internamente con papel de aluminio como continente del producto. Las hamburguesas se envasaron al vacío en films de permeabilidad media al vapor de agua ( $1,858 \times 10^{-7}$  g de agua día<sup>-1</sup> m<sup>-1</sup> Pa<sup>-1</sup>) y se conservaron en condiciones de congelaron a -18 °C, hasta el momento de su cocción y/o análisis.

### III.9.3 Cocción

Las hamburguesas se cocinaron en horno eléctrico con circulación forzada a 200 °C por 15 minutos. Estas condiciones resultaron suficiente para que la temperatura en el centro



geométrico sea mayor que la temperatura de coagulación de las proteínas miofibrilares (aprox. 77°C). Las condiciones de cocción se establecieron en un ensayo previo y se mantuvieron constante en todos los tratamientos.

### III.9.4 Caracterización fisicoquímica

Se realizó la determinación del contenido de humedad, actividad acuosa y lípidos totales de los productos formulados según se detalla en secciones previas. La determinación de humedad se realizó por deshidratación a 105°C, de acuerdo con el método 950.46. La retención de agua y grasas totales se calcularon como la diferencia entre la cantidad de agua (o grasa) en los productos cocidos y crudos, y se expresó como porcentaje respecto del contenido del producto crudo.

### III.9.5 Evaluación de color y textura

La **evaluación del color** de las hamburguesas cocidas se realizó utilizando un espectrofotómetro según se describe en la sección III.6.10. Previo a la determinación, las hamburguesas se procesaron moderadamente y se colocaron en placas de vidrio de igual tamaño y transparencia. Por cada sistema se realizaron cinco lecturas en posiciones aleatorias a los efectos de lograr una medida representativa.

Las **características texturales** de las hamburguesas cocidas se evaluaron utilizando un Texturómetro CT3 (Brookfield, MA, USA) provisto con una celda de carga de 4,5 kg. Luego de la cocción, las hamburguesas se enfriaron a 25°C y se cortaron con sacabocado cilindros de  $22 \pm 0.6$  mm de diámetro y  $16 \pm 0.4$  mm de altura, obteniéndose 5 unidades del perímetro y del centro de cada hamburguesa. Las muestras se sometieron a una doble compresión con una deformación del 40% de la altura del producto, con un émbolo (TA4/100) de 38,1 mm diámetro, a una velocidad constante de 1 mm/min y tiempo de recuperación de 10 s. A partir del perfil de textura (APT) obtenido se obtuvieron los parámetros de dureza, elasticidad, gomosidad, masticabilidad, cohesividad, adhesividad y firmeza, del reporte emitido por el software Texture Loader V1.0 (Brookfield, MA, USA).

### III.9.6 Evaluación del deterioro oxidativo

El deterioro oxidativo de los productos cárnicos enriquecidos por efecto de la cocción y durante el almacenamiento en condiciones de congelación, se evaluó determinando el valor de peróxidos (VP) y valor de TBA siguiendo la metodología descrita en las secciones III.8.7.1 y III.8.7.2. Los valores VP y TBA se determinaron en la fracción lipídica extraída por el método de Bligh and Dyer (Bligh y col., 1959) (sección III.8.7.1), empleando 10 g de muestra, en presencia de un antioxidante sintético BHA (10  $\mu$ l, 30% en etanol) para frenar la reacción de oxidación. Las grasas extraídas se conservaron en viales herméticamente cerrados y en atmósfera de nitrógeno a  $-18^{\circ}\text{C}$  hasta el momento del análisis.

El estudio de la estabilidad oxidativa durante el almacenamiento en condiciones de congelación se realizó de acuerdo con un diseño escalonado simple, en que las muestras crudas y congeladas ( $-18^{\circ}\text{C}$ ), se extrajeron a intervalos definidos de tiempo y se sometieron a cocción ( $200^{\circ}\text{C}$ , 15 min). Inmediatamente después de la cocción, se procedió a la extracción de la fracción grasa según lo descrito anteriormente. Adicionalmente se evaluó el perfil de ácidos grasos por GC-FID, siguiendo la metodología descrita en III.8.7.4.

### III.10 Análisis de datos

La comparación de medias entre dos grupos se realizó mediante la prueba T. La comparación de medias entre varios grupos se realizó por ANOVA de una vía y posteriormente se aplicó el Test de Tukey para la comparación múltiple. En ambos casos, las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para  $p < 0,05$  (intervalo de confianza del 95%). Los análisis estadísticos y modelado de datos experimentales se realizaron con el programa Prism v5.01 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA). El análisis multivariado de componentes principales se realizó utilizando el programa Statgraphics Plus para Windows Versión 4.0 (Manugistics Inc Rockville, MD).

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## IV. RESULTADOS y DISCUSIÓN

### IV.1 Caracterización de la goma exudada de *Prosopis alba* empleada como material de pared

En esta sección, se describen las características de la goma de *P. alba* en estado natural y el efecto de distintos métodos de purificación, para luego profundizar el estudio de aspectos físico-químicos, estructurales, funcionales y toxicológicos. Estos resultados permitirán evaluar el potencial tecnológico de la goma como aditivo alimentario y, en particular, concluir sobre la aplicabilidad la goma como componente de material de pared en sistemas de encapsulación por gelación iónica, para la protección de ácidos grasos poliinsaturados.

#### IV.1.1 Obtención de la goma

Como se indicó en la sección III.3.1, los exudados de *P. alba* se recolectaron manualmente de la corteza de árboles nativos y protegidos, ubicados en la zona central de la provincia de Chaco, en el noreste argentino. La muestra incluyó exudaciones de cortes debidos a prácticas agrícolas, así como de grietas naturales sobre la corteza. En la Figura IV.1 se muestra el aspecto de los exudados sobre la corteza de tronco y ramas de *P. alba*.



**Figura IV.1** Goma exudada de *Prosopis alba* en estado natural. (a, c y d) Exudaciones espontáneas. (b) Exudación inducida por daños mecánicos.

Durante la recolección se observó que los exudados son altamente solubles en agua. Si bien esta propiedad es deseable para su empleo en sistemas acuosos (Porto y col., 2015), representó una dificultad al momento de la recolección, ya que limitó la obtención del material a períodos secos, debido a que la lluvia afecta la formación y crecimiento de los exudados. Otros investigadores también señalaron que la cosecha de goma exudada por especies botánicamente relacionadas (*Prosopis spp.*) en países tropicales, es propicia en la “estación seca” donde la escasez de precipitaciones posibilita una recolección copiosa del material (Clamens y col., 1998, Vernon-Carter y col., 2000).

En condiciones ambientales de baja humedad los exudados se deshidratan, se endurecen y se adhieren fuertemente a la corteza, lo cual hizo necesario el uso de instrumentos adecuados para lograr un desprendimiento cuidadoso del material, que no dañe el árbol, y que permita su extracción con la menor cantidad de restos de otros materiales, principalmente corteza.

Las muestras recolectadas incluyeron piezas más o menos redondeadas de tamaño variable y fragmentos angulosos resultantes de su rotura. Los exudados eran translúcidos, de color ámbar, que variaba desde un tono claro a un pardo oscuro, de consistencia sólida y de sabor amargo, débilmente azucarado. En la Figura IV.2 se muestra la apariencia (morfología, color y translucidez) de la goma antes de su purificación.



**Figura IV.2** Goma exudada de *Prosopis alba* antes de la purificación.

El contenido de agua de una muestra representativa de los exudados recolectados fue de  $14,23 \pm 0,08$  % b.s. y su  $a_w$  de 0,612. En estas condiciones, se pudo almacenar la muestra cruda sin riesgos de deterioro microbiológico (Syamaladevi y col., 2010). Por otro lado, el

contenido de materias inorgánicas resultó 30 mg/g material b.s., y estuvo fuertemente influenciado por la fracción de material extraño (corteza, polvo, arena, insectos, etc.), que a su vez, dependió de los medios y condiciones de extracción. Por tanto, una caracterización exhaustiva de la composición del material en estado natural (sin purificación) carece de sentido, haciéndose indispensable la remoción de la fracción insoluble como etapa clave en el proceso de acondicionamiento.

### **IV.1.2 Evaluación del método de purificación sobre la composición general de la goma**

Debido a que la composición y las propiedades funcionales de las gomas son sensibles a las condiciones de preparación (López-Franco y col., 2012), resultó interesante comparar el efecto de distintos métodos de purificación en base a los cambios en la composición y en ciertas propiedades fisicoquímicas que podrían afectar la funcionalidad del biomaterial. Para ello, se adoptaron procedimientos comúnmente aplicados a gomas exudadas.

Muchas gomas comercialmente disponibles, luego de ser recolectadas, son sometidas a un mínimo proceso de acondicionamiento. En el caso particular de la goma arábiga (*Acacia senegal*, *A. seyal*), los exudados son cernidos y clasificados para separarlos de materiales extraños. Seguidamente, las piezas son trituradas hasta alcanzar el tamaño de partícula deseado (Islam y col., 1997). En ciertos casos, el proceso incluye la disolución, filtración o centrifugación y la deshidratación por atomización (Verbeken y col., 2003).

En la investigación de nuevas fuentes de gomas exudadas, el proceso de filtración es el más empleado (Goycoolea y col., 1997). Otras variantes incluyen la diálisis o ultrafiltración (López-Franco y col., 2012) o bien, la precipitación en solventes de polaridad intermedia (comúnmente etanol), para separar las fracciones de goma insolubles en éste (Goycoolea y col., 1995a).

En este trabajo, se evaluaron los métodos de filtración (F), diálisis (D) y precipitación (P) sobre el perfil composicional y propiedades fisicoquímicas de la goma.

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos. Los análisis también se realizaron para GA adquirida de Sigma (pureza >95%), a fin de comparar los resultados con la goma comercial, actualmente más utilizada.

**Tabla 1.** Efecto del método de purificación sobre la composición y algunas propiedades fisicoquímicas de la goma exudada de *Prosopis alba*. F-GAL (muestra clarificada por filtración), D-GAL (muestra filtrada y dializada), P-GAL (muestra obtenida por precipitación con etanol) y GA (goma arábica).

	F-GAL	D-GAL	P-GAL	GA
Carbohidratos totales, % b.s.	61,62 ± 0,09 <sup>a</sup>	64,06 ± 0,99 <sup>b</sup>	66,01 ± 1,05 <sup>b</sup>	65,2 ± 0,58 <sup>b</sup>
Nitrógeno total, % b.s.	2,21 ± 0,05 <sup>a</sup>	2,12 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,90 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,21 ± 0,01 <sup>c</sup>
Proteínas (x 6,25), % b.s.	13,81 ± 0,33 <sup>a</sup>	13,26 ± 0,34 <sup>a</sup>	11,85 ± 0,17 <sup>a</sup>	1,37 ± 0,03 <sup>b</sup>
Cenizas, % b.s.	2,78 ± 0,00 <sup>c</sup>	2,29 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,57 ± 0,01 <sup>b</sup>	4,67 ± 0,06 <sup>d</sup>
Na <sup>+</sup> , mg/g goma b.s.	0,88 ± 1,27 <sup>a</sup>	0,53 ± 1,10 <sup>a</sup>	0,65 ± 0,02 <sup>a</sup>	3,96 ± 1,81 <sup>b</sup>
K <sup>+</sup> , mg/g goma b.s.	5,30 ± 0,01 <sup>d</sup>	0,50 ± 0,00 <sup>a</sup>	2,70 ± 0,00 <sup>c</sup>	1,51 ± 0,01 <sup>b</sup>
Ca <sup>2+</sup> , mg/g goma b.s.	4,61 ± 0,02 <sup>a</sup>	4,56 ± 0,02 <sup>a</sup>	4,86 ± 0,03 <sup>b</sup>	8,84 ± 0,07 <sup>c</sup>
Polifenólicos, mg eq. AG/ g goma b.s.	9,55 ± 0,06 <sup>a</sup>	5,88 ± 0,16 <sup>b</sup>	5,01 ± 0,22 <sup>c</sup>	1,76 ± 0,03 <sup>d</sup>
Taninos, mg eq. AT/g goma b.s.	2,10 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,20 ± 0,01 <sup>b</sup>	2,14 ± 0,04 <sup>a,b</sup>	2,00 ± 0,04 <sup>c</sup>
Color, L*	83,55 ± 0,37 <sup>b</sup>	84,62 ± 0,41 <sup>b</sup>	83,00 ± 0,35 <sup>b</sup>	94,30 ± 1,53 <sup>a</sup>
Color, a*	4,88 ± 0,05 <sup>d</sup>	2,53 ± 0,05 <sup>c</sup>	1,57 ± 0,10 <sup>b</sup>	1,30 ± 0,00 <sup>a</sup>
Color, b*	13,6 ± 0,12 <sup>d</sup>	8,68 ± 0,05 <sup>b</sup>	11,80 ± 0,22 <sup>c</sup>	7,53 ± 0,10 <sup>a</sup>
pH (sol. 5%)	4,81 ± 0,01 <sup>a</sup>	4,85 ± 0,03 <sup>a</sup>	5,11 ± 0,01 <sup>b</sup>	4,98 ± 0,01 <sup>c</sup>
[α] <sub>589,3</sub> <sup>25</sup>	46,46 ± 1,53 <sup>a</sup>	40,67 ± 1,47 <sup>b</sup>	40,72 ± 1,65 <sup>b</sup>	-58,78 ± 0,60 <sup>c</sup>

Valores promedios ± desviación estándar con diferentes letras en la misma fila son significativamente diferentes de acuerdo al análisis de la varianza (p<0,05).

Los carbohidratos fueron los componentes mayoritarios de la goma para los tres métodos de purificación estudiados y para GA. La extracción selectiva de sustancias de bajo PM por diálisis, condujo a un aumento relativo de los polisacáridos de mayor PM. De la misma manera, la precipitación de polisacáridos con solvente, condujo a un aumento relativo de los mismos. Es importante señalar que el método fenol-sulfúrico, utilizado para la cuantificación de carbohidratos, podría presentar limitaciones, especialmente en aquellas muestras cuya composición difiera cualitativamente de la sustancia (glucosa) utilizada como estándar. Esta limitación fue reportada por Mecozzi (2005) quien observó que en presencia de fenol y en

medios fuertemente ácidos, muestras complejas compuestas por azúcares neutros, ácidos urónicos y amino azúcares presentan características espectrales y máximos de absorción distintos al de la glucosa (máximo de absorción a 485 nm), por lo que en estos casos, se estaría subestimando el contenido de carbohidratos totales. Mecozzi indicó que los espectros de absorción obtenidos por el método fenol-sulfúrico, resultan del aporte individual de los azúcares presentes en la composición de muestras naturales. Los espectros de absorción (datos no mostrados) determinados para GAL, obtenida por cualquiera de los métodos de purificación estudiados, y para GA fueron similares, con un único máximo de absorción a alrededor de 478 nm, lo cual indicaría que presentan una composición de azúcares similar.

El contenido de proteínas de GAL, independientemente del método de purificación, fue mucho mayor que el de GA, y mayor incluso que los valores reportados para gomas obtenidas de otras especies de *Prosopis* (entre 2,1 y 6,8 %) (Trejo-Espino y col., 2010, Alfrén y col., 2012). El contenido de proteínas determinado para GA (1,37 % b.s) fue similar al determinado por otros autores para goma arábica comercial (entre 1 y 3,73 % b.s.) (Mhinzi, 2002, Alfrén y col., 2012, Lopez-Torrez y col., 2015). Esta mayor proporción de compuestos proteicos en GAL podría tener un impacto importante sobre las propiedades funcionales de la goma. Román-Guerrero y col. (2009) realizaron un fraccionamiento de la goma de mezquite (GM) y encontraron que, la fracción con un contenido intermedio de proteínas, (16.29 % b.s.) presentó actividad superficial, con mayor viscosidad interfacial y mayor módulo elástico que la goma sin fraccionar, resultando en mejores propiedades emulsionantes.

La filtración y la diálisis no mostraron diferencias significativas, lo cual sugiere que la goma no contiene péptidos libres de bajo peso molecular (López-Franco y col., 2012) o bien, que se encuentran interactuando con polisacáridos que quedan retenidos luego de la diálisis. La precipitación con alcohol probablemente lleva a la pérdida de compuestos nitrogenados solubles en etanol y por lo tanto condujo a un menor contenido de proteínas (11,85 % b.s.).

Las muestras de GAL presentaron un contenido de cenizas inferior al de GA (Tabla 1). El contenido de materias inorgánicas medido en GA resultó similar al reportado por Mihnzi (2004) para *A. senegal* var. *senegal* (4,5 - 3,8%). Tanto la diálisis como la precipitación alcohólica condujeron a una reducción en el contenido de materias inorgánicas. Esta disminución se observó para  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . No obstante, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  no presentó



diferencias entre F-GAL y D-GAL, y evidenció un ligero aumento para P-GAL. Esto confirma que GAL al igual que GM es una sal ácida de  $\text{Ca}^{2+}$  (Vernon-Carter y col., 2000) y el catión precipita o se retiene junto a la porción de polisacáridos de alto peso molecular.

En la muestra de F-GAL la abundancia de metales alcalinos y alcalinos térreos presentó la tendencia  $\text{K}^+ > \text{Ca}^{2+} > \text{Na}^+$ . Trabajos previos demostraron que el contenido de metales de las gomas exudadas, deriva de los cationes de las sales de ácidos urónicos. En la mayoría de los casos refleja la composición del suelo sobre el cual crece el árbol (Anderson y col., 1989a, Abed El Kader y col., 2003, Lelon y col., 2010) por lo que el perfil de cationes también constituye una particularidad de este biomaterial.

El contenido de polifenoles totales se determinó por el método de Folin-Cicolteau y se expresó como equivalentes de ácido gálico. En la Tabla 1 se observa que el contenido de compuestos fenólicos de GAL fue mucho mayor que el determinado para GA, especialmente en la muestra obtenida por filtración. Con la diálisis se redujo un 40%, probablemente debido a la pérdida de polifenoles libres (no glicosilados) de bajo peso molecular. Una reducción similar se observó en P-GAL y esto podría atribuirse a la extracción de polifenoles solubles en alcohol. Debido a la potencial actividad antioxidante de estos compuestos, una disminución en su contenido conduciría a la reducción de una propiedad funcional de gran interés para su aplicación.

Tanto GAL como GA presentaron taninos en su composición (Tabla 1). El contenido de taninos de GAL resultó ligeramente afectado por los métodos de purificación. Respecto de la muestra filtrada, se observó una concentración ligeramente mayor en la muestra purificada por diálisis, probablemente debido a la retención de taninos de alto peso molecular, o bien, la existencia de taninos glicosilados a polisacáridos de alto peso molecular (López-Franco y col., 2012). Esto permitiría además explicar el aumento en la concentración de taninos observada en la fracción precipitada en alcohol. El contenido de taninos fue levemente mayor en las muestras de GAL purificada por cualquiera de los métodos que en GA. El contenido de taninos, determinado para GA, fue similar al reportado por Mihnzi (2004) para *A. senegal* var. *senegal* el cual estuvo comprendido entre 2,8 – 5,2 mg/g de goma. La concentración de taninos en GAL fue menor que la determinada para goma exudada de *Prosopis velutina* (4,6 mg/g) (Goycoolea y col., 1997) y menor que la goma de *Prosopis spp.* (3,5 mg/g) (López-Franco y col., 2012).

El contenido de taninos en muestras de gomas exudadas se relaciona con diversos aspectos negativos de calidad (coloración, toxicidad, adulteración, purificación deficiente, etc.). La presencia de taninos en gomas se ha considerado un riesgo para la salud (López-Franco y col., 2012), habiéndose relacionado a la aparición de efectos mutagénicos (Goycoolea y col., 1997). Esta situación limitó la aprobación de la GM como aditivo alimentario GRAS a nivel mundial (Vernon-Carter y col., 2000). Sin embargo, la ingesta directa de GM por pueblos originarios de Sonora, México no registra antecedentes de toxicidad (Goycoolea y col., 1997, Vernon-Carter y col., 2000), habiéndose aprobado la GM para usos alimenticios por la Secretaría de Bienestar de ese país (Vernon-Carter y col., 2000). En este sentido, GAL filtrada presentó menor concentración de taninos que GM, lo cual contribuye a considerar su inocuidad, indicando que la filtración fue un método adecuado para el acondicionamiento de la goma.

En forma complementaria al estudio de la composición química de la goma, se realizaron determinaciones de color empleando un fotocolorímetro. En la Tabla 1 se muestran los parámetros de cromaticidad  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  de las muestras purificadas.

Las muestras purificadas de GAL presentaron valores similares de  $L^*$ , no obstante, se encontraron diferencias en los parámetros  $a^*$  y  $b^*$ . La diálisis y precipitación, condujeron a una reducción en el grado de rojo y de amarillo, indicando la eliminación de sustancias coloreadas de bajo peso molecular (Figura III.1), o bien la extracción de pigmentos solubles en el solvente orgánico. En ambos casos, los cambios en el color puede relacionarse con la disminución observada en el contenido de polifenólicos (Tabla 1), cuyo efecto en la coloración ha sido ampliamente documentado (Fennema, 2010).

En comparación con GA, las muestras purificadas de GAL presentaron una menor luminosidad ( $L^*$ ), mayor grado de rojo ( $a^*$ ) y mayor grado de amarillo ( $b^*$ ), correspondiéndose con la percepción visual de un color pardo intenso. Esta característica también fue reportada para GM (Vernon-Carter y col., 2000). Distintos autores señalaron que la coloración de GM es el principal motivo por el cual se la considera un sustituto de GA de inferior calidad (Goycoolea y col., 1997, Vernon-Carter y col., 2000, López-Franco y col., 2012). Sin embargo, otros autores reportaron que esta característica podría tener especiales ventajas cuando se utilice a la goma como material encapsulante, ya que podría actuar como filtro de luz (Vernon-Carter y col., 1996, Jiménez-Aguilar y col., 2011, Vasile y col., 2015).

Soluciones al 5% p/v de gomas purificadas (Tabla 1), exhibieron valores de pH ligeramente ácidos y esto podría ser atribuido al contenido de ácidos urónicos naturalmente presente en las gomas exudadas (López-Franco, et al., 2012). El valor de pH resultó levemente afectado por el método de purificación y, similar en promedio, al valor determinado para GA. El pH de la solución de GA estuvo en el rango de los valores informados por Mihzni (2004) para *A. senegal* var. *senegal* (4,84 a 5,01).

La rotación óptica ha sido utilizada para evaluar la identidad de gomas exudadas y como un parámetro de clasificación dentro del marco regulatorio (Biswas y col., 2000). Al igual que para otras gomas exudadas de *Prosopis*, las gomas resultantes de la purificación de GAL presentaron actividad dextrorrotatoria (Anderson y col., 1989a) contrariamente a la actividad óptica medida para GA. La rotación óptica específica medida para GA fue similar a la reportada por Mihzni (2004) para la goma de *A. senegal* var. *senegal* (-55). Respecto de la muestra filtrada, la diálisis y precipitación en alcohol, condujeron a una reducción en el contenido de sustancias dextrorrotatorias resultando F-GAL>P-GAL>D-GAL, de mayor a menor desviación dextrorrotatoria. López-Franco y col. (2012), trabajando con gomas de *Prosopis spp.*, observaron que el contenido de polisacáridos ejerce un efecto predominante sobre el valor de rotación óptica, el cual fue dependiente del método de purificación empleado.

A partir de los resultados presentados en la Tabla 1, se concluyó que la filtración sería el proceso de purificación más conveniente ya que se obtiene una goma con un balance adecuado de proteínas/carbohidratos (Román-Guerrero y col., 2009) y con una mayor retención de compuestos bioactivos (polifenoles, taninos, etc.) de interés por su actividad antioxidante, entre otras. La retención de estos compuestos sería crítica para el uso de la goma como material de pared en la protección de ácidos grasos sensibles a la oxidación.

El proceso de diálisis no produjo cambios significativos en los componentes mayoritarios (polisacáridos y proteínas) de la goma, y al igual que la precipitación en alcohol, redujo el contenido de polifenoles respecto de la filtración. La filtración es además, un método sencillo, no tiene requerimientos tecnológicos específicos (como membranas especiales), no requiere el uso de solventes y es fácil de escalar a nivel industrial.

### IV.1.3 Composición y estructura de GAL

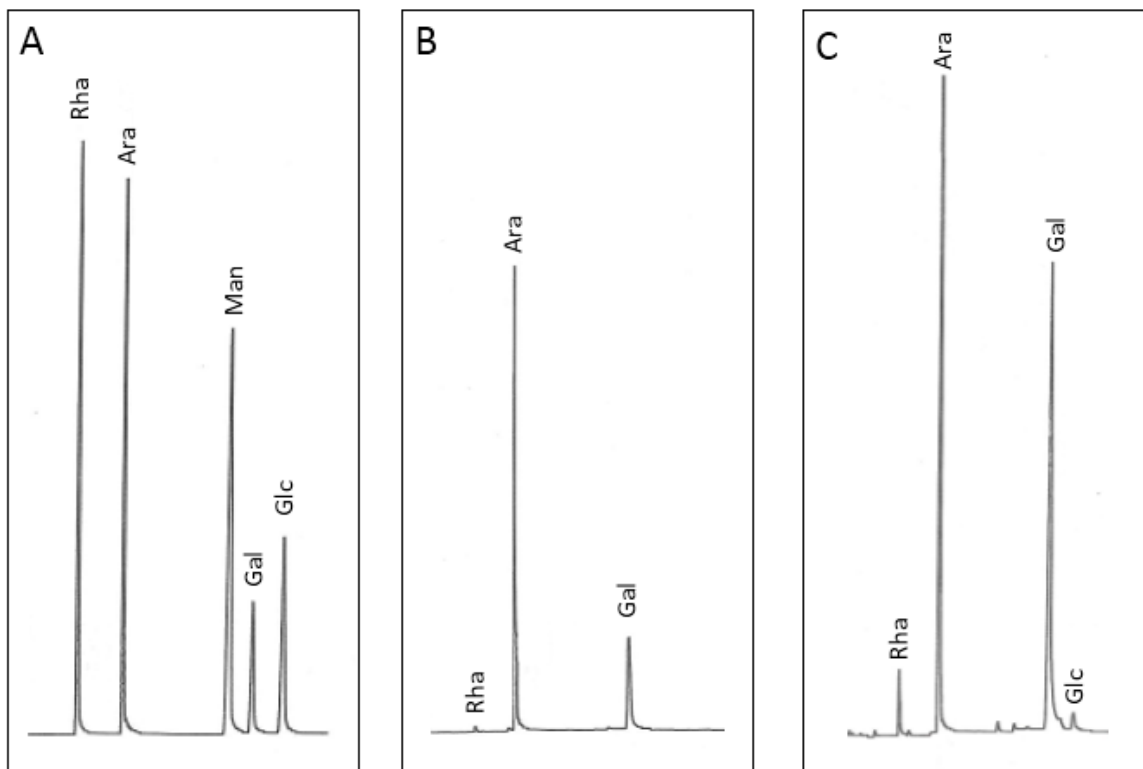
Una vez definido el método de filtración como el más conveniente, se completó la caracterización química y estructural de la goma exudada de *P. alba* (GAL) y se la comparó con la goma arábiga (GA) por su importancia académica y tecnológica. Conocer la estructura de materiales complejos como los hidrocoloides, es importante para poder comprender y predecir sus propiedades. La caracterización, empleando diversos enfoques y técnicas y la combinación de los mismos, permite la obtención de datos complementarios. Cada técnica contribuye a la caracterización de los componentes a través de información de diferente naturaleza. En esta parte del trabajo, se determinó la composición de monosacáridos mediante cromatografía gaseosa (GC-FID), el contenido de ácidos urónicos por espectroscopía UV-vis, y se complementó esta información con la obtenida por resonancia magnética nuclear (RMN) y espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

#### IV.1.3.1 Determinación de monosacáridos neutros

El análisis de la composición de monosacáridos constituye uno de los aspectos más importantes en la química estructural de los polisacáridos. En la Figura IV.3 se muestran los cromatogramas obtenidos por GC-FID, de los alditoles peracetilados de los monosacáridos componentes obtenidos a partir de la goma exudada de *Prosopis alba* (Figura IV.3 B) y goma arábiga (Figura IV.3 C).

Se observó que ambas gomas están compuestas principalmente por arabinosa y galactosa, aunque en proporciones diferentes. GAL presentó arabinosa (71%) y galactosa (25%) como monosacáridos mayoritarios, mientras que GA presentó arabinosa (50%), galactosa (44%) y en menor proporción rhamnosa (3%).

Esta proporción de monosacáridos neutros se informó como una característica de las gomas exudadas de la familia de las *Gummiferae*, las cuales se han reportado compuestas principalmente por arabinosa (41 -22 %), galactosa (53 - 32%) y rhamnosa (1- 3%) (Biswas y col., 2000, Williams y col., 2009, Lopez-Torrez y col., 2015).



**Figura IV.3** Cromatogramas obtenidos para acetatos de alditoles de azúcares. Estándar (A). GAL (B). GA (C). Rha: rhamnosa, Ara: arabinosa, Man: manosa, Gal: galactosa, Glc: glucosa.

De acuerdo con la clasificación propuesta por Doco y col. (2007), GAL y GA podrían ser denominados como “polisacáridos ricos en arabinosa y galactosa” (PRAG).

La relación arabinosa:galactosa en GAL (2,85:1) fue superior a la reportada para los exudados de *Prosopis juliflora* (2,0:1) (Vernon-Carter y col., 2000), *Prosopis leavigata* (0,93:1) (Orozco-Villafuerte y col., 2003) y *Prosopis spp.* (0,5:1) (Román-Guerrero y col., 2009). Esto se ha relacionado con particularidades de la fuente botánica, la edad de los árboles productores, las condiciones climáticas y las características el suelo, que de acuerdo con Al-Assaf y col. (2005) ejercen notable influencia sobre la composición de azúcares de las gomas exudadas.

La composición de monosacáridos permitió distinguir el exudado de *P. alba* de otras especies de *Prosopis* (GM) y de GA, lo cual podría relacionarse con propiedades funcionales y aplicaciones diferentes.

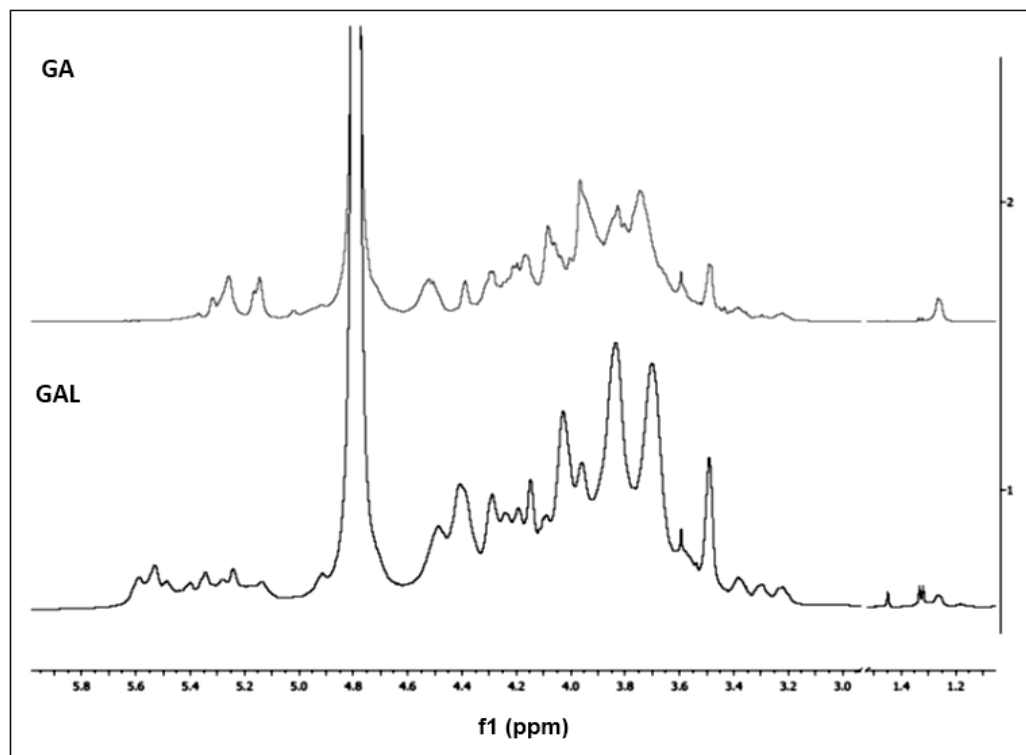
### ***IV.1.3.2 Determinación de ácidos urónicos***

GAL presentó un menor contenido de ácidos urónicos ( $14,93 \pm 0,64$  %) respecto de GA ( $21,42 \pm 0,77$  %). El contenido de ácidos urónicos de GAL resultó comparable a los reportados para GM, los cuales estuvieron comprendidos entre 16,2 % y 23,27 % (Orozco-Villafuerte y col., 2003, Román-Guerrero y col., 2009). Por otro lado, el contenido de ácidos urónicos de GA estuvo comprendido en el rango reportado por Biswas y col. (2000) para goma de *Acacia seyal*, el cual varió entre 13 y 24 %.

Los ácidos urónicos son componentes naturales en gomas exudadas encontrándose como sales de Mg, K y Ca (Montenegro y col., 2012). De acuerdo con López-Franco y col. (2012), la proporción de ácidos urónicos en GAL y GA, resultó coherente con el contenido materias inorgánicas, presentando GA la mayor concentración de cenizas obtenidas por calcinación (Tabla 1). A pesar de su mayor contenido en ácidos urónicos, GA presentó un pH relativamente mayor (4,98) que GAL (4,81), lo cual podría indicar que en solución acuosa, el grado de disociación es ligeramente menor (Beristain y col., 1996). El grado de disociación de los grupos  $-\text{COOH}$  a lo largo de la cadena del polímero podría tener importantes efectos en sus propiedades funcionales (sección IV.1.5).

### ***IV.1.3.3 Resonancia magnética nuclear $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$***

Como complemento al análisis de composición de las gomas, se utilizó espectroscopía de RMN para elucidar características estructurales de GAL, tomando como referencia los datos reportados para GA. En la Figura IV.4 se muestran los espectros de resonancia magnética nuclear  $^1\text{H}$  de GA y GAL.



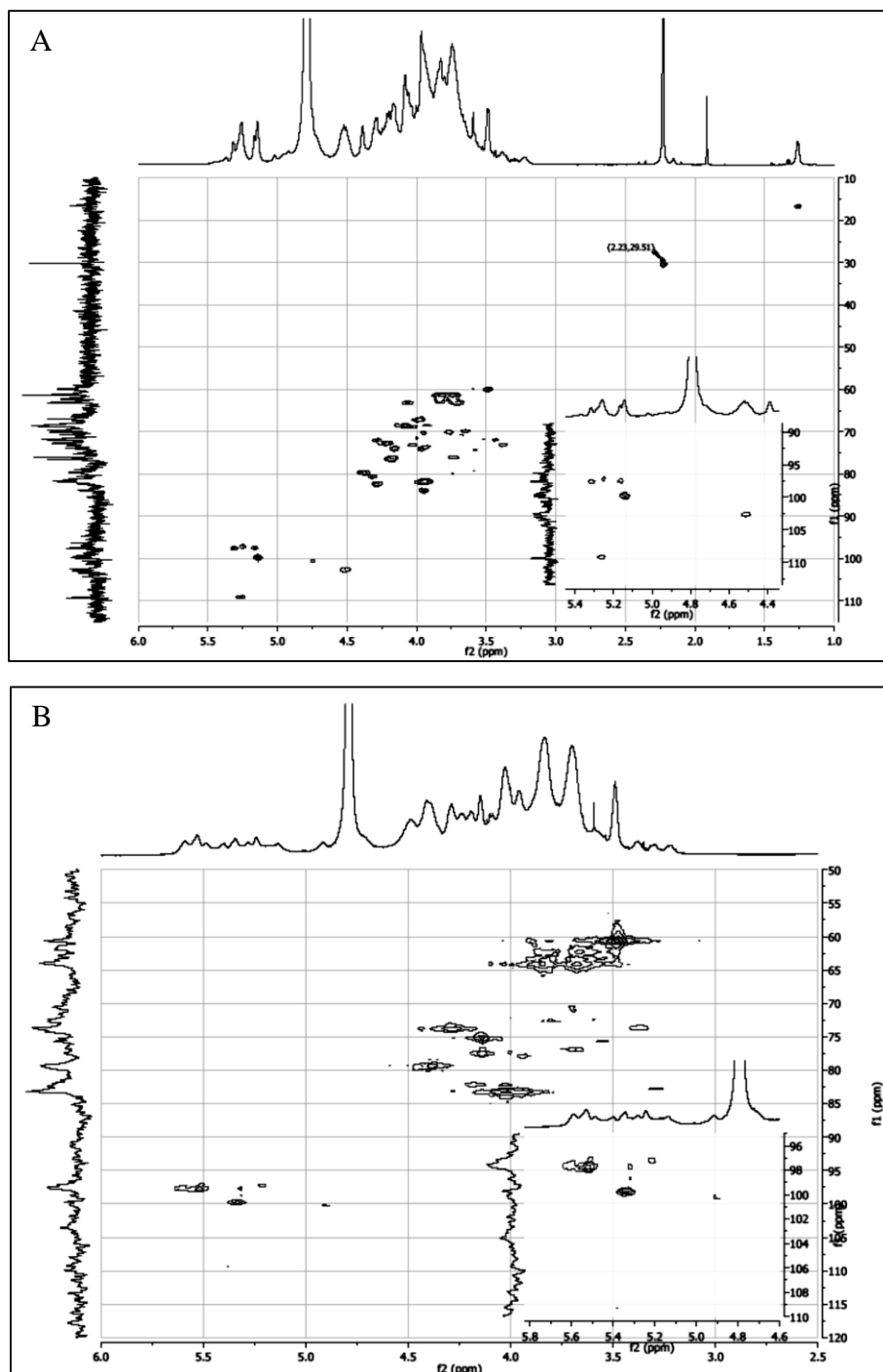
**Figura IV.4** Espectros RMN  $^1\text{H}$  de goma arábica (GA) y de goma exudada de *Prosopis alba* (GAL).

Los espectros protónicos permitieron observar la existencia de señales comunes entre GA y GAL, como así también, evidenciaron una mayor complejidad en el espectro correspondiente a GAL, especialmente en la región anomérica (4,9 - 5,7 ppm).

A fin de profundizar el conocimiento de la estructura de los polisacáridos, se registraron los espectros bidimensionales HSQC  $^1\text{H}$   $^{13}\text{C}$  para GA (Figura IV.5 A) y GAL (Figura IV.5 B). Teniendo en cuenta la composición en monosacáridos y datos de bibliografía, fue posible la asignación de las señales correspondientes a la región anomérica de los espectros.

En GA (Figura IV.5 A), la señal a  $\delta$  5,27/109,5 se atribuye a unidades de  $\alpha$ -L-Araf sustituida en posición 3 (McIntyre y col., 1996, Grein y col., 2013), mientras que la correlación a  $\delta$  4,51/102,7 correspondería a  $\beta$ -Glc pA (McIntyre y col., 1996, Delgobo y col., 1999). La otra señal principal, a  $\delta$  5,14/99,77, es atribuible a unidades de  $\alpha$ -Gal p (Sims y col., 2003, Grein y col., 2013). En el espectro se observa además una señal menos intensa a  $\delta$  4,75/100,64 consistente con la presencia de residuos de  $\alpha$ -Rhap (McIntyre y col., 1996). Las señales mencionadas hasta este momento coinciden con los monosacáridos componentes de este polisacárido. Adicionalmente se observa un conjunto de tres correlaciones menores,

poco intensas, a  $\delta$  5,16-5,31/97,21-97,75 cuyos desplazamientos químicos no coinciden con los informados habitualmente para goma arábiga.



**Figura IV.5** Espectros bidimensionales HSQC  $^1\text{H}$   $^{13}\text{C}$  para goma arábiga, GA (A) y goma exudada de *Prosopis alba*, GAL (B).

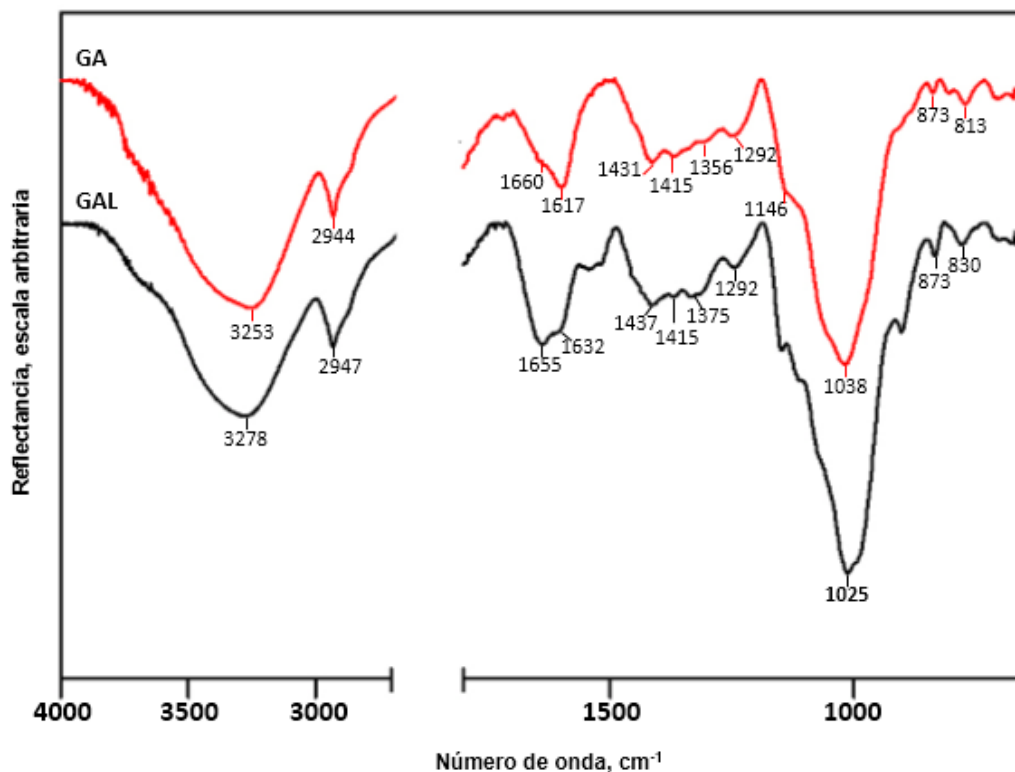


El espectro HSQC  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  registrado para GAL (Figura IV.5 B) presentó una señal principal a  $\delta$  5,33/99,79 que podría corresponder a unidades de  $\alpha$ -Galp o  $\alpha$ -GlcpA (Sims y col., 2003, Grein y col., 2013). Se observan resonancias menores a  $\delta$  5,38/109,31 y 4,90/100,26, asignadas a  $\alpha$ -L-Araf y  $\alpha$ -Rhap. Resta por identificar una correlación intensa a  $\delta$  5,21-5,60/97,18-97,76, con desplazamientos similares a una señal minoritaria observada en el espectro de GA. Teniendo en cuenta que GAL tiene 67,4% molar de arabinosa y que sólo se identificó una señal menor para este monosacárido, es de esperar que esta señal principal corresponda a residuos de Ara. Estos valores de desplazamientos químicos no son usuales en polisacáridos exudados de plantas superiores, aunque recientemente se informó un (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -L-arabinano sulfatado del alga verde *Codium vermilara*, cuyo producto de desulfatación presenta una señal anomérica a  $\delta$  5,13/97,0 (Fernández y col., 2013).

Para completar y confirmar la estructura del polisacárido GAL sería necesario llevar a cabo un análisis estructural más profundo, que incluya estudios de reducción de los ácidos urónicos, metilación e hidrólisis a fin de correlacionar las unidades repetitivas con las resonancias observadas en los espectros RMN.

#### ***IV.1.3.4 Espectroscopía FTIR***

Con el fin de establecer las diferencias y similitudes en la estructura química de GAL y GA, se realizaron estudios por FTIR (Figura IV.6). El estudio se realizó con las gomas en estado deshidratado para evitar las interferencias del agua (Lopez-Torrez y col., 2015). Los espectros infrarrojo obtenidos para ambas gomas mostraron una banda ancha centrada a  $3300\text{ cm}^{-1}$  debido al estiramiento de los grupos  $-\text{OH}$ , atribuibles a la presencia de monosacáridos con  $-\text{OH}$  libres (Quintanilha y col., 2014). Las bandas de absorción para grupos amino primarios ( $3400\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ ) y secundarios ( $3310\text{--}3350\text{ cm}^{-1}$ ) de las fracciones proteicas, podrían no ser claramente diferenciadas debido a que esas bandas quedarían inmersas dentro de la amplia banda de absorción de estiramiento de  $-\text{OH}$  (Roque y col., 2009). Una banda aguda atribuible al estiramiento de los grupos  $-\text{CH}$  se observó a  $2944\text{ cm}^{-1}$  y a  $2947\text{ cm}^{-1}$  para GA y GAL, respectivamente.



**Figura IV.6** Espectro FTIR de la goma exudada de *Prosopis alba* (GAL) en comparación con la goma arábiga (GA).

Los grupos carboxilatos de ácidos urónicos, presentan un estiramiento asimétrico de  $\text{C}=\text{O}$  a  $1616\text{ cm}^{-1}$  con una banda de estiramiento simétrico más débil a  $1423\text{ cm}^{-1}$  (Singh y col., 2011). Para GA, la banda de estiramiento asimétrico de  $\text{C}=\text{O}$  se observó a  $1617\text{ cm}^{-1}$ , mientras que para GAL se observó a  $1632\text{ cm}^{-1}$ , lo cual concuerda con los resultados reportados por Tiwari y col. (2008). Finalmente, ambas muestras presentaron una banda más débil a  $1415\text{ cm}^{-1}$  confirmando la presencia de funciones carboxílicas.

Los espectros FTIR de ambas gomas presentaron bandas características en la región de  $1700\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$  que podrían atribuirse a las proteínas. En los espectros FTIR de proteínas, las vibraciones de los grupos amida I y II aparecen en las proximidades de  $1650\text{ cm}^{-1}$  y  $1550\text{ cm}^{-1}$  respectivamente (Lopez-Torrez y col., 2015). Las bandas debidas a la presencia de grupos amida I se observaron a  $1660\text{ cm}^{-1}$  y  $1655\text{ cm}^{-1}$  para GA y GAL, respectivamente. Por el contrario, sólo en GAL se observó una banda centrada a  $1544\text{ cm}^{-1}$  la cual podría ser asignada al grupo amida II.

Tanto en GA como en GAL, se observaron las bandas de estiramiento de  $\text{OH}$  a aproximadamente  $3300\text{ cm}^{-1}$ , también reportadas para GA (Quintanilha y col., 2014). En

ambas muestras se observó una banda a  $1292\text{ cm}^{-1}$  la cual correspondería a los estiramientos C-N (Tiwari y col., 2008). Los picos observados a  $1038\text{ cm}^{-1}$  y a  $1025\text{ cm}^{-1}$  en GAL, podrían atribuirse a la flexión de O-H de acuerdo con Singh y Singh (2011).

La región del infrarrojo comprendida en la región de longitudes de onda entre  $1200$  y  $800\text{ cm}^{-1}$  es la denominada huella digital de los carbohidratos. Su interpretación es más compleja debido a que las bandas de absorción dan información sobre las vibraciones de estiramiento de las cadenas principales y laterales de los azúcares. En esta región, los espectros de GAL y GA presentaron numerosas similitudes con los reportados para gomas de otras especies de *Acacia* (Lopez-Torrez y col., 2015).

Finalmente, a bajos números de onda, los espectros mostraron la región anomérica característica, donde las bandas en las proximidades de  $920$  y  $880\text{ cm}^{-1}$ , podrían ser atribuidas a los enlaces  $\beta$ -glucosídicos presentes en las unidades de galactopiranososa en ambas gomas (Kacurakova y col., 2000).

Los espectros de GA y GAL presentaron numerosas bandas comunes que podrían ser relacionadas con características específicas de su compleja estructura. El análisis de FTIR contribuyó a sostener que ambas gomas comparten una naturaleza química común aunque la proporción de sus componentes en términos de carbohidratos y proteínas, sea diferentes.

### IV.1.4 Evaluación de la toxicidad *in vivo* de GAL

La aprobación de un aditivo para uso alimentario requiere como prerequisite clave, la evidencia de que dicha sustancia ha sido sometida a un estudio adecuado de toxicidad (Abed El Kader y col., 2003). Los criterios para la evaluación toxicológica de aditivos alimentarios, requieren comúnmente el empleo de animales experimentales de laboratorio y la examinación de la apariencia física, comportamiento, tasa de crecimiento, consumo de alimento y estudios histopatológicos (von Müller y col., 2009).

Dado el potencial aprovechamiento de la goma exudada de *Prosopis alba* como aditivo alimentario, se realizó un estudio preliminar de toxicidad *in vivo*. El ensayo se realizó como se detalla en la sección III.6.16, usando ratones Wistar macho a los que se les evaluaron parámetros fisiológicos y conductuales luego de administrarles una solución de GAL por intubación intragástrica. El seguimiento se realizó durante 14 días, con el objeto de evaluar reversibilidad, persistencia, o aparición de toxicidad a lo largo del tiempo.

En forma complementaria se realizó un estudio histopatológico de los órganos del aparato digestivo (hígado, riñón e intestino). Estos estudios se realizaron bajo la dirección de la Dra. Miriam Virgolini del Instituto de Farmacología Experimental de la Universidad de Córdoba (UNC-CONICET).

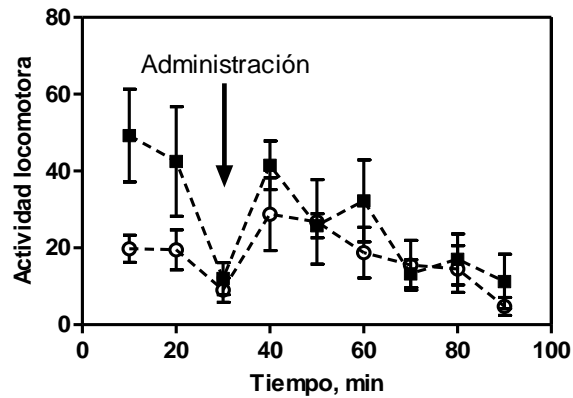
### ***IV.1.4.1 Seguimiento de parámetros fisiológicos y conductuales***

Para verificar la uniformidad entre los individuos en estudio, se monitoreó el consumo de alimento, ingesta de líquido y aumento de peso corporal de los ratones del grupo experimental (GE) y control (GC), durante seis días previo a la administración de la goma. Además se registró el consumo de alimento y la ingesta de líquido tres horas después de la administración. Los indicadores fisiológicos mostraron una variación similar en ambos grupos durante el período previo a la administración. El consumo de alimento e ingesta de líquido tres horas después de la administración, no mostró diferencias significativas entre los grupos, indicando que la administración de GAL no indujo cambios apreciables en el comportamiento de los animales.

Estos resultados se correspondieron con la observación de aspectos morfológicos externos de los animales en estudio, los cuales no presentaron anormalidades en piel, ojos ni en membranas mucosas. Así mismo, tampoco se observaron diferencias en las secreciones y excreciones (lagrimeo y deposiciones) ni cambios en el ritmo de respiración, posturas, ni movimientos estereotipados (movimientos repetitivos) o extraños (automutilación o excitabilidad).

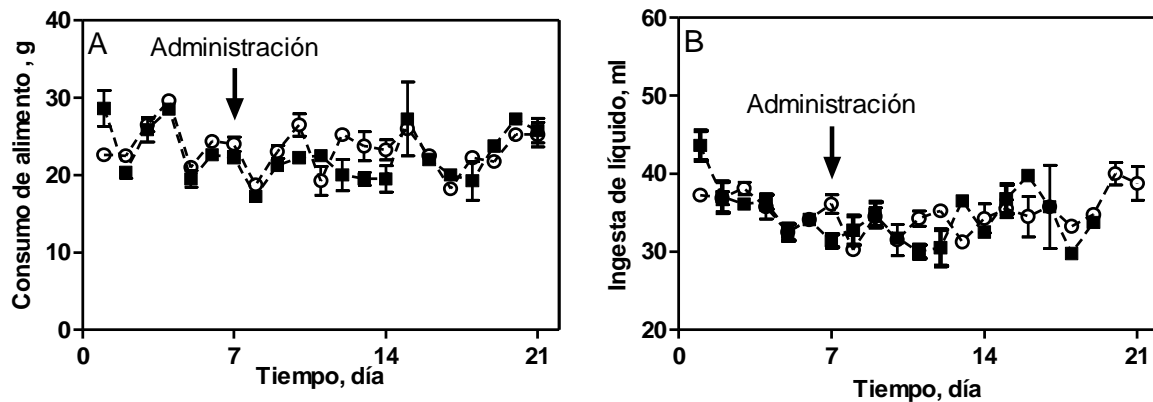
En la Figura IV.7 se muestra la actividad locomotora medida en *cuentas de actividad* (unidad registrada por el software acoplado al actógrafo), antes y después de una única administración de GAL (grupo experimental, GE) o de agua destilada (grupo control, GC) a los roedores.

El registro de la actividad basal, 30 minutos previos a la administración, mostró una reducción en la locomoción, lo cual podría explicarse en términos de la habituación de los animales al nuevo ambiente (actógrafo). A partir de la administración, se observó un ligero incremento en la movilidad debido al estrés que sufren los animales como consecuencia del procedimiento de intubación. A pesar de ello, no se observaron diferencias en las tendencias de locomoción de ambos grupos durante el resto de la prueba.



**Figura IV.7** Actividad locomotora medida en cuentas de actividad, 30 minutos antes y 90 minutos después de la administración intragástrica de GAL (grupo experimental, ■) o de agua destilada (grupo control, ○) a los roedores.

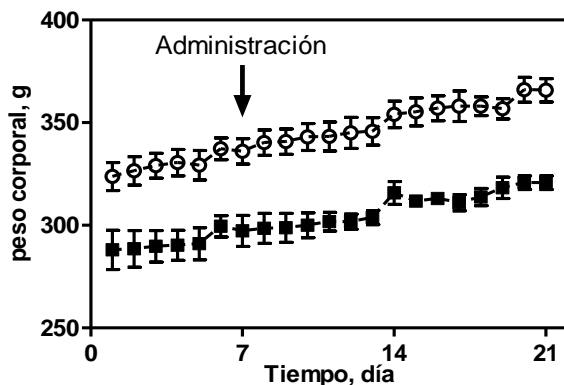
Para poder evaluar reversibilidad o aparición de toxicidad, se siguió la evolución del consumo de alimento e ingesta de líquido durante los 14 días posteriores a la administración de la goma. Las Figura IV.8 A y B, muestran la evolución del consumo de alimento e ingesta de líquido en el período previo y posterior a la administración.



**Figura IV.8** Consumo de alimento (a) e ingesta de líquido (b) determinada antes y después de la administración intragástrica de GAL (grupo experimental, ■) o de agua destilada (grupo control, ○) a los roedores.

La variación en la cantidad de alimento y de líquido consumidos no presentó cambios apreciables atribuibles a la administración de GAL (realizada como única dosis el día 7), evidenciando que la ingesta de la goma no condujo a la aparición de signos toxicológicos adversos en el período de tiempo estudiado.

En forma similar, se registró la variación de pesos antes y después de la administración intragástrica (Figura IV.9).



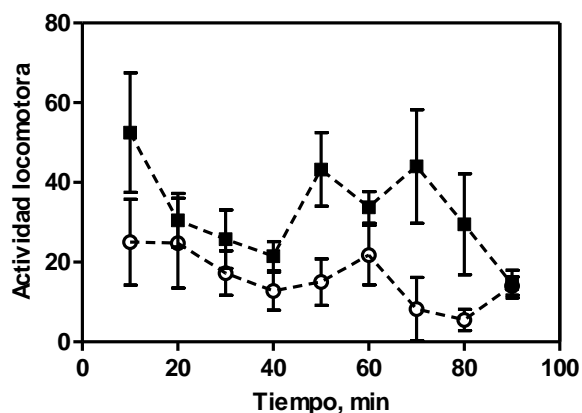
x

**Figura IV.9** Peso corporal determinado antes y después de una única administración intragástrica de GAL (grupo experimental, ■) o de agua destilada (grupo control, ○) a los roedores.

En ambos grupos, la tendencia observada en el aumento de peso corporal fue similar, no observándose cambios asociados a la ingesta de GAL. Si bien el grupo control presentó pesos ligeramente superiores al momento de inicio, esta tendencia se mantuvo durante el ensayo, resultando independiente de la dosis de goma.

Durante los 14 días posteriores a la administración con GAL, no se observaron signos de toxicidad entre los animales en estudio. Los individuos de ambos grupos se mostraron activos y saludables. Estos resultados son coherentes con la observación de las características morfológicas de los animales de cada grupo, efectuados en el mismo período de tiempo, por la cual no se demostraron diferencias en el aspecto físico de piel, ojos, y membranas mucosas. Tampoco se observaron secreciones ni excreciones atípicas, respiración o posturas anormales ni movimientos estereotipados y/o repetitivos.

La Figura IV.10 muestra la actividad locomotora en término del número de cuentas de actividad efectuado en actógrafo al día 14. La actividad conductual a los 14 días posteriores a la administración de la goma presentó un comportamiento similar al observado al día 7, registrándose una reducción de la locomoción durante los 30 primeros minutos tras haber sido colocados en el actógrafo.



**Figura IV.10** Actividad locomotora medida en cuentas de actividad, a los 14 días de la administración intragástrica de GAL (grupo experimental, ■) o de agua destilada (grupo control, ○) a los roedores.

Luego, se observó un incremento en la actividad que podría atribuirse a la habituación de los animales al nuevo ambiente. Si bien se observó una actividad locomotora ligeramente mayor en GE en ciertos puntos, en ambos grupos la actividad locomotora fue similar hacia el final del ensayo.

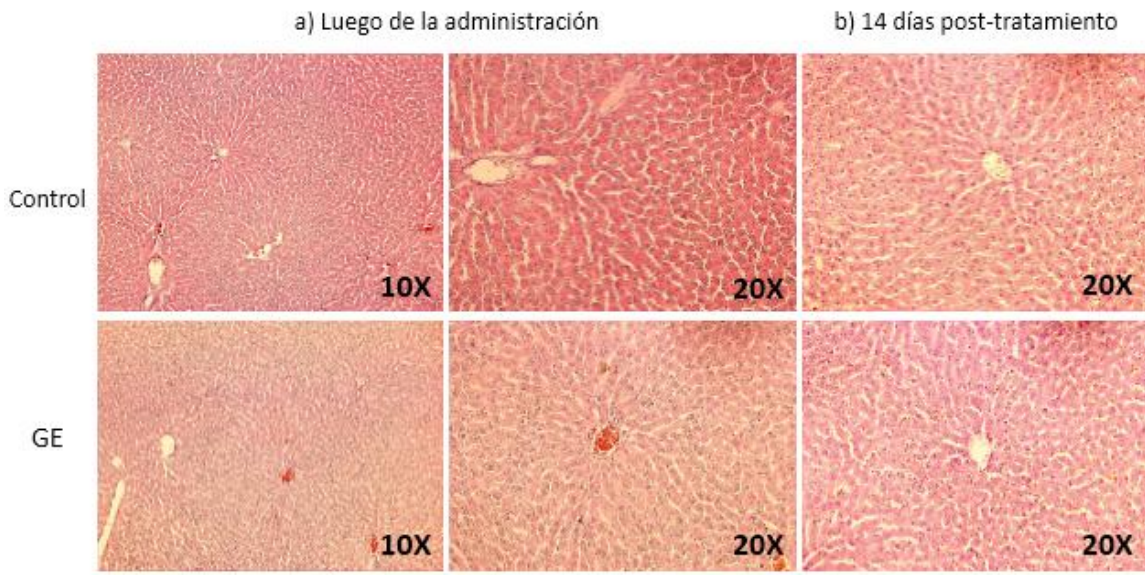
#### *IV.1.4.2 Estudios histopatológicos de órganos del sistema digestivo*

En la necropsia no se observaron lesiones patológicas generales en los órganos examinados (hígado, riñón e intestino), ni cambios en el peso (absoluto o relativo) de los mismos, asociados a la administración de GAL a los roedores.

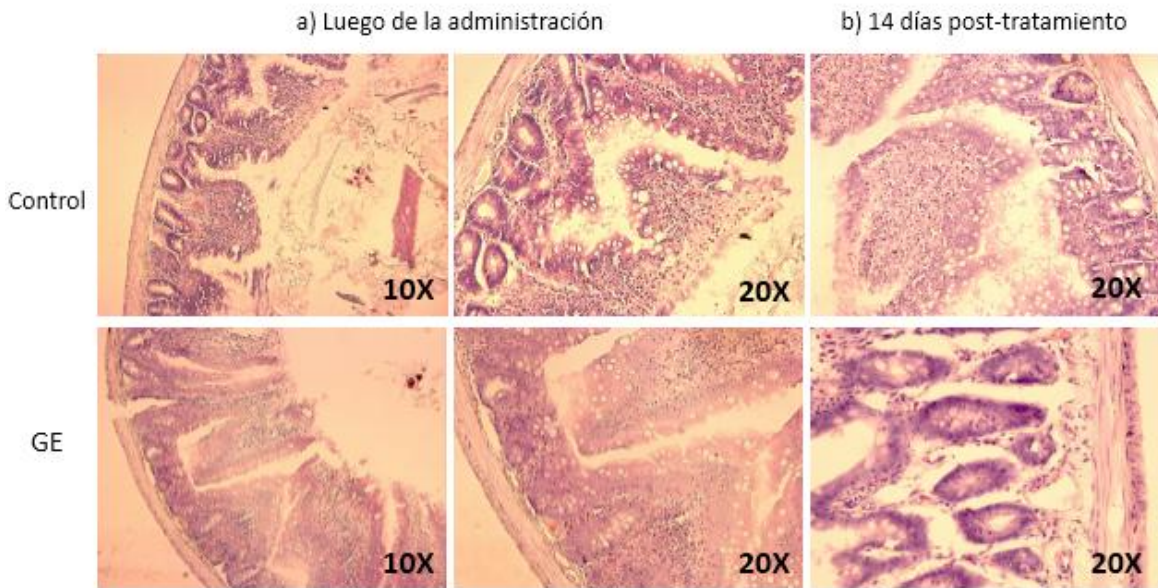
Las Figura IV.11, Figura IV.12 y Figura IV.13 muestran las micrografías de las preparaciones histológicas correspondientes a hígado, riñón e intestino delgado, respectivamente, obtenidas para el grupo experimental y control inmediatamente después de la administración y a los 14 días post-tratamiento.

El estudio de los tejidos hepáticos y renales constituye un aspecto clave debido a su importancia de estos órganos en los procesos desintoxicantes (von Müller y col., 2009).

La Figura IV.11 muestra que la estructura hepática se conservó en los distintos grupos estudiados. No se observaron alteraciones de la estructura lobulillar, ni dilatación de los vasos capilares sinusoides, venas o arterias. Tampoco, se observó incremento en tejido conectivo ni infiltrado linfocitario.

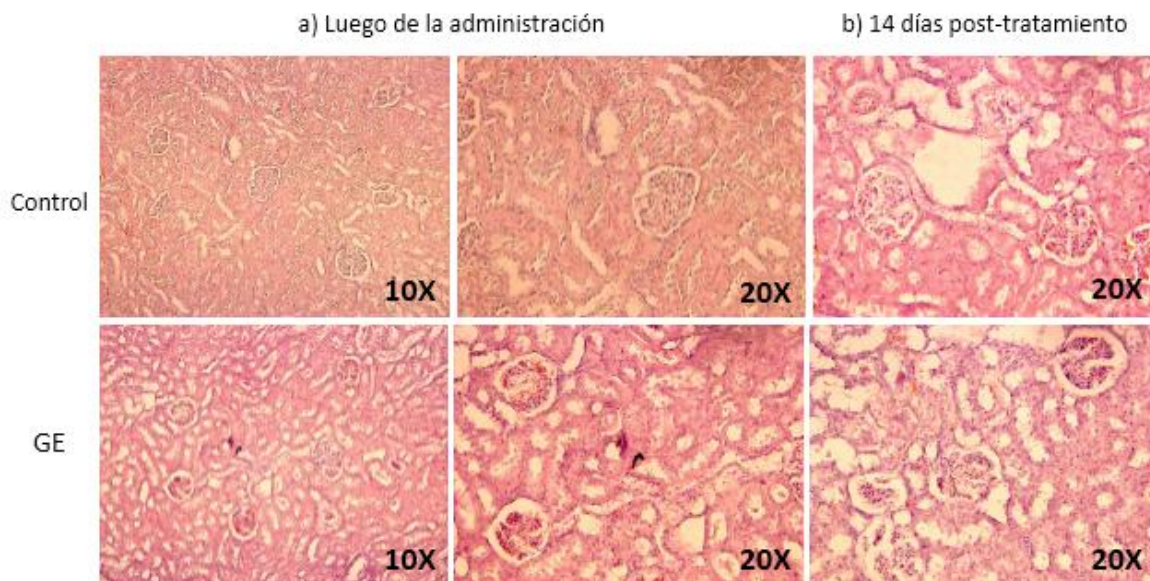


**Figura IV.11** Micrografía de cortes de hígado de ratones Wistar inmediatamente después de la administración intragástrica de GAL (grupo experimental, GE) o de agua destilada (Control) y a los 14 días post-tratamiento. Las muestras se tiñeron con hematoxilina-eosina y se observaron en microscopio a una magnificación de 10X y 20X.



**Figura IV.12** Micrografía de cortes de riñón de ratones Wistar inmediatamente después de la administración intragástrica de GAL (grupo experimental, GE) o de agua destilada (Control) y a los 14 días post-tratamiento. Las muestras se tiñeron con hematoxilina-eosina y se observaron en microscopio a una magnificación de 10X y 20X.





**Figura IV.13** Micrografía de cortes de intestino de ratones Wistar inmediatamente después de la administración intragástrica de GAL (grupo experimental, GE) o de agua destilada (Control) y a los 14 días post-tratamiento. Las muestras se tiñeron con hematoxilina-eosina y se observaron en microscopio a una magnificación de 10X y 20X.

La estructura renal (zona cortical y medular) (Figura IV.12) del grupo tratado se conservó igual al grupo control en el período estudiado, no se observaron alteraciones en la superficie renal, como tampoco en la distribución ni en la morfología de glomérulos de la región cortical para el grupo administrado con GAL. Tampoco se observaron túbulos renales dilatados, incremento de tejido conectivo o infiltrado linfocitario.

Las micrografías de intestino delgado (Figura IV.13), muestran que no hubo alteraciones en la distribución estructural de las capas de los tejidos intestinales (mucosa, submucosa, muscular y serosa), ni presencia de infiltrado linfocitario en la submucosa, muscular y serosa. Así mismo, los leucocitos de los tejidos conectivos laxos de las láminas propias de la mucosa resultaron normales. Del mismo modo, el epitelio de revestimiento y la chapa estriada no presentaron diferencias entre los tratamientos.

En resumen, la evaluación microscópica de los tejidos estudiados no reveló lesiones inusuales o patrones de distribución que podrían sugerir un efecto de la exposición a GAL en la dieta.

Otros autores evaluaron la toxicidad de GM (Vernon-Carter y col., 2000) y goma brea (GB) (von Müller y col., 2009) realizando estudios de toxicidad oral *in vivo* en condiciones similares a las estudiadas en este trabajo y concluyeron que estas gomas serían también

inocuas. Vernon-Carter y col. (2000) realizaron también un estudio de toxicidad oral aguda con GM en ratas y observaron que la goma no afectó el crecimiento, desarrollo ni supervivencia de los roedores. También observaron que GM no indujo ningún tipo de mutagenicidad ni actividad carcinogénica. Por su parte, von Müller y col (2009), evaluaron la toxicidad subcrónica de GB y encontraron que la curva de crecimiento no presentó diferencias respecto del control y que los estudios hematológicos e histopatológicos no evidenciaron anormalidades.

Los resultados de los estudios de toxicidad oral *in vivo* advierten que la goma exudada de *Prosopis alba* purificada por filtración, no produjo efectos toxicológicos adversos, manifestados en parámetros fisiológicos, morfológicos, conductuales e histológicos en el grupo de animales estudiados, no observándose aparición de toxicidad incluso a los 14 días de ingestión. De acuerdo con Schmitt y col. (2008), como no se observaron signos tóxicos ni mortalidad, podría decirse que el valor de LD50 (dosis letal media) para GAL es superior a 1000 mg/kg de peso corporal (dosis utilizada en este estudio).

Estos resultados constituyen un invaluable antecedente sobre la inocuidad de este biomaterial que advierten y contribuyen a considerar su potencial utilización como aditivo en sistemas alimentarios de consumo humano, como así también sustentan su posible introducción en el Código Alimentario Argentino.

### **IV.1.5 Evaluación de las propiedades funcionales de GAL en comparación con GA**

Por propiedad funcional o “funcionalidad” de un componente alimentario, se entiende a la habilidad de interactuar con otros componentes e impartir propiedades deseables al sistema (Li y col., 2016). En esta sección, se estudiaron distintas propiedades funcionales (propiedades de hidratación, reológicas, emulsionantes, estabilizantes, interfaciales, térmicas, capacidad antioxidante y antimicrobiana) de GAL, en sistemas modelo, con el fin de complementar los estudios de composición y estructura presentados en la sección IV.1.3. Con fines comparativos, algunas de estas determinaciones se realizaron simultáneamente para GA, utilizada como referencia. De esta manera se realizó una amplia caracterización de GAL, que resulta útil para evaluar el potencial tecnológico de la goma.

En particular, en el marco de esta tesis se prestó especial atención a aquellas propiedades que pudieran estar relacionadas con la aplicación de GAL como material de pared en sistemas de encapsulación (sección III.5).

### *IV.1.5.1 Propiedades de interacción con el solvente*

Muchas de las propiedades funcionales de gomas y otros hidrocoloides que determinan su aplicación en sistemas alimentarios, están relacionadas con su capacidad de interacción con el agua (Beristain y col., 1996). Una primera aproximación al estudio de las propiedades funcionales de la gomas implica evaluar su habilidad para adsorber humedad, hidratarse y solubilizarse (Pilosof y col., 1985).

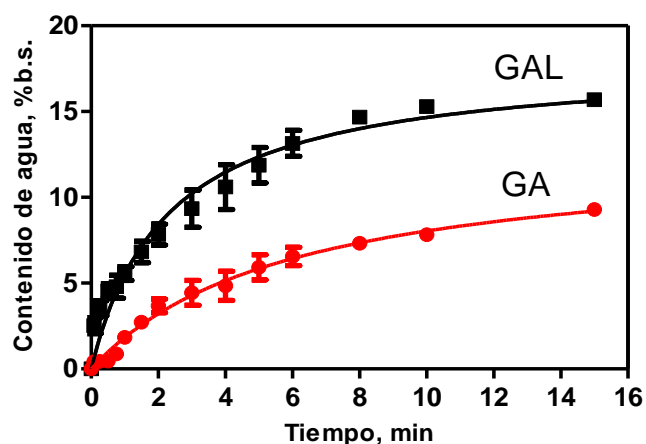
La higroscopicidad de polvos alimentarios describe la tendencia del material a absorber agua del ambiente en un entorno de humedad relativa conocida (Cai y col., 2000). Aplicado al estudio de gomas, la determinación de la higroscopicidad brinda información sobre la composición y estructura los biopolímeros (Torres y col., 2012). Con fines comparativos, se liofilizaron muestras de GAL y GA, y la determinación se realizó sobre muestras liofilizadas que fueron expuestas durante siete días en un ambiente de 75 % HR a 25°C.

Luego de la humidificación el contenido de agua de GAL fue de  $83,99 \pm 3,15$  g agua/100 g de goma b.s., mucho menor que el de GA, que alcanzó un valor de  $188,3 \pm 2,68$  g agua/100 g de goma b.s.. La mayor proporción de ácidos urónicos determinados experimentalmente para GA, podría contribuir en alguna medida a la mayor higroscopicidad de GA. Torres y col. (2012) evaluaron la higroscopicidad de gomas comerciales y reportaron que aquellas con mayor proporción de grupos iónicos o ácidos, presentaron la mayor higroscopicidad, debido a la alta polaridad de estos grupos funcionales.

Por otro lado, el mayor contenido de materias inorgánicas presentes en GA (Tabla 1), también podría ejercer un efecto importante. Las sales afectan en gran medida las interacciones sólido-agua, aumentando la higroscopicidad en los sistemas deshidratados (Mazzobre y col., 2001). Debido a la importancia de los fenómenos de sorción de agua sobre la estabilidad de hidrocoloides y polímeros en general, y su impacto en las propiedades físicas de los sistemas de encapsulación (Pérez-Alonso y col., 2006a), serán tratadas con mayor profundidad en el apartado IV.1.5.5.

Por otro lado, la capacidad de rehidratación es una propiedad importante en el procesamiento de alimentos ya que gran parte de los ingredientes o alimentos deshidratados se deben rehidratar antes de ser utilizados o consumidos (Ortega-Rivas y col., 2006). Para alcanzar la máxima funcionalidad, los hidrocoloides deben previamente dispersarse completamente en agua (Williams, 2008). La velocidad de rehidratación puede influir en el orden en que se incorporan los ingredientes secos e indicar además si el ingrediente necesita o no rehidratarse previo a su utilización (Pilosoff y col., 1985).

En la Figura IV.14 se muestran las curvas de la absorción de agua obtenidas para GAL y GA a 25°C según se describe en la sección III.6.17.2. Las curvas se ajustaron con el modelo propuesto por Pilosoff y col. (1985), ampliamente utilizado para describir la cinética de absorción de agua de diversos materiales alimentarios tales como almidones, proteínas vegetales y animales.



**Figura IV.14** Cinética de absorción de agua de la goma exudada de *Prosopis alba* (GAL) comparada con la cinética de absorción de la goma arábiga (GA). Los símbolos representan el promedio de los valores experimentales y las líneas corresponden al ajuste según la ecuación propuesta por Pilosoff y col. (1983).

El modelo de Pilosoff y col. (1985) resultó adecuado para describir los datos experimentales obtenidos tanto para GAL como para GA. En la Tabla 2 se detallan los valores de ajuste para los parámetros del modelo. Ambas gomas presentaron un comportamiento similar caracterizado por una rápida absorción de agua a tiempos cortos, seguida de una desaceleración hasta alcanzar una situación de equilibrio. Esto

indica que ambos sólidos son químicamente estables en presencia del solvente, ya que la disolución es prevenida por interacciones intermoleculares (Pilosof y col., 1985).

**Tabla 2.** Parámetros de ajuste al modelo de Pilosoff y col. (1985) empleado para describir la cinética de absorción de agua de la goma exudada de *Prosopis alba* (GAL) y goma arábica (GA).

	GAL	GA
Q, % agua b.s.	17,99 ± 0,83 <sup>b</sup>	12,89 ± 0,65 <sup>a</sup>
B, min	2,28 ± 0,32 <sup>a</sup>	6,03 ± 0,63 <sup>b</sup>
(QB) <sup>-1</sup> , (% agua b.s. min) <sup>-1</sup>	0,024	0,013
R <sup>2</sup>	0,950	0,983

Valores promedios ± desviación estándar con diferentes letras en la misma fila son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba T (p<0,05).

La capacidad de absorción de agua en el equilibrio representada por el valor de Q fue mayor para GAL que para GA, como se observa claramente en las curvas de la Figura IV.14. Los parámetros cinéticos reflejan además que GAL requiere menos tiempo para alcanzar Q/2 (menor B) y por lo tanto, presentó un valor mayor de la constante de velocidad de absorción de agua (mayor (QB)<sup>-1</sup>) que GA.

Beristain y col. (1996) reportaron que GM presentó mayor capacidad y velocidad de absorción de agua que GA, y explicaron este resultado, en términos del mayor contenido de ácido glucurónico en GM y su respectiva concentración de contra iones asociados, que induciría una mayor presión osmótica aumentando la velocidad y capacidad de absorción de agua. Sin embargo, como se observó en la sección IV.1.3.2, GA presentó una mayor proporción de ácidos urónicos (21,42 ± 0,77 %) que GAL (14,93 ± 0,64 %), lo cual indicaría que no sólo es importante la proporción, sino también el grado de ionización de los grupos ácidos en contacto con el solvente (Beristain y col., 1996). Por lo cual, la mayor absorción de agua de GAL podría atribuirse a un mayor grado de ionización de sus grupos carboxílicos. Esta observación se corresponde con los resultados obtenidos al comparar el pH de soluciones de GAL y GA (5 % p/v) donde el valor pH de soluciones de GAL fue menor que el de GA, a pesar de su menor concentración de ácidos urónicos.

La solubilidad en agua es una de las características más deseables de las gomas debido a que la funcionalidad de estos materiales depende en gran medida de su capacidad de interactuar con el solvente (Porto y col., 2015). La mayor parte de las gomas no se disuelve en agua a concentraciones superiores al 5% debido a sus altas viscosidades. Sin embargo la goma arábica es altamente soluble pudiendo alcanzar concentraciones incluso superiores al 50 %. Esta característica, entre otras, llevó a considerarla única entre los hidrocoloides naturales (Nussinovitch, 2009). La solubilidad en agua determinada en este trabajo para GAL fue de 88% y para GA de 95%.

La solubilidad de un hidrocoloide depende de numerosos factores entre los que se encuentran la distribución de grupos hidrófilos (Fernández, 2003) y el tamaño molecular (Porto y col., 2015), entre otros. GAL y GA presentaron una alta solubilidad (>85%), y esto indicaría la presencia de grupos hidrófilos (hidroxilos, carboxilos, aminas, etc.) a lo largo de la estructura de ambos biopolímeros suficientes para favorecer la solvatación (Fernández, 2003). La solubilidad entre GAL y GA también podría relacionarse con el tamaño molecular de sus constituyentes. Porto y col. (2015) evaluaron el efecto de la aplicación de altas presiones en el tamaño molecular sobre la solubilidad de la goma del árbol de anacardo (*Anacardium occidentale* L.). Estos autores encontraron que al aumentar la intensidad del tratamiento, se produjo una disminución del tamaño molecular del biopolímero y aumentó la solubilidad de la goma. En este sentido, GA presentaría especies moleculares de menor tamaño en comparación con GAL. A su vez, Porto y col. (2015) observaron que al disminuir el PM, también disminuye la capacidad de hinchamiento y absorción de agua, lo cual se corresponde con los resultados obtenidos de absorción de agua para GA en la Figura IV.14.

El estudio de las propiedades de interacción con el solvente, permitió demostrar que GAL presenta propiedades similares a GA. La facilidad de rehidratación y adecuada solubilidad habilita al uso de GAL en sistemas acuosos en que podría actuar como modificador del flujo y/o agente emulsionante, lo cual amplía sus posibilidades de uso.

### ***IV.1.5.2 Propiedades reológicas de dispersiones acuosas***

Ciertas gomas son útiles como agentes espesantes y gelificantes en diversos alimentos (Li y col., 2016). Otras gomas tienen la ventaja de poder dispersarse a altas concentraciones manteniendo viscosidades bajas, como es el caso de la goma arábica y de la goma estudiada

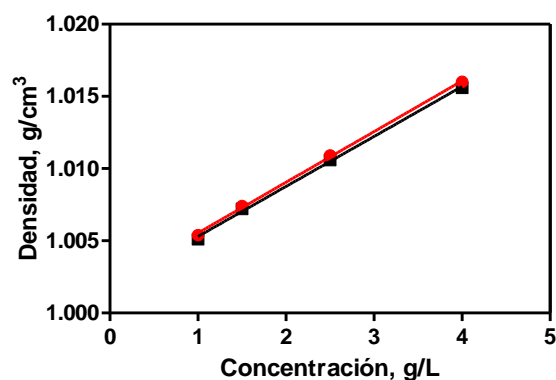
en esta tesis. Los estudios reológicos permiten obtener información acerca de la estructura química y peso molecular del polímero, así como de las interacciones con el disolvente y otras moléculas presentes. En esta sección se estudiaron las propiedades reológicas de GAL en comparación con GA en dispersiones diluidas, medias y concentradas con el fin de lograr una visión global del comportamiento reológico de la goma en estudio y una mejor interpretación de sus características moleculares.

### IV.1.5.2.1 Comportamiento reológico de dispersiones diluidas

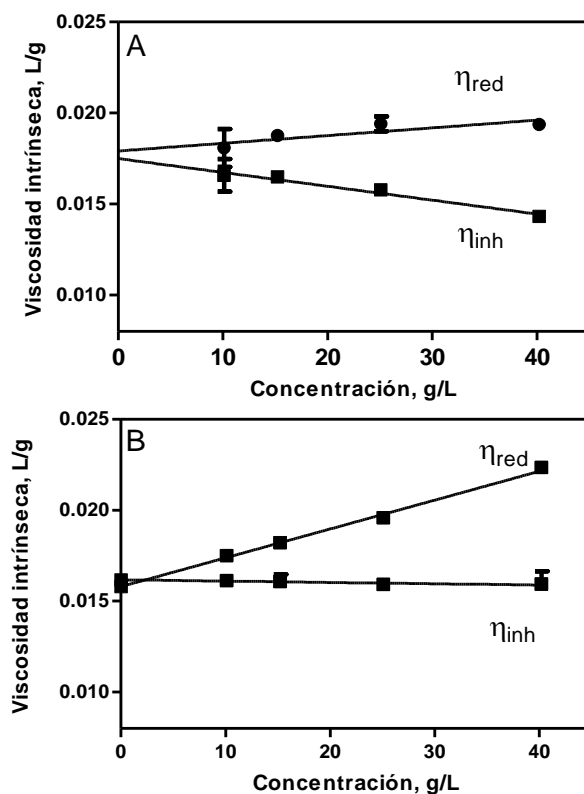
El estudio del comportamiento reológico de soluciones diluidas de hidrocoloides, proporciona información útil sobre sus características estructurales y conformacionales en términos de su viscosidad intrínseca  $[\eta]$ . La viscosidad intrínseca se ha utilizado ampliamente en el análisis de las relaciones estructura-propiedad, los efectos del entorno y la estabilidad de los polímeros en solución (Sibaja-Hernández, et al., 2015). La viscosidad intrínseca se define como el valor límite de la viscosidad específica cuando la concentración del polímero tiende a cero y puede atribuirse su valor al volumen que ocupa un gramo del polímero a dilución infinita (Williams, 2008). El procedimiento comúnmente usado para determinar la viscosidad intrínseca consiste en determinar la viscosidad reducida (o inherente) para diferentes concentraciones de polímero. Se utiliza un medio isoiónico a bajas concentraciones de NaCl, donde los polielectrolitos se comportan como polímeros neutros, previniendo las interacciones intermoleculares (Frollini y col., 1995). Seguidamente, se representan los datos utilizando las ecuaciones de Huggins y Kraemer (sección III.6.18.1) y se calcula el valor a concentración cero. Para poder realizar el cálculo de viscosidad intrínseca, fue necesario medir previamente la densidad de las suspensiones de GAL y GA en la solución de NaCl estudiada (0,1 M). Los resultados se muestran en la Figura IV.15 para GAL y GA a distintas concentraciones de NaCl.

La variación de la densidad de las suspensiones en función de la concentración de los hidrocoloides, presentó un comportamiento lineal tanto para GAL ( $R^2=0,998$ ), como para GA ( $R^2=0,998$ ). Las pendientes no presentaron diferencias significativas ( $p>0,05$ ), pudiéndose indicar como función característica para ambos biopolímeros  $y=0,0035x+1,0019$ .

Las Figura IV.16 muestran la variación de las viscosidades reducidas e inherentes para GAL (Figura IV.16 A) y para GA (Figura IV.16 B) en función de la concentración.



**Figura IV.15** Variación de la densidad de soluciones de la goma exudada de la goma exudada de *Prosopis alba* (GAL) (■) en comparación con la goma arábica (GA) (●). Símbolos: datos experimentales, línea: modelo de regresión lineal.



**Figura IV.16** Evaluación de la viscosidad intrínseca de GAL (A) y GA (B) en soluciones acuosas de NaCl 0,1M a 25 °C, a partir de extrapolar  $\eta_{red}$  y  $\eta_{inh}$  a concentración cero. Los símbolos representan el promedio de los valores experimentales y las líneas al ajuste según el modelo de Huggins y Kramer.



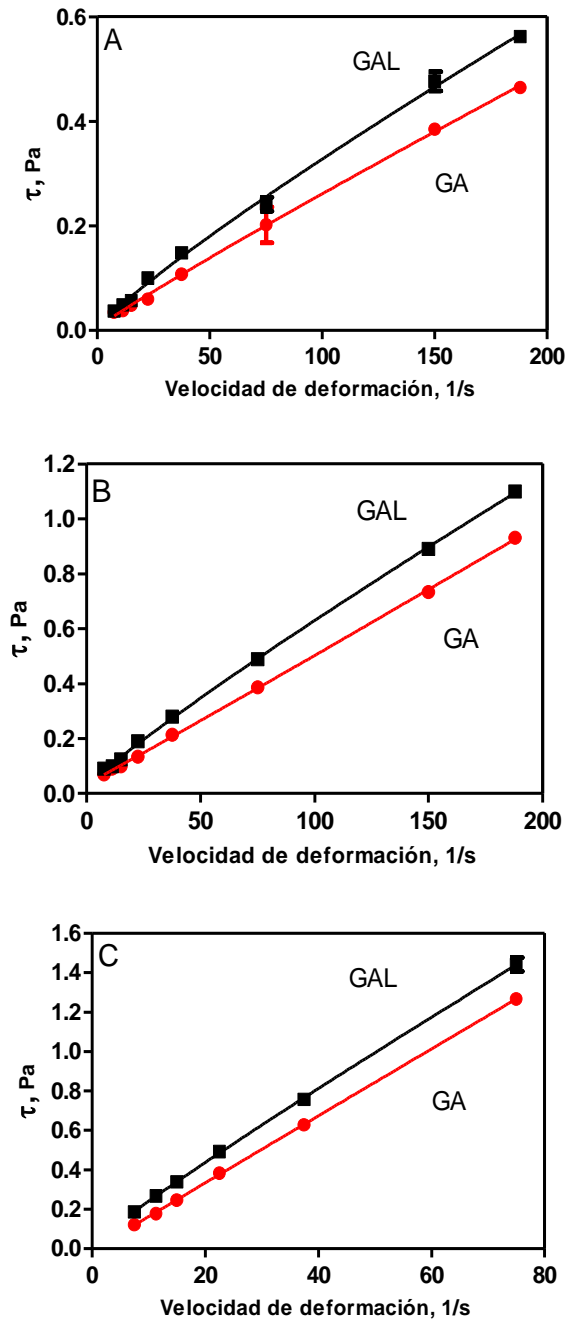
Para ambas gomas fue posible obtener el valor de viscosidad intrínseca  $[\eta]$  a partir de la extrapolación lineal de los valores de  $\eta_{\text{red}}$  (o  $\eta_{\text{inh}}$ ) a dilución infinita ( $C \rightarrow 0$  g/L). La viscosidad intrínseca obtenida para GAL fue  $1,77 \cdot 10^{-2} \pm 0,03 \cdot 10^{-2}$  L/g, ligeramente superior al valor determinado para GA ( $1,59 \cdot 10^{-2} \pm 0,03 \cdot 10^{-2}$  L/g). Este valor fue similar a los reportados previamente para otras gomas de *Acacia*, los cuales variaron entre  $1,77 \cdot 10^{-2}$  y  $1,8 \cdot 10^{-2}$  L/g (Gómez-Díaz y col., 2008, López-Franco y col., 2012).

La  $[\eta]$  de GAL fue significativamente mayor que las informadas para otras especies de *Prosopis* (como GM) las cuales variaron entre  $0,83 \cdot 10^{-2}$  y  $0,99 \cdot 10^{-2}$  L/g (Goycoolea y col., 1995b, López-Franco y col., 2012). Asumiendo que la viscosidad intrínseca se relaciona directamente con el volumen hidrodinámico ocupado por una macromolécula promedio y con el peso molecular promedio (Rao, 2010), la mayor  $[\eta]$  obtenida para GAL, podría indicar que GAL presenta especies moleculares de mayor tamaño que las reportadas para otras especies de *Prosopis*, sugiriendo una estructura más similar a la de GA.

#### IV.1.5.2.2 Comportamiento reológico de dispersiones de concentración media

En la Figura IV.17 se muestran las curvas de flujo en estado estacionario obtenidas para GAL y GA, a 25 °C. No se observó dependencia del comportamiento de flujo con el tiempo (tixotropía) para ninguna de las gomas (dato no mostrado). Los datos experimentales de esfuerzo de corte vs velocidad de deformación se ajustaron al modelo de Ostwald-de Waele (ley de la potencia). En la Tabla 3 se muestran los parámetros obtenidos a partir de la regresión no lineal. Los coeficientes de correlación ( $R^2$ ) resultaron mayores a 0,99 en todas las muestras, indicando que este modelo describe adecuadamente los datos experimentales en el rango de velocidades de deformación examinado. Los valores de índice de flujo ( $n$ ) obtenidos para GAL indican cierto grado de pseudoplasticidad, independientemente de la concentración (Tabla 3). Sibaja-Hernández y col. (2015) encontraron resultados similares para las gomas exudadas de *Acacia cochliacantha* y *A. farnesiana* cuyos índices de flujo, 0,16 y 0,69 respectivamente, resultaron independientes de la concentración a 5 y 20% p/v. Los índices de flujo obtenidos para GA fueron cercanos a 1, lo cual indicaría un comportamiento tipo newtoniano para esta goma, especialmente a la mayor concentración.

Resultados similares reportaron Li y col. (2009) quienes observaron que a mayores concentraciones de GA disminuye el efecto de adelgazamiento por cizalla.

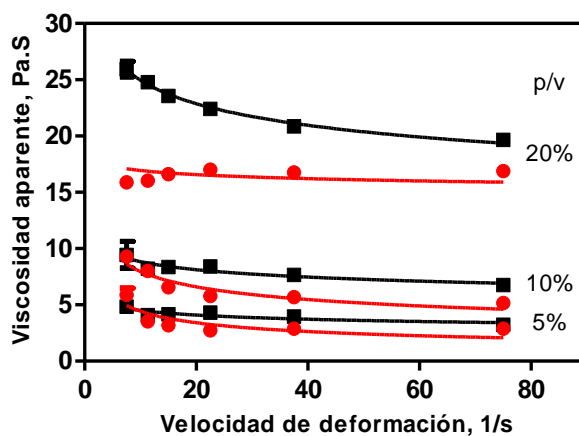


**Figura IV.17** Curvas de flujo obtenidas para la goma exudada de *Prosopis alba* (GAL) y para goma arábica (GA) a distintas concentraciones: (A) 5 % p/v, (B) 10 % p/v y (C) 20% p/v. Los símbolos corresponden a los valores experimentales promedio y las líneas al ajuste según el modelo de Ostwald -de Waele.

**Tabla 3.** Parámetros del modelo de Ostwald-de Waele obtenidos para la goma exudada de *Prosopis alba* (GAL) y para goma arábica (GA) a distintas concentraciones.  $n$ : índice de flujo,  $K$ : índice de consistencia.

C	GAL		GA	
	n	K (Pa s)	n	K (Pa s)
5 % p/v	0,863 ± 0,00	0,040 ± 0,00	0,911 ± 0,02	0,029 ± 0,00
10 % p/v	0,846 ± 0,01	0,089 ± 0,00	0,911 ± 0,01	0,061 ± 0,00
20 % p/v	0,897 ± 0,01	0,261 ± 0,01	1,013 ± 0,01	0,164 ± 0,00

El mayor grado de pseudoplasticidad de GAL respecto a GA, podría atribuirse a la presencia de polímeros con menor grado de ramificación, o bien, a una mayor proporción de fracciones lineales (Thompson y col., 2000). Cuanto menor es el grado de ramificación, las moléculas pueden solaparse, favoreciéndose la formación de agregados (Li y col., 2009). Al aumentar la deformación, estos agregados podrían disociarse en entidades más pequeñas, disminuyendo así la viscosidad hasta alcanzar un valor constante, siendo el comportamiento newtoniano a grandes velocidades de deformación. En la Figura IV.18 se muestra la variación de la viscosidad aparente con la velocidad de deformación para ambas gomas a diferentes concentraciones.



**Figura IV.18** Variación de la viscosidad aparente en función de la velocidad de deformación para la goma exudada de *Prosopis alba* (GAL) (■) en comparación con la goma arábica (GA) (●), a distintas concentraciones.

Para ambas gomas se observó que la viscosidad disminuye con la velocidad de deformación y aumenta con el contenido de sólidos. El aumento de viscosidad fue atribuido por distintos autores a una mayor tendencia de las moléculas a interactuar a mayores concentraciones del polímero (Maskan y col., 2000).

Las dispersiones de GAL presentaron viscosidades aparentes mayores que GA a todas las concentraciones evaluadas. Se sabe que la viscosidad depende de la estructura química del polímero, de las interacciones con el disolvente y del peso molecular (Fernández, 2003). En este sentido, las mayores viscosidades de GAL podrían atribuirse a un mayor peso molecular promedio de esta goma, que por interacción con el solvente conduce a un mayor volumen hidrodinámico. Estos resultados son consistentes con los datos obtenidos de viscosidad intrínseca (Figura IV.16). A su vez, en el caso particular de polielectrolitos como GAL y GA, el volumen hidrodinámico depende además del número y distribución de grupos iónicos en la cadena del polímero. Un mayor grado de ionización expande las cadenas por repulsión electrostática, aumentando el volumen hidrodinámico y por tanto incrementando la viscosidad. En los estudios de interacción con el solvente, presentados en la sección IV.1.5.1, la mayor capacidad de absorción de agua de GAL también se relacionó con un mayor grado de ionización de esta goma respecto a GA.

Por otro lado, los valores de índice de consistencia, resultaron entre 30 y 40% mayores que los determinados para GA y aumentaron, en ambos casos, con la concentración de goma. El índice de consistencia determinado para GAL a 5% fue comparable con los reportados previamente para otras gomas exudadas a la misma concentración, los cuales variaron entre 0,01 y 0,09 Pa s (Sibaja-Hernández y col., 2015). Si bien se observa un mayor efecto de GAL sobre el índice de consistencia, los valores son bajos en comparación con otros hidrocoloides (ej. gomas de semilla) y muestran que GAL, como la goma arábica, permite obtener soluciones poco viscosas aún a altas concentraciones de goma. Esta propiedad de las gomas exudadas no se observa para gomas obtenidas de semillas. Así por ejemplo, el valor de K para suspensiones al 1% de goma tara (obtenida del endospermo de la semilla de *Caesalpinia spinosa*) es de 5,9 Pa s (Wu y col., 2015), aproximadamente 23 veces más grande que suspensiones al 20% de GAL. Suspensiones de goma espina corona (obtenida de la semilla de *Gleditsia amorphoides*) al 5% presentan un K (0,409 Pa s) (Perduca y col., 2013) casi 10 veces mayor que suspensiones de GAL a la misma concentración.

La posibilidad de generar soluciones concentradas de baja viscosidad resulta especialmente interesante en diversas aplicaciones, tales como el uso de gomas como agente encapsulante en sistemas secados por atomización (Nussinovitch, 2009).

La evaluación de las propiedades reológicas de dispersiones de concentración media de GAL y GA permitió observar ligeras diferencias entre ambos biopolímeros. Se comprobó que GAL exhibe un comportamiento de flujo pseudoplástico con viscosidades aparentes relativamente bajas a concentraciones de hasta 20%. Los datos aquí expuestos resultan de gran interés para diversas aplicaciones en que la selección de GAL como aditivo se determine por criterios reológicos. Así mismo, provee información útil para cálculos en operaciones de transporte de fluidos, extracción, filtrado y dimensionamiento de bombas.

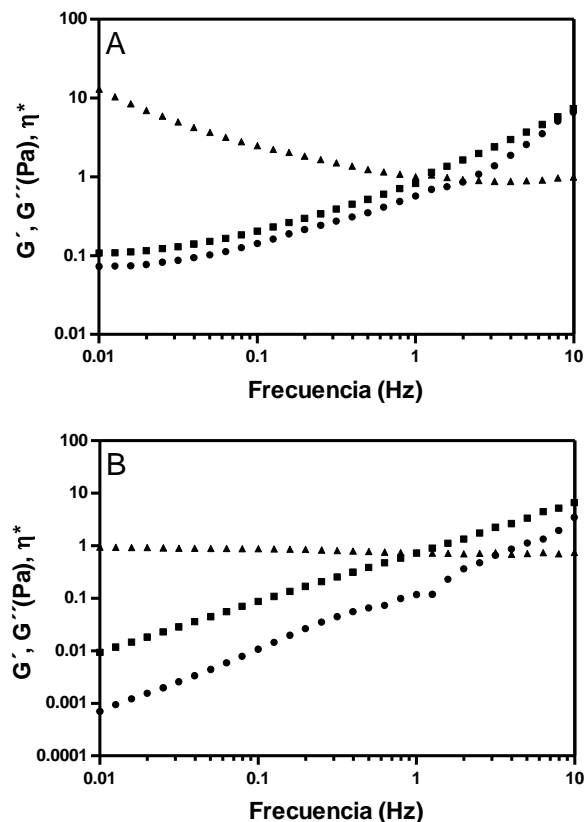
### IV.1.5.2.3 Comportamiento reológico de dispersiones concentradas

Se evaluó el comportamiento reológico de soluciones concentradas de GAL y GA (40% p/v) mediante ensayos dinámicos oscilatorios a 25°C. En la Figura IV.19 se muestran los espectros mecánicos obtenidos para para GAL (Figura IV.19 A) y GA (Figura IV.19 B), para un esfuerzo de 0,1 Pa, comprendido en el rango de viscoelasticidad lineal (datos no mostrados).

Las soluciones de GAL y GA (40% p/v) presentaron un comportamiento típico de sistemas poliméricos (Qian y col., 2011). El flujo viscoso (módulo de pérdida,  $G''$ ) se mantuvo por encima de la respuesta elástica (módulo de almacenamiento,  $G'$ ) en el rango de frecuencias estudiado. GA mostró un comportamiento predominantemente viscoso principalmente a bajas frecuencias, mientras que en GAL el valor de  $G''$  fue levemente superior al de  $G'$  lo cual sugiere que, a igual concentración, GAL tendría un mayor carácter sólido que GA (Wu y col., 2015).

Ambos módulos presentaron un aumento más pronunciado a partir de 1 Hz, y tendencia a entrecruzarse a valores de frecuencia cercanos a 10 Hz. Resultados similares encontraron otros autores para la goma exudada del duraznero, donde el entrecruzamiento ocurrió también a 10 Hz para soluciones al 6% (Qian y col., 2011). A partir del punto de cruce la solución se comportaría como un gel, con predominio del módulo elástico. La viscosidad dinámica compleja ( $\eta^*$ ) para GA fue prácticamente independiente de la frecuencia indicando un comportamiento de tipo newtoniano (Goycoolea y col., 1995b), mientras que para GAL

disminuyó marcadamente con la frecuencia, confirmando su comportamiento pseudoplástico. Las diferencias observadas en el comportamiento reológico de GAL respecto de GA podrían atribuirse a diferencias en la arquitectura molecular de estos polímeros.



**Figura IV.19** Espectros mecánicos de soluciones concentradas (40% p/v) de goma exudada de *Prosopis alba* (A) y goma arábica (B). Módulo de pérdida,  $G''$  (■), módulo de almacenamiento,  $G'$  (●), viscosidad dinámica compleja,  $\eta^*$  (▲).

Los resultados obtenidos a partir de los ensayos a grandes y pequeñas deformaciones indican que GAL comparte características reológicas con GA. Resulta de especial importancia que GAL, al igual que GA, tienen baja capacidad viscosante, incluso a concentraciones mayores que 20% p/v, con índices de consistencia mucho menores que gomas de semilla. Esto contribuye a considerar que GAL podría usarse como sustituto de GA en ciertas aplicaciones.

Los resultados expuestos en esta sección contribuyen al conocimiento del comportamiento reológico de GAL, el cual es de gran importancia en la evaluación global de sus propiedades funcionales para futuras aplicaciones.

### IV.1.5.3 Propiedades emulsionantes

Aunque comúnmente se relaciona a los hidrocoloides con su capacidad espesante y gelificante, ciertas gomas anfifílicas presentan además la capacidad de adsorberse a la interfase aceite-agua y formar membranas interfaciales que previenen o retardan los fenómenos de desestabilización de emulsiones (Dickinson, 2003). Dentro de los hidrocoloides, la goma arábiga es un agente emulsionante de referencia (Li y col., 2016).

El estudio de la capacidad emulsionante de un cierto ingrediente implica conocer su poder emulsionante, es decir su capacidad para favorecer la formación de partículas o gotas pequeñas, y su capacidad para estabilizar la emulsión, postergando aquellos fenómenos que conducen a su desestabilización (Pilosof y col., 2000).

En esta sección se estudiaron para GAL y GA propiedades interfaciales (tensión y módulo de dilatación interfacial) y la estabilidad de emulsiones o/w a través de la evaluación del tamaño de partícula, índice de polidispersidad, potencial Z e índice de cremado. Se empleó aceite comercial de pescado, de interés por su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados.

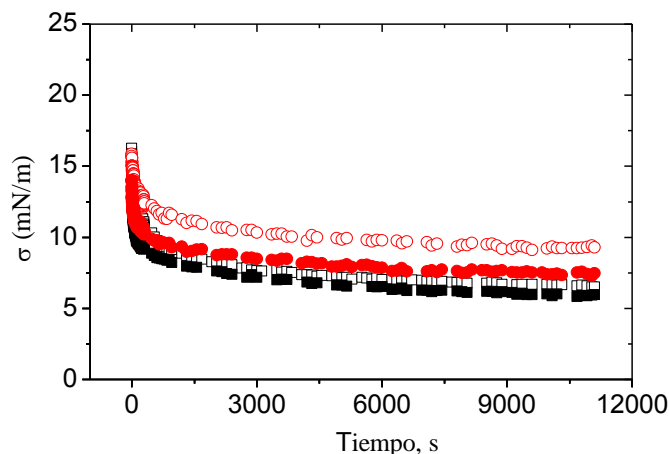
#### IV.1.5.3.1 Actividad y reología interfacial

La actividad interfacial de GAL y GA se caracterizó midiendo la tensión interfacial en un tensiómetro de gota. Los estudios se realizaron usando el aceite comercial, sin purificación previa, para evaluar así el comportamiento de la goma en la emulsión real, que se utilizará luego como material a estabilizar por encapsulación (sección IV.2).

Inicialmente, se midió la tensión interfacial del aceite de pescado (24 mN/m) en ausencia de goma, observándose una ligera disminución de este valor en el tiempo de medición (datos no mostrados). Probablemente esto se deba a la presencia de moléculas superficialmente activas en el aceite (antioxidantes, etc.). La Figura IV.20 muestra la evolución en el tiempo de la tensión dinámica interfacial determinada para distintas concentraciones de las gomas (2 y 5%).

Como tendencia general, se observa una disminución de los valores de  $\sigma$  durante los primeros 600 s que luego tienden a valores asintóticos tanto para GAL como para GA a las concentraciones estudiadas. La cinética de la disminución inicial de  $\sigma$  se relacionó con el grado de difusión y adsorción del emulsificante a la interfase (Pizones Ruiz-Henestrosa y

col., 2014). Luego ocurre una disminución gradual cuando las moléculas adsorbidas tienden a alcanzar un estado de cuasi-equilibrio que puede considerarse cuando los valores de  $\sigma$  no cambian en más de 0,1 mN / m en 30 min (Seta y col., 2014). La disminución de  $\sigma$  con el tiempo se relacionó también con la concentración y con cambios conformacionales de las moléculas en la interfase (Graham y col., 1979, MacRitchie, 1989, Dickinson, 2011, Pizones Ruiz-Henestrosa y col., 2014).



**Figura IV.20** Efecto de la concentración de gomas sobre la tensión dinámica interfacial,  $\sigma$  de los films interfaciales de GAL y GA adsorbidos a la interfase o/w en función del tiempo. GAL 2% ( $\square$ ) y 5% ( $\blacksquare$ ); GA 2% ( $\circ$ ) y 5% ( $\bullet$ ).

Un emulsionante eficaz debe adsorberse rápidamente a la interfase para reducir así la tensión interfacial y prevenir la coalescencia de las gotas (Dickinson, 2009). La adsorción de un emulsificante hidrofílico a la interfase o/w ocurre a través de diferentes pasos que afectan la medición de  $\sigma$ : inicialmente, las moléculas difunden de la solución acuosa a la interfase, donde interactúa con la fase oleosa y experimenta una reorganización estructural (Babak y col., 2005, Martínez y col., 2009, López-Franco y col., 2012).

La Figura IV.20 muestra que se alcanzaron menores valores de  $\sigma$  en el período analizado cuando se usó GAL, lo cual indica una mejor actividad interfacial en los distintos estadios, en comparación con GA. La capacidad para reducir  $\sigma$  se relacionó tanto con la composición (presencia de grupos hidrofóbicos capaces de promover la difusión de las moléculas de goma a la interfase o/w, carga neta superficial de las moléculas superficialmente activas) así como con el PM y la conformación molecular que éstas adoptan una vez que han alcanzado la

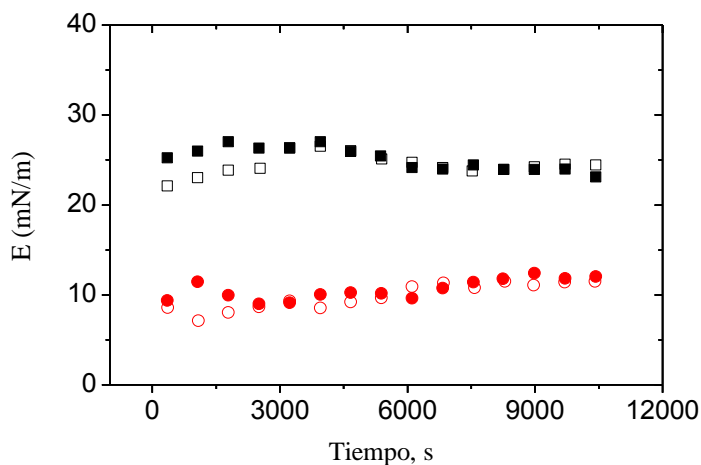


interfase (Vernon-Carter y col., 2000, López-Franco y col., 2012). También puede observarse en la Figura IV.20 que GAL redujo los valores de  $\sigma$  más rápidamente que GA. Esto puede explicarse considerando una mayor proporción de fracciones proteicas hidrofóbicas y una estructura más flexible de GAL, que le confiere una mejor actividad interfacial en comparación con GA (Dickinson, 2003, Román-Guerrero y col., 2009).

Se sabe que mejores propiedades interfaciales afectan el tamaño de gota de la emulsión, permitiendo la formación de emulsiones o/w con menor tamaño de gota (Mahfoudhi y col., 2014). La mayor afinidad de GAL por la interfase o/w comparada con GA indica que se requiere menor cantidad de material para estabilizar la emulsión.

En relación al efecto de la concentración de goma sobre el comportamiento interfacial de GAL y GA, se observó en ambos casos, que los valores  $\sigma$  disminuyeron con el aumento de concentración (Figura IV.20). La mayor disminución se observó al aumentar la concentración de GA, mientras que para GAL el aumento de concentración sólo produjo una ligera disminución, lo cual indica que el film interfacial formado por GAL probablemente alcanzó la saturación a las concentraciones estudiadas (Möbius y col., 1998, Beverung y col., 1999). Esto resulta positivo ya que se lograría un mismo efecto con menor cantidad de material.

Las propiedades dilatacionales de los films interfaciales también se evaluaron usando un tensiómetro de gota, con el fin de comprender mejor el efecto de las gomas en la capa de adsorción. Estas propiedades son muy importantes ya que afectan en gran medida la estabilidad de los sistemas coloidales, tales como emulsiones o/w (Dickinson, 2001, Wilde y col., 2004, Dickinson, 2009). La Figura IV.21 muestra el módulo de dilatación interfacial (E) de los films de GAL y GA adsorbidos a la interfase o/w en función del tiempo de formada la gota y a distintas concentraciones de goma. Los valores de E fueron muy similares a los valores de elasticidad dilatacional y ambos a su vez, mucho mayores que los valores de viscosidad dilatacional, obtenidos del mismo ensayo (datos no mostrados), lo cual indica un comportamiento viscoelástico dominante de los films (Ruíz-Henestrosa y col., 2008).

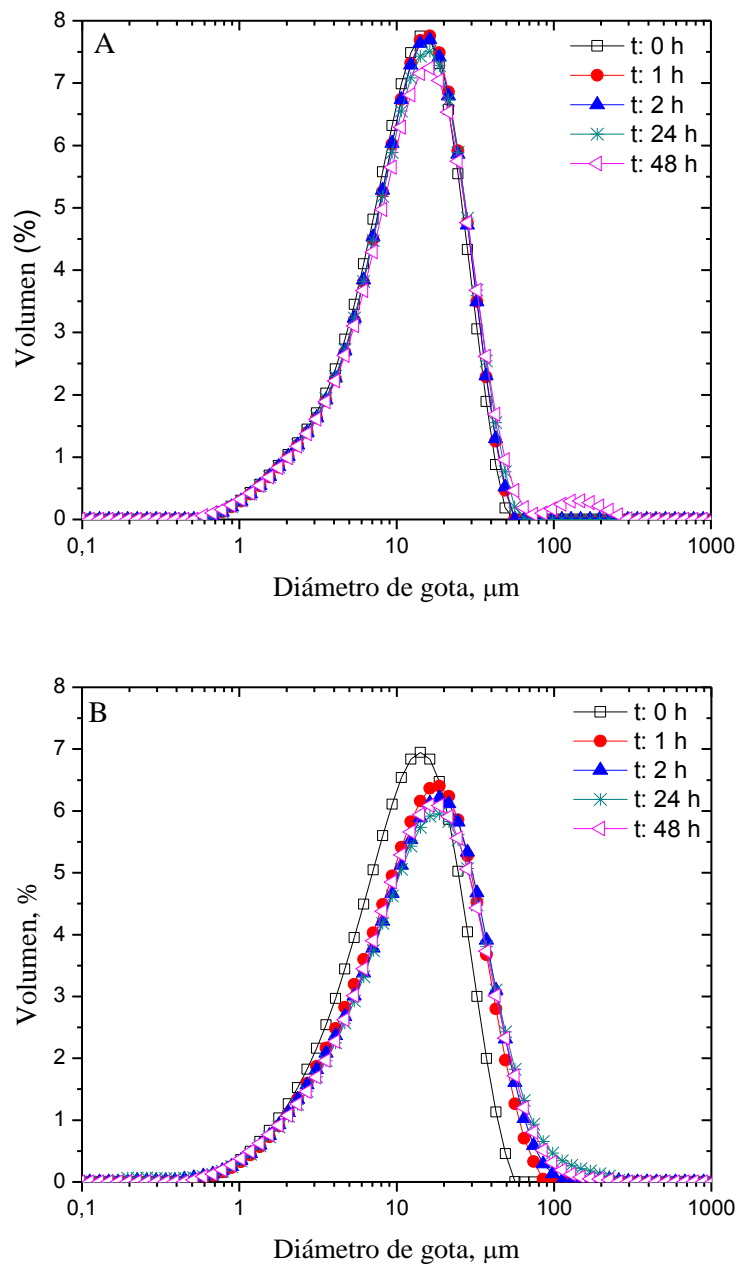


**Figura IV.21** Efecto de la concentración de gomas sobre el módulo dilatacional interfacial,  $E$  de los films interfaciales de GAL y GA adsorbidos a la interfase o/w como función del tiempo, resultantes del ensayo de la gota colgante. GAL 2% (□) y 5% (■); GA 2% (○) y 5% (●).

La Figura IV.21 muestra el valor del módulo dilatacional interfacial ( $E$ ) para ambas gomas, en el período de tiempo estudiado, cuyo valor se relaciona con la adsorción de moléculas activas en la interfase o/w, las interacciones que establecen entre ellas y con los cambios conformacionales (Graham y col., 1979, Damodaran y col., 1988, A. Bos y col., 2001). Cuando se comparan los valores de  $E$  para los films interfaciales de GAL y GA, se observan mayores valores para GAL, lo cual sugiere la formación de una red intermolecular en la interfase más fuerte, con características similares a las de un sólido (Pizones Ruiz-Henestrosa, et al., 2014). La Figura IV.21 también muestra la influencia de la concentración de las gomas sobre la elasticidad interfacial. Los valores de  $E$  prácticamente no variaron con la concentración de goma, lo cual podría indicar que las interacciones entre las moléculas adsorbidas pueden resultar casi similares.

#### IV.1.5.3.2 Determinación del tamaño de partícula e índice de polidispersidad

La Figura IV.22 muestra la distribución de tamaño de gota en volumen de emulsiones conteniendo 2% de GAL (A) o GA (B) luego de la preparación y durante el almacenamiento por 48 h a 25°C.

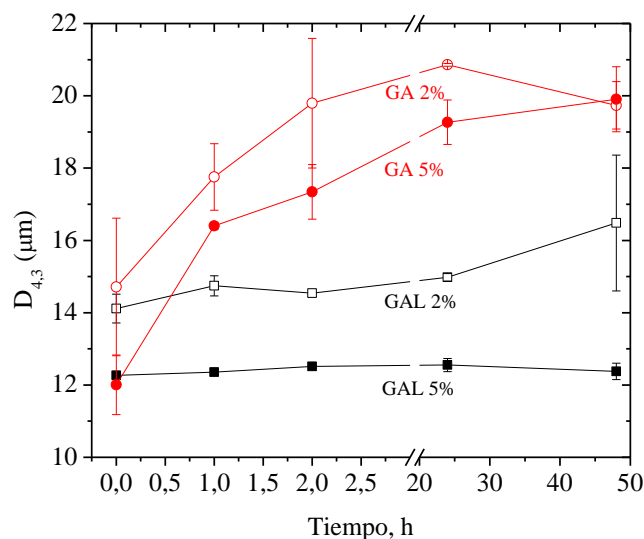


**Figura IV.22** Curvas de distribución de tamaño de volumen de emulsiones de aceite de pescado estabilizadas con 2% de goma exudada de *Prosopis alba* (A) o goma arábica (B), luego de la preparación ( $\square$ ) y durante el almacenamiento a  $25^{\circ}\text{C}$  a ( $\bullet$ ) 1 h, ( $\blacktriangle$ ) 2 h, ( $\ast$ ) 24 h y ( $\blacktriangleleft$ ) 48 h.

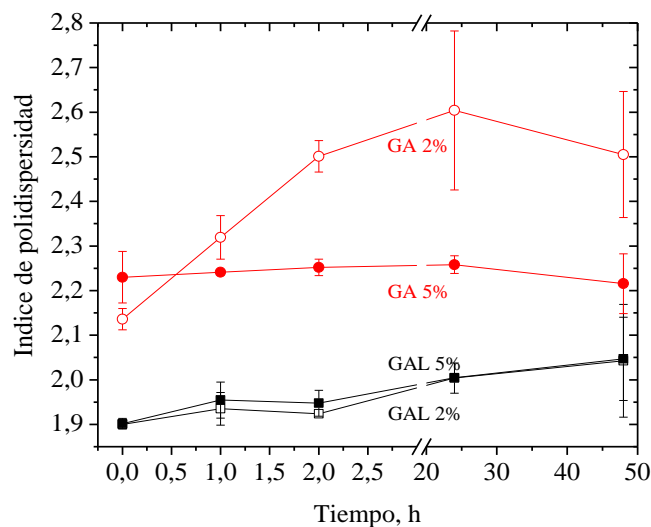
La distribución del tamaño de gota de emulsiones estabilizadas con GAL mostró luego de la preparación (Figura IV.22 A) una distribución monomodal con un pico amplio desde 0,7 a 60  $\mu\text{m}$ . No se observaron cambios apreciables de la distribución durante el almacenamiento,

excepto para el último tiempo evaluado donde se observó un segundo pico correspondiente a gotas de mayor tamaño (100 - 200  $\mu\text{m}$ ). La distribución de tamaño de gota de emulsiones estabilizadas con GA (Figura IV.22 B) luego de la preparación fue similar a la observada en presencia de GAL, con un pico amplio en el mismo rango y un tamaño de gota medio alrededor de 13  $\mu\text{m}$ , lo cual muestra que la capacidad emulsionante de ambas gomas es similar. Sin embargo, es importante señalar que durante el almacenamiento la distribución de tamaño de gota de las emulsiones que contenían GA se desplazó ligeramente hacia valores de tamaño mayores (variando entre 0,1 a 200  $\mu\text{m}$ ). Asumiendo que el incremento en el tamaño de gota es un indicador de una menor habilidad de la goma para estabilizar una cierta área superficial. Por tanto, GAL parecería tener mejor poder emulsionante que GA. Las propiedades emulsionantes de GA se atribuyeron en gran medida a una pequeña fracción rica en proteínas (Randall y col., 1988). Del mismo modo, podría relacionarse la capacidad emulsionantes de GAL principalmente a su contenido de proteínas (Tabla 1), el cual fue significativamente mayor que el determinado para GA.

En las Figura IV.23 y Figura IV.24 se muestran el diámetro  $D_{4,3}$  y los valores del índice de polidispersidad, respectivamente, ambos relacionados con procesos de desestabilización, para emulsiones conteniendo GAL o GA en distintas concentraciones.



**Figura IV.23** Diámetro  $D_{4,3}$  calculado a partir de las distribuciones de tamaño para emulsiones estabilizadas con 2 o 5% de GAL o GA durante el almacenamiento a 25°C.



**Figura IV.24** Índice de polidispersidad calculado a partir de las distribuciones de tamaño para emulsiones estabilizadas con 2 o 5% de GAL o GA durante el almacenamiento a 25°C.

Tanto para GAL como para GA, el  $D_{4,3}$  fue menor cuanto mayor fue la concentración del biopolímero (5 %) indicando que una mayor concentración del hidrocoloide favorece la formación de gotas más pequeñas durante el proceso de emulsificación. Esto podría relacionarse con una difusión y absorción más rápida de las moléculas a la interfase, lo cual se corresponde con los menores valores de  $\sigma$  observados a las mayores concentraciones de goma (Figura IV.20).

El diámetro  $D_{4,3}$  para las emulsiones estabilizadas con 2 y 5% de GAL (Figura IV.23) se mantuvo prácticamente sin cambios durante el almacenamiento a 25°C. Por el contrario, se observó que el diámetro  $D_{4,3}$  de las emulsiones estabilizadas con 2 % de GA incrementó marcadamente durante el almacenamiento alcanzando valores superiores a los obtenidos para GAL. Estos resultados están de acuerdo con la distribución de tamaño de gota observada para la emulsión de GA al 2% (Figura IV.22 B), donde se observó un aumento significativo en el tamaño promedio de la gota para las emulsiones almacenadas (1 a 48 h).

El diámetro  $D_{3,2}$  de ambas gomas se mantuvo en el rango de 5 y 8  $\mu\text{m}$ , siendo menores para mayores concentraciones de goma. Se sabe que diferencias mayores entre  $D_{3,2}$  y  $D_{4,3}$  son indicativas de una mayor tendencia a la desestabilización (Gu y col., 2005). En este sentido, es importante señalar que las emulsiones estabilizadas con GA presentaron mayores diferencias en estos diámetros respecto de las emulsiones preparadas con GAL.

El índice de polidispersidad también mostró valores mayores para las emulsiones que contenían GA (Figura IV.23), y por lo tanto mayor tendencia a la desestabilización. Mayores valores de  $D_{4,3}$  e índice de polidispersidad promueven los fenómenos de cremado y floculación en las emulsiones (Camino y col., 2011). Los menores tamaños en la distribución de volumen de gota (Figura IV.20) como así también del  $D_{4,3}$  e índice de polidispersidad durante el almacenamiento de las emulsiones que contenían GAL, están de acuerdo con los mayores valores de E obtenidos en los estudios de reología interfacial (Figura IV.21) en comparación con GA. Un mayor valor de E sugiere la presencia de interacciones más fuertes entre las moléculas de GAL en el film interfacial, lo cual resulta de gran importancia en la formulación de emulsiones estables (Wilde, 2000).

#### IV.1.5.3.3 Potencial Z

Los valores de potencial Z determinados para las emulsiones inmediatamente después de la preparación se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Potencial Z de emulsiones conteniendo 2 y 5% de la goma exudada de *Prosopis alba* (GAL) y goma arábica (GA).

	GAL		GA	
	2%	5%	2%	5%
Potencial Z (mV)	-43,50± 0,79 <sup>c</sup>	-45,85± 0,35 <sup>d</sup>	-41,20± 1,13 <sup>b</sup>	-36,10± 0,28 <sup>a</sup>

Valores promedios ± desviación estándar con diferentes letras en la misma fila son significativamente diferentes de acuerdo al análisis de la varianza ( $p < 0,05$ ).

El valor absoluto del potencial Z resultó diferente para todas las emulsiones y éste presentó el siguiente orden: 5% GAL > 2% GAL > 2% GA > 5% GA. Todas las emulsiones presentaron valores de potencial Z menores que -30 mV, y esto podría indicar que la repulsión electrostática entre las gotas es suficiente para superar las interacciones atractivas gota-gota y contribuir de esa manera a la estabilización de las emulsiones (Guzey & McClements, 2007).

Sin embargo, el valor absoluto del potencial Z para las emulsiones de GAL fue significativamente mayor que para las emulsiones estabilizadas con GA, contribuyendo así a una mayor estabilidad del sistema. Esta característica observada en las emulsiones estabilizadas con GAL puede ser atribuida a la presencia de una alta proporción de grupos

hidroxilo y carboxilo distribuidos en la estructura molecular. De esta manera, el polímero cargado y adsorbido sobre las gotas de aceite, les confiere su misma carga e inhibe la agregación de partículas por repulsión (estabilización electrostática). De esta manera, la combinación de un alto peso molecular, una apropiada relación carbohidrato/proteína (Tabla 1) y una carga predominantemente negativa, conducen a que las emulsiones preparadas con GAL, presenten una mejor estabilidad (Sibaja-Hernández, et al., 2015).

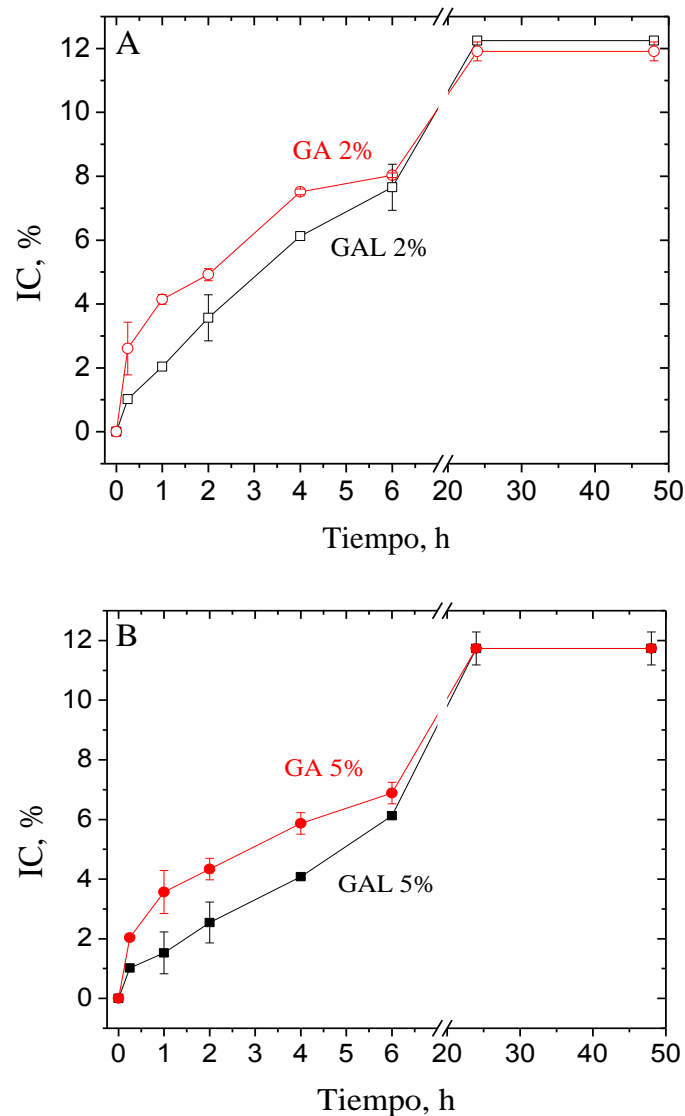
#### IV.1.5.3.4 Estudio de la estabilidad de las emulsiones al cremado

La estabilidad de las emulsiones conteniendo GAL o GA se evaluó también en términos de la capacidad de las gomas para evitar el cremado, proceso que refleja la tendencia a la separación de fases en condiciones normales, no aceleradas. La estabilidad frente al cremado de los sistemas conteniendo GAL y GA se evaluó a 25°C midiendo la altura de la emulsión diluida inferior, en función del tiempo como se detalla en la sección III.7.4 y se expresó como índice de cremado (IC). Este valor está relacionado con el grado de agregación de las gotas de aceite en la emulsión (Ye y col., 2006). La Figura IV.25 muestra la variación del IC para emulsiones estabilizadas con 2 y 5% de GAL y GA durante el almacenamiento a 25°C.

En todas las emulsiones estudiadas se observa que la separación de fases comenzó inmediatamente después de su preparación. Las emulsiones conteniendo GA presentaron valores de IC más altos que GAL durante las primeras 4 h de almacenamiento, a cualquiera de las concentraciones estudiadas. Luego, se observó un comportamiento similar para ambas gomas, con IC que alcanzaron un valor constante luego de 24 h de almacenamiento. Como se indica en la literatura (Carp y col., 1997, Martínez y col., 2005, Dickinson, 2009, Pizones Ruiz-Henestrosa y col., 2014), es importante considerar el efecto de la viscosidad de la fase continua en relación a la estabilidad de sistemas coloidales tales como espumas y emulsiones. Así, la mayor estabilidad observada en emulsiones conteniendo GAL podría relacionarse con un mayor efecto viscosante de los componentes hidrofílicos de GAL en la fase dispersante que reducen el movimiento de las gotas de aceite y en consecuencia, la velocidad de floculación y coalescencia.

Este hecho puede verse también reflejado en el mantenimiento de la distribución de tamaño de gota durante el período de almacenamiento (Figura IV.22A) como así también en las mejores propiedades reológicas de los films interfaciales formados por GAL (Figura

IV.21), que podrían dificultar los fenómenos de coalescencia (Seta y col., 2014). Considerando que la distribución de tamaño de las emulsiones estabilizadas con GAL no cambió durante el período estudiado, el mecanismo de desestabilización dominante parece ser el cremado gravitacional. Para mejorar la eficiencia de GAL se podría pensar en la incorporación de un segundo componente que aumente aún más la viscosidad de la fase dispersante.



**Figura IV.25** Índice de Cremado IC (%) de emulsiones estabilizadas con 2% (A) y 5% (B) de GAL y GA durante el almacenamiento a 25°C.



#### IV.1.5.4 Propiedades antioxidantes y antimicrobianas

Las gomas forman parte del metabolismo normal de las plantas. En muchos casos, se ha relacionado su producción a diversos fenómenos patológicos (infección de tejidos, ataque de insectos y microorganismos, etc.) en los que la goma se genera como mecanismo de defensa (Nussinovitch, 2009, Rana y col., 2011). La actividad protectora de las gomas se asoció en gran parte a la presencia de compuestos fenólicos y otros metabolitos secundarios. La presencia natural de estos compuestos podría conferir a las gomas propiedades antioxidantes y antimicrobianas, especialmente interesantes para su utilización como aditivo alimentario.

En esta sección se identificaron y cuantificaron los compuestos fenólicos presentes en GAL y se evaluó la actividad antioxidante y antimicrobiana de la goma. Estas propiedades funcionales podrían conferir beneficios adicionales a la goma frente a otros hidrocoloides que no presentan actividad antioxidante (Li y col., 2016), ampliando su uso como ingrediente (Mirhosseini y col., 2012).

##### IV.1.5.4.1 Identificación y cuantificación de compuestos con potencial actividad antioxidante

Los compuestos fenólicos son los antioxidantes más comunes en la naturaleza (Tan y col., 2015). En la Tabla 5, se muestran los compuestos fenólicos de reconocida actividad antioxidante identificados en GAL y GAL.

El contenido de polifenoles totales se determinó por el método de Folin-Cicolteau. Esta determinación provee una medida indirecta de la capacidad reductora total de la muestra y por tanto de su actividad antioxidante (Tan y col., 2015). El contenido de polifenoles de GAL fue significativamente mayor que el determinado para GA.

A pesar del reconocido interés por los compuestos fenólicos naturales, la cuantificación de sustancias polifenólicas es poco frecuente en la caracterización química de gomas, lo cual hace difícil su comparación. El contenido de compuestos polifenólicos presentes en GAL resultó ligeramente superior al reportado para *Acacia var. seyal* (8,4 mg eq. ácido gálico/g goma) (Andres-Brull y col., 2015) pero menor que el informado para otras gomas exudadas como la de *Prunus cerasoides* ( $64 \pm 2,33$  mg eq. ácido gálico /g goma b.s.) (Malsawmtluangi y col., 2014) o de *Eucalyptus spp.* ( $35,71 \pm 0,07$  a  $68,43 \pm 0,08$  g TAE/g) (von Martius y col., 2012). A su vez, los compuestos fenólicos presentes en GAL fueron comparables a los

encontrados para otros productos obtenidos de *Prosopis*, tales como harina del fruto de *P. alba* ( $4 \pm 0,01$  mg eq. ácido gálico /g sólido) y de *P. nigra* ( $4,1 \pm 0,01$  mg eq. ácido gálico /g sólido) (Cardozo y col., 2010).

**Tabla 5.** Compuestos fenólicos presentes en la goma exudada de *Prosopis alba* (GAL) en comparación con la goma arábiga (GA).

	GAL	GA
<b>Polifenólicos totales,</b> mg ácido gálico eq./g goma b.s	$9,55 \pm 0,06^b$	$1,76 \pm 0,03^a$
<b>Polifenólicos totales,</b> mg ácido tánico eq./ g goma b.s.	$12,24 \pm 0,07^b$	$2,40 \pm 0,04^a$
<b>Flavonoides,</b> mg quercetina eq./ g goma b.s.	$2,53 \pm 0,04^b$	$1,08 \pm 0,05^a$
<b>Taninos totales (método directo),</b> mg eq. ácido tánico/ g goma b.s.	$2,10 \pm 0,02^b$	$2,00 \pm 0,04^a$
<b>Taninos totales (método indirecto),</b> mg eq. ácido tánico eq./ g goma b.s.	$5,78 \pm 0,04^b$	$1,18 \pm 0,06^a$
<b>Taninos condensados,</b> mg taninos de quebracho eq./ g goma b.s.	$0,61 \pm 0,04^a$	$0,72 \pm 0,01^a$

Valores promedios  $\pm$  desviación estándar con diferentes letras en la misma fila son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba T ( $p < 0,05$ ).

Dentro de los polifenoles, los flavonoides son sustancias abundantes en la naturaleza y constituyen un conjunto de compuestos con reconocida actividad antioxidante y numerosos efectos positivos para la salud (Oroian y col., 2015). Se observa que GAL presentó un contenido de flavonoides 40% mayor que GA (Tabla 5), y mayor también que el reportado para la gomas exudadas de *Raphia hookeri* ( $0,0026 \pm 0,02$  mg/g de goma b.s.) y *Dacryodes edulis* ( $0,0039 \pm 0,11$  mg/g de goma b.s.) (Okwu y col., 2008). El contenido de flavonoides de GAL fue comparable al encontrado en otros alimentos obtenidos de *Prosopis*, tales como harina del fruto de *Prosopis alba* (0.01–0.03 mg eq. quercetina /g sólido) y *P. nigra* (0.07–0.13 mg eq. quercetina /g sólido) (Cardozo y col., 2010).

Los taninos, a diferencia de los polifenoles y flavonoides, son componentes fundamentales en la caracterización química de las gomas exudadas, ya que su concentración constituye, en muchos casos, un criterio de calidad. Los taninos se consideran normalmente un

contaminante y su concentración varía dependiendo del contacto entre la goma y la corteza durante el proceso de gumosis (Andres-Brull y col., 2015).

De acuerdo con lo descrito en la sección III.6.8, la evaluación de la concentración de taninos se realizó por distintas aproximaciones.

Por un lado, el método directo, se basa en la formación de complejos coloreados por adición de  $\text{FeCl}_3$ , de acuerdo con lo descrito por Anderson y Wang (1989a). Esta técnica, rápida y fácil de realizar, es la que se usa generalmente para evaluar la composición global de taninos en gomas. Como se observa en la (Tabla 5) el contenido de taninos de ambas gomas fue similar y comparable a los reportados para *Acacia senegal* var. *senegal* (2,8 – 5,2 mg/g) y menor que el determinado para gomas exudadas de *Prosopis velutina* (4,6 mg/g) (Goycoolea y col., 1997), así como para ciertas especies de *Acacias*, *Enterolobium* y *Samanea spp.* (2,2 – 20,5 mg/g) identificadas como potenciales fuentes de goma en Venezuela (Abed El Kader y col., 2003). En estos trabajos relacionaron el contenido de taninos de las gomas con diversos aspectos de calidad, tales como la coloración de los exudados. Sin embargo, como se describió en la sección IV.1.2, en relación al efecto de los métodos de purificación y composición de las gomas, el color podría estar más bien relacionado a los polifenoles totales que con los taninos medidos por este método.

Por otro lado, en el método indirecto, el contenido de taninos se cuantifica en términos de la fracción de polifenólicos totales que precipita en presencia de gelatina. De acuerdo con esta técnica, GAL presentó un contenido de taninos significativamente mayor que GA (Tabla 5), pero mucho menor que los reportados para diversas especies de *Eucaliptus*, los cuales variaron entre 16,7 y 516 mg de ácido tánico/g goma (von Martius y col., 2012). La diferencia en las concentraciones de taninos encontradas por esta técnica entre GAL y GA, explica en mayor medida las diferencias observadas en los atributos cromáticos de estas gomas (Tabla 1).

Por último, se midió el contenido de taninos condensados, o proantocianidinas, de acuerdo con el método descrito inicialmente por Porter (1985) con las modificaciones propuestas recientemente por Cardozo y col. (2010). GAL y GA no presentaron diferencias significativas (Tabla 5). En ambos casos, el contenido de taninos condensados fue ligeramente mayor que los valores determinados para diversas especies de *Acacia* de Venezuela (0,083 - 0,4 mg/g goma) (Abed El Kader y col., 2003), y menor que los valores

encontrados para harina del fruto de *P. alba* y *P. nigra* los cuales variaron entre 4.64 a 6,90 mg equivalentes de tanino de quebracho /g de sólidos (Cardozo y col., 2010).

La concentración de taninos en gomas exudadas constituye un aspecto clave en la evaluación de la seguridad del aditivo. Numerosos trabajos han postulado que los taninos presentes en gomas exudadas podrían ejercer efectos mutagénicos (Goycoolea y col., 1997) y anti nutricionales (Seeram, 2008), entre otros riesgos potenciales para la salud (López-Franco y col., 2012). Sin embargo, no hay evidencias claras en la literatura sobre la relación dosis-efecto asociada a la ingesta directa de gomas exudadas, o de alimentos conteniendo estas gomas como ingrediente. Goycoolea y col. (1997) sustentaron la inocuidad de gomas exudadas del género *Prosopis* basados en la evidencia histórica del consumo de este producto en los pueblos originarios de México, en los que no se encontraron efectos tóxicos asociados. Un enfoque reciente sobre la presencia de taninos en alimentos propone considerarlos como compuestos beneficiosos para la salud, y en sistemas alimentarios, como potenciales antioxidantes (Figuroa-Espinoza y col., 2015) y antimicrobianos. Los resultados del ensayo toxicológico *in vivo*, realizados en este trabajo (sección IV.1.4) no evidenciaron efectos tóxicos de GAL, lo cual contribuye a considerar que la concentración de taninos en la goma no sería un factor de riesgo.

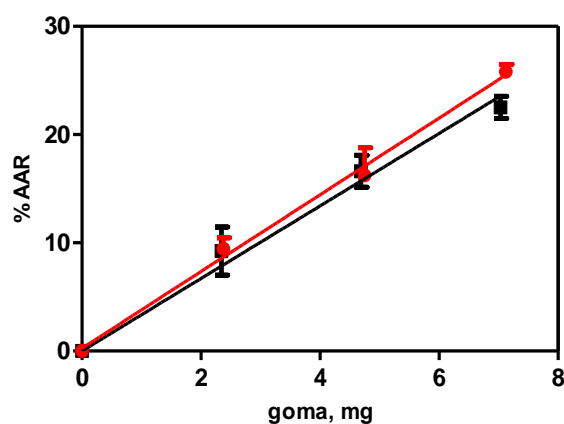
En términos generales, GAL presentó un mayor contenido de metabolitos secundarios con potencial actividad antioxidante que GA. La presencia de polifenoles, flavonoides y taninos en GAL permiten pensar en propiedades interesantes de la goma, como antioxidantes (Figuroa-Espinoza y col., 2015) y y/o antimicrobianas (von Martius y col., 2012), que amplían aún más su campo de aplicación.

#### IV.1.5.4.2 Evaluación de la actividad antioxidante

Se evaluó la actividad antioxidante de la goma exudada de *Prosopis alba* y se la comparó con la de GA a través de una combinación de ensayos *in vitro* que pretenden interpretar su comportamiento en términos de distintos mecanismos antioxidantes.

La actividad antioxidante es una de las propiedades funcionales más investigadas en productos naturales no sólo debido a su rol protector en alimentos sino debido a sus implicancias en el mantenimiento de la salud (Balboa y col., 2013).

La captura de radicales libres es el principal mecanismo de acción de los antioxidantes en los sistemas biológicos y alimentarios (Pokorny y col., 2005). Como primera aproximación, se puede evaluar la actividad antirradicalaria utilizando radicales sintéticos estables como el 2,2'azino bis (3-etilbenzotiazolina-ácido sulfónico),  $ABTS^{+\cdot}$  preparado convenientemente en medios acuosos, ya que las gomas son insolubles en solventes orgánicos o de polaridad intermedia. Tanto GAL como GA presentaron capacidad atrapadora de radicales  $ABTS^{+\cdot}$ , evidenciando un porcentaje de actividad antirradicalaria (%AAR) linealmente dependiente de la concentración (Figura IV.26).



**Figura IV.26** Porcentaje de actividad antirradicalaria (% AAR) por mg de goma para la goma exudada de *Prosopis alba* (GAL) (■) en comparación con la goma arábiga (GA) (●). Símbolos: datos experimentales. Líneas: modelo de regresión lineal.

En el rango de concentraciones evaluadas, las cantidades de GAL o GA, requeridas para alcanzar cierto %AAR, fue similar. No se pudo evaluar la capacidad antioxidante a mayores concentraciones de los hidrocoloides ya que se observó turbidez en el medio de reacción.

El ensayo de captura de radicales  $ABTS^{+\cdot}$  al igual que el método de determinación de polifenólicos totales, se basan en el mecanismo de transferencia de un simple electrón (SET) (Tan y col., 2015). A pesar de ello, no se encontró una correlación directa entre ambas medidas, lo cual podría indicar que la captura de radicales  $ABTS^{+\cdot}$  pudo haber sido afectada por reacciones laterales o sustancias interferentes.

Se evaluaron además otros indicadores de capacidad antioxidante. En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos.

**Tabla 6.** Capacidad antioxidante de la goma exudada de *Prosopis alba* (GAL) en comparación con la goma arábica (GA).

	GAL	GA
<b>Inhibición de radicales OH·,</b> % /mg goma b.s	50,61 ± 0,48 <sup>b</sup>	46,08 ± 0,24 <sup>a</sup>
<b>Poder reductor,</b> mg ácido ascórbico eq. /g goma b.s.	2,19 ± 0,05 <sup>b</sup>	1,06 ± 0,01 <sup>a</sup>
<b>Capacidad quelante de Fe<sup>3+</sup>,</b> mg EDTA eq. /g goma b.s.	0,14 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,02 ± 0,00 <sup>a</sup>

Valores promedios ± desviación estándar con diferentes letras en la misma fila son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba T ( $p < 0,05$ ).

La capacidad atrapadora de radicales OH· se evaluó en términos de la competencia entre la desoxirribosa y los compuestos antioxidantes presentes en la goma, por los radicales libres OH· generados a partir del sistema Fe<sup>3+</sup>/ácido ascórbico/EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los radicales hidroxilos constituyen una de las especies reactivas del oxígeno más potentes en los sistemas biológicos al reaccionar con los ácidos grasos insaturados, componentes de los fosfolípidos de las membranas celulares, ADN y proteínas (Alam y col., 2013, Balboa y col., 2013). Ofrece por tanto, una visión de la actividad antioxidante de la sustancia que se investiga, frente a radicales presentes en sistemas reales.

Los antioxidantes presentes en GAL evitaron que los radicales libres OH· reaccionaran con la desoxirribosa resultando en sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) cuantificables espectrofotométricamente. GAL ejerció un porcentaje de inhibición mayor que GA (Tabla 6). La mayor actividad capturadora de radicales OH· de GAL podría explicarse considerando su mayor contenido en sustancias polifenólicas respecto de GA (Tabla 5). Se reconoce en los polifenoles la capacidad de inactivar a los radicales libres de acuerdo con los mecanismos de transferencia de un átomo de hidrógeno o transferencia de un único electrón (Oroian y col., 2015). En este sentido, el ensayo de captura de radicales OH· resultó más sensible que el de captura de radicales ABTS<sup>+</sup>, reportando una mayor actividad antioxidante para GAL, la cual podría explicarse satisfactoriamente en términos de su mayor proporción compuestos fenólicos, especialmente flavonoides, cuya alta reactividad frente a los radicales hidroxilos ha sido previamente reportada (Pokorny y col., 2005).

El poder reductor es otro indicador de la capacidad antioxidante, se basa en la medida de la habilidad de donar electrones y reducir los intermediarios oxidados en el proceso de peroxidación (Balboa y col., 2013). En este sentido, GAL evidenció mayor eficacia en la reducción del complejo  $\text{Fe}^{3+}$ -ferricianuro, resultando en un poder reductor casi dos veces mayor que GA (Tabla 6).

El poder reductor también se basa en mecanismos de transferencia de un simple electrón. De acuerdo con ello, los resultados de este ensayo son coherentes con los del ensayo de captura de radicales  $\text{OH}\cdot$  y el ensayo de Folin-Cicolteau (Tabla 5). Debe reconocerse sin embargo, que junto con polifenólicos y sustancias relacionadas, otros compuestos presentes en GAL podrían contribuir a la actividad reductora, tales como aminoácidos y azúcares reductores con grupos hidroxilos activos (Xiong y col., 2013). Así por ejemplo, Yao y col. (2013) reportaron que fracciones de oligosacáridos altamente purificadas, obtenidas por hidrólisis de la goma exudada del duraznero, presentaron poder reductor y capacidad capturadora de radicales hidroxilo y DPPH. En forma similar, Kamboj y Rana (2014) evaluaron la actividad antioxidante de la goma extraída de la fibra de maíz, encontrándose una respuesta positiva para los ensayos de DPPH y captura de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Sin embargo, en ambos casos, los mecanismos implicados en la actividad antioxidante no se explicaron completamente.

Por otro lado, la habilidad de quelar metales de transición es el mecanismo antioxidante secundario más importante debido a que previene el efecto prooxidante de los iones metálicos que descomponen hidroperóxidos generando sustancias reactivas que inician la cadena radicalaria (Pokorny y col., 2005) o a través de la producción de radicales hidroxilo en la reacción de Fenton (Matanjan y col., 2008). En términos de la captura de cationes  $\text{Fe}^{2+}$ , GAL resultó más eficiente que GA (Tabla 6). La capacidad de captura de cationes  $\text{Fe}^{2+}$  podría explicarse observando el contenido de taninos cuantificados según el método indirecto (por precipitación con gelatina). Se ha reportado que los taninos son capaces de formar complejos quelatos con muchos iones metálicos (von Martius y col., 2012) y que la formación de complejos de hierro y cobre, transforma a los iones metálicos prooxidantes en productos más estables (Carocho y col., 2013).

La actividad antioxidante de GAL, evidencia su potencial tecnológico como agente protector de sustancias oxidables por mecanismos radicalarios, tales como aquellos

acoplados a la peroxidación de lípidos insaturados. Esta propiedad resulta de gran interés en aplicaciones alimentarias y farmacéuticas, donde los hidrocoloides emulsionan o encapsulan lípidos sensibles a la oxidación. Por otro lado, los antioxidantes naturales constituyen una ventaja ya que son mejor percibidos por parte de los consumidores en comparación con los sintéticos. Los ensayos de actividad antioxidante proveen evidencia suficiente para establecer que GAL exhibe funcionalidad antioxidante y esto expande su utilidad a sistemas alimentarios en que podría actuar impartiendo protección a sustancias susceptibles a la oxidación tales como lípidos insaturados.

#### IV.1.5.4.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana

Recientemente, se encontró que existe una correlación positiva entre el contenido total de compuestos polifenólicos en distintas gomas exudadas (*Eucalyptus*, *Prunus persica*) y sus propiedades antimicrobianas (von Martius y col., 2012, Yao y col., 2013). La toxicidad de los taninos contra bacterias, hongos filamentosos y levaduras está bien documentada, atribuyéndose ésta a la habilidad que presentan los taninos para precipitar las proteínas a través de interacciones hidrofóbicas, covalentes y de puentes de hidrógeno induciendo daños irreversibles en las estructuras celulares de los microorganismos (Haslam, 1996).

Conociendo estos antecedentes, en este trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana de suspensiones de GAL y GA (10 % p/v) mediante la técnica de difusión en agar, evaluando el halo de inhibición frente a microorganismos comúnmente presentes en alimentos como *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* y *Lactobacillus curvatus*.

En las condiciones ensayadas no se detectó actividad antimicrobiana para ninguna de las gomas. Probablemente la concentración de compuestos fenólicos presentes en las suspensiones de GAL o GA fue insuficiente para ejercer un efecto bactericida.

En el trabajo de von Martius y col. (2012) la goma con menor actividad antimicrobiana, para una solución 10 % p/v, presentó una concentración de fenólicos totales (364 mg de ácido tánico/g goma) y de taninos (155 mg de ácido tánico/g goma) aproximadamente 30 veces mayor que las determinadas para GAL a igual concentración.

Para poder detectar la actividad antimicrobiana de los compuestos bioactivos presentes en GAL probablemente debería realizarse una extracción o concentración de los mismos. Sin embargo en este trabajo no se pretende hacer una purificación exhaustiva de la goma, con



separación o concentración de sus componentes, sino más bien utilizarla con un mínimo procesamiento para aprovechar todas sus funcionalidades.

### *IV.1.5.5 Propiedades térmicas y de sorción*

Además de las propiedades viscosantes, emulsionantes y estabilizantes observadas para las gomas en solución, los hidrocoloides pueden actuar como estabilizantes en sistemas concentrados o deshidratados (Ramoneda y col., 2011, Mosquera y col., 2012, Vásquez y col., 2013).

La capacidad de protección frente a los cambios estructurales debidos a la exposición a ambientes de distintas humedades relativas y/o aumento de temperatura, requiere considerar el efecto de los hidrocoloides como componentes de sistemas amorfos. El estudio de las propiedades de sorción de agua y su relación con la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), permite obtener parámetros tecnológicos que resultan de interés, especialmente en aquellas aplicaciones donde la estabilidad estructural resulta importante (Mosquera y col., 2012).

En esta sección se estudiaron para GAL liofilizada, propiedades físicas ligadas a la estabilidad de materiales biológicos o alimentos deshidratados como propiedades de sorción de agua y propiedades térmicas, y se confeccionaron diagramas para predecir temperatura y humedades críticas de almacenamiento.

#### IV.1.5.5.1 Isotermas de sorción

Las isotermas de sorción de agua son herramientas útiles para estudiar las interacciones de los materiales o sistemas alimenticios con el agua (Tonon y col., 2009, Vásquez y col., 2013, Velázquez-Gutiérrez y col., 2015). Han sido utilizadas para estudiar las características estructurales de alimentos (Beristain y col., 2002) y proveen información útil para seleccionar las condiciones adecuadas de deshidratación, mezcla, envasado y almacenamiento (Bell y col., 2000). El modelado de las isotermas de sorción de agua es particularmente importante para predecir la vida media de sistemas o alimentos con humedad baja e intermedia (Labuza y col., 1970, Simatos y col., 1988).

En este trabajo se utilizaron dos modelos ampliamente usados en alimentos para caracterizar el comportamiento de sorción de GAL. Por un lado se empleó el modelo de Guggenheim-Anderson-de Boer (van den Berg y col., 1981) y el modelo generalizado de

D'arcy y Watt (d'Arcy y col., 1970) recientemente propuesto por Furmaniak (Furmaniak y col., 2005a) para describir las isotermas de sorción de agua de varios alimentos.

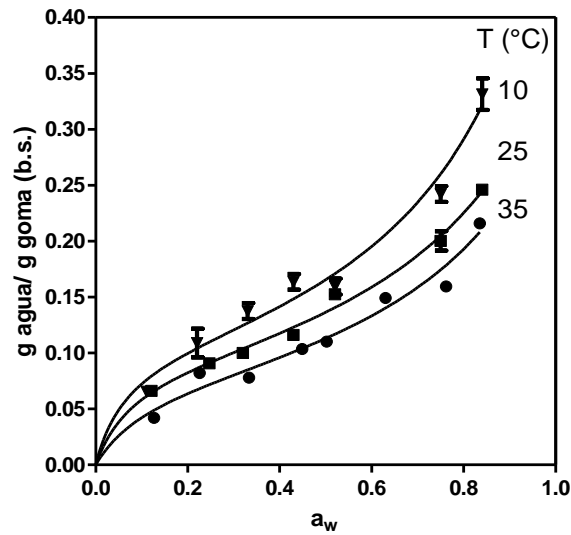
El modelo de GAB ha sido muy utilizado para describir las propiedades de sorción de agua en un rango amplio de humedades (11 a 90 % HR). Considera que la adsorción ocurre en mono y multicapas, y que la energía de adsorción varía en cada etapa. Permite determinar el contenido de agua de la monocapa, importante para definir las condiciones óptimas de almacenamiento y/o envasado (Rosa y col., 2010).

El modelo de GDW provee una visión más profunda sobre los mecanismos de sorción de agua (Furmaniak y col., 2009). Este modelo, considera el hecho de que las moléculas de agua adsorbidas sobre los sitios primarios de sorción (tipo Langmuir) no siempre se convierten en sitios secundarios de adsorción. Ciertas limitaciones físicas producidas por hinchamiento del material, rugosidad y/o efectos estéricos, pueden prevenir la formación de multicapas (Furmaniak y col., 2005b). En el caso en que, cada molécula de agua adsorbida a un sitio primario se transforme en un sitio secundario, el mecanismo de adsorción de GDW se reduce al mecanismo del modelo de GAB. El modelo de GDW introduce un cuarto parámetro al modelo de GAB, mejorando así su precisión y ajuste a los datos experimentales (Furmaniak y col., 2007a, Furmaniak y col., 2009).

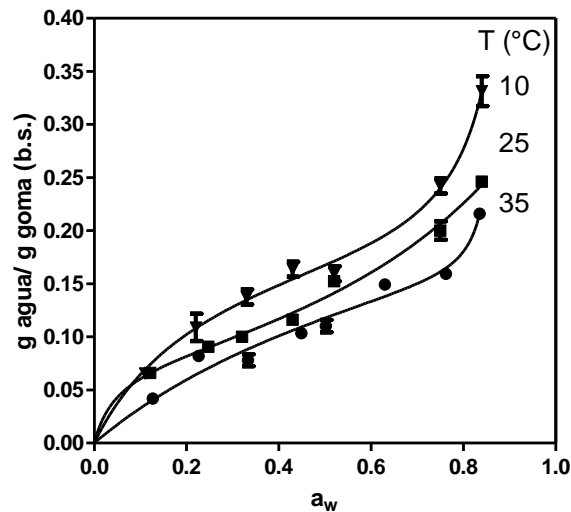
Las Figura IV.27 y Figura IV.28 muestran las isotermas de sorción de agua obtenidas para GAL liofilizada a 10, 25 y 35 °C, ajustadas con el modelo de GAB (Figura IV.27) y con el modelo de GDW (Figura IV.28). Las muestras alcanzaron el equilibrio luego de 30 días de humidificación.

Las curvas de sorción presentaron un comportamiento sigmoideo a todas las temperaturas estudiadas, de tipo II de acuerdo con la clasificación de BET (Brunauer y col., 1938). Este comportamiento es característico de productos biológicos y sistemas alimenticios donde se observa un ligero aumento del contenido de agua a bajas  $a_w$  y un aumento pronunciado a  $a_w$  mayores que 0,8, debido principalmente a la disolución de azúcares (Alhamdan y col., 1999, Mosquera y col., 2012).

Los carbohidratos y proteínas presentes en la goma (Tabla 1) podrían ser los principales responsables del comportamiento de sorción observados. La presencia de sales en los exudados, incluso en pequeñas proporciones podría ejercer también un efecto importante sobre las interacciones sólido-agua en los sistemas de baja humedad (Mazzobre y col., 2001).



**Figura IV.27** Isotermas de sorción de agua de la goma exudada de *Prosopis alba* obtenidas a 10 °C, 25 °C y 35 °C. Los símbolos representan el promedio de los valores experimentales y las líneas corresponden al ajuste según el modelo de GAB.



**Figura IV.28** Isotermas de sorción de agua de la goma exudada de *Prosopis alba* obtenidas a 10 °C, 25 °C y 35 °C. Los símbolos representan el promedio de los valores experimentales y las líneas corresponden al ajuste según el modelo de GDW.

Los valores de contenido de agua de la isoterma de GAL a 25°C fueron similares a los informados para goma arábica y goma de mezquite cuya composición proximal es similar a la de GAL y a la de otros exudados (Pérez-Alonso y col., 2006b, Ramoneda y col., 2011). Para una dada  $a_w$ , el contenido de agua disminuyó con el aumento de la temperatura de

equilibración. A mayores temperaturas aumenta la energía de las moléculas, las interacciones sólido-agua son menos estables y tiendan a romperse resultando en una disminución del contenido de agua en el equilibrio (Palipane y col., 1993). No se observaron entrecruzamientos ni discontinuidades de las curvas como suele observarse en sistemas en los que ocurre cristalización de solutos. Curvas similares se obtuvieron para otros polímeros no cristalizables como maltodextrina (Pérez-Alonso y col., 2006a, Pérez-Alonso y col., 2006b), carboximetil celulosa, gomas guar, locust-bean, tragacanto y xantana (Torres y col., 2012). Los carbohidratos y proteínas de alto peso molecular en GAL podrían prevenir la cristalización de los azúcares presentes (Mazzobre y col., 2001).

En las Tabla 7 y Tabla 8 se muestran los parámetros de ajuste del modelo de GAB y de GDW respectivamente, para las isothermas de sorción de agua de GAL a las distintas temperaturas estudiadas.

**Tabla 7.** Parámetros de ajuste de la ecuación de GAB para las isothermas de sorción de agua de GAL a las distintas temperaturas estudiadas. Se informan además los valores de coeficientes de regresión no lineal ( $R^2$ ), bondad de ajuste (E) y habilidad de ajuste (DEE).

GAB	Temperatura, °C		
	10	25	35
$m_o$ , g agua/g goma b.s.	0,107	0,094	0,080
C	18,89	16,61	11,51
K	0,805	0,749	0,758
$R^2$	0,982	0,992	0,971
E, %	4,471	1,647	3,800
DEE	0,017	0,003	0,006

Tanto el modelo de GAB como el modelo de GDW se ajustaron bien a los datos experimentales y permitieron describir el comportamiento de sorción de GAL a las temperaturas estudiadas.

El contenido de agua de la monocapa ( $m_o$ ) obtenido de la ecuación de GAB, corresponde a la primera etapa de sorción descrita por GAB y es de particular interés ya que refiere a la cantidad de agua adsorbida fuertemente a sitios primarios de adsorción, se considera en alimentos como valor límite de estabilidad (Pérez-Alonso y col., 2006b, Rosa y col., 2010). El valor de monocapa de GAL a 25°C (0,094 g de agua/g de sólido seco) fue ligeramente

mayor que los reportados para goma arábica (0,053 – 0,087 g agua/g sólido seco) (Pérez-Alonso y col., 2006b, Tonon y col., 2009), goma de mezquite (0,0811 g de agua/g de sólido seco) (Pérez-Alonso y col., 2006b) y mucílago de chíá (0,041-0,080 g agua/g sólido seco) (Velázquez-Gutiérrez y col., 2015). Esto indica que GAL requiere mayor cantidad de agua para saturar sus sitios activos y por lo tanto sería estable a contenidos de agua mayores. El valor de monocapa depende de una combinación de factores tales como la conformación y topología de las moléculas que componen la matriz, proporción de sitios hidrofílicos/hidrofóbicos en la superficie (Tonon y col., 2009), así como también a diferencias en la composición y naturaleza de los azúcares que conforman la cadena del biopolímero (Torres y col., 2012).

En la Tabla 7 se observa además que el valor de  $m_0$  disminuyó con la temperatura. Este efecto fue atribuido por otros autores a la reducción del número de sitios disponibles para interactuar con el agua debido a cambios fisicoquímicos, topológicos y estructurales que ocurren al aumentar la temperatura (Velázquez-Gutiérrez y col., 2015).

La constante de Guggenheim (C), relacionada con el calor de sorción (kJ/mol), determinada para GAL a 25°C fue 16,61 kJ/mol, similar al valor reportado para GA (15,90 kJ/mol) y mayor que para GM (7,52 kJ/mol) (Pérez-Alonso y col., 2006b). Se observó que C disminuyó al aumentar la temperatura y esto podría explicarse considerando que las interacciones adsorbente-adsorbato son exotérmicas haciendo que el valor de C sea menor a 30° que a 10°C (Diosady y col., 1996).

El parámetro K de la ecuación de GAB, se aproxima a 1 conforme las propiedades del agua de la multicapa se aproximan a las del agua líquida. El valor de K a 25°C para GAL fue 0,749, ligeramente menor que el valor reportado para GA y GM (0,841 y 0,843, respectivamente) (Pérez-Alonso y col., 2006b).

Las isotermas de sorción de agua se modelaron además usando el modelo generalizado de d'Arcy y Watt (d'Arcy y col., 1970) (Tabla 8). En este modelo el parámetro  $m$  informa sobre la concentración de sitios primarios de adsorción. El valor para GAL fue 0.079 (g agua /g de goma b.s.), similar a los valores publicados para diversos alimentos cuyos valores de  $m$  estuvieron comprendidos entre 0,001 y 0,242 g agua/ g sólido seco (Furmaniak y col., 2007a, Furmaniak y col., 2009).

**Tabla 8.** Parámetros de ajuste de la ecuación de GDW para las isotermas de sorción de agua de GAL a las distintas temperaturas estudiadas. Se informan además los valores de coeficientes de regresión no lineal ( $R^2$ ), bondad de ajuste (E, %) y habilidad de ajuste (SEE).

GDW	Temperatura, °C		
	10	25	35
m, g agua/g goma b.s.	0,2242	0,079	0,306
$K'$	3,980	20,96	1.201
k	1,066	0,655	1,146
w	0,108	1,837	0,018
$R^2$	0,993	0,992	0,974
E, %	1,396	0,890	2,728
SEE	0,005	0,003	0,006

Las constantes relacionadas a la cinética de adsorción a sitios primarios ( $K'$ ) y secundarios ( $k$ ) fueron similares a las reportadas por Furmaniak y col. (2011) para otros alimentos, las cuales variaron entre 182,1 - 0,74, para  $K'$  y 0,983 - 0,901, para  $k$ . Estos parámetros no evidenciaron cambios apreciables por efecto de la temperatura, contrariamente a lo reportado por Furmaniak y col. (2007b).

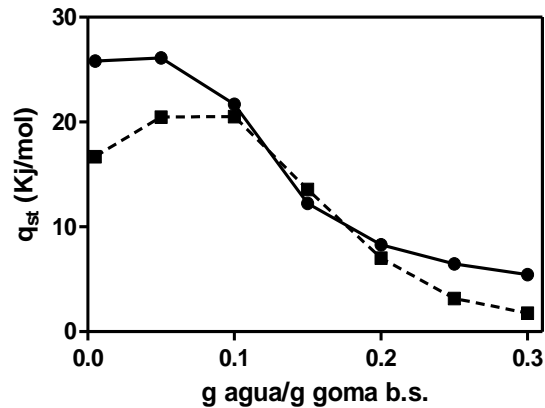
A 25°C, el valor del parámetro  $w$  fue 1,84 lo cual indica que una molécula de agua adsorbida a un sitio primario de adsorción genera más de un sitio secundario. Es decir que no habría restricciones geométricas para la creación de sitios secundarios de adsorción sobre la superficie del sólido (Furmaniak y col., 2009).

#### IV.1.5.5.2 Análisis termodinámico de las isotermas de sorción de agua

El análisis termodinámico de las isotermas de sorción de agua permite profundizar la comprensión de los fenómenos de sorción involucrados (Beristain y col., 2002).

Con esta finalidad se calculó el calor isostérico de sorción (Figura IV.29) y la entropía diferencial de sorción (Figura IV.30) a partir de los datos de sorción a 10, 25 y 35°C, utilizando los modelos de GAB y GDW. La variación del calor isostérico de sorción con el contenido de agua fue similar para los dos modelos utilizados. Se observaron diferencias principalmente a bajas humedades, donde el modelo de GDW condujo a menores entalpías de sorción. En ambos modelos, se observa que conforme disminuye el contenido de agua,

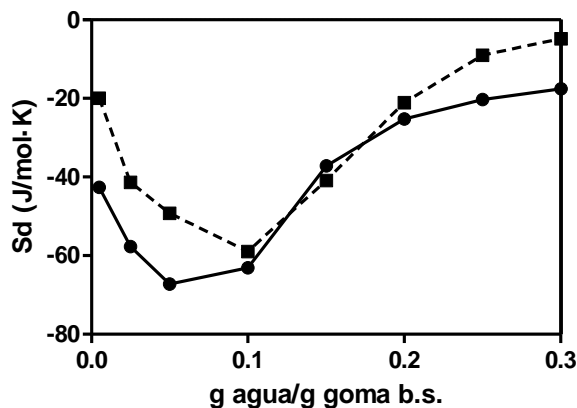
aumenta el calor isostérico de sorción. Esto puede explicarse considerando que la adsorción se produce en sitios de alta energía (altamente polares en la superficie del material). A partir de allí, la energía disminuye conforme disminuyen los sitios disponibles para la sorción de agua y comienzan a prevalecer las interacciones adsorbato – adsorbato (Rosa y col., 2010).



**Figura IV.29** Calor isostérico de sorción de agua obtenida para GAL aplicando el modelo de GAB (línea continua) y GDW (línea punteada).

En estas condiciones, el calor de sorción promedio determinado por GAB fue 25,70 kJ/mol y 19,5 kJ/mol usando GDW, ambos se encuentran dentro del rango de valores informado para otros hidrocoloides (11,7 a 37 kJ/mol) (Rosa y col., 2010).

En la Figura IV.30 se representó la variación de la entropía diferencial con el contenido de agua, calculada utilizando los modelos de GAB y GDW.



**Figura IV.30** Entropía diferencial de sorción de agua obtenida para GAL aplicando el modelo de GAB (línea continua) y GDW (línea punteada).

Utilizando cualquiera de los modelos, se observó un comportamiento similar, fuertemente dependiente del contenido de agua, con un valor mínimo en el rango de 0,05 a 0,1 g agua/g goma b.s.. Esta tendencia también fue observada para otros biopolímeros (Rosa y col., 2010, Torres y col., 2012). De acuerdo con McMinn y Magee, (2003), en este punto, las moléculas de agua tienen menos movilidad debido a que interactúan fuertemente con el sólido, y estarían por lo tanto, menos disponibles para el crecimiento de microorganismos. Al igual que el valor de monocapa de GAB, a menores valores de  $S_d$  mayor sería la estabilidad del sistema (Torres y col., 2012). En este sentido, se verificó que el mínimo valor de  $S_d$  resulta comparable al valor de monocapa,  $m_o$  determinado para GAL (Tabla 7).

#### IV.1.5.5.3 Evaluación de la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ )

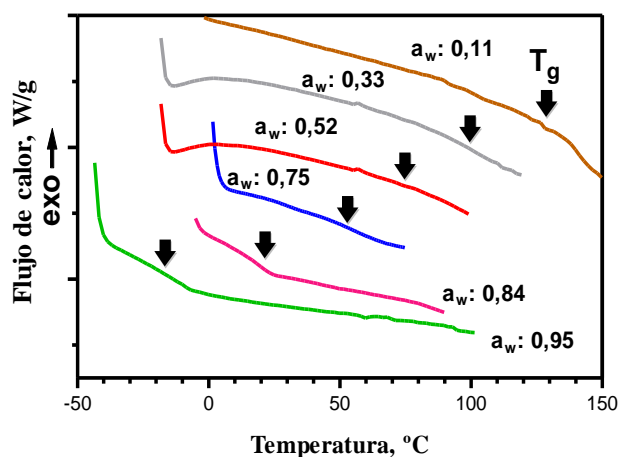
Muchas preparaciones farmacéuticas, alimentos deshidratados, ingredientes, aditivos y productos biológicos, se encuentran en estado de sólido amorfo (vítreo). En este estado los compuestos solubles se encuentran dispuestos en una estructura molecular desordenada (no cristalinos) y presentan una movilidad reducida, donde los cambios físicos y químicos limitados por difusión se encuentran inhibidos (Fennema, 2010, Velázquez-Gutiérrez y col., 2015). Los sólidos amorfos se obtienen en la práctica por inmovilización de las moléculas mediante una rápida separación del agua por congelamiento o deshidratación (liofilización, secado por aspersión, etc.). Los sistemas en estado amorfo presentan una temperatura característica, denominada temperatura de transición vítrea, por encima de la cual, los vidrios empiezan a ablandarse y fluir, permitiendo que los cambios dependientes del tiempo sucedan (Barbosa-Cánovas y col., 2005). La temperatura de transición vítrea depende principalmente del contenido de agua, y de la naturaleza y PM de los componentes del sistema. Es un concepto fundamental en el control de la estabilidad física, química y biológica de materiales o alimentos deshidratados (Slade y col., 1991).

Como se describió en la sección III.3.1.1, el exudado obtenido de *P. alba* se disolvió en agua, se purificó por filtración y luego se deshidrató por liofilización. La goma se encuentra luego de este proceso en estado amorfo y su estabilidad dependerá de la temperatura de transición vítrea del sistema y de las condiciones de almacenamiento (contenido de agua y temperatura). Para comprender mejor los factores que controlan la estabilidad de los materiales o alimentos de baja humedad se ha sugerido analizar de manera conjunta el



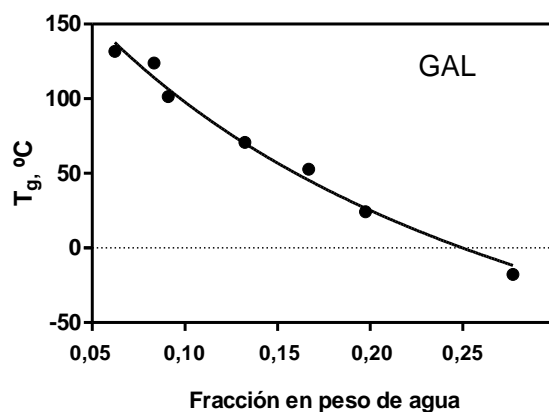
concepto de  $a_w$  y  $T_g$  (Bhandari y col., 1999). En este sentido, fue de interés en esta sección estudiar las transiciones térmicas de GAL por calorimetría diferencial de barrido para poder predecir variables críticas de almacenamiento de la goma a partir de diagramas de estado o mapas de estabilidad  $T_g$ - $a_w$ - $M_e$  (Bazardeh y col., 2014).

En la Figura IV.31 se muestran los termogramas obtenidos por DSC para GAL liofilizada y humidificada a distintas HR. La transición vítrea se observa como un salto en la línea de base, correspondiente al cambio en el flujo de calor debido a que cambia la capacidad calorífica de la muestra al ocurrir la transición. La  $T_g$  no es un valor único sino que ocurre en un rango de temperaturas, en la Figura IV.32 se indica para cada  $a_w$  el inicio de la transición (*onset*) con una flecha sobre la curva. Se observa que la  $T_g$  disminuye al aumentar la  $a_w$  de la goma, evidenciando el efecto plastificante del agua sobre los componentes amorfos del sistema (Syamaladevi y col., 2010).



**Figura IV.31** Termogramas obtenidos para muestras de GAL equilibradas a distintas  $a_w$  (0,11-0,95). Las flechas indican la temperatura de inicio de la transición.

No se observaron transiciones endotérmicas asociadas a la fusión de cristales de hielo incluso a la  $a_w$  más alta ( $a_w=0,95$ ). Esto indica que no se formó hielo durante el enfriamiento en el DSC (previo al calentamiento dinámico), ya sea porque no hay agua libre en el sistema o bien, porque la presencia de la goma previno la cristalización de agua. Resultados similares obtuvieron otros autores trabajando con banana y manzana liofilizadas (Moraga y col., 2011). En la Figura IV.32, se muestran los valores de  $T_g$  determinados para GAL en función del contenido de agua.



**Figura IV.32** Temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) determinada para GAL en función de la fracción en peso de agua. Los símbolos representan los datos experimentales y la línea, el ajuste de Gordon y Taylor.

El efecto plastificante del agua se evaluó ajustando los datos experimentales con la ecuación de Gordon y Taylor (Gordon y col., 1952), la cual considera al sistema compuesto por dos componentes: agua y sólido anhidro. Se consideró un valor de  $T_g$  para el agua pura de  $-135^\circ\text{C}$ .

La ecuación de Gordon y Taylor fue adecuada para describir los datos experimentales ( $R^2=0,986$ ). Del análisis de regresión no lineal, se determinó que el valor de la constante de Gordon y Taylor ( $k_{GT}$ ) fue  $5,12 \pm 0,55$  y la temperatura de transición vítrea del sólido anhidro ( $T_{gs}$ ) fue  $230 \pm 15^\circ\text{C}$ . El parámetro  $k_{GT}$  se relaciona con la curvatura del gráfico de  $T_g$  vs contenido de agua, y se asocia con la fuerza de interacción entre los componentes del sistema (Gordon y col., 1952). La  $k_{GT}$  de GAL fue ligeramente mayor que las reportadas para goma arábica (3,6 – 2,5), gelatina (2,5) y maltodextrina (3,7) (Tonon y col., 2009, Ramoneda y col., 2011), lo cual indicaría que GAL es más susceptible a la plastificación, es decir que pequeñas cantidades de agua producirían una disminución más pronunciada en la  $T_g$  de GAL respecto a los polímeros mencionados.

Por otro lado, la  $T_{gs}$  de GAL fue mayor que la reportada para goma arábica ( $125 \pm 9^\circ\text{C}$ ), gelatina ( $150 \pm 20^\circ\text{C}$ ), maltodextrina ( $108 \pm 18^\circ\text{C}$ ) (Ramoneda y col., 2011) y almidón de mandioca ( $97^\circ\text{C}$ ) (Tonon y col., 2009). Esto tiene implicancias prácticas ya que biopolímeros con elevada  $T_{gs}$  se usan preferentemente para mejorar la estabilidad física de alimentos o ingredientes altamente higroscópicos, mejorando sus atributos de calidad y/o

manipulación durante el almacenamiento (Ramoneda y col., 2011, Mosquera y col., 2012, Vásquez y col., 2013).

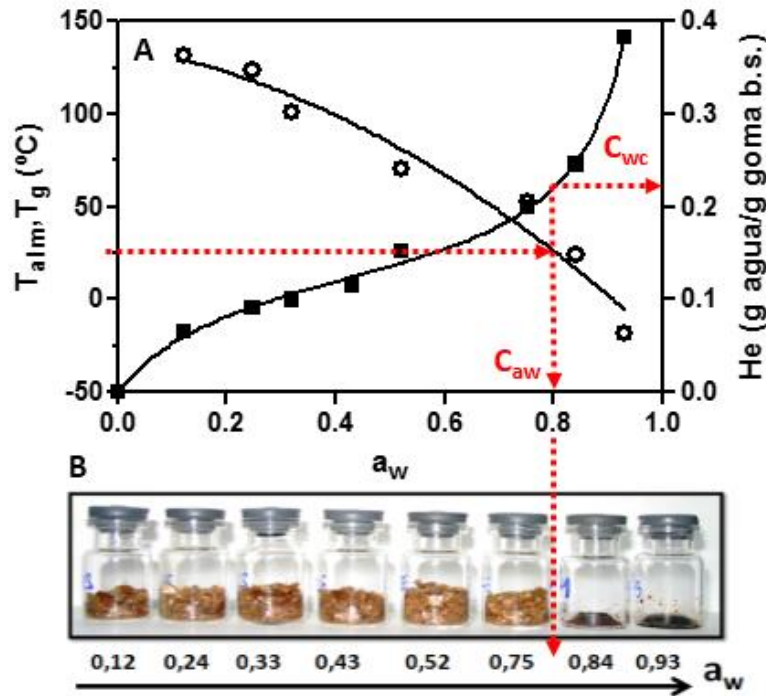
Mosquera y col. (2012) utilizaron GA para aumentar la  $T_g$  de polvo de frutilla liofilizada permitiéndoles reducir la higroscopicidad, y mejorar la estabilidad y manipulación del producto. Tonon y col. (2009) observaron que el uso de maltodextrina y GA como material encapsulante de jugo de açai (*Euterpe oleracea* Mart.) secado por atomización, mejoró las características y estabilidad del polvo. Fabra y col. (2011) demostraron que la incorporación de maltodextrina a pulpa de noni en polvo (*Morinda citrifolia* L.) aumentó la  $T_g$  en el rango de bajas  $a_w$  y se logró así evitar la pegajosidad durante el procesamiento que conducía a problemas operacionales. En todos los casos, el aumento de la  $T_g$  se relacionó con el aumento del PM promedio del sistema debido a la adición de compuestos de alto peso molecular (Tonon y col., 2009, Mosquera y col., 2012).

La elevada  $T_{gs}$  de GAL permite pensar en su uso como ingrediente para estabilizar productos de baja humedad, promoviendo su incorporación en sistemas tales como extractos naturales deshidratados, matrices poliméricas, microencapsulados, etc., en los que la estabilidad depende de mantener el sistema en estado amorfo (Santagapita y col., 2012). El valor de  $T_g$  refleja en gran medida las características físicas y estructurales de los materiales. Velázquez-Gutiérrez y col. (2015) relacionaron la temperatura de transición vítrea con la rigidez y estructura de las cadenas del polímero y encontraron que a mayor  $T_g$ , mayor es la densidad y grado de entrecruzamiento.

Es importante señalar que el concepto de transición vítrea y de actividad de agua son complementarios y tienen sus respectivos límites: la actividad de agua es una propiedad termodinámica relacionada con la disponibilidad del agua en el equilibrio. Los alimentos y materiales biológicos sin embargo, son en su mayoría sistemas heterogéneos que se encuentran fuera del equilibrio, en los cuales la  $T_g$  describe mejor la movilidad relativa del agua entre el estado amorfo y sobresaturado. Por lo tanto se ha tratado de relacionar ambos conceptos en diagramas de estado  $T_g$ - $a_w$ - $H_e$  para poder establecer y unificar así criterios de estabilidad en alimentos (Rahman, 2010, Rahman, 2012). Estos diagramas ayudan a comprender mejor los cambios complejos que ocurren cuando el contenido de agua del producto o la temperatura se modifican. Permiten definir una actividad de agua crítica ( $C_{aw}$ ), a la cual  $T_g$  es menor que la temperatura de almacenamiento y el contenido de agua crítico

( $C_{wc}$ ) correspondiente (Roos y col., 1995). En este sentido, las curvas de  $T_g$  en función de la actividad acuosa y la isoterma de sorción de agua modelada por GAB, se combinaron para evaluar las condiciones de almacenamiento más apropiadas para la goma liofilizada.

En la Figura IV.33 se muestra el diagrama de estado  $T_g$ - $a_w$ -He. Estos diagramas permiten relacionar el estado físico del producto (vítreo o sobresaturado), la interacción del sólido con el agua y predecir temperaturas críticas para conservar el material (Roos y col., 1995).



**Figura IV.33** Relación entre la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) y la curva de sorción de agua modelada por GAB (A). En rojo se indica el contenido de agua crítico ( $C_{wc}$ ) y la actividad de agua crítica ( $C_{aw}$ ) para la estabilidad física de la goma a 25 °C. Aspecto físico de GAL a distintas actividades de agua (B).

La Figura IV.33 puede considerarse como un diagrama de fases en el que se muestran las relaciones entre el estado físico del producto (vítreo/sobresaturado), la interacción del sólido con el agua y la temperatura. Esta herramienta permite predecir las variables críticas a las cuales ocurre la transición vítrea a determinada temperatura (Roos y col., 1995).

A partir de los modelos empleados fue posible determinar tanto el contenido de agua crítico ( $C_{wc}= 0,23$  g agua/g goma b.s.) como la  $a_w$  crítica ( $C_{aw}= 0,82$ ) que aseguran un valor de  $T_g$  de GAL igual a la temperatura de almacenamiento (25 °C), condiciones en las que la goma estaría en estado amorfo. Estos valores fueron coherentes con el colapso que presentó

la goma (Figura IV.33 B) a  $a_w = 0,84$ , condición en la que la  $T_g$  es menor que la temperatura de almacenamiento. Se observó además un oscurecimiento importante de la muestra, pegajosidad, apelmazamiento y pérdida de estructura como consecuencia de la caída abrupta de la viscosidad al ocurrir la transición vítrea (Aguilera y col., 1995).

Tanto el valor de  $a_w$  como el contenido de agua críticos determinados para GAL fueron mayores que los valores determinados para GA por otros autores considerando un almacenamiento a 25 °C. Para GA el colapso de la matriz ocurrió a  $a_w \geq 0,69$  y 0,1 g de agua/g sólido seco (Tonon y col., 2009), lo cual confirma la mayor estabilidad física de GAL.

Estos resultados ponen de manifiesto que las propiedades térmicas y de sorción de GAL son similares a otros hidrocoloides ampliamente utilizados en la industria de los alimentos. Así también, advierten sobre la potencial aplicación de GAL en la estabilización de sustancias higroscópicas o como agente encapsulante de bioactivos al proveerles protección frente a factores ambientales de deterioro, en específico temperatura y humedad.

## **IV.2 Aprovechamiento de GAL como material de pared para encapsular ácidos grasos poliinsaturados por gelación iónica**

La encapsulación de AGPI se ha propuesto como una estrategia para reducir y/o postergar los fenómenos oxidativos permitiendo así la obtención de ingredientes estables, útiles en la formulación de alimentos de alto valor nutricional (Polavarapu y col., 2011, Calvo y col., 2012, Gallardo y col., 2013). Con esta finalidad, se propusieron distintos métodos de encapsulación, identificándose en cada uno limitaciones y ventajas potenciales (Augustin y col., 2010).

En este trabajo, se propuso evaluar la encapsulación de AGPI por gelación iónica. Este método ha sido ampliamente utilizado con múltiples propósitos: para la protección de fármacos (Pongjanyakul y col., 2007, Nayak y col., 2012), antioxidantes (Deladino y col., 2008, Córdoba y col., 2013), vitaminas (Puguan y col., 2014) y enzimas (Santagapita y col., 2012), entre otros. Sin embargo, su uso para la protección de AGPI ha sido menos estudiado (Peniche y col., 2004, Chan, 2011). Probablemente, las características de las cápsulas obtenidas por este método (porosidad, erosión, permeabilidad, etc.) limitan su utilización para la protección de sustancias sensibles a la oxidación. Para resolver estos inconvenientes, distintos autores propusieron el uso de matrices compuestas (alginato, gomas, almidones, etc.) y estructuras en multicapa (quitosano, proteínas, etc.) (Pongjanyakul y col., 2007, Córdoba y col., 2013, Wang y col., 2013). En este sentido, resultó de especial interés evaluar el comportamiento de GAL como excipiente para mejorar las propiedades fisicoquímicas y la estabilidad de encapsulados conteniendo aceite de pescado. Las propiedades funcionales de GAL, evaluadas en las secciones previas, contribuyen a considerar la potencialidad de este excipiente innovador como componente de la matriz encapsulante.

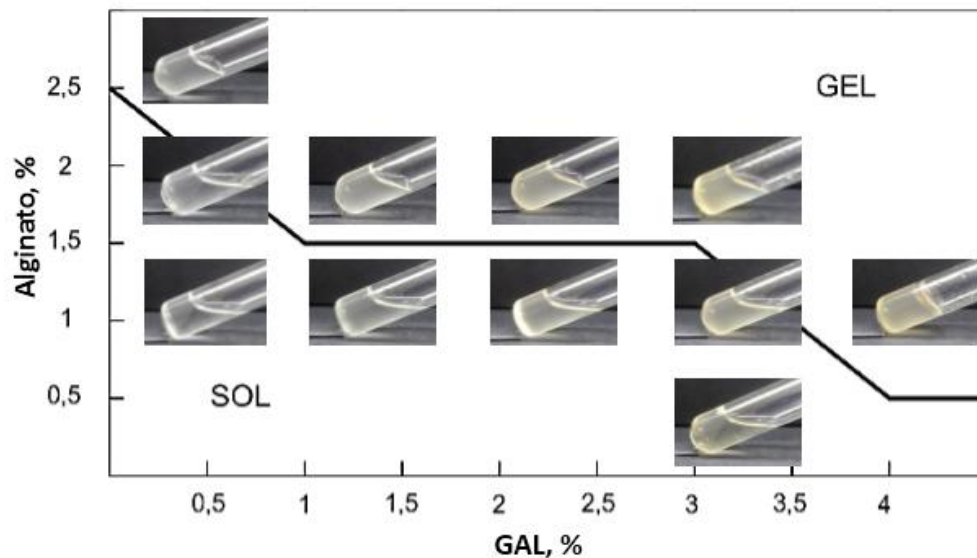
En esta sección se estudió en primer lugar el efecto de la concentración de GAL y de alginato sobre el proceso de gelificación iónica y la estabilidad de las emulsiones formuladas con estos polielectrolitos y aceite de pescado. Se evaluó además el uso de quitosano como cubierta externa y distintos métodos de secado de las cápsulas (liofilización o vacío). Una vez seleccionada la composición y tipo de secado, se estudió el efecto de GAL como componente de material de pared sobre las características físicas y estructurales de las cápsulas deshidratadas y sobre la retención y estabilidad del aceite.

#### IV.2.1 Estudio de las interacciones GAL-alginato mediante diagramas de fases SOL-GEL

El estudio de mezclas de polisacáridos y sus interacciones ha sido de gran interés en los últimos años (Yang y col., 2015). La combinación de polisacáridos de distinta naturaleza, en distintas proporciones y concentraciones, amplía la funcionalidad de las mezclas y sus posibilidades de uso. Al igual que otros polisacáridos naturales, el alginato se utiliza en combinación con otros polímeros compatibles como goma xántica, goma arábiga, proteínas de suero de quesería y almidón, entre otros (Pongjanyakul y col., 2007, Nayak y col., 2012, Córdoba y col., 2013, Wichchukit y col., 2013). Las mezclas así obtenidas presentan propiedades de ambos ingredientes, y con frecuencia, características mejores que las de sus componentes individuales (Rehm, 2009).

Ensayos exploratorios mostraron que suspensiones de alginato y GAL gelifican con gran facilidad incluso a bajas concentraciones de ambos biopolímeros. La formación de un gel, dificultaría las etapas posteriores de emulsificación del compuesto activo (aceite de pescado) y de transporte a través del sistema de goteo, limitando las posibilidades de formulación al rango de concentraciones en que la suspensión de alginato-GAL se conserve fluida (no gelifique). Con el fin de identificar las condiciones en que las suspensiones de alginato y GAL resultan adecuadas para emulsionar el aceite (que será luego encapsulado por gelación iónica), se obtuvieron diagramas de fases sol-gel para el sistema alginato-GAL. Esta herramienta, permite identificar rápidamente las regiones (concentraciones relativas de ambos biopolímeros) para las cuales el sistema se mantiene en suspensión y aquellas en las que tiene lugar la formación de geles más o menos firmes (Correa, 2003).

En la Figura IV.34 se muestra el diagrama de fases sol-gel obtenido para el sistema alginato-GAL. Las mezclas de GAL y alginato no presentaron separación macroscópica de fases a ninguna de las concentraciones estudiadas, lo cual indica una buena miscibilidad entre los polímeros. Se observó que concentraciones de alginato mayores al 2% p/v condujeron a la formación de un gel fuerte aún a concentraciones bajas de goma (0,5 %). La adición de concentraciones mayores de GAL redujo la cantidad mínima de alginato necesaria para gelificar.



**Figura IV.34** Diagrama de fases sol-gel para el sistema binario alginato-GAL, sin agregado de  $\text{CaCl}_2$ . La observación se realizó luego de 24 h a  $25^\circ\text{C}$ .

Los sistemas conteniendo 1% p/v de alginato y concentraciones de GAL mayores al 2%, mostraron un aumento marcado de la viscosidad y formaron un gel rígido a concentraciones de goma del 4%. El efecto gelificante de la goma podría estar relacionado con una disminución del pH del medio. Sin embargo, la formación de geles ácidos de alginato requiere valores de pH por debajo del  $\text{pK}_a$  de los ácidos manurónico ( $\text{pK}_a \approx 3.38$ ) y glucurónico ( $\text{pK}_a \approx 3.65$ ), condiciones en las que se favorecen las interacciones electrostáticas soluto-soluto (Rehm, 2009). Sabiendo que las soluciones de GAL al 5% p/v tienen un pH de  $4,81 \pm 0,01$  (Tabla 1), se descarta este efecto a las concentraciones estudiadas. Probablemente, la mayor concentración de GAL favorece la gelificación debido al aporte de iones ( $\text{Ca}^{2+}$ ) naturalmente presentes en el exudado (Tabla 1). De acuerdo con BeMiller y Huber (2007), bajas concentraciones de calcio aumentan significativamente la viscosidad de suspensiones de alginato. La formación del gel también podría estar favorecida en presencia de la goma por interacciones directas entre los polielectrolitos (GAL-alginato). De acuerdo con Pongjanyakul y Puttipipatkachorn (2007), en presencia de una goma, las moléculas de alginato podrían formar enlaces intermoleculares por interacción de los grupos carboxilo e hidroxilo de los polímeros, resultando en un incremento de la viscosidad. En este sentido, los grupos cargados positivamente en GAL (aminoácidos) podrían interactuar con



grupos  $\text{COO}^-$  del alginato, estableciendo zonas de unión por interacciones electrostáticas y conduciendo a la consolidación de estructuras tridimensionales (Yang y col., 2015).

El análisis del diagrama de fases (Figura IV.34) permitió concluir que la mezcla GAL-alginato presenta un rango acotado de concentraciones (alginato 0,5 - 1% y GAL 0,5 - 3%) para las cuales la mezcla de hidrocoloides tiene una fluidez adecuada para preparar emulsiones conteniendo el activo de interés (aceite de pescado) y para su posterior transporte a través del sistema de inyección o goteo empleado en la generación de cápsulas.

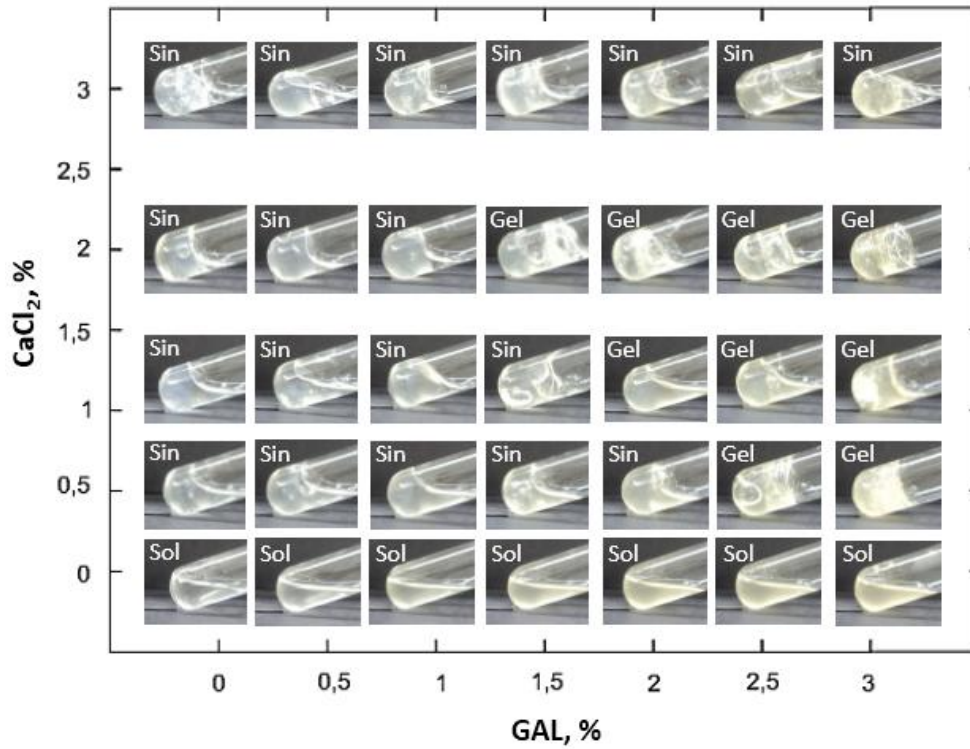
Además de conocer las combinaciones de GAL y alginato adecuadas para generar la emulsión, en la etapa de encapsulación es indispensable conocer las concentraciones relativas de alginato, GAL y  $\text{CaCl}_2$  en las que el sistema gelifica.

Si bien bajas concentraciones de alginato admiten una mayor proporción de GAL sin que ocurra gelificación (Figura IV.34), se sabe que un contenido de alginato menor al 1% conduce a la formación de geles débiles e inestables durante la gelación en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (Rehm, 2009).

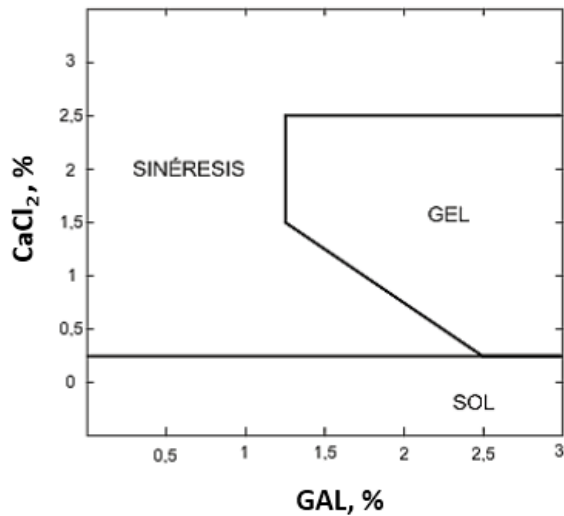
Para evaluar la influencia de GAL en el proceso de gelación iónica, se construyó el diagrama de fases que se muestra en la Figura IV.35. La concentración de alginato se mantuvo constante (1% p/v) y se variaron las proporciones de GAL y  $\text{CaCl}_2$ . Esta concentración de alginato se seleccionó por ser la máxima concentración que permite evaluar distintas proporciones de GAL sin que ocurra gelificación espontánea. Estos diagramas permiten determinar las condiciones en las que ocurre la formación del gel en forma instantánea, condición requerida para la generación de cápsulas por goteo. Las mezclas se realizaron de acuerdo con un diseño de red simple siguiendo la metodología propuesta por Correa (2003). El diagrama de fases obtenido (Figura IV.35) permite además identificar las regiones donde los sistemas permanecen en suspensión (no forman gel), o bien donde se produce la sinéresis (Mestdagh y col., 1999). Para facilitar su comprensión, el diagrama puede esquematizarse como se muestra en la Figura IV.36.

En el diagrama (Figura IV.35) se observa que concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  iguales o superiores a 0,5% p/v fueron suficientes para inducir la gelificación de las suspensiones de alginato y GAL. A bajas concentraciones de GAL, los geles presentaron sinéresis. Este fenómeno se evidenció por la presencia de líquido en la superficie del gel, lo cual indica que

la gelificación no fue completa, o bien que las interacciones GAL-alginato- $\text{Ca}^{2+}$  conducen a la formación de una estructura compacta, rígida, con poca capacidad de retención agua.



**Figura IV.35** Diagrama de fases obtenido para sistemas conteniendo alginato (1 p/v) y distintas proporciones de GAL y  $\text{CaCl}_2$ , inmediatamente después de la preparación. Se indica en cada caso si se trata de una suspensión (sol) o de un gel, y si se produce sinéresis (Sin).

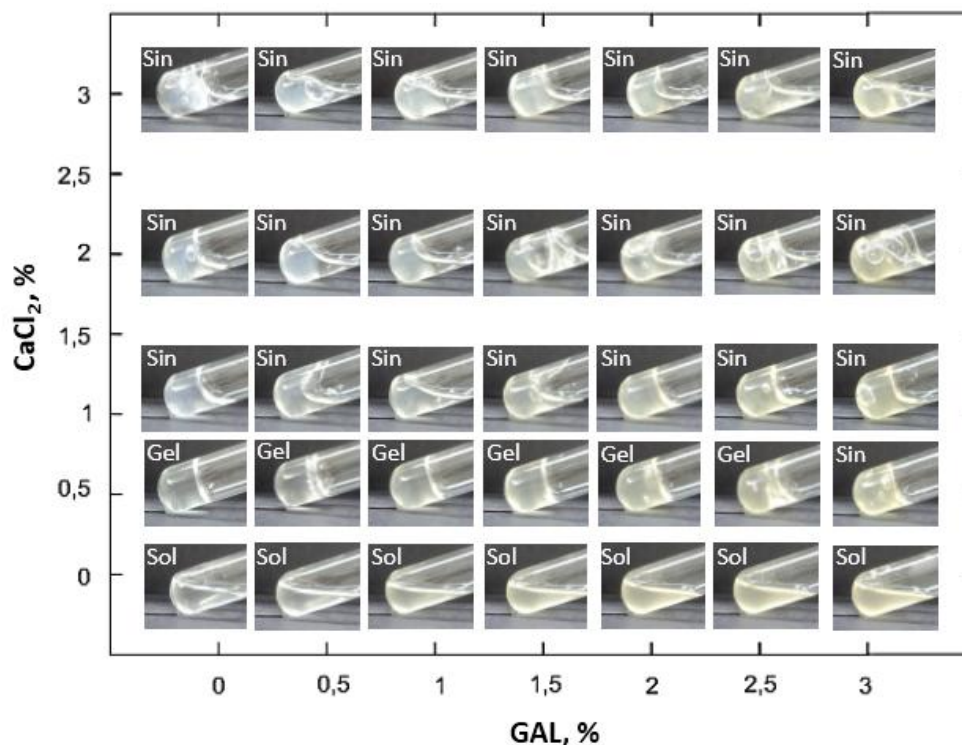


**Figura IV.36** Diagrama de fases esquematizado para sistemas ternarios alginato-GAL y  $\text{CaCl}_2$ .

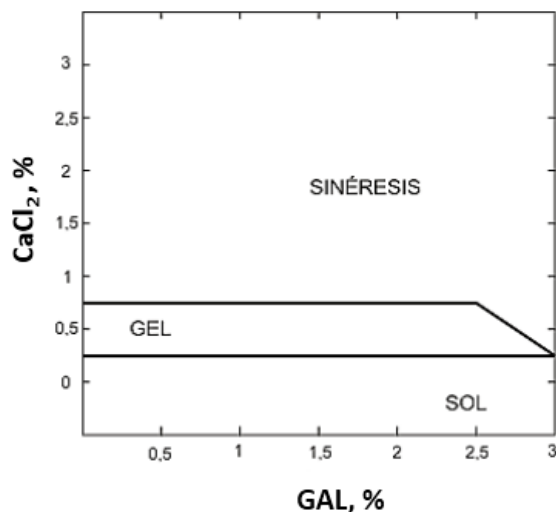
Numerosos factores explican el fenómeno de sinéresis. La longitud y distribución de bloques-M y bloques-G en la estructura del alginato (ver sección I.3.3.1), así como la concentración del agente de entrecruzamiento, serían los más importantes (Rehm, 2009). En el proceso de encapsulación, la sinéresis implicaría la expulsión de la fase acuosa conteniendo el activo (emulsión) lo cual conduciría a una menor eficiencia en el atrapamiento de aceite durante la encapsulación.

Por otro lado, se observó que al aumentar la concentración de GAL, la formación de un gel requirió menores concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  sin evidenciar sinéresis, siempre que la concentración de calcio fuera menor que 2,5%. En la región Gel, el agua estaría físicamente atrapada en la red polimérica. GAL podría actuar obstaculizando la estructuración del gel, reduciendo así los fenómenos de contracción, evitando la sinéresis y conservando la capacidad de retención de la fase acuosa de la matriz mixta.

Luego de 24 h a temperatura ambiente (Figura IV.37 y Figura IV.38), los sistemas mostraron cambios físicos evidentes.



**Figura IV.37** Diagrama de fases obtenido para sistemas conteniendo alginato (1 p/v) y distintas proporciones de GAL y  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , luego de 24 h de almacenamiento a 25 °C. Se indica en cada caso si se trata de una suspensión (sol) o de un gel, y si se produce sinéresis (Sin).



**Figura IV.38** Diagrama de fases esquematizado para el sistema alginato-GAL- $\text{CaCl}_2$  observado a las 24 h.

Los geles presentaron sinéresis en gran parte de las combinaciones GAL- $\text{CaCl}_2$  estudiadas. Sólo unas pocas mezclas ( $\text{CaCl}_2$  0,5% y GAL 0 a 2,5% p/v) formaron geles estables. A mayor concentración de GAL (3% p/v), se produjo sinéresis probablemente debido al aporte adicional de calcio presente en la goma.

Los cambios observados luego del almacenamiento se relacionaron con una reorganización de las cadenas de los polisacáridos debido a modificaciones en las interacciones moleculares que llevan a la desestabilización del gel (Rehm, 2009). Los rangos de concentración en los que se verificó la gelificación y la sinéresis de las suspensiones de alginato (1% p/v) se correspondieron con los resultados obtenidos previamente por Correa (2003).

La construcción de los diagramas de fases permitió definir las concentraciones de polielectrolitos (GAL y alginato) y del agente de entrecruzamiento ( $\text{CaCl}_2$ ) más adecuadas para la preparación de cápsulas por gelación iónica externa, como así también conocer el comportamiento de GAL en la matriz mixta. A partir de los resultados obtenidos se consideró que el sistema conteniendo alginato (1% p/v) y GAL (2% p/v) conduce a suspensiones con buenas características de flujo, aptas para las etapas posteriores de emulsión y goteo. Por otro lado, se determinó que soluciones de  $\text{CaCl}_2$  al 2% p/v fueron suficientes para inducir la formación inmediata de geles con máxima capacidad de retención de agua, lo cual permitiría un atrapamiento eficiente del activo.

### **IV.2.2 Estabilidad de emulsiones GAL-alginato**

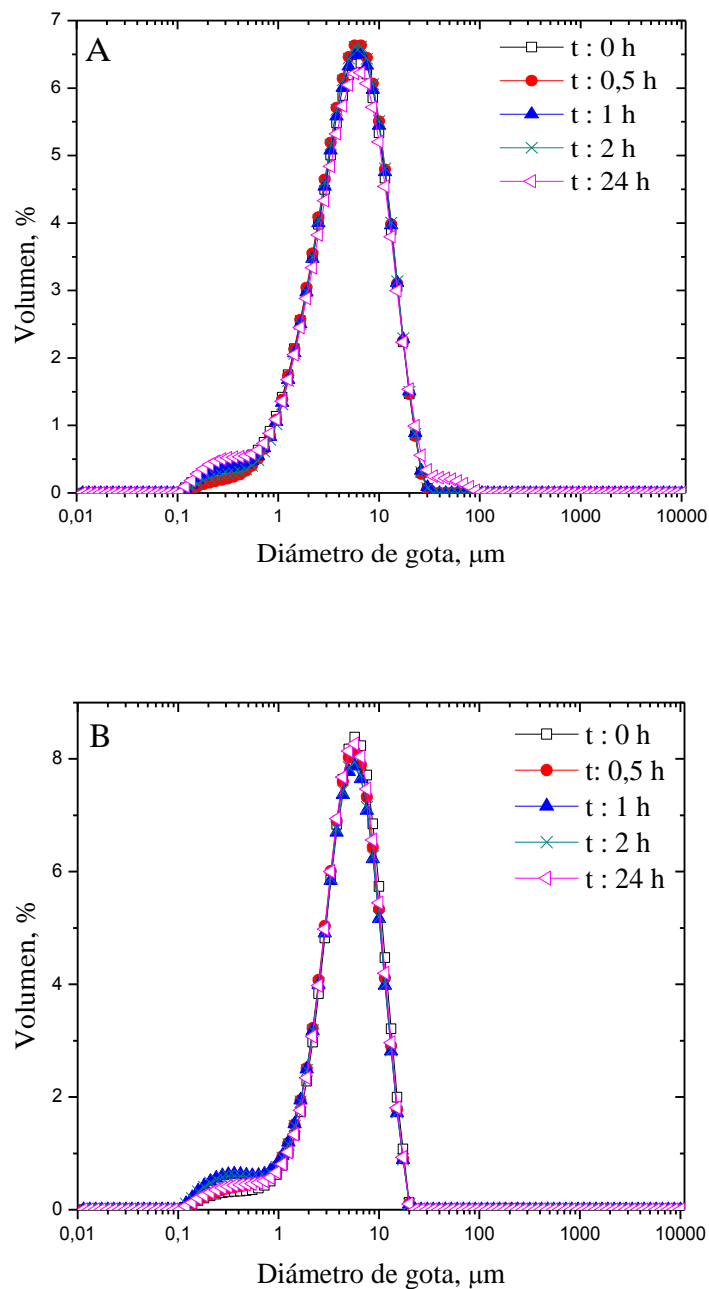
La mayoría de las técnicas industriales empleadas para la encapsulación y microencapsulación de aceites ricos en AGPI, requieren en primera instancia la preparación de una emulsión del aceite en una suspensión acuosa de los materiales encapsulantes (Chan, 2011). Durante la formación de la emulsión, la matriz recubre al compuesto activo formando una estructura definida en la interfase aceite/agua, que posteriormente, por deshidratación conduce a la formación de partículas sólidas multifásicas (Drusch y col., 2009).

En particular, la encapsulación de aceite de pescado por gelación iónica externa requiere, como paso previo a la generación de cápsulas, la dispersión del activo lipofílico en la suspensión acuosa conteniendo los materiales de pared (alginato y GAL).

Habiéndose definido la composición de la fase dispersante (GAL 2% p/v y alginato 1% p/v) a partir de los diagramas de fases, resultó de interés estudiar las características de la emulsión formada en presencia del aceite y en especial, el efecto de la incorporación de GAL sobre la distribución de tamaño de gota y estabilidad de la emulsión. Estos datos son de interés ya que tendrán impacto sobre la estabilidad del compuesto activo en los sistemas encapsulados.

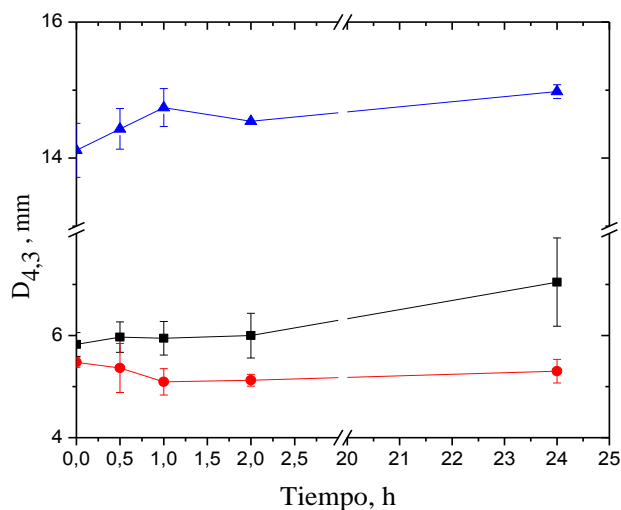
En la Figura IV.39 se muestra la distribución de tamaño de gota por volumen de emulsiones conteniendo 10% de aceite de pescado y estabilizadas con alginato (Figura IV.39 A) y alginato-GAL (Figura IV.39 B), inmediatamente después de la preparación y durante el almacenamiento a 25 °C.

Ambas emulsiones presentaron inicialmente una distribución bimodal de tamaños de gota con un pico principal centrado en 7  $\mu\text{m}$  y uno secundario centrado en 0,3  $\mu\text{m}$ . Durante el almacenamiento no se observaron cambios apreciables en las distribuciones, excepto para la emulsión estabilizada sólo con alginato (Figura IV.39 A), que a las 24 h evidenció la aparición de un tercer pico centrado en 50  $\mu\text{m}$  que indicaría la formación de gotas de mayor tamaño, y por lo tanto una mayor tendencia a la desestabilización.



**Figura IV.39** Curvas de distribución de tamaño de gotas por volumen de emulsiones de aceite de pescado estabilizadas con 1% de alginato (A) y 1% de alginato + 2% de goma exudada de *Prosopis alba* (B) luego de la preparación ( $\square$ ) y durante el almacenamiento a  $25^\circ\text{C}$  a 0,5 h ( $\bullet$ ), 1 h ( $\blacktriangle$ ), 2 h ( $*$ ) y 24 h ( $\blacktriangledown$ ).

En forma complementaria, se monitoreó el cambio en el tamaño de gota de la emulsión por medio del diámetro de De Broucker o  $D_{4,3}$  en función del tiempo por ser éste un indicador más sensible para evaluar los procesos de desestabilización (Galazka y col., 1996, Relkin y col., 2005). En la Figura IV.40 se muestran los valores del diámetro  $D_{4,3}$  calculado a partir de las distribuciones de tamaño de gota para emulsiones estabilizadas con GAL, alginato y alginato-GAL durante el almacenamiento a 25°C. Se incluyó además con fines comparativos, la variación del  $D_{4,3}$  de emulsiones (10% de aceite) estabilizadas sólo con GAL (2% p/v), analizada previamente en el estudio de las propiedades emulsionantes de la goma (Ver sección IV.1.5.3.4).



**Figura IV.40** Diámetro  $D_{4,3}$  calculado a partir de las distribuciones de tamaño para emulsiones estabilizadas con 2% de GAL (▲), 1 % de alginato (■) y 1% de alginato + 2% de GAL (●), durante el almacenamiento a 25°C.

La evolución de los diámetros  $D_{4,3}$  evidenció claras diferencias entre los sistemas en estudio. En comparación con la emulsión estabilizada sólo con GAL, las emulsiones que contenían alginato condujeron a menores  $D_{4,3}$ . Sabiendo que es mínima la actividad superficial del alginato, la reducción observada en el tamaño de gota puede atribuirse principalmente al efecto viscosante de este biopolímero sobre la fase dispersante. El aumento de viscosidad retardaría además el acercamiento, aglomeración y aumento de tamaño de las gotas en la emulsión (Dickinson, 2009, Chan, 2011). Para la emulsión estabilizada con ambos biopolímeros se observó que los valores de  $D_{4,3}$  fueron aún menores que la emulsión preparada sólo con alginato. Esto implica considerar un efecto sinérgico dado por la mayor

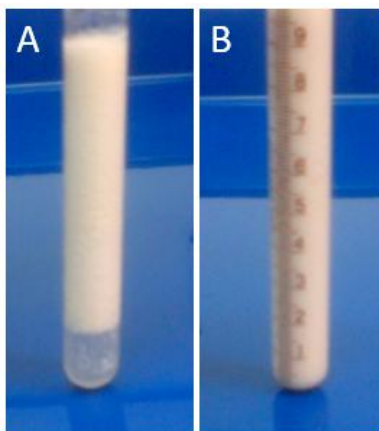
viscosidad debido a la presencia del alginato y a las buenas propiedades emulsionantes de GAL (sección IV.1.5.3). Se observó además, que el diámetro  $D_{4,3}$  para la emulsión preparada con alginato y GAL se mantuvo prácticamente constante durante el período de tiempo estudiado, evidenciando que la emulsión mixta es más estable (Fioramonti y col., 2015) respecto de los otros sistemas.

Para entender mejor la mayor estabilidad de las emulsiones de alginato-GAL, se determinó el potencial Z de las emulsiones preparadas con alginato (A) y con alginato y goma (A-GAL). En ambos casos los valores del potencial Z fueron menores que  $-30$  mV, indicando que la distribución de cargas es suficiente para superar las interacciones atractivas gota-gota y contribuir a la estabilización de las emulsiones (Guzey y col., 2007). El potencial Z de la muestra con A ( $-89,3 \pm 1,83$  mV) fue menor que en las muestras preparadas con A-GAL ( $-79,1 \pm 0,14$  mV). La reducción en la carga neta de la emulsión conteniendo GAL podría atribuirse a un efecto de compensación entre los grupos con carga negativa del alginato y grupos con cargas positivas de restos proteicos presentes en GAL (Jones y col., 2011, Fioramonti y col., 2015). Estas observaciones son válidas considerando que el pH de suspensiones A-GAL (pH=5,2) es mayor que el pH necesario para neutralizar las cargas del alginato (pKa=3,5), lo cual indica la existencia de cargas negativas en A y cargas positivas y negativas en GAL, con predominio de éstas últimas (potencial Z de emulsiones GAL 2% =  $-43,5 \pm 0,79$  mV). Como consecuencia, la limitada interacción entre los polímeros en estas condiciones, implica considerar que el alginato no se adsorbe sobre el film interfacial de GAL, permaneciendo en suspensión, aumentando así la viscosidad de la fase dispersante.

En las emulsiones estudiadas se analizó también la tendencia a la separación de fases o cremado luego de 24 h de su preparación. Si bien no se observó la formación de una capa concentrada en la superficie de ninguna de las emulsiones estudiadas ni separación de aceite, la emulsión que contenía sólo alginato, condujo a la separación de una capa diluida (ligeramente opalescente) en la base del recipiente (Figura IV.41). Este fenómeno podría estar asociado a la aparición de fuerzas de depleción debidas a la presencia de alginato en la fase dispersante. Dickinson (2009), estableció que la presencia de ciertos hidrocoloides a bajas concentraciones ejerce un efecto desestabilizante sobre la emulsión al promover la floculación inducida por depleción, donde prevalecen las fuerzas de interacción que promueven la aproximación entre las gotas y la separación de suero, o emulsión diluida. En



las emulsiones con GAL, este fenómeno no se observó lo cual indicaría que la goma reduce las fuerzas de depleción, contribuyendo así a la mayor estabilidad de la emulsión.



**Figura IV.41** Aspecto de emulsiones de 10% p/v de aceite de pescado estabilizadas con alginato 1% p/v (A) y alginato 1% p/v, GAL 2% p/v (B), luego del almacenamiento 24 h a 25°C.

En resumen, a partir de los estudios realizados se concluye que la incorporación de GAL favorece la formación de emulsiones con gotas más pequeñas, que se mantienen estables luego de 24 h a temperatura ambiente, confirmando las propiedades emulsionantes y estabilizantes de GAL en la mezcla. Este tiempo resulta suficiente para garantizar la estabilidad de las emulsiones utilizadas durante el proceso de gelación iónica. De acuerdo con el método de preparación utilizado, el tiempo que toma el goteo de 10 g de emulsión sobre la solución de  $\text{Ca}^{2+}$  para generar los encapsulados es menor a 30 min.

### IV.2.3 Obtención y caracterización de los sistemas encapsulados

Las cápsulas obtenidas por gelificación iónica son generalmente grandes (2–5 mm) (Mofidi y col., 2000), insolubles en medios acuosos (Rehm, 2009) y de estructura muy porosa (Peniche y col., 2004, Gal y col., 2007, Nayak y col., 2012). La porosidad de la matriz es un aspecto importante a considerar ya que puede afectar en gran medida la retención del compuesto activo, y su estabilidad especialmente cuando se trata de compuestos que se oxidan fácilmente en presencia de oxígeno. En este sentido, se han estudiado distintas estrategias de preparación y formulación para generar matrices de estructuras variadas (Drusch y col., 2009), las cuales inciden directamente sobre diversas propiedades

fisicoquímicas y funcionales de las cápsulas tales como carga, porosidad, estabilidad y liberación en condiciones gastrointestinales (Li y col., 2011).

En esta sección se estudió el efecto de GAL, como componente del material de pared, y de quitosano, como cubierta externa, sobre las características físicas y estructurales de cápsulas de alginato deshidratadas, y sobre la retención y estabilidad del aceite de pescado.

Para ello se puso a punto y se estandarizó el método de generación de cápsulas (según se detalla la sección III.5) para obtener un tamaño homogéneo y consistencia adecuada. Brevemente, las emulsiones de alginato o alginato-GAL conteniendo aceite se hicieron gotear sobre una solución de  $\text{CaCl}_2$ . En algunos sistemas, las capsulas formadas se introdujeron en una solución de quitosano para promover la adsorción electrostática de este biopolímero sobre la cápsula. El quitosano ha sido usado para aumentar la estabilidad de las cápsulas de alginato, así como para minimizar la pérdida del material encapsulado y controlar su liberación (Peniche y col., 2004, Garti y col., 2012).

Las cápsulas de alginato y alginato-GAL, con y sin recubrimiento de quitosano, presentaron luego de la preparación un aspecto blanquecino y opaco, similar al que presentaba la emulsión, previo al proceso de gelificación (Figura IV.41). Estas características también fueron observadas por Li y col. (2011) para cápsulas de alginato y quitosano conteniendo triglicéridos de cadena media, quienes atribuyeron el aspecto “lechoso” a la distribución uniforme de las gotas de aceite en los encapsulados.



**Figura IV.42** Cápsulas de aceite de pescado obtenidas por gelación iónica en matrices de alginato y GAL, recubiertas con quitosano.

En estas condiciones, las cápsulas húmedas o hidrogeles, presentan un alto contenido de agua, lo cual reduce la estabilidad del aceite encapsulado. La deshidratación de las cápsulas mejora su conservación (Drusch y col., 2006b). La eliminación de agua, conduce a la formación de una matriz amorfa donde la movilidad está reducida, al igual que las reacciones de deterioro, lográndose por tanto una mayor estabilidad (Zuidam y col., 2010). A su vez, disponer del aceite en estado sólido facilita la manipulación y el transporte, así como la incorporación y dosificación en formulaciones alimentarias (Zuidam y col., 2010, Gaonkar y col., 2014). En este sentido, fue de interés en este trabajo estudiar la estabilidad del aceite en sistemas deshidratados. Para minimizar el deterioro oxidativo del aceite encapsulado durante la remoción de agua, se evaluaron dos métodos de secado: liofilización y secado en estufa de vacío a 30 °C.

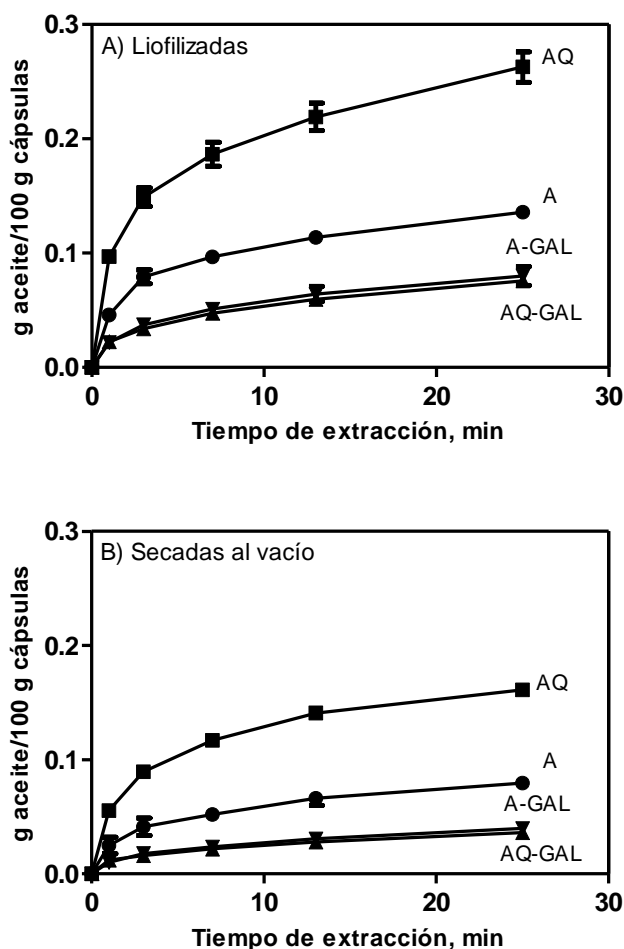
La influencia de la incorporación de GAL y del método de secado, se estudiaron en relación a las características físicas de las cápsulas y capacidad de protección del aceite.

### ***IV.2.3.1 Efecto de la composición y tipo de secado***

#### ***IV.2.3.1.1 Extracción acelerada con solvente***

El estudio de los perfiles de extracción con solvente permite conocer las características de porosidad y posibles interacciones activo/material de pared (Correa, 2003).

En la Figura IV.43 se muestra el efecto conjunto de la composición y del método de secado de los encapsulados sobre los perfiles de extracción de aceite en hexano en función del tiempo de agitación. La cantidad de aceite extraíble, expresado como g de aceite extraído/100 g de cápsulas, siguió una tendencia similar en todos los sistemas, aumentando de manera marcada al comienzo de la extracción antes de estabilizarse alcanzando un plateau. Este comportamiento fue observado también por Chan (2011) para cápsulas de alginato-Ca<sup>2+</sup> conteniendo aceite de palma. Tanto el método de secado como la composición, afectaron significativamente la difusión de aceite desde el interior de las cápsulas hacia la superficie, lo cual puede atribuirse a las características estructurales de los encapsulados (Chan, 2011, Puguan y col., 2014).



**Figura IV.43** Perfiles de extracción de aceite con solvente en condiciones aceleradas de cápsulas liofilizadas (A) y secadas al vacío (B). Alginato (A), Alginato-quitosano (AQ), alginato-goma (A-GAL), alginato-quitosano-goma (AQ-GAL).

Independientemente de la composición, las cápsulas secadas en estufa de vacío presentaron una mayor capacidad para retener el aceite (0,02 a 0,15 g aceite/100 g cápsulas) que las cápsulas liofilizadas (0,06 a 0,27 g aceite/100 g cápsulas). El perfil de extracción de aceite puede relacionarse con las características microestructurales de las cápsulas, las cuales dependen en gran medida del método de secado (Smrdel y col., 2008, Chan, 2011). La menor permeabilidad de los sistemas secados al vacío podría atribuirse por un lado, a la formación de una corteza densa debida al arrastre de solutos por difusión de agua desde la estructura interna hasta la superficie de las cápsulas (Smrdel y col., 2008). Por otro lado, en los sistemas que contienen GAL, los azúcares de bajo peso molecular presentes en la goma podrían

rellenar cavidades en la red polimérica favoreciendo la formación de una matriz densa durante el secado. Botrel y col. (2014), observaron una mayor capacidad de retención en cápsulas de WPI obtenidas por atomización, cuando introdujeron sustancias de menor PM como maltodextrina e inulina en la matriz. La menor permeabilidad en los sistemas secados al vacío tendría la ventaja no sólo de favorecer la retención del compuesto activo sino también de disminuir la permeabilidad al oxígeno mejorando la estabilidad oxidativa del aceite.

Las cápsulas liofilizadas presentaron menor capacidad para retener el aceite que las secadas al vacío (Figura IV.43 A), probablemente debido a las características microestructurales propias de los productos obtenidos por este método de secado. La sublimación de los cristales de agua de la matriz conduce a la formación de poros y cavidades internas interconectadas y menor contracción estructural (Smrdel y col., 2008, Chan, 2011). Correa (2003) comparó la estructura de cápsulas de polielectrolitos secadas por liofilización con esponjas en alusión a su matriz altamente porosa. Por lo tanto, una estructura porosa y permeable aumenta la cantidad de aceite extraído al inicio, así como en el equilibrio (Figura IV.43 A). En cápsulas liofilizadas, el solvente puede penetrar profundamente facilitando la extracción de aceite (Chan, 2011). Una estructura con estas características supone al mismo tiempo, una mayor difusión del oxígeno lo cual reduciría la estabilidad del activo encapsulado. De acuerdo con los estudios de Deladino y col. (2008) sobre encapsulación de extractos de yerba mate en cápsulas de alginato, se concluye que la liofilización no sería un método de secado adecuado cuando se pretende estabilizar compuestos oxidables.

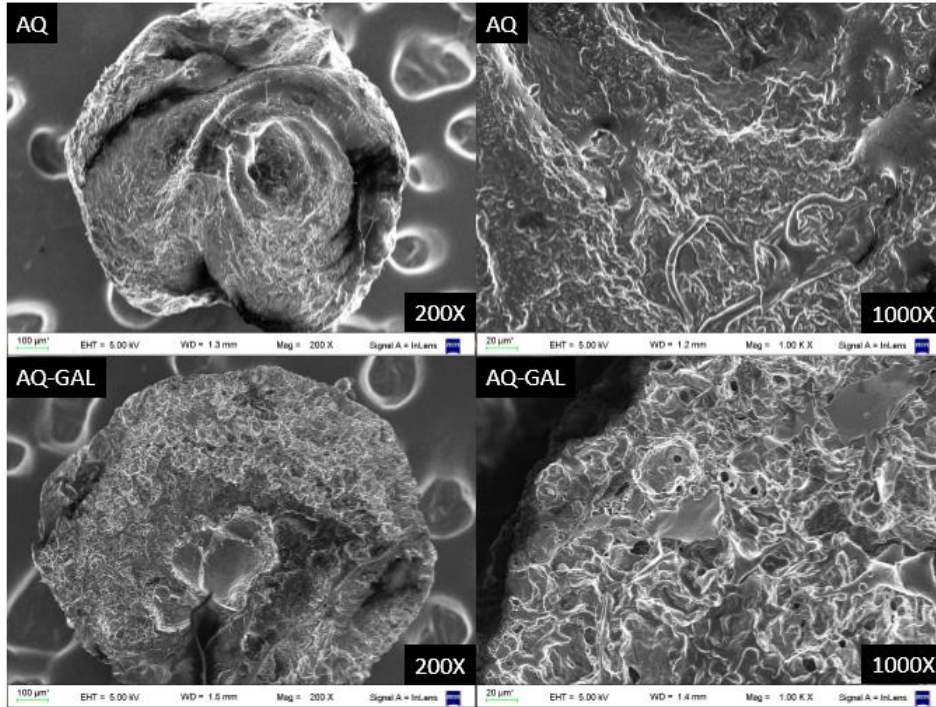
El recubrimiento con quitosano se ha propuesto como una estrategia para aumentar la densidad y entrecruzamiento de los polímeros en la superficie de la cápsula y limitar así la difusión del activo (Peniche y col., 2004, Garti y col., 2012). Sin embargo en las Figura IV.43 A y B, se observa que en presencia de quitosano la capacidad de retención de aceite fue menor especialmente en cápsulas sin goma (AQ), tanto en sistemas liofilizados como secados al vacío. La adsorción de quitosano sobre la superficie de las cápsulas depende de la disponibilidad de cargas negativas del alginato (Li y col., 2007). En condiciones de pH adecuado, el quitosano ( $pK_a \approx 6,5$ ) presenta grupos  $NH_3^+$  capaces de interactuar con los grupos  $COO^-$  del alginato remanentes de la formación de complejos carboxilato de calcio. Por lo tanto, las interacciones alginato-quitosano conducirían a una estructura en la que prevalecen las interacciones entre los polímeros produciéndose la liberación del aceite.

La incorporación de GAL condujo a una mayor retención de aceite en las cápsulas de alginato, con o sin cubierta de quitosano (los perfiles de extracción de aceite fueron similares para A-GAL y para AQ-GAL). De acuerdo con Pongjanyakul y col. (2007) el agregado de gomas en la matriz de alginato, podría aumentar la tortuosidad del material encapsulante limitando la difusión del activo. La goma podría además actuar obstaculizando la interacción alginato-quitosano. Este efecto hace posible la adsorción de quitosano como una barrera de protección adicional, resultando su incorporación útil desde varios puntos de vista. Por un lado, una cubierta de quitosano prevé su funcionalidad antimicrobiana (Arancibia y col., 2015, Ma y col., 2016), junto con otras propiedades deseables tales como biocompatibilidad y biodegradabilidad (Çetinus y col., 2009). La naturaleza catiónica del biopolímero le confiere además características de mucoadhesividad interesantes para la liberación controlada del activo en condiciones gastrointestinales (Li y col., 2011). Se consideró, por tanto, positiva la incorporación de quitosano en estructura de multicapa.

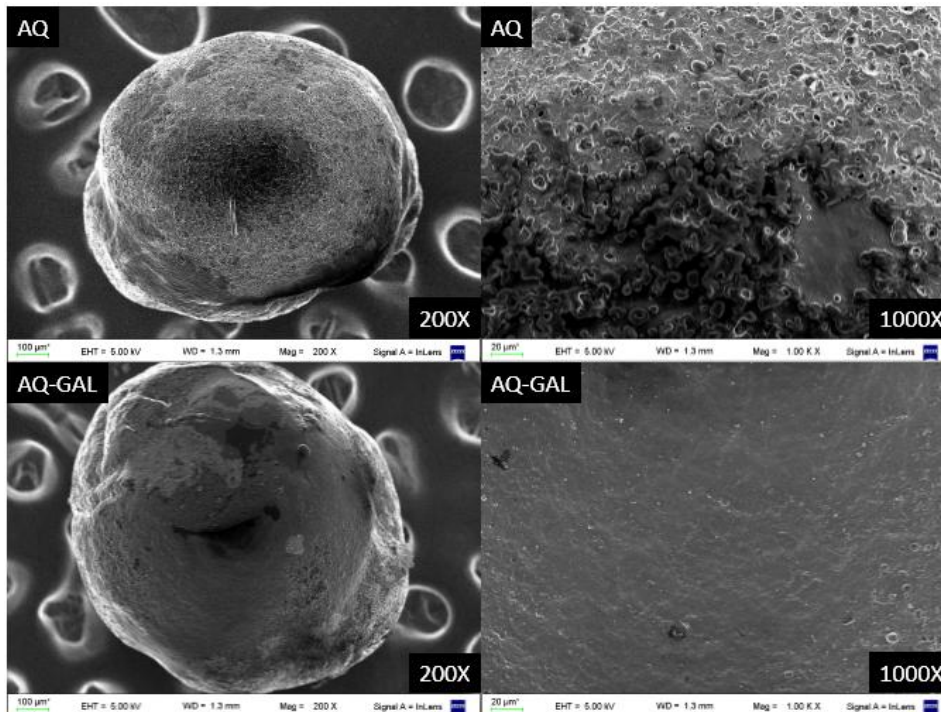
### IV.2.3.1.2 Características morfológicas y microestructurales

El efecto de la composición y del método de secado se estudió también sobre las características estructurales de los encapsulados empleando microscopía electrónica de barrido (SEM). Las imágenes obtenidas muestran la morfología externa (Figura IV.44 y Figura IV.45) y la estructura interna (Figura IV.46 y Figura IV.47) de las cápsulas. En todos los casos, la observación de las estructuras externas e internas requirió la extracción previa del aceite superficial con solvente debido a que dificultaba la observación.

A partir de las micrografías y de acuerdo con lo reportado por Smrdel y col. (2008), se observó que el método de secado tuvo un efecto importante sobre la morfología de las cápsulas. Las cápsulas liofilizadas (Figura IV.44) presentaron una superficie irregular con pliegues y depresiones, mientras que las cápsulas secadas al vacío, fueron más esféricas y con una superficie más lisa y uniforme. Chan (2011) observó también que cápsulas de alginato- $\text{Ca}^{2+}$  conteniendo aceite de palma y secadas en estufa fueron más esféricas que las obtenidas por liofilización. Smrdel y col. (2008) observaron para cápsulas de alginato secadas en corriente de aire o en lecho fluidizado una superficie más suave en comparación con cápsulas deshidratadas por liofilización.



**Figura IV.44** Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido de cápsulas de alginato-quitosano (AQ) y alginato-quitosano-goma (AQ-GAL) secadas por liofilización.



**Figura IV.45** Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido de cápsulas de alginato-quitosano (AQ) y alginato-quitosano-goma (AQ-GAL) secadas al vacío.

En relación a la composición, se observó que la presencia de la goma en sistemas liofilizados, favoreció la formación de cápsulas de mayor tamaño en comparación con AQ, con huecos y discontinuidades en la superficie, característicos de una estructura porosa. En las cápsulas liofilizadas sin goma (Figura IV.44), la presencia de aceite en la superficie dificultó la observación.

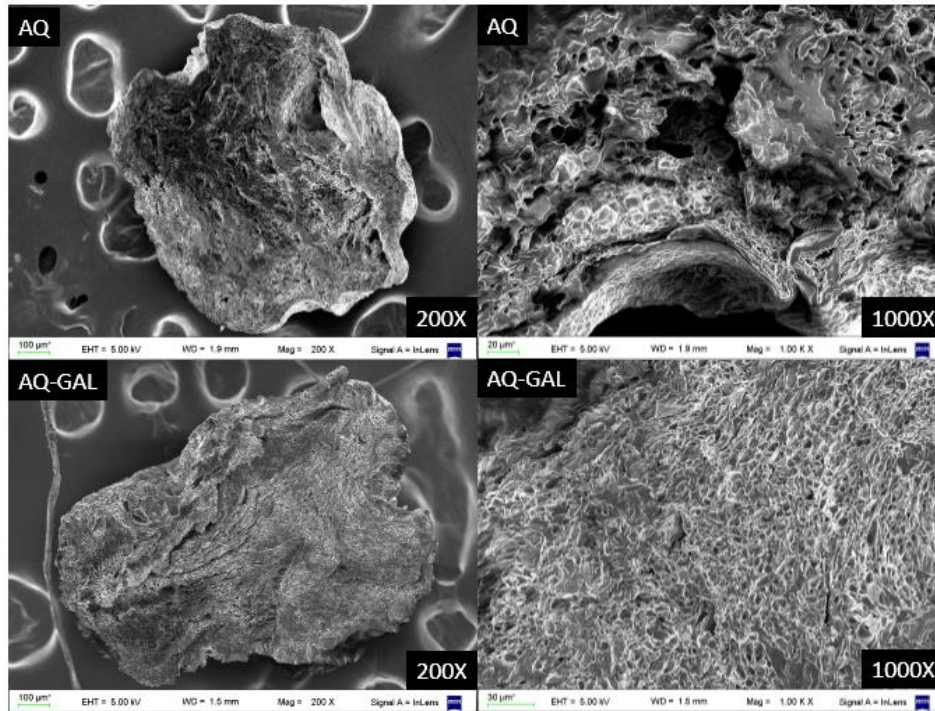
Las cápsulas con goma y secadas al vacío (Figura IV.45) fueron más grandes y presentaron una superficie más lisa y uniforme que AQ, evidenciando una estructura continua y más densa. Estas observaciones se corresponden con la menor permeabilidad observada de estas cápsulas en el estudio de extracción de aceite con hexano (Figura IV.43). La superficie más compacta en AQ-GAL se relacionó con la presencia de azúcares de bajo peso molecular naturalmente presentes en la goma, que podrían actuar como relleno de huecos en la red polimérica, aumentando así la densidad de la corteza y reduciendo el volumen libre. Desobry y col. (1999) encontraron que la incorporación de mono y disacáridos contribuyeron a la impermeabilización de micropartículas de maltodextrina. Las cápsulas AQ secadas al vacío (Figura IV.45) presentaron una superficie irregular con huecos y más rugosa, así como restos de aceite superficial.

El análisis de las características morfológicas externas contribuyó al entendimiento de las propiedades de retención del activo en relación al efecto de la composición y del método de secado.

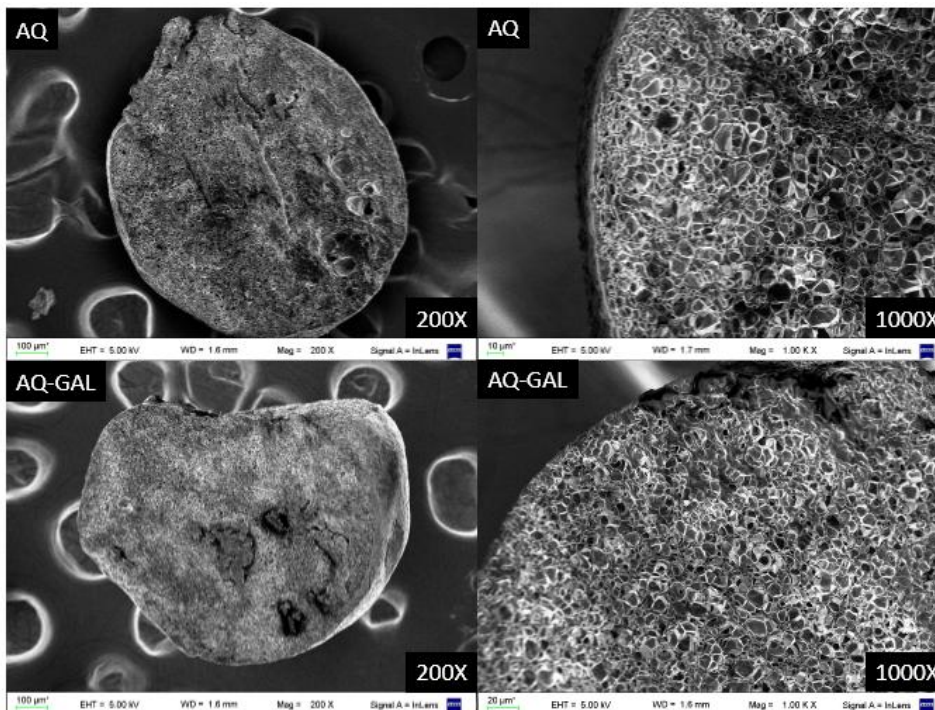
Para el análisis de la estructura interna se realizó un corte transversal de las cápsulas con bisturí. Las cápsulas seccionadas se sometieron a un proceso de extracción con solvente para eliminar la interferencia del aceite y mejorar así la observación. En las Figura IV.46 y Figura IV.47 se muestra el efecto de la composición y tipo de secado sobre la estructura interna de las cápsulas.

Las imágenes obtenidas de la sección transversal muestran que todos los sistemas presentan una estructura interna del tipo “multicore” o “multinúcleo”, en la cual el activo se encuentra en cavidades que forman una estructura de panal o esponja resultante del proceso de gelificación de la emulsión. La extracción del aceite con solvente generó cierta contracción de la estructura, que fue más evidente en las cápsulas liofilizadas donde se observó una distorsión de las cavidades (Figura IV.46).





**Figura IV.46** Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido de cápsulas de alginato-quitosano (AQ) y alginato-quitosano-goma (AQ-GAL) secadas por liofilización.



**Figura IV.47** Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido de cápsulas de alginato-quitosano (AQ) y alginato-quitosano-goma (AQ-GAL) secadas al vacío.

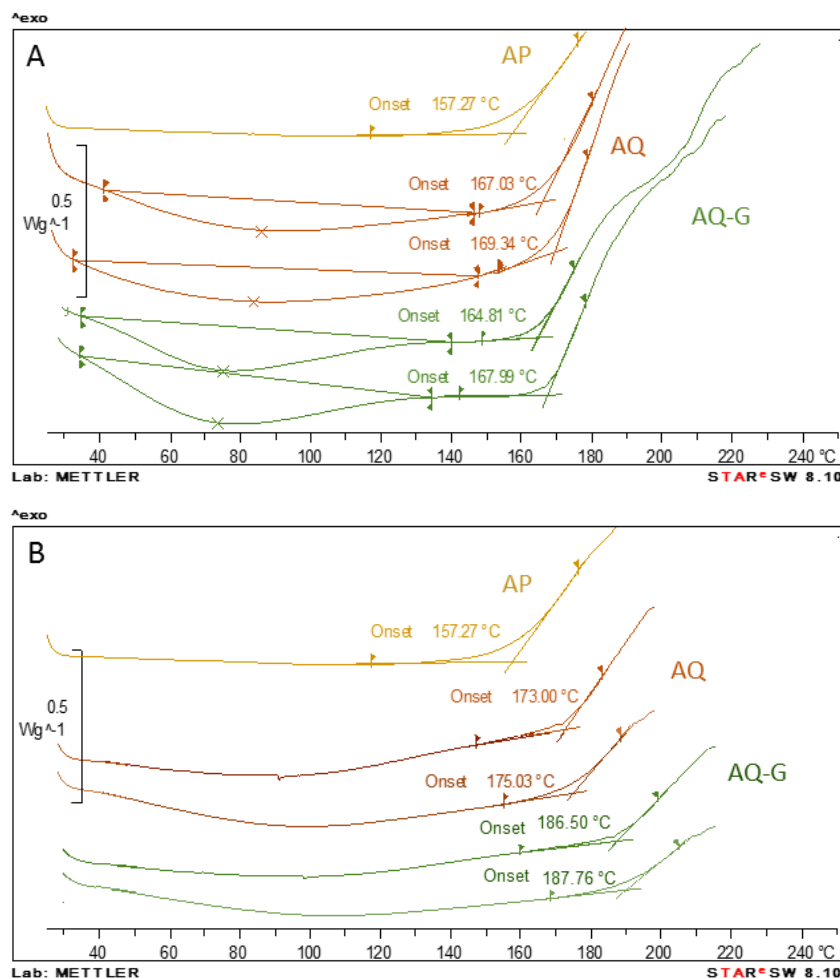
La estructura interna de las cápsulas secadas al vacío (Figura IV.47) refleja una distribución más homogénea de las gotas de aceite en la emulsión, observándose cavidades definidas de forma poliédrica, debido probablemente al acercamiento de las gotas de aceite durante el proceso de secado. Es importante destacar que en presencia de la goma, las cavidades fueron de menor tamaño y se distribuyeron de manera más uniforme y compacta. Estas características se relacionaron con la mayor estabilidad de la emulsión observada en presencia de GAL (Figura IV.40).

Se puede concluir que el tipo de secado influyó en la estructura macro y microscópica de las cápsulas, afectando su tamaño, superficie y permeabilidad. En líneas generales, las cápsulas liofilizadas fueron más grandes que las secadas al vacío, con una superficie más rugosa. Las cápsulas secadas al vacío y en particular con goma, fueron más esféricas y con una superficie más lisa y uniforme. En presencia de la goma se obtuvieron cápsulas de mayor tamaño independientemente del método de secado. En las cápsulas secadas al vacío la goma podría actuar rellenando la matriz polimérica favoreciendo estructuras de superficie más lisa y más compactas.

### IV.2.3.1.3 Protección por calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Como la oxidación y la descomposición térmica de grasas y aceites son reacciones exotérmicas, el análisis térmico puede usarse como método para evaluar la estabilidad y calidad de aceites tanto libres como encapsulados (Shahidi y col., 2005, Pérez-Alonso y col., 2008, Gallardo y col., 2013). La calorimetría diferencial de barrido ofrece una alternativa no química, sencilla y rápida para evaluar la oxidación, comparable con otros métodos instrumentales como Rancimat (Pardauil y col., 2011) y espectroscopía de resonancia de spin de electrón (Velasco y col., 2004). El análisis por DSC permite hacer estudios de oxidación térmica acelerada calentando la muestra a velocidad controlada (método dinámico) en aire (cápsula pinchada). Al ocurrir la oxidación, el calor liberado conduce a un marcado cambio de pendiente en la línea de base del termograma que indica la temperatura de inicio (*onset*) de la oxidación. La temperatura de oxidación determinada por el método dinámico se relacionó con etapas avanzadas (o de terminación) del proceso oxidativo (Shahidi y col., 2005).

Como aproximación para estudiar la estabilidad relativa del aceite de pescado en relación con la composición y método de secado de las cápsulas, se realizó un análisis térmico por DSC en condiciones oxidativas. En la Figura IV.48 se muestran los termogramas obtenidos por DSC para las cápsulas preparadas con o sin GAL y secadas por liofilización o al vacío, en comparación con el aceite libre o control.



**Figura IV.48** Termogramas obtenidos por DSC para cápsulas de polielectrolitos conteniendo aceite de pescado deshidratadas por liofilización (A) y secadas al vacío (B). Cápsulas de alginato-quitosano (AQ), alginato-goma- quitosano (AQ-G), aceite de pescado libre o control (AP). Inicio de la oxidación térmica indicado como *Onset*.

La oxidación se observó como un cambio en la línea de base del termograma, donde la temperatura de inicio (*onset*) de la reacción se determinó como la intersección de las líneas extrapoladas de la línea de base y la tangente del pico exotérmico.

Se observa que independientemente del tipo de secado, la oxidación en los sistemas encapsulados ocurrió a mayores temperaturas (165 - 187°C) que en el aceite libre o control (157°C). Pérez-Alonso y col. (2008) observaron también por DSC un aumento en la estabilidad oxidativa de oleoresina de chile cuando ésta se encapsuló por secado por atomización en matrices de proteína de suero-goma de mezquite-maltodextrina.

Las cápsulas secadas al vacío (Figura IV.48 B) se oxidaron en general a mayores temperaturas que las liofilizadas (Figura IV.48 A.). En particular, la oxidación para AQ ocurrió a  $174 \pm 1$  °C en sistemas secados al vacío y a  $168 \pm 1$  °C en los liofilizados. Estos resultados están de acuerdo con las características estructurales observadas para las cápsulas secadas al vacío (menor porosidad y superficie más densa) que serían favorables para la protección del aceite.

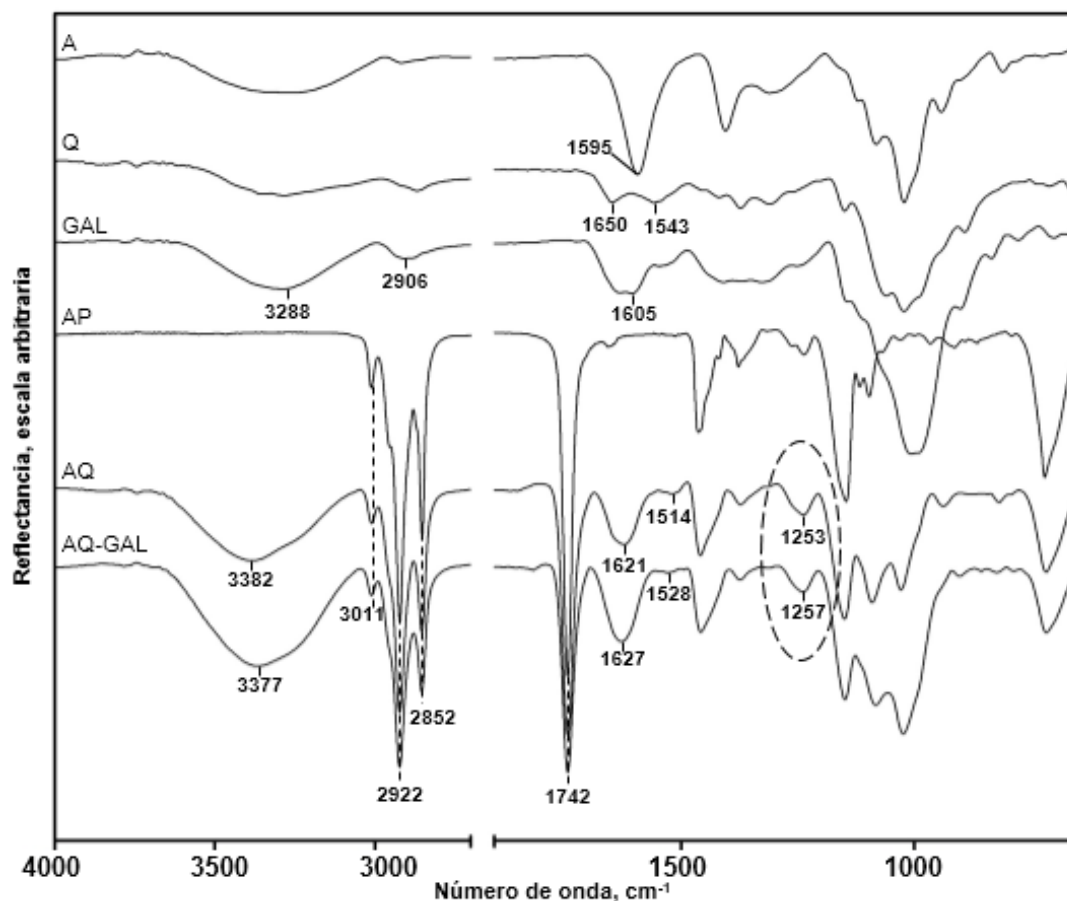
En relación al efecto de la composición de las cápsulas, en los sistemas liofilizados no se observaron diferencias apreciables en la temperatura de inicio de la oxidación (Figura IV.47). Sin embargo, en los sistemas secados (Figura IV.48 B) al vacío se observó que en las cápsulas que contenían GAL como componente del material de pared la oxidación ocurrió a mayor temperatura ( $187 \pm 1$  °C). Probablemente la presencia de la goma, además de aportar compuestos con actividad antioxidante, favorece la formación de una estructura de pared más compacta, menos porosa, que retiene y protege mejor el activo. En las cápsulas liofilizadas este efecto no se manifiesta debido a la alta porosidad de la matriz que resulta de este tipo de secado.

A partir de los resultados de estabilidad obtenidos por DSC y de las características de permeabilidad y estructura analizadas en las secciones anteriores en relación al método de secado, se definió como más adecuado el secado de las cápsulas en estufa de vacío.

### ***IV.2.3.2 Interacciones moleculares por FTIR***

La caracterización de los sistemas encapsulados secados al vacío se realizó además por espectroscopía infrarroja por transformadas de Fourier (FTIR-ATR) a fin de profundizar el conocimiento de las interacciones fisicoquímicas que se establecen entre los polielectrolitos componentes del material de pared y el compuesto activo encapsulado.

La Figura IV.49 muestra los espectros obtenidos para las cápsulas AQ y AQ-GAL y para los controles (quitosano y goma secadas al vacío, y aceite de pescado).



**Figura IV.49** Espectros FTIR de alginato (A), quitosano (Q), goma exudada de *Prosopis alba* (GAL), aceite de pescado (AP) y cápsulas de alginato-quitosano (AQ) y alginato-quitosano-goma (AQ-GAL).

El alginato de sodio presentó bandas características debidas al estiramiento asimétrico de los grupos  $\text{-COO}^-$  ( $1595\text{ cm}^{-1}$ ). En los sistemas encapsulados, esta banda evidenció un desplazamiento a  $1621\text{ cm}^{-1}$  en AQ y a  $1627\text{ cm}^{-1}$  en AQ-GAL, lo cual podría atribuirse al estiramiento asimétrico de los grupos carboxilatos en los complejos alginato de calcio, como consecuencia de la gelación iónica (Illanes y col., 2013).

Por otro lado, el espectro FTIR del quitosano mostró bandas típicas debido a la vibración del grupo  $\text{C=O}$  de las unidades acetiladas ( $\text{-CONH}_2$ ) a  $1650\text{ cm}^{-1}$  (amida I), y de los grupos amino protonados a  $1543\text{ cm}^{-1}$  (amida II) (Deladino y col., 2008). Luego de la encapsulación, las bandas características del quitosano (amida I y amida II) se desplazaron hacia menores

longitudes de onda tanto para AQ (1621 y 1514  $\text{cm}^{-1}$ ) y para AQ-GAL (1627 y 1528  $\text{cm}^{-1}$ ) lo cual indicaría la interacción alginato-quitosano (Deladino y col., 2008). De acuerdo con Deladino y col. (2008), la aparición de una banda en torno a 1240  $\text{cm}^{-1}$ , confirmaría la interacción electrostática entre los grupos amino protonados del quitosano y los grupos carboxilatos disociados del alginato de sodio. Esta banda se observó claramente tanto para AQ (1253  $\text{cm}^{-1}$ ) como para AQ-GAL (1257  $\text{cm}^{-1}$ ).

La observación de los desplazamientos debidos a la gelación iónica así como a la adsorción electrostática de quitosano, tanto en AQ y AQ-GAL, indicarían que la incorporación de goma no obstaculizó ninguna de esas interacciones. En este sentido, GAL se comportaría como un agente de relleno.

La observación de ciertas diferencias entre los espectros de AQ y AQ-GAL contribuyó al entendimiento del efecto de GAL en las cápsulas compuestas. En ambos sistemas se observó la banda debida al estiramiento del grupo  $-\text{OH}$  centrada en 3300  $\text{cm}^{-1}$ , resultando esta banda más estrecha y de mayor intensidad en presencia de GAL. De acuerdo con Pongjanyakul y Puttipatkhachorn (2007) este fenómeno sugiere considerar que la goma podría formar enlaces de hidrógeno intermoleculares con los otros polielectrolitos de la matriz encapsulante. Estas interacciones podrían contribuir a la formación de una matriz compleja que limita el escape del activo por obstaculización y reducción de espacios libres. Estas observaciones se corresponden a los resultados del ensayo de extracción del aceite con solvente.

El espectro FTIR del aceite de pescado (AP), mostró las bandas triples características (entre 3000 y 2800  $\text{cm}^{-1}$ ) correspondientes a los estiramientos C-H de los grupos metilo y metilenos presentes en las cadenas carbonadas de los ácidos grasos (Vongsvivut y col., 2012). En especial, la banda observada a 3011  $\text{cm}^{-1}$ , asignada a los estiramientos de los dobles enlaces *cis*,  $=\text{C}-\text{H}$ , podría relacionarse con las múltiples insaturaciones de los AGPI, tales como C22:6 y C20:5 (Liao y col., 2012). La conservación de estas bandas sin desplazamientos en los espectros de AQ y AQ-GAL, indicaría la ausencia de interacciones químicas entre el aceite de pescado y los materiales encapsulantes. De acuerdo con Aghbashlo y col. (2012), esto pone de manifiesto que el aceite se encuentra atrapado físicamente en ambos sistemas. La ausencia de interacciones químicas se evidenció también

por DSC donde se observó que la fusión del aceite en los sistemas encapsulados ocurrió a la misma temperatura que el aceite libre (datos no mostrados).

Del estudio de las propiedades macro y microestructurales, térmicas así como de las interacciones a nivel molecular, se concluye que la incorporación de GAL en los sistemas de encapsulación ionotrópica mejoró las propiedades fisicoquímicas y estructurales de las cápsulas conteniendo aceite de pescado. GAL actuaría como agente de relleno, sin obstaculizar los procesos de gelación iónica ni de adsorción de quitosano, estableciendo interacciones electrostáticas positivas con los otros componentes de pared, generando una matriz compleja donde el activo es retenido físicamente. La mayor retención y protección del aceite se alcanzó en cápsulas con goma y deshidratadas al vacío.

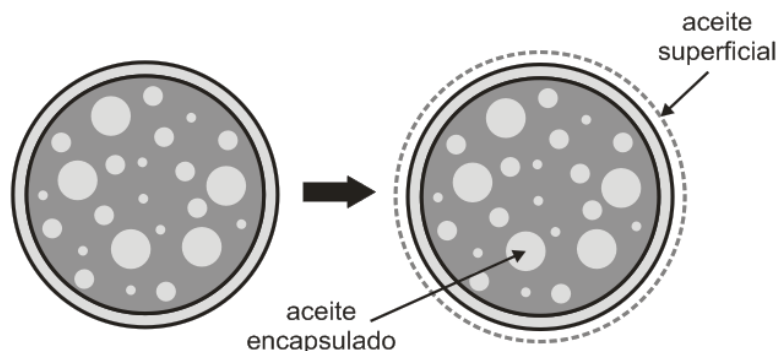
### ***IV.2.3.3 Distribución de aceite, rendimiento y eficiencia de encapsulación después del secado***

La distribución del aceite en la cápsula (fracción superficial/interna) tiene gran relevancia tecnológica, se usa generalmente como criterio de calidad cuando se evalúan las propiedades de sistemas encapsulados. Influye directamente sobre las características de manipulación, dosificación y transporte, así como en la estabilidad oxidativa global del producto, especialmente cuando se encapsula aceite altamente sensible a la acción del aire y de la luz (Velasco y col., 2009a). En esta sección se cuantificó la proporción de ambas fracciones y se las utilizó para calcular la eficiencia y el rendimiento de encapsulación como indicadores globales del método de encapsulación.

Los estudios de encapsulación de aceites describen generalmente la existencia de dos fracciones dependiendo de su localización (Velasco y col., 2009b). Por un lado, la fracción mayoritaria, inmersa en la matriz encapsulante, denominada *aceite encapsulado* o *interno*, y por otro lado, una fracción minoritaria, sobre la superficie de los encapsulados, denominada *aceite superficial* o *libre* (Figura IV.50).

Distintos autores observaron que tanto la composición como la estructura de la cápsula (y en consecuencia el secado) afectan en gran medida la distribución de aceite en los encapsulados (Augustin y col., 2010, Calvo y col., 2012). Considerando estos antecedentes, resultó de interés estudiar el efecto de la incorporación de GAL sobre la distribución de aceite en las cápsulas deshidratadas al vacío. El aceite superficial y el aceite encapsulado se

determinaron gravimétricamente como se describe en la secciones III.8.3 y III.8.4. En la Tabla 9, se muestran los resultados obtenidos.



**Figura IV.50** Esquema que ilustra la fracción de aceite interno o encapsulado (AE) y aceite superficial (AS).

**Tabla 9.** Contenido de aceite superficial, encapsulado y total determinado en cápsulas alginato-quitosano (AQ) y alginato-quitosano-goma (AQ-GAL) deshidratadas al vacío.

	AQ	AQ-GAL
Aceite superficial, % b.s.	7,87 ± 0,47 <sup>b</sup>	1,07 ± 0,04 <sup>a</sup>
Aceite encapsulado, % b.s.	70,43 ± 0,44 <sup>a</sup>	76,90 ± 1,70 <sup>b</sup>
Aceite total, % b.s.	78,29 ± 0,04 <sup>a</sup>	77,97 ± 1,74 <sup>a</sup>

Valores promedios ± desviación estándar con diferentes letras en la misma fila son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba T ( $p < 0,05$ ).

Luego de la preparación y secado al vacío, la fracción de aceite superficial fue mayor en las cápsulas que no contenían goma. Esto se correspondió con el aspecto aceitoso y pegajoso de AQ, percibido visualmente y durante su manipulación. Estas características no se observaron en las cápsulas AQ-GAL, las cuales presentaron mejores características de flujo. La fracción de aceite superficial en las cápsulas con goma fue menor que la reportada para cápsulas de alginato- $\text{Ca}^{2+}$  conteniendo aceite de palma, la cual varió entre 6,4 a 7,9 % (Chan, 2011). La existencia de una fracción de aceite superficial fue relacionada por estos autores con la permeación de aceite durante el proceso de secado como consecuencia de la contracción de la estructura de gel (Williams, 2008, Chan, 2011). La fracción de aceite superficial se relacionó también con la estabilidad de la emulsión y la capacidad de retención



de la cápsula. En este sentido, la menor cantidad de aceite superficial en AQ-GAL pone de manifiesto la importancia de GAL durante la formación de la emulsión, proceso de gelificación y secado.

De acuerdo con los resultados del estudio de las propiedades emulsionantes (sección IV.1.5.3), GAL forma films viscoelásticos fuertes en la interfase aceite/agua. Esta propiedad le permite conservar la distribución de tamaños de partículas (Figura IV.39) y evitar el fenómeno de coalescencia y liberación de aceite por rotura del film. En combinación con alginato, una mayor viscosidad del medio de dispersión contribuiría a retardar los fenómenos de desestabilización y separación de fases. A su vez, cuanto mayor es la estabilidad de la emulsión y menor es el tamaño de partícula, mayor es la retención de aceite, lo cual disminuye la fracción de aceite superficial (Chan, 2011). Adicionalmente, por análisis de los espectros FTIR, se observó que GAL establece interacciones electrostáticas con los otros polielectrolitos (Figura IV.49) confirmando un mayor entramado a la matriz encapsulante y limitando así la permeación del activo. Por otro lado, se observó que en presencia de la goma las cápsulas presentaron una superficie más compacta y densa cuando la deshidratación se realizó al vacío (Figura IV.45). Todos estos aspectos explican en gran medida la menor fracción de aceite superficial en las cápsulas con GAL.

Si bien GAL redujo significativamente la cantidad de aceite superficial, es importante mencionar que incluso una pequeña cantidad podría conducir a la formación de sabores y aromas indeseables durante el almacenamiento de los encapsulados (Drusch y col., 2009), así como de los alimentos fortificados en los que se incluyen como ingrediente (Kralovec y col., 2012). Con el fin de minimizar la oxidación de la fracción superficial de aceite, se ha recomendado el almacenamiento en condiciones de humedad relativa cercanas al valor de monocapa (Velasco y col., 2009b), por ser la velocidad de oxidación mínima en estas condiciones (Labuza y col., 1971).

Por otro lado, la incorporación de GAL aumentó en un 10 % la cantidad de aceite encapsulado (fracción interna) respecto de AQ, resultando en una capacidad de carga cercana al 77 % p/p (Tabla 9). La cantidad de aceite encapsulado en AQ-GAL fue similar a la determinada para cápsulas de alginato-Ca<sup>2+</sup> obtenidas por gelación externa conteniendo aceite de palma (79 % p/p) (Chan, 2011) y cápsulas de alginato-Ca-quitosano conteniendo aceite de tiburón (65 % p/p) (Peniche y col., 2004).

La capacidad de carga alcanzada en los sistemas estudiados, y en especial en presencia de GAL, resulta una ventaja interesante en comparación con otros sistemas de encapsulación tales como el secado por atomización, donde la carga de aceite es aproximadamente 30 % (Velasco y col., 2009a), o coacervación compleja en que alcanza valores cercanos al 60 % (Kralovec y col., 2012). Una alta capacidad de carga de aceite implica considerar que se requerirá una menor cantidad de material encapsulante, de modo que el costo y el impacto sensorial en el producto alimenticio en que se incorporen los encapsulados se minimizan (Kralovec y col., 2012). Por otro, una mayor carga de aceite, es de interés para diversas aplicaciones en las que se requiere un menor volumen de producto (Chan, 2011).

Considerando la mayor proporción de sólidos en la emulsión AQ-GAL (alginato 1% p/p, GAL 2% p/p) respecto de AQ (alginato 1% p/p), podría esperarse una menor proporción de aceite en las cápsulas con goma. Sin embargo, el contenido de aceite total calculado como la suma de las fracciones superficial e interna, fue similar en ambos sistemas (Tabla 9).

En base al conocimiento de las fracciones de aceite superficial, encapsulado y total, se calculó la eficiencia y el rendimiento de encapsulación. Por un lado, la eficiencia de encapsulación, describe la proporción de aceite superficial respecto del interno, y por otro, el rendimiento de encapsulación cuantifica indirectamente las pérdidas de activo a lo largo del proceso de encapsulación. En la Tabla 10 se resumen los resultados obtenidos.

**Tabla 10.** Eficiencia de encapsulación (%) y rendimiento de encapsulación (%) de aceite de pescado calculado para las cápsulas alginato-quitosano (AQ) y alginato-quitosano-goma (AQ-GAL) deshidratadas al vacío.

	AQ	AQ-GAL
Eficiencia de encapsulación, %	89,95 ± 0,62 <sup>a</sup>	98,63 ± 0,02 <sup>b</sup>
Rendimiento de encapsulación, %	70,72 ± 0,19 <sup>a</sup>	89,12 ± 0,06 <sup>b</sup>

Valores promedios ± desviación estándar con diferentes letras en la misma fila son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba T (p<0,05).

La incorporación de GAL aumentó la eficiencia de encapsulación en un 8,4%, respecto de las cápsulas sin GAL, indicando una mayor proporción de aceite encapsulado respecto del aceite total. Esta característica es altamente deseable en la encapsulación de aceites, debido a que cuanto mayor es la eficiencia de encapsulación (menor proporción de aceite superficial), mejores son las propiedades de flujo libre del sólido y mayor es su estabilidad frente a la oxidación (Augustin y col., 2010). La eficiencia de encapsulación lograda por

gelación iónica fue mayor, tanto en AQ-GAL como en AQ, que la obtenida para la encapsulación de aceites por otros métodos como secado por atomización, donde la eficiencia fue menor al 75% (Velasco y col., 2009b).

Por otro lado, la presencia de GAL aumentó el rendimiento de encapsulación de aceite de pescado, lo cual indica una menor pérdida del compuesto activo durante el proceso de generación de cápsulas y deshidratación. Rendimientos similares fueron publicados por otros autores para la generación de cápsulas de alginato- $\text{Ca}^{2+}$  conteniendo aceite de palma (79%) (Chan, 2011), aceite de eucalipto (90-92%) (Chang y col., 2003), aceite de germen de trigo (88%) (Chan y col., 2000) y aceite de tiburón (92%) (Peniche y col., 2004). Sin embargo es importante señalar que el rendimiento de encapsulación es un indicador global del proceso y se ve fuertemente influenciado por las características particulares del sistema usado para generar las cápsulas, lo cual hace difícil la comparación de los valores obtenidos con datos reportados en la literatura. El cálculo del rendimiento cuantifica indirectamente las pérdidas en los procesos de emulsificación y transporte en el sistema de goteo (manguera), como así también las pérdidas de activo (aceite) durante la consolidación de la estructura de gel y por drenado durante el método de secado. Manteniendo constantes las condiciones y sistema de generación de las cápsulas las comparaciones son válidas y permiten atribuir las diferencias observadas a cambios en la composición (Tabla 10).

Por un lado, Botrel y col. (2014), relacionaron el rendimiento de encapsulación de aceite de pescado por atomización con la estabilidad de la emulsión. Por otro, Chan (2011) sostiene que el rendimiento de encapsulación de aceite en cápsulas de alginato depende del grado de entrecruzamiento en la superficie, lo cual contribuye a un mayor atrapamiento del activo. En este sentido, el mayor rendimiento observado en los sistemas con GAL podría relacionarse con la mayor estabilidad de la emulsión, como así también a la formación de una matriz polimérica con mayor capacidad para retener el activo (Figura IV.43).

A partir de los resultados obtenidos se concluye que GAL mejoró la eficiencia de encapsulación, conduciendo a la obtención de cápsulas con mejores propiedades tecnológicas, aumentando el rendimiento de la encapsulación y disminuyendo las pérdidas de aceite en el proceso.

#### *IV.2.3.4 Apariencia de los encapsulados*

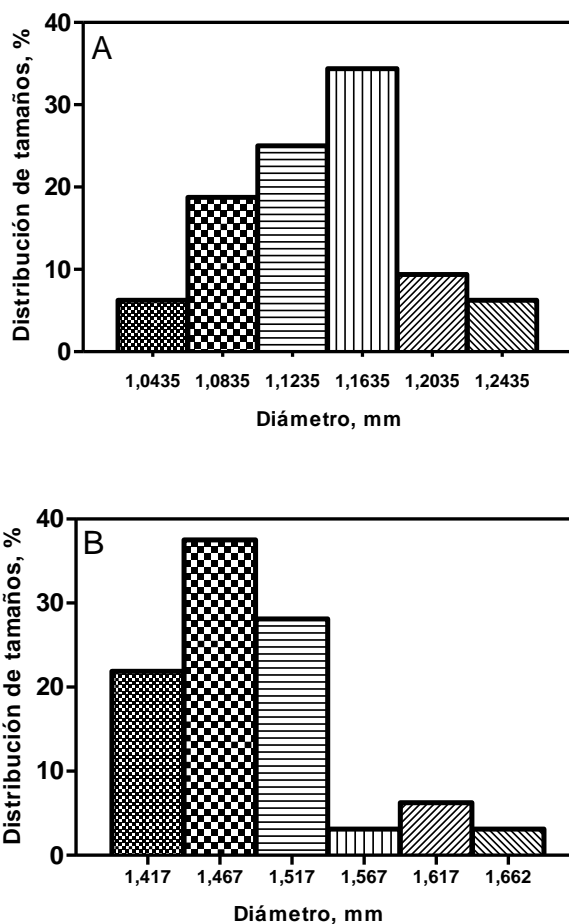
La apariencia de los encapsulados es otro aspecto importante a considerar especialmente cuando se prevé su utilización como ingredientes en alimentos y su posible impacto en la percepción sensorial por parte del consumidor (Garti y col., 2012). Con el nombre de apariencia se suele aludir en un sentido amplio a una serie de aspectos visuales en los que se incluye el color, la textura, el brillo, la transparencia e incluso, la forma y el tamaño de cierto material. En particular, en esta sección se estudió el efecto de la incorporación de GAL sobre los atributos morfológicos y propiedades ópticas de las cápsulas utilizando análisis de imágenes digitales (Papadakis y col., 2000, Du y col., 2004).

##### IV.2.3.4.1 Distribución de tamaño y atributos morfológicos

El tamaño de los encapsulados depende en gran medida de las características y condiciones del sistema de generación, como así también de la composición del material de pared (Chan y col., 2009b). En la sección IV.2.3.1.2 se observó por SEM que tanto el secado como la presencia de goma afectarían el tamaño de las cápsulas estudiadas. En esta sección el estudio por análisis de imagen permitió evaluar de manera estadística la distribución de tamaños y los parámetros de forma característicos para cada sistema.

La caracterización del tamaño y la forma se realizó analizando las imágenes digitales obtenidas con el software de licencia libre IMAGE J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Este software permite realizar calibraciones de forma tal de obtener los parámetros de interés en las unidades adecuadas (mm) y no en píxeles, como se explicó en la sección III.8.6.

Se estudió el efecto de GAL sobre la distribución de tamaño en términos del diámetro, (dimensión que se obtiene del software a partir del procesamiento de las imágenes) y distintos parámetros de forma como el diámetro de Feret (distancia máxima entre los dos puntos más distantes pasando por el centro), el área, el perímetro, la circularidad. Los datos informados corresponden al análisis de al menos 50 cápsulas por sistema. En la Figura IV.51 se muestra la distribución de frecuencias porcentuales de tamaños (diámetro, mm) para las cápsulas AQ y AQ-GAL secadas al vacío.



**Figura IV.51** Distribución porcentual de tamaños de cápsulas de alginato-quitosano (A) y alginato-quitosano-goma (B) obtenidas por análisis de imágenes digitales.

Se observó que la incorporación de GAL afectó en gran medida la distribución de tamaños de las cápsulas. Las cápsulas AQ-GAL presentaron una distribución monomodal y asimétrica centrada en 1,46 mm, mientras que para AQ la distribución fue monomodal y simétrica, centrada en 1,16 mm. Chan (2011) informó tamaños similares para cápsulas de alginato- $\text{Ca}^{2+}$  preparadas a partir de emulsiones con 20 y 30 % de aceite de palma, cuyos diámetros promedios variaron entre 1,50 y 1,64 mm.

El mayor tamaño de las cápsulas con goma (AQ-GAL) se relacionó con el mayor contenido de sólidos en la emulsión formadora (g sólido/gota), así como con el efecto viscosante de GAL. En otros trabajos publicados, observaron que cuanto mayor es la viscosidad aparente de la emulsión, mayor es el tamaño de los encapsulados (Wichchukit y

col., 2013). Pongjanyakul y Puttipipatkachorn (2007) observaron también un aumento en el diámetro medio de cápsulas de alginato- $\text{Ca}^{2+}$  conteniendo diclofenac, conforme se aumentó la fracción de goma xántica en la suspensión acuosa. Del mismo modo, Wang y col. (2013) encontraron que el tamaño de cápsulas de alginato- $\text{Ca}^{2+}$  conteniendo aceite de canola fue mayor cuando se incorporó pectina como componente del material de pared.

Para el caso particular de cápsulas conteniendo aceite, el mayor tamaño presenta potenciales ventajas. Por un lado, cuanto mayor es el tamaño se espera que la velocidad de oxidación sea menor, por ser menor la superficie expuesta (Augustin y col., 2010). Por otro lado, en cápsulas de mayor tamaño se podría retardar la velocidad y extensión de la digestión de los lípidos encapsulados. Li y col. (2011) estudiaron la digestibilidad de aceites en cápsulas de alginato- $\text{Ca}^{2+}$  y encontraron que la liberación de ácidos grasos *in vitro* por acción de la lipasa pancreática disminuyó al aumentar el tamaño de las cápsulas, debido a una menor accesibilidad de la enzima a los triglicéridos encapsulados, y a la mayor distancia para que difundan los productos de la hidrólisis. Estos autores indicaron que una menor velocidad de digestión podría ser positiva, ya que la liberación gradual de ácidos grasos en el íleon controla los mecanismos que regulan el hambre y la saciedad. A pesar de las ventajas mencionadas, es importante señalar que el tamaño puede influir en gran medida en la percepción visual de los encapsulados pudiendo afectar negativamente la aceptabilidad de los consumidores (Gaonkar y col., 2014). Así, partículas de  $r < 0,25$  nm se usan generalmente en alimentos y bebidas transparentes (debido a su reducida capacidad de dispersar la luz), mientras que partículas de mayor tamaño se utilizan más en productos opacos (Matalanis y col., 2011). Por otro lado, cápsulas de gran tamaño se perciben más fácil en el alimentos generando una sensación de aspereza o granulosidad en la boca, lo cual puede ser deseable para ciertos alimentos, pero indeseables para otros, (Oxley, 2012).

Para completar el estudio de la distribución de tamaños realizado en base al diámetro de los encapsulados (Figura IV.51), se evaluaron otros atributos morfológicos como el área, el perímetro, la circularidad, esfericidad y el diámetro de Feret (Tabla 11). Los datos informados corresponden al promedio de al menos 50 cápsulas por sistema.

**Tabla 11.** Atributos morfológicos obtenidos por análisis de imágenes digitales de cápsulas de alginato-quitosano (AQ) y alginato-quitosano-goma (AQ-GAL) deshidratadas al vacío.

	AQ	AQ-GAL
Diámetro, mm	$1,14 \pm 0,05^a$	$1,49 \pm 0,07^b$
Diámetro de Feret, mm	$1,19 \pm 0,05^a$	$1,56 \pm 0,08^b$
Perímetro, mm	$3,58 \pm 0,15^a$	$4,684 \pm 0,20^b$
Área, mm <sup>2</sup>	$1,02 \pm 0,08^a$	$1,74 \pm 0,16^b$
Circularidad	$0,78 \pm 0,03^a$	$0,78 \pm 0,02^a$
Esfericidad	$0,02 \pm 0,01^a$	$0,02 \pm 0,01^a$

Valores promedios  $\pm$  desviación estándar con diferentes letras en la misma fila son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba T ( $p < 0,05$ ).

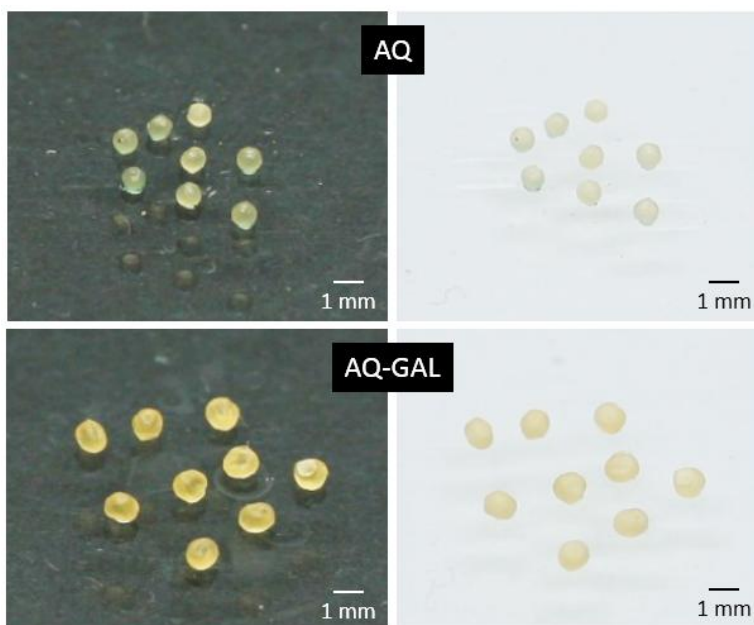
Junto con el diámetro, el diámetro de Feret, el área y el perímetro, son atributos que permiten caracterizar el tamaño de un cierto objeto (Du y col., 2004). Por tanto, en concordancia con lo observado para el diámetro (Figura IV.51), se encontró que GAL condujo a la obtención de cápsulas con mayor área, perímetro y diámetro de Feret. Combinando las medidas de atributos de tamaño (diámetro, perímetro, área) se calcularon los descriptores de forma *circularidad* y *esfericidad*, ambos importantes en la caracterización de encapsulados (Chan y col., 2009b, Santagapita, 2010, Chan, 2011). Los valores obtenidos (Tabla 11) muestran que no se encontraron diferencias significativas en la circularidad y esfericidad, indicando que la introducción de GAL no afectó la forma de los encapsulados. De acuerdo con Chan y col. (2009b), una partícula es esférica cuando su factor de esfericidad es menor que 0,05 como es el caso de las cápsulas AQ y AQ-GAL (Tabla 11). Generalmente, se busca generar partículas esféricas y monodispersas ya que mejoran las propiedades de flujo libre del sólido durante la dosificación y manipulación, así como las características estéticas del producto (Chan y col., 2009b).

#### IV.2.3.4.2 Propiedades ópticas de los encapsulados

Las propiedades ópticas de los encapsulados describen la interacción del material con la luz, las cuales se manifiestan en términos de atributos de la apariencia como color y transparencia u opacidad, entre otros (Puguan y col., 2014). En este contexto se suele definir al color como el aspecto de la apariencia que resulta de las diferencias en la distribución

espectral de la luz. Por otro lado, existe todo un campo que se refiere a aquellas condiciones que producen diferencias en la distribución espacial de la luz y que hacen que luzcan como transparente u opaco, brillante, mate, etc. En la industria de los alimentos, la apariencia es comúnmente evaluada en términos de color (absorción selectiva de ciertas longitudes de onda) y cuantificada en términos de las coordenadas triestímulo  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  (Matalanis y col., 2011). Sin embargo, la evaluación del color puede conducir a medidas erróneas cuando las muestras presentan cierto grado de translucidez, esto es, la propiedad por la cual la luz puede penetrar, reflejarse, dispersarse o absorberse en un material, variando entre los extremos de la transparencia y la opacidad (Hutchings, 2011).

Visualmente, las cápsulas AQ y AQ-GAL presentaron un color amarillento, levemente más claro en los sistemas sin goma (Figura IV.52).



**Figura IV.52** Apariencia de cápsulas de alginato-quitosano (AQ) y alginato-quitosano-goma (AQ-GAL), deshidratadas al vacío, tomadas con fondo negro y blanco en cada caso. Todas las imágenes se obtuvieron con una cámara digital.

El color de los encapsulados se vio fuertemente influenciado por el color del fondo, demostrando cierto grado de translucidez. En estos sistemas resulta por lo tanto de interés caracterizar la apariencia comparando la translucidez (o grado de opacidad) calculada como la relación entre el valor de luminosidad ( $L^*$ ) determinado con fondo negro y fondo blanco,



y las variables calculadas a través de la teoría de Kubelka-Munk para medios traslucidos:  $K$ ,  $S$  y su relación  $K/S$  (Tabla 12). Este tratamiento permite evitar el efecto del espesor, y contar con un parámetro que tiene en cuenta el cambio de luminosidad independientemente del poder dispersivo del material. En la Tabla 12 se presentan los valores de luminosidad ( $L^*$ ) obtenidos por análisis de imagen para los sistemas encapsulados con y sin GAL, evaluados con fondo blanco y fondo negro, el grado de opacidad y los parámetros de Kubelka-Munk,  $S$ ,  $K$  y  $K/S$ .

**Tabla 12.** Evaluación de la traslucidez y parámetro de Kubelka-Munk para cápsulas de alginato-quitosano (AQ) y alginato-quitosano-goma (AQ-GAL) conteniendo aceite de pescado.

	AQ	AQ-GAL
$L^*$ (fondo negro)	$50,28 \pm 2,93^a$	$55,88 \pm 1,97^b$
$L^*$ (fondo blanco)	$81,78 \pm 0,67^b$	$81,23 \pm 0,64^a$
Opacidad	$0,61 \pm 0,03^a$	$0,69 \pm 0,02^b$
$S$	$1,122 \pm 0,143^a$	$1,437 \pm 0,12^b$
$K$	$0,057 \pm 0,00^a$	$0,066 \pm 0,00^b$
$K/S$	$0,052 \pm 0,00^b$	$0,046 \pm 0,00^a$

Valores promedios  $\pm$  desviación estándar con diferentes letras en la misma fila son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba T ( $p < 0,05$ ).

Los valores de  $L^*$  de AQ y AQ-GAL variaron con el fondo usado para obtener la imagen, confirmando que ambos sistemas son traslúcidos (opacidad  $< 1$ ). En términos generales, la traslucidez de un material se ha atribuido a la difusión de la luz a través de interfaces con distintos índices de refracción (Buera y col., 2015). En este sentido, la opacidad de los encapsulados podría explicarse inicialmente en términos de la microestructura heterofásica que resulta de la distribución del activo en pequeñas cavidades. A su vez, se observó que el grado de opacidad resultó afectado por la composición del material de pared, indicando que la incorporación de GAL, aumentó el contraste de índices de refracción entre la partícula y el medio circundante.

En presencia de GAL el coeficiente de dispersión  $S$  fue mayor en las cápsulas con goma. Este coeficiente se ha relacionado con la cantidad de partículas dispersivas en el material (Matalanis y col., 2011) y por tanto, podría estar reflejando una mayor concentración y

empaques de la matriz polimérica en presencia de GAL. Por otro lado, para las cápsulas AQ-GAL el coeficiente de atenuación  $K$ , relacionado en otros trabajos con la concentración de pigmentos, también fue levemente mayor. El mayor valor de  $K$  podría atribuirse a la presencia de compuestos coloreados naturalmente presentes en la goma.

Por último, la relación  $K/S$  resultó mayor en AQ lo cual indica una mayor transparencia de las cápsulas sin goma. En este sentido, esta medida resultó coherente con los resultados obtenidos de la evaluación del grado de opacidad.

La caracterización de la apariencia de las cápsulas, en relación tanto al tamaño como a sus características ópticas y/o cromáticas, resulta de gran importancia para definir sus posibles aplicaciones en diferentes alimentos. Así por ejemplo, para bebidas claras se usarán preferentemente partículas transparentes, mientras que para su uso en yogur o aderezos cremosos podrán ser opacas (Matalanis y col., 2011).

#### ***IV.2.3.5 Efecto del contenido de agua y transición vítrea sobre las características físicas y estabilidad de las cápsulas***

Considerando la influencia que ejerce el agua en el deterioro de formulaciones o alimentos conteniendo compuestos activos sensibles (Beristain y col., 2002), resultó de gran interés estudiar el impacto de la incorporación de GAL en cápsulas de alginato y quitosano, en relación a la interacción de los encapsulados con el agua (retención de humedad, higroscopicidad, estado físico de la matriz, etc.) y su efecto en la protección del aceite. En esta sección se analizó el efecto de GAL sobre el contenido de agua,  $a_w$  y movilidad molecular de cápsulas deshidratadas. Posteriormente se estudiaron las propiedades de sorción en relación al deterioro oxidativo y características físicas de los encapsulados.

En la

Tabla 13 se presenta el contenido de agua y  $a_w$  de los encapsulados inmediatamente después del secado al vacío. Las cápsulas AQ-GAL presentaron luego del secado un mayor contenido de agua ( $3,67 \pm 0,13\%$  b.s.) que AQ ( $1,31 \pm 0,10\%$  b.s.), siendo los valores de  $a_w$  0,453 y 0,368, respectivamente. Estos resultados muestran que la presencia de la goma aumentó la retención de agua en las cápsulas. Otros autores también encontraron valores mayores de  $a_w$  para cápsulas compuestas alginato-pectina ( $a_w=0,46$ ) respecto de las cápsulas formuladas sólo con alginato ( $a_w=0,14$ ), ambas conteniendo aceite de canola (Wang y col.,

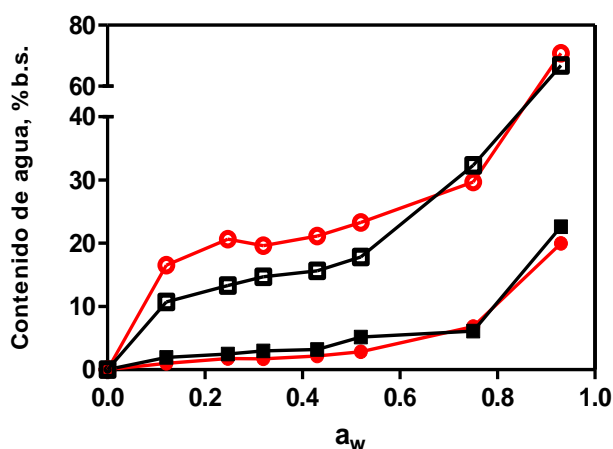
2013). Valores altos de contenido de agua y  $a_w$  pueden afectar negativamente la susceptibilidad del sistema al daño oxidativo, considerando que se ha sugerido que el rango de  $a_w$  adecuado para la protección de lípidos en alimentos estaría comprendido entre 0,2 y 0,35 (Velasco y col., 2009b). En este sentido, las propiedades de sorción de agua constituyen uno de los aspectos críticos a la hora de evaluar la estabilidad de aceites encapsulados (Botrel y col., 2014).

**Tabla 13.** Valores de contenido de agua y  $a_w$ , obtenidos para las cápsulas AQ y AQ-GAL con aceite de pescado, luego del secado en estufa de vacío.

	AQ	AQ-GAL
H, % b.s.	1,31 ± 0,10 <sup>a</sup>	3,67 ± 0,13 <sup>b</sup>
$a_w$	0,368 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,453 ± 0,03 <sup>b</sup>

Valores promedios ± desviación estándar con diferentes letras en la misma fila son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba T ( $p < 0,05$ ).

Resultó de interés estudiar las isotermas de sorción de agua de las cápsulas en relación con la estabilidad del aceite y las características físicas del material de pared. En la Figura IV.53 se muestran las isotermas de sorción de agua obtenidas para las cápsulas AQ y AQ-GAL con y sin aceite encapsulado. El comportamiento de los materiales de pared (cápsulas sin aceite) se estudió como control para poder evaluar la influencia de la fracción lipídica en los fenómenos de sorción.



**Figura IV.53** Isotermas de sorción de agua obtenidas a 25 °C, para cápsulas de alginato- quitosano (●) y alginato-quitosano-goma (■) conteniendo aceite de pescado (símbolos llenos) y sin aceite de pescado (símbolos vacíos).

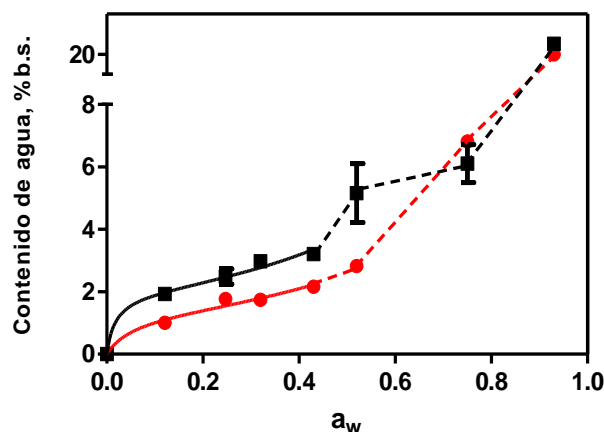
Tanto la composición del material de pared, como la presencia del activo (aceite de pescado) afectaron significativamente las propiedades de sorción de agua. En todos los casos, se observó un comportamiento de tipo sigmoideo caracterizado por un aumento gradual del contenido de agua a bajas  $a_w$ , seguido por un incremento marcado a  $a_w$  mayores que 0,70.

Las cápsulas con el aceite encapsulado fueron mucho menos higroscópicas que los correspondientes materiales de pared (Figura IV.53). Resultados similares se encontraron para aceite de menta encapsulado con maltodextrina por atomización, donde la presencia del activo lipofílico redujo la cantidad de agua adsorbida respecto de sus correspondientes materiales encapsulantes (Adamiec y col., 2006). La disminución de la higroscopicidad de una matriz de hidrocoloides por incorporación de lípidos se relacionó con una reducción en el número de sitios activos disponibles para la adsorción de agua (Soazo y col., 2011). En este sentido, en cápsulas sin goma donde la fracción de aceite superficial fue mayor, el contenido de agua fue aún menor. Una menor proporción de aceite en la superficie conduciría a una mayor exposición de los polielectrolitos y a una mayor sorción.

A valores de  $a_w > 0,6$  las cápsulas con GAL conteniendo aceite, evidenciaron un cambio en la tendencia de sorción, observada en menor medida para el material de pared, lo cual podría atribuirse a un cambio en la estructura de las cápsulas. Velasco y col. (2009) observaron un comportamiento similar en aceites microencapsulados por atomización a  $a_w > 0,7$  y relacionaron este efecto a cambios físicos de la matriz observados como colapso y apelmazamiento de las muestras.

En cápsulas sin aceite, la incorporación de GAL redujo la higroscopicidad, principalmente en el rango de  $a_w$  comprendido entre 0,12 y 0,52. Este comportamiento podría relacionarse con un aumento en el PM promedio de los biopolímeros debido a la incorporación de goma respecto de las cápsulas que tienen sólo alginato y quitosano. Se sabe que a mayor PM, menor es la higroscopicidad de los biopolímeros (Torres y col., 2012). La menor higroscopicidad en AQ-GAL sin aceite, también podría explicarse considerando que en presencia de goma, la cantidad de cationes  $Ca^{2+}$  necesaria para gelificar es menor, y como consecuencia sería menor la retención de iones y sales en la estructura de los encapsulados conduciendo a una menor captación de agua.

Las isotermas de las cápsulas conteniendo aceite se modelaron con la ecuación de BET ya que sólo se consideraron los valores ( $a_w < 0,5$ ) donde no se detectaron cambios en el comportamiento de sorción (Figura IV.53).



**Figura IV.54** Isotermas de sorción de agua obtenidas a 25 °C, para cápsulas de alginato- quitosano (●) y alginato- quitosano- goma (■) conteniendo aceite de pescado. Líneas continuas: modelo de BET.

El modelo resultó adecuado para ajustar los datos experimentales de AQ ( $R^2=0,96$ ) y AQ-GAL ( $R^2=0,97$ ). A partir del ajuste, se determinó el contenido de agua de la monocapa para ambos sistemas. El contenido de agua de la monocapa para AQ-GAL ( $m_0=1,96$  % b.s.) fue mayor que el de AQ ( $m_0=1,37$  % b.s.), indicando que la incorporación de GAL aumentó la cantidad de agua requerida para saturar los sitios polares activos de las cápsulas. Los valores obtenidos para ambos sistemas fueron ligeramente inferiores a los informados por Botrel y col. (2014) para microcápsulas de aceite de pescado en matrices de proteína de suero ( $m_0=3,6$  % b.s.) y matrices de proteína con maltodextrina ( $m_0=2,6$  % b.s.) e inulina ( $m_0=7,4$  % b.s.) secadas por atomización. Bonilla y col. (2010) también encontraron valores menores ( $m_0=5,56$  % b.s.) para microcápsulas de aceite de canola y goma de mezquite obtenidas también por secado por atomización. A partir de las isotermas, el valor de  $a_w$  correspondiente a la humedad de monocapa fue menor para AQ-GAL ( $a_w=0,18$ ) que para AQ ( $a_w=0,27$ ), por lo tanto la mayor protección del aceite se alcanzaría a menor humedad de almacenamiento en presencia de la goma.

Como se mencionó en la sección IV.2.3, durante el secado de las cápsulas, la eliminación del agua conduce a la formación de una matriz sólida en estado amorfo. En este estado los componentes solubles (azúcares, sales) y polímeros, se encuentran molecularmente

desordenados con muy baja movilidad (Augustin y col., 2010). En estas condiciones se dificulta la difusión del  $O_2$ , y por lo tanto, se retrasan los fenómenos oxidativos (Bell y col., 1994, Fennema, 2010, Escalona-García y col., 2016). Sin embargo, por aumento de la humedad o de la temperatura, la matriz pasa al estado sobresaturado (o gomoso) donde las reacciones controladas por difusión se aceleran, entre ellas, la oxidación lipídica (Slade y col., 1991) En particular, para aceites encapsulados, los cambios físicos de la matriz podrían afectar la distribución de aceite y consecuentemente, el contacto del aceite con el oxígeno (Dobarganes y col., 2003).

Se sabe que la composición del material de pared afecta en gran medida la higroscopicidad, susceptibilidad a la plastificación y transición vítrea de los encapsulados (Shimada y col., 1991). Por lo tanto en esta sección fue de interés evaluar el impacto de GAL sobre la temperatura de transición vítrea de las cápsulas de polielectrolitos conteniendo el aceite de pescado, a fin de establecer las potencialidades de la goma para mejorar la estabilidad física de los encapsulados.

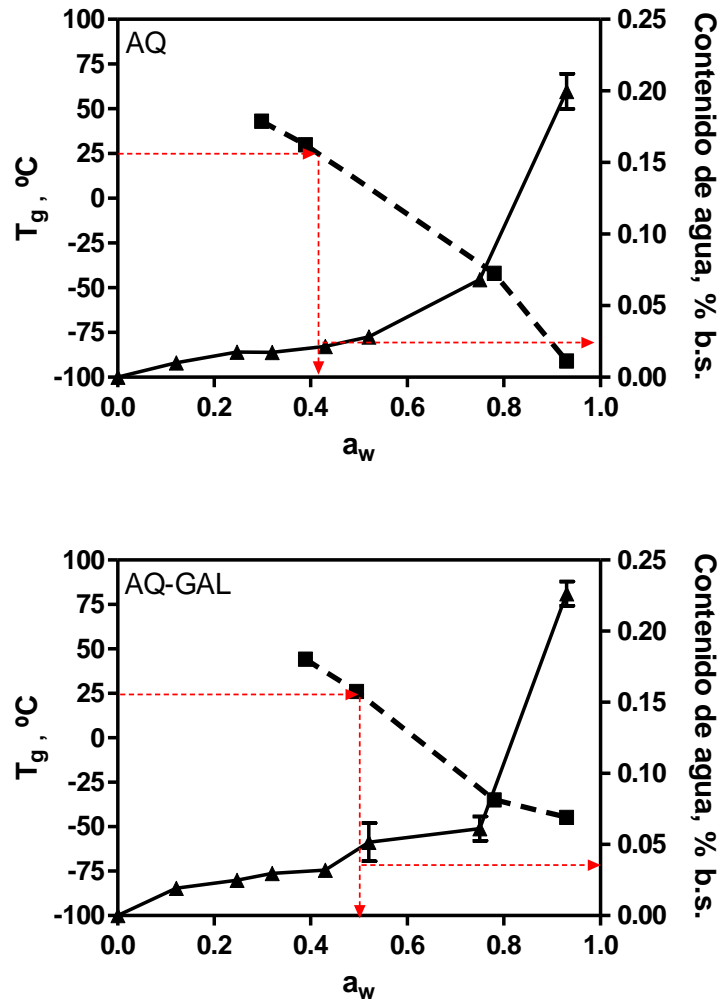
Para obtener las condiciones críticas de almacenamiento de los encapsulados se graficó la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) y las isoterms de sorción en función de la  $a_w$  (Figura IV.55). En el rango de  $a_w$  intermedias no fue posible determinar la  $T_g$  ya que los valores coincidían con las transiciones endotérmicas de fusión del aceite.

Tanto para AQ como para AQ-GAL la  $T_g$  disminuyó al aumentar la humedad relativa de equilibrio, evidenciando el efecto plastificante del agua que fue más marcado en ausencia de goma. Los valores críticos de  $a_w$  y contenido de agua se obtuvieron considerando una temperatura de almacenamiento de 25 °C, indicada con una flecha en el diagrama.

Las  $a_w$  crítica para las cápsulas con GAL (0,524) fue mayor que la  $a_w$  crítica determinada para las cápsulas sin goma (0,435). La presencia de GAL extiende el rango de  $a_w$  en el que los encapsulados se encuentran en estado amorfo (vítreo) a temperatura ambiente. Como se mencionó previamente, en general es deseable mantener el sistema en estado amorfo debido a que la alta viscosidad y baja movilidad molecular dificultan la difusión de  $O_2$  y la permeación de aceite, postergando así el deterioro oxidativo del activo (Velasco y col., 2009b).

A  $a_w$  mayores que el valor crítico, la  $T_g$  del sistema es menor que la temperatura de almacenamiento. Como consecuencia el sistema evoluciona hacia el estado sobresaturado

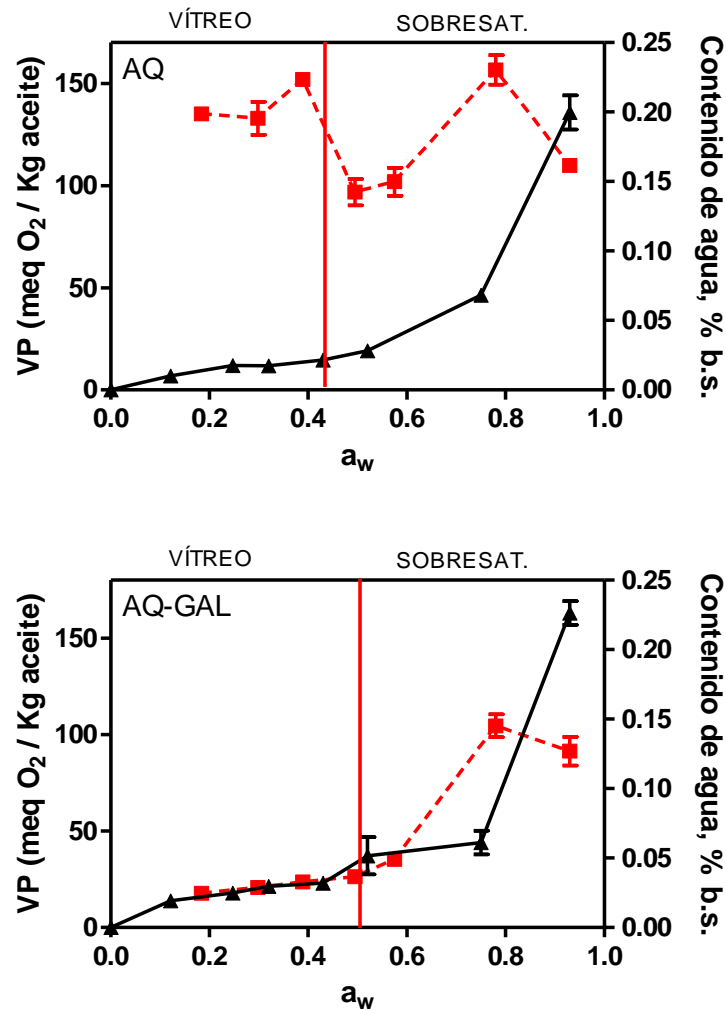
(gomoso), la viscosidad disminuye debido a la alta movilidad, y pueden ocurrir cambios estructurales como pérdida de estructura o colapso, y por lo tanto las reacciones de deterioro se aceleran (Ramoneda y col., 2011). Los cambios físicos se relacionaron con una mayor exposición del aceite encapsulado al oxígeno (Velasco y col., 2009b, Escalona-García y col., 2016).



**Figura IV.55** Diagramas  $T_g$ - $a_w$ -Humedad para capsulas de alginato-quitosano (AQ) y alginato-quitosano-goma (AQ-GAL) conteniendo aceite de pescado, equilibradas a distintas actividades de agua. Se incorporó para cada sistema la isoterma de sorción de agua correspondiente.

Para evaluar si el estado físico de la matriz de encapsulación (amorfo/sobresaturado) afecta el estado oxidativo del aceite, se determinó el valor de peróxidos (VP), como indicador

de las etapas iniciales de la oxidación en sistemas equilibrados a distintas humedades relativas (Figura IV.56).



**Figura IV.56** Valor de peróxido determinado en cápsulas de alginato-quitosano (AQ) y alginato-quitosano goma (AQ-GAL) equilibradas a distintas humedades relativas. Se incorporó para cada sistema la isoterma de sorción de agua correspondiente.

El estado oxidativo de las muestras se vio afectado tanto por la composición del material de pared, como por el contenido de agua y el estado físico de los encapsulados. El aceite encapsulado en presencia de GAL se oxidó mucho menos que en AQ a la distintas  $a_w$  (Figura IV.56) En AQ-GAL, se observó una fuerte influencia del estado físico del material de pared. Los valores de peróxido fueron muy bajos ( $VP < 40$  meq  $O_2$  / kg de aceite) hasta  $a_w = 0,53$  (humedades en las que los sistemas se encontraban en estado vítreo), mientras que a valores mayores de  $a_w$  (estado sobresaturado o gomoso) se produjo un aumento brusco. Como la

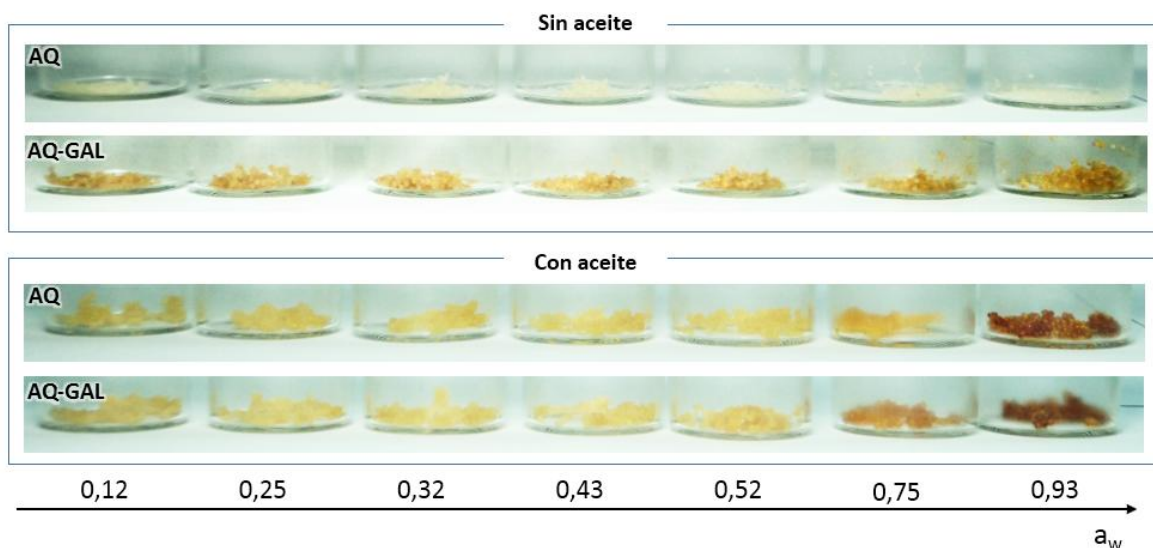


movilidad molecular aumenta debido al efecto plastificante del agua, puede ocurrir colapso y por lo tanto, pérdida de integridad estructural de las cápsulas. Estos cambios físicos conducirían a una mayor exposición del aceite interno, incrementando en consecuencia la velocidad de oxidación (Elizalde y col., 2002, Velasco y col., 2009b, Escalona-García y col., 2016). Elizalde y col. (2002) indicaron, que a medida que se produce la hidratación, el agua puede conducir a la disrupción de la red de puentes de hidrógenos formados en la matriz no cristalina de carbohidratos, permitiendo que los compuestos atrapados en la matriz deshidratada se liberen. Por otro lado, Drusch y col. (2006b) observaron un aumento marcado en el contenido de hidroperóxidos en aceites encapsulados en trealosa secada por atomización a HR mayores que 44%. En este caso, la mayor oxidación se atribuyó a la cristalización del azúcar debido a al aumento en la movilidad molecular del sistema al ocurrir la transición vítrea.

En las cápsulas sin GAL el comportamiento oxidativo fue independiente del estado físico de la matriz encapsulante (Figura IV.56), siendo más parecido al de un aceite libre. Esto se relacionó con la mayor proporción de aceite superficial, la cual se comportaría como aceite no encapsulado. Es un hecho conocido que la oxidación de lípidos en alimentos o productos deshidratados varía con la humedad. Entornos extremadamente secos o extremadamente húmedos aceleran la oxidación mientras que a niveles de humedad intermedia, normalmente correspondientes a la humedad de monocapa, la velocidad de oxidación alcanza un mínimo (Labuza y col., 1971). En este punto, el agua disminuye la actividad catalítica de los metales de transición, atrapa radicales libres y al oxígeno singulete, retardando la descomposición de hidroperóxidos (Dobarganes y col., 2003). Experimentalmente se encontró que la máxima protección frente a la oxidación de lípidos en AQ se alcanzó a valores de  $a_w$  (aprox. 0,5 - 0,6) (Figura IV.56) ligeramente mayores que el correspondiente a la formación de monocapa ( $a_w=0,27$ ). Velasco y col (2009) encontraron para una mezcla física de aceite-caseinato de sodio-lactosa (en que el aceite no se encuentra encapsulado) que la oxidación fue mínima a valores de  $a_w$  mayores que el valor de monocapa estimado. Estos autores observaron además que HR intermedias, maximizaron la protección de la fracción superficial de aceite libre, mientras que el efecto sobre la fracción encapsulada fue prácticamente despreciable. Por lo tanto se sugiere que en ausencia de GAL, la oxidación en las cápsulas AQ estaría gobernada por la fracción de aceite superficial.

A partir de los datos expuestos se concluye que la incorporación de GAL como material de pared permite extender el rango de  $a_w$  en el que las cápsulas se conservan en estado vítreo, maximizando en estas condiciones la protección del aceite encapsulado. Las cápsulas de alginato-quitosano-goma podrían utilizarse como una fuente estable de AGPI n3 para fortificar de alimentos de baja humedad, tales como bebidas y fórmulas instantáneas, así como pre mezclas para panificados, salsas, sopas, etc..

En la Figura IV.57 se muestra el aspecto físico de las cápsulas AQ y AQ-GAL, con y sin aceite encapsulado luego de la equilibración a las distintas  $a_w$ .

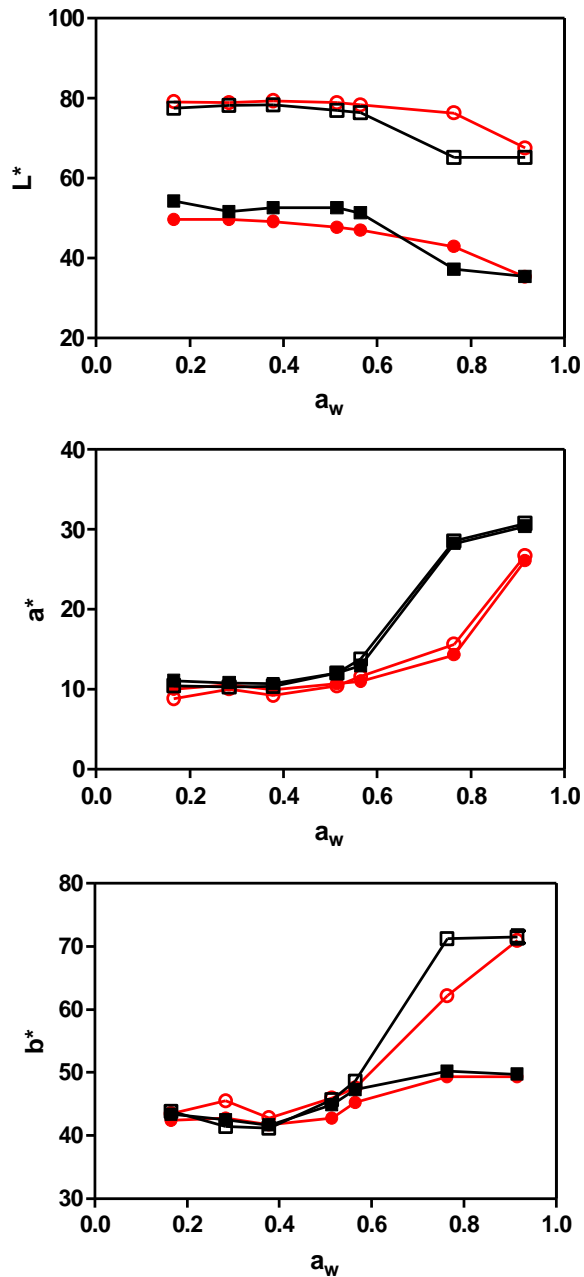


**Figura IV.57** Aspecto físico de las cápsulas de alginato-quitosano (AQ) y alginato-quitosano-goma (AQ-GAL), con y con aceite, equilibradas a distintas  $a_w$  a 25°C.

Cápsulas con y sin aceite encapsulado permitieron distinguir el efecto del aceite de los debidos a cambios propios del material de pared. Se observó que sólo las cápsulas con aceite mostraron un cambio de color apreciable (oscurecimiento) a  $a_w$  mayores que 0,52, mientras que los respectivos materiales de pared prácticamente no evidenciaron cambios con el aumento de humedad. Esto pone de manifiesto que los cambios de color observados se deben al deterioro del aceite encapsulado a altas  $a_w$ . Se observa además, que en sistemas sin aceite, la presencia de GAL confiere un color amarillento a la matriz.

Empleando análisis de imágenes digitales se analizó también el efecto de los cambios físicos de la matriz de encapsulación sobre las propiedades ópticas de los encapsulados, a fin de poder establecer su relación con el contenido de agua, estructura y protección del activo.

En la Figura IV.58 se representa la variación de las coordenadas cromáticas CIE  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ , obtenidas con fondo blanco y negro para AQ y AQ-GAL conteniendo aceite, en función de la  $a_w$ .



**Figura IV.58** Variación de las coordenadas cromáticas  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  en función de la  $a_w$  para cápsulas de alginato- quitosano (●) y alginato-quitosano-goma (■) conteniendo aceite de pescado. Fondo blanco (símbolos vacíos). Fondo negro (símbolos llenos).

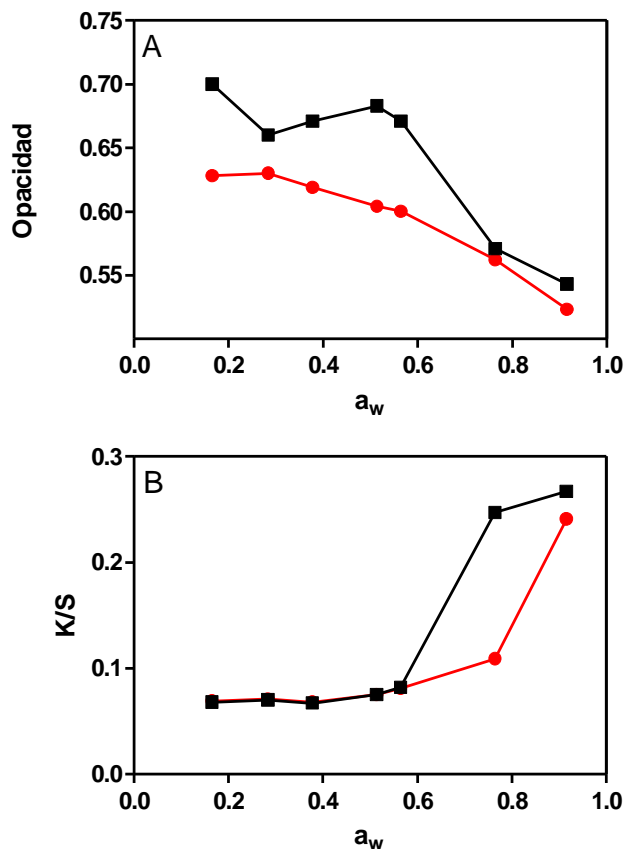
Tanto en las cápsulas AQ como en AQ-GAL, el valor de  $L^*$  varió con el color del fondo (negro o blanco) indicando cierto grado de translucidez ( $opacidad < 1$ ) de las muestras. Se observa que las muestras se oscurecieron (menor  $L^*$ ) principalmente a  $a_w$  mayores que 0,60, y más aún en presencia de la goma (Figura IV.58). Tanto el grado de rojo ( $a^*$ ) como el grado de amarillo ( $b^*$ ) presentaron un comportamiento similar manteniéndose prácticamente constantes e independientes del color del fondo hasta  $a_w < 0,6$ . A partir de allí, tanto AQ como AQ-GAL evidenciaron un aumento en  $a^*$  y  $b^*$ , resultando estos cambios coherentes con la percepción visual de tonos marrones (Figura IV.57). La variación de la coloración de las muestras podría relacionarse con la formación de sustancias poliméricas coloreadas debido a la mayor oxidación del aceite en condiciones de alta movilidad molecular. En este sentido, la formación de polímeros coloreados se observó en AQ-GAL a menores valores de  $a_w$  que en AQ. De acuerdo con lo observado, el cambio de coloración parece no estar relacionado directamente con la  $T_g$  de los sistemas. En efecto, a 25°C se determinó un valor de  $a_w$  crítico para AQ-GAL de 0,524 y para AQ de 0,435, mientras que los cambios más significativos en el color se evidenciaron a  $a_w$  mayores que 0,60, condiciones en que la movilidad molecular fue mayor.

En la Figura IV.59 se muestra la variación de la opacidad y la relación de los coeficientes de atenuación y dispersión derivados del análisis de Kubelka-Munk en función de la  $a_w$ .

En ambos sistemas se observó que la opacidad disminuyó con el aumento de la actividad de agua. En AQ-GAL la disminución fue más pronunciada a partir de  $a_w > 0,6$ . Por otro lado, la relación  $K/S$  se mantuvo prácticamente constante y sin diferencias apreciables entre ambos sistemas hasta valores de  $a_w = 0,6$ , luego se observó un aumento marcado en AQ-GAL a mayores  $a_w$ . De acuerdo con Hutchings (2011), un valor mayor de  $K/S$  indica que más luz es transmitida que reflejada, indicando por tanto una mayor transparencia del material. Resultados similares encontraron Moraga y col. (2011) para discos de banana y manzana liofilizados equilibrados a distintas HR, en los que observaron un aumento de la transparencia a altas actividades de agua.

La disminución de la opacidad, o aumento de la transparencia, se ha relacionado con un índice de refracción homogéneo dentro el material (Moraga y col., 2011), asociado con la hidratación y llenado de cavidades con agua (Buera y col., 2015). En este sentido, la hidratación de AQ-GAL podría estar favorecida por la naturaleza hidrofílica de la goma. A

su vez, el mayor contenido de agua favorece la aparición de sustancias coloreadas debido a la formación de polímeros oxidados del aceite.



**Figura IV.59** Opacidad (A) y Parámetros de Kubelka-Munk (B) en función de la  $a_w$  para cápsulas de alginato- quitosano (●) y alginato-quitosano-goma (■) conteniendo aceite de pescado.

#### IV.2.3.6 Estabilidad oxidativa del aceite encapsulado con GAL

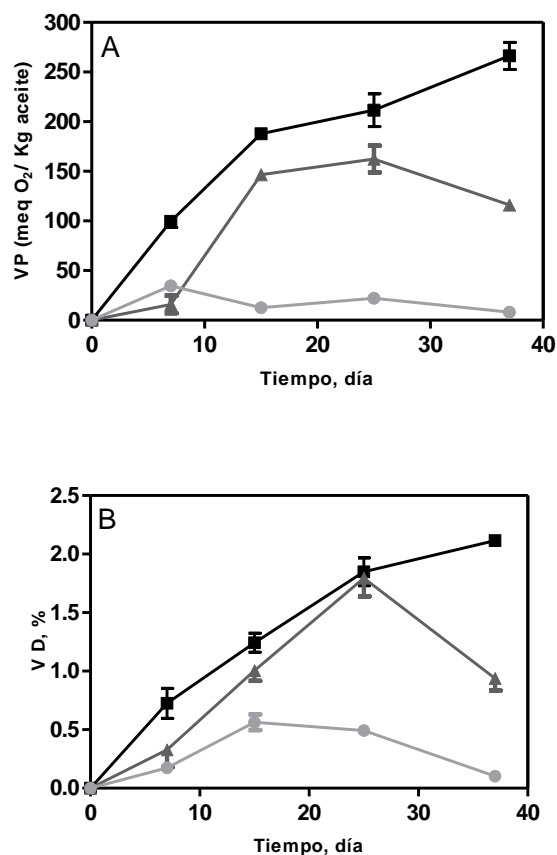
En esta parte del trabajo el objetivo fue evaluar el efecto de la goma exudada de *Prosopis alba*, empleada como componente de material de pared, en la estabilidad oxidativa del aceite de pescado contenido en cápsulas de alginato-quitosano. Para ello, las cápsulas se deshidrataron en estufa de vacío y se estudió la estabilidad del aceite analizando los productos primarios y secundarios de la oxidación. También se evaluaron los cambios en el perfil de ácidos grasos e índices de calidad nutricional de los lípidos durante el almacenamiento de las

cápsulas en condiciones controladas. Para evitar el deterioro del aceite debido a cambios estructurales de las cápsulas a altas  $a_w$ , el estudio de la estabilidad se llevó a cabo a  $a_w$  bajas (11% HR) y a 30°C. Las muestras se expusieron a luz fluorescente para acelerar el deterioro oxidativo.

#### IV.2.3.6.1 Evolución de indicadores de oxidación primaria y secundaria durante el almacenamiento en condiciones controladas

Se evaluó la estabilidad oxidativa de aceite de pescado libre y encapsulado en cápsulas de alginato-quitosano-goma (AQ-GAL) y alginato-quitosano (AQ), en términos de la evolución de los productos primarios y secundarios de la oxidación.

La Figura IV.60 muestra la evolución del valor de peróxidos (VP) y del valor de dienos conjugados (VD) como indicadores de las primeras etapas de oxidación lipídica durante el almacenamiento en condiciones controladas (30°C, 11% HR y luz fluorescente).



**Figura IV.60** Valores de peróxido, VP (A) y de dienos conjugados, VD (B) determinados para aceite de pescado libre (■), y encapsulado en AQ (▲) y AQ-GAL (●) durante el almacenamiento a 30°C bajo luz fluorescente. Las cápsulas fueron secadas al vacío y equilibradas a 11 %HR previo al almacenamiento.

Si bien el proceso de encapsulación podría aumentar la superficie de contacto de los lípidos con el oxígeno, se observa que la formación de peróxidos fue menor en los sistemas encapsulados que en el aceite libre. En AQ, el VP aumentó rápidamente a partir del día 7 y mostró un comportamiento cercano al observado para el aceite libre hasta el día 25, seguido de una ligera disminución. El aumento inicial en el VP se asoció con la oxidación del aceite superficial, fácilmente extraíble, y la disminución observada hacia el final podría corresponder a la oxidación de fracciones de aceite internas menos disponibles (Drusch y col., 2006b). En presencia de goma (AQ-GAL), los valores de peróxido se mantuvieron bajos durante todo el almacenamiento. Un ligero incremento se registró en el día 7, probablemente debido a la oxidación de la fracción externa o no encapsulada. Drusch y col. (2006a) observaron un comportamiento similar para aceite de pescado encapsulado por secado por atomización, donde el aumento inicial en la concentración de hidroperóxidos se atribuyó a la oxidación del aceite fácilmente extraíble (compuesto principalmente por la fracción no encapsulada) y la disminución posterior a la oxidación más lenta del aceite encapsulado.

Durante la formación de hidroperóxidos, aumenta simultáneamente la concentración de dienos conjugados como consecuencia del reordenamiento de dobles enlaces presentes en los ácidos grasos insaturados (Shahidi y col., 2005). El VD presentó la misma tendencia que el VP, alcanzando valores mayores para el aceite libre, seguido por AQ y finalmente AQ-GAL, donde el VD se mantuvo por debajo del 1%. Como se observó para el VP, la velocidad de oxidación fue menor en las cápsulas que contenían la goma como material de pared. La composición afectó en distinto grado la protección frente a la formación de productos primarios de oxidación. Diferentes aspectos fisicoquímicos de GAL podrían influir en la formación de hidroperóxidos y en el reordenamiento de los dobles enlaces de los ácidos grasos.

La formación de hidroperóxidos puede iniciarse por varios factores. Entre ellos, la luz puede tener un efecto importante, especialmente cuando los aceites o aceites encapsulados se almacenan durante largos períodos de tiempo (Akhtar y col., 2010). Vernon-Carter y col. (1996) encontraron buenas propiedades de barrera a la luz en films preparados con gomas exudadas obtenidas de especies botánicamente relacionadas a *Prosopis spp.* (goma de mezquite, GM). Observaron que en comparación con la goma arábiga, el color más oscuro

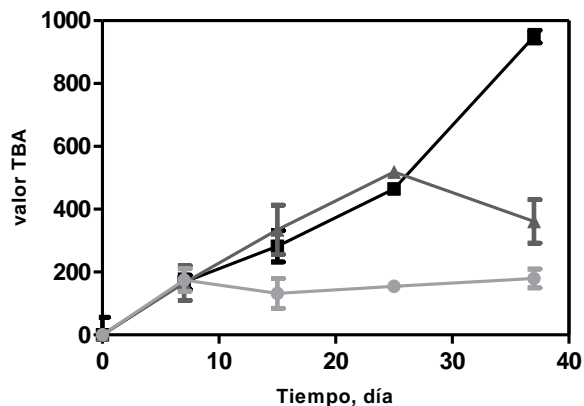
de las gomas de *Prosopis spp.*, podría actuar como filtro de luz previniendo la degradación del color de la oleoresina de caléndula Azteca emulsionadas con GM. Jiménez-Aguilar y col. (2011) también informaron el efecto protector de GM sobre la degradación fotocatalítica del color de extractos de arándanos encapsulados con GM. En este sentido, los pigmentos naturalmente presentes en la goma exudada de *Prosopis alba*, principalmente taninos y otros compuestos polifenólicos coloreados, podrían actuar como filtro previniendo el efecto catalítico de la luz sobre la foto-oxidación de lípidos, contribuyendo así a la mayor estabilidad observada en los sistemas AQ-GAL. Además, estas sustancias coloreadas, así como los azúcares de bajo peso molecular presentes en GAL podrían actuar previniendo o retrasando la oxidación del aceite, según se informó en otros trabajos (Hagerman y col., 1998, Yao y col., 2013).

La encapsulación permite prevenir físicamente la oxidación manteniendo los lípidos retenidos en una estructura interna, y actuando a la vez como barrera a la difusión de oxígeno. Una mayor estabilidad oxidativa se relacionó en otros trabajos con la menor permeabilidad al oxígeno de la matriz. Desobry y col., (1999) encontraron que la adición de mono y disacáridos a micropartículas de maltodextrina condujeron a una reducción en el tamaño de poro y por tanto de la permeabilidad al oxígeno. En este sentido, como se mencionó en la sección IV.2.3.1.1, los azúcares de bajo peso molecular presentes en GAL podrían actuar rellenando espacios o cavidades en la red polimérica alginato- $\text{Ca}^{2+}$ -goma, reduciendo así la difusión de oxígeno y mejorando la estabilidad del aceite encapsulado. Por otro lado, el efecto viscosante de los compuestos de alto peso molecular de la goma limitaría la salida del aceite encapsulado al estabilizar la emulsión durante el secado y almacenamiento.

Los productos de oxidación secundaria incluyen aldehídos, cetonas, alcoholes, hidrocarburos, ácidos volátiles y compuestos epoxi entre otros. Se producen por la descomposición de hidroperóxidos y son indicadores de una oxidación lipídica avanzada. El ensayo del ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) es uno de los más utilizados para detectar oxidación en sistemas encapsulados. Malonaldehído, alquenos, alcadienos, cetonas, etc. (conocidos comúnmente como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico TBARS) forman complejos coloreados con el TBA que pueden medirse espectrofotométricamente. Mayores valores de TBA indican mayor daño oxidativo. En Figura IV.61 se muestra el valor de TBA



determinado para el aceite libre y para aceite encapsulado en AQ-GAL y AQ, durante el almacenamiento.



**Figura IV.61** Valor de TBA determinados para aceite de pescado libre (■), y encapsulado en AQ (▲) y AQ-GAL (●) durante el almacenamiento a 30°C bajo luz fluorescente. Las cápsulas fueron secadas al vacío y equilibradas a 11 %HR previo al almacenamiento.

De acuerdo a lo esperado, el valor de TBA aumentó con el tiempo de almacenamiento. En ninguno de los sistemas se observó periodo de inducción lo cual indica que las sustancias reactivas al TBA estaban presentes desde el comienzo del almacenamiento, habiéndose formado probablemente durante los procesos previos de emulsificación y encapsulación. El aceite libre y el aceite encapsulado en AQ presentaron un comportamiento similar hasta el día 25, a partir del cual se observó una reducción del valor de TBA en AQ. La disminución al final del período de almacenamiento fue consistente con la disminución observada para VP y VD (Figura IV.60), lo cual podría explicarse considerando que la fracción de aceite superficial susceptible a la oxidación disminuyó durante el almacenamiento. En contraste, la disponibilidad de lípidos insaturados en el aceite libre, favoreció el aumento continuo de cualquiera de los índices de oxidación estudiados. El valor de TBA en el sistema AQ-GAL aumentó levemente al comienzo pero luego se mantuvo constante a valores bajos, menores que AQ lo cual está de acuerdo con los valores de VP y VD determinados al final del almacenamiento.

## IV.2.3.6.2 Cambios en el perfil de ácidos grasos durante el almacenamiento

Los ácidos grasos insaturados son los compuestos reactivos que más varían durante el proceso de oxidación. El estudio de los cambios en el perfil de ácidos grasos provee una medida indirecta del grado de oxidación lipídica. En la Tabla 14 se resume de manera cuantitativa los principales cambios en la composición de ácidos grasos e índices de calidad nutricional en cápsulas AQ y AQ-GAL deshidratadas y luego de su almacenamiento a 30 °C.

**Tabla 14.** Perfil de ácidos grasos e índices de calidad nutricional de lípidos en el aceite de pescado libre y encapsulado en AQ y AQ-GAL deshidratados (cero) y luego de 37 días de almacenamiento a 30°C, y luz fluorescente. Índice de aterogenicidad (IA), índice de trombogenicidad (IT), ácidos grasos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) y poliinsaturados (AGPI).

	Aceite libre		AQ		AQ-GAL	
	0	37	0	37	0	37
C16:0	16,08 ± 0,09 <sup>a</sup>	16,08 ± 0,37 <sup>a</sup>	16,11 ± 0,02 <sup>a</sup>	16,11 ± 0,14 <sup>a</sup>	15,99 ± 0,07 <sup>a</sup>	15,99 ± 0,10 <sup>a</sup>
C18:0	2,64 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,63 ± 0,00 <sup>a</sup>	2,63 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,66 ± 0,03 <sup>a</sup>	2,68 ± 0,08 <sup>a</sup>	2,65 ± 0,01 <sup>a</sup>
C18:1	16,52 ± 0,06 <sup>a</sup>	16,35 ± 0,11 <sup>a</sup>	16,63 ± 0,05 <sup>b</sup>	15,90 ± 0,12 <sup>a</sup>	16,36 ± 0,06 <sup>a</sup>	16,23 ± 0,10 <sup>a</sup>
C18:2	1,20 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,13 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,23 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,02 ± 0,00 <sup>a</sup>	1,21 ± 0,00 <sup>a</sup>	1,19 ± 0,01 <sup>a</sup>
C18:3	10,19 ± 0,01 <sup>a</sup>	9,60 ± 0,28 <sup>a</sup>	9,75 ± 0,60 <sup>a</sup>	9,21 ± 0,64 <sup>a</sup>	10,07 ± 0,01 <sup>a</sup>	9,98 ± 0,07 <sup>a</sup>
EPA	0,81 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,74 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,82 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,75 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,81 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,78 ± 0,04 <sup>a</sup>
DHA	18,62 ± 0,15 <sup>b</sup>	13,89 ± 0,12 <sup>a</sup>	18,61 ± 0,20 <sup>b</sup>	11,84 ± 0,11 <sup>a</sup>	18,75 ± 0,10 <sup>b</sup>	17,63 ± 0,01 <sup>a</sup>
AGS (%)	38,95 ± 0,11 <sup>a</sup>	38,64 ± 0,15 <sup>a</sup>	39,10 ± 0,23 <sup>a</sup>	38,98 ± 0,41 <sup>a</sup>	39,10 ± 0,04 <sup>a</sup>	39,16 ± 0,13 <sup>a</sup>
AGMI (%)	23,85 ± 0,11 <sup>b</sup>	23,17 ± 0,36 <sup>a</sup>	23,96 ± 0,24 <sup>b</sup>	22,30 ± 0,20 <sup>a</sup>	23,65 ± 0,14 <sup>a</sup>	23,21 ± 0,12 <sup>a</sup>
AGPI (%)	36,46 ± 0,21 <sup>b</sup>	30,73 ± 0,62 <sup>a</sup>	36,20 ± 0,50 <sup>b</sup>	27,22 ± 0,45 <sup>a</sup>	36,50 ± 0,17 <sup>a</sup>	35,45 ± 0,64 <sup>a</sup>
n6/n3	0,12 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,14 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,13 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,00 <sup>a</sup>
IA	0,50 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,57 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,50 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,61 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,50 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,51 ± 0,00 <sup>a</sup>
IT	0,18 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,19 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,26 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,18 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,19 ± 0,01 <sup>a</sup>

Valores promedios ± desviación estándar con diferentes letras para el mismo sistema a tiempo 0 y 37, son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba T ( $p < 0,05$ ).

El grado de oxidación en todos los sistemas se analizó considerando la concentración de EPA y DHA como principales indicadores (Akhtar y col., 2010, Polavarapu y col., 2011). La Tabla 14 muestra que el contenido de DHA disminuyó ( $p < 0,05$ ) en todos los sistemas durante

el almacenamiento, particularmente en AQ (36,38%) y en el aceite libre (25,40%). Sin embargo, en presencia de la goma la reducción fue solo del 5,97%. La disminución de EPA también fue mayor en el aceite libre (8,64%) y en AQ (8,53%) respecto de AQ-GAL (3,70%). Estos resultados indican que la incorporación de GAL fue crítica para conservar el EPA y el DHA durante el almacenamiento, y se corresponden con los menores valores de los índices de oxidación determinados en AQ-GAL (Figura IV.60 y Figura IV.61). No se observaron cambios significativos en los niveles de C18:3, C18:2 y C18:1 en ninguno de los sistemas estudiados excepto para AQ donde C18:2 y C18:1 disminuyeron significativamente. Es importante señalar que la estabilidad oxidativa basada en el cambio en el perfil de ácidos grasos muestra que el aceite de pescado fue incluso menos estable en AQ que en el aceite libre. Esto podría atribuirse al efecto de otras variables que pueden promover las reacciones de auto oxidación en sistemas encapsulados tales como, tamaño de partícula, tamaño del glóbulo de aceite, distribución de lípidos, actividad de agua, pH o interacciones específicas con los componentes de la matriz (Dobarganes y col., 2003).

Además, en base a la composición cuantitativa de los ácidos grasos en las muestras, se calcularon algunos índices relacionados con la calidad nutricional de los lípidos para evaluar el daño oxidativo. En la Tabla 14 se muestra el cambio en el porcentaje de ácidos grasos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) y poliinsaturados (AGPI) y los valores obtenidos para el índice de aterogenicidad (IA) y el índice de trombogenicidad (IT), en el aceite libre y encapsulados durante el almacenamiento.

La reducción en los niveles de AGPI fue más pronunciada en AQ (24,81%) y en el aceite libre (15,72%). Los niveles de AGMI disminuyeron en menor medida, siendo la pérdida mayor en AQ (7%). El contenido de AGS se mantuvo en los niveles iniciales luego del almacenamiento, de acuerdo a lo esperado por su estructura más estable (Berdeaux y col., 2012). No se observaron cambios en la composición de AGPI, AGMI y AGS en AQ-GAL, lo cual indica que la presencia de la goma ayudó a conservar en mayor medida el perfil lipídico inicial.

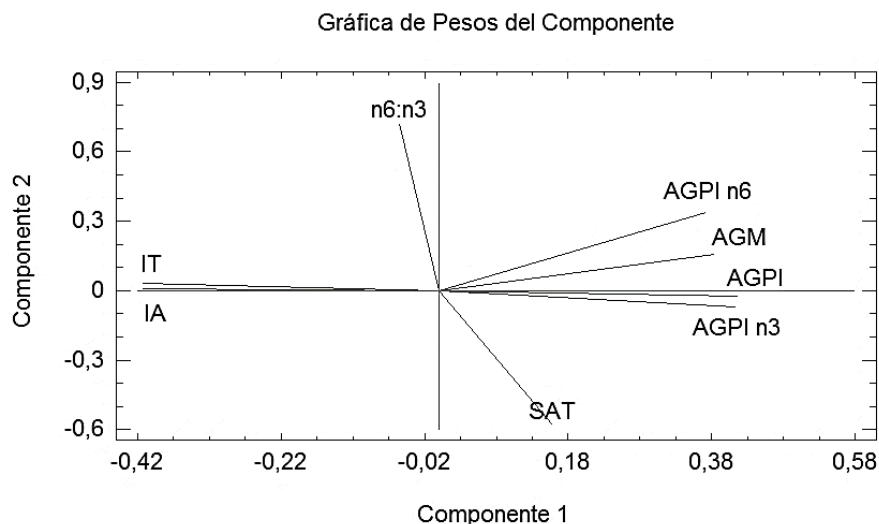
Sólo el aceite libre mostró un aumento significativo en la relación n6/n3 (16,60%) debido probablemente al mayor deterioro de los AGPI n3, cuya alta susceptibilidad es bien conocida (Polavarapu y col., 2011). Al final del período de almacenamiento AQ-GAL conservó la

menor relación n6/n3 indicando una composición de ácidos grasos más saludable que el aceite libre (Josquin y col., 2012).

Los índices IA e IT aumentaron de manera significativa en el aceite libre y en AQ, evidenciando cambios negativos en los atributos nutricionales durante el almacenamiento. En cambio, en AQ-GAL, los índices IA e IT prácticamente no cambiaron, lo cual muestra el beneficio de la incorporación de la goma. Valores bajos de IA e IT se relacionaron con una mejor calidad de los ácidos grasos (Hosseini y col., 2014). Estos resultados son consistentes con la evolución de los productos primarios y secundarios de oxidación presentados en las Figura IV.60 y Figura IV.61. Hosseini y col. (2014) informaron valores de IA de 0,74 e IT de 0,17 para pescado crudo *kutum roach*.

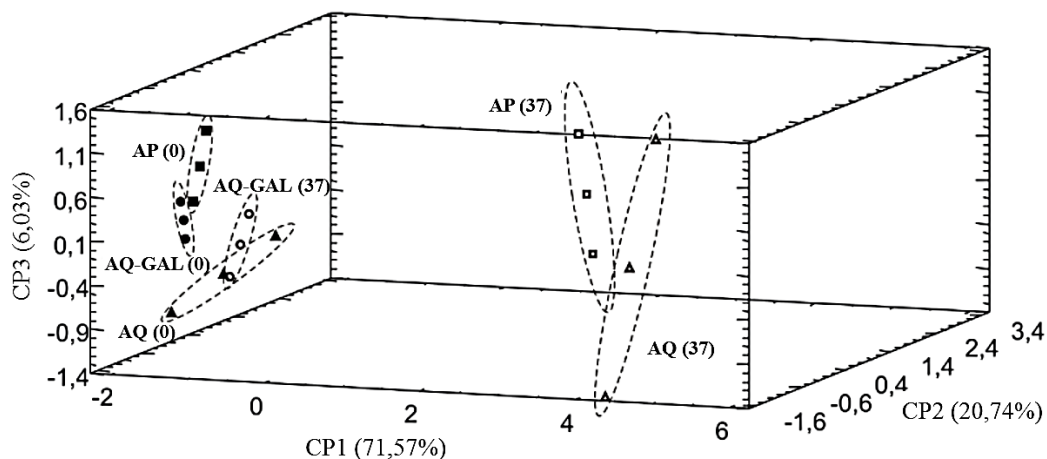
El análisis del perfil lipídico y de los índices de calidad nutricional (Tabla 14) muestra que AQ fue el sistema más sensible a la oxidación, mientras que la encapsulación con la goma exudada de *Prosopis alba* ayudó a conservar la proporción inicial de ácidos grasos y los índices de calidad nutricional del aceite.

En base al cambio de los índices de calidad nutricional determinados en el aceite libre, AQ y AQ-GAL antes y después del almacenamiento, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) para identificar las principales diferencias entre las muestras (Figura IV.62 y Figura IV.63).



**Figura IV.62** Representación de los pesos de los componentes resultante del análisis de componentes principales.

Las variables que principalmente contribuyeron al primer componente (CP1) fueron el contenido de AGPI n3 y el IA, los cuales se relacionaron de manera inversa como se muestra en la representación gráfica del peso de los componentes (Figura IV.62). Una reducción en el contenido de AGPI n3 resultó en un consecuente aumento relativo del IA. El diagrama de dispersión de las variables resultante del análisis de componentes principales realizado sobre los índices de calidad nutricional se muestra en la Figura IV.63.



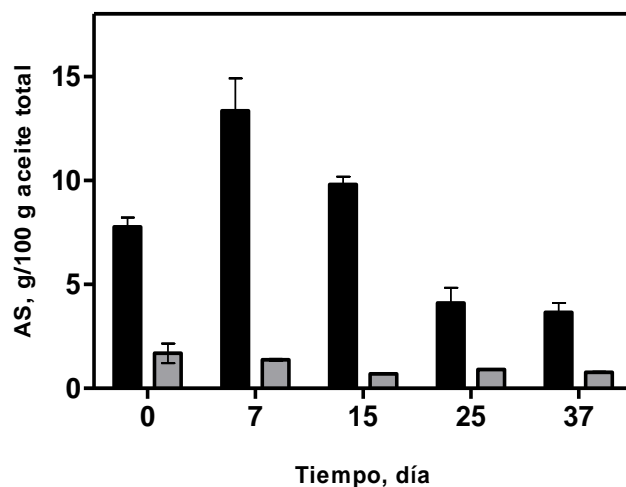
**Figura IV.63** Diagrama de dispersión resultante del análisis de componentes principales realizado sobre los índices de calidad nutricional de lípidos del aceite libre y aceites encapsulados al día 0 (símbolos rellenos) y al día 37 (símbolos vacíos) de almacenamiento a 30°C, 11% HR y luz fluorescente. AQ: matriz de alginato-quitosano; AQ-G: matriz de alginato-quitosano-goma. AP: aceite libre.

Aunque los dos primeros componentes permitieron explicar el 92% de la variabilidad, PC1 (71,57% de variabilidad) permite distinguir las muestras claramente.

Como puede observarse en la Figura IV.63, se atribuyeron valores positivos del primer componente al aceite libre y a AQ luego del almacenamiento (máximo deterioro oxidativo) y valores negativos para el aceite libre, AQ y AQ-GAL al tiempo 0 (mínimo daño). No se encontraron diferencias significativas para el primer componente para las cápsulas AQ-GAL antes y después del almacenamiento indicando que los índices de calidad nutricional de lípidos se conservaron cuando se introdujo la goma como componente del sistema encapsulante.

## IV.2.3.6.3 Permeación natural de aceite durante el almacenamiento

Además del estudio de estabilidad oxidativa del aceite de pescado libre y encapsulado, se estudió la permeación del aceite durante el almacenamiento, determinando la cantidad de aceite en la superficie de las cápsulas por extracción con solvente. La Figura IV.64 muestra el aceite superficial extraído de las cápsulas AQ y AQ-GAL durante el almacenamiento a 30°C bajo luz fluorescente y 11%HR.



**Figura IV.64** Aceite superficial (AS) en cápsulas (■) AQ y (■) AQ-G durante el almacenamiento a 30°C, luz fluorescente y 11%HR. Cada valor represente la media de los duplicados  $\pm$  SD. AQ: matriz de alginato-quitosano; AQ-G: alginato-quitosano- goma exudada de *Prosopis alba*.

Las cápsulas preparadas con GAL presentaron la mayor retención de aceite (menos aceite superficial) al tiempo 0. A los distintos tiempos de almacenamiento, la permeación fue mayor en AQ que en AQ-GAL. En AQ se observó un aumento de la fracción de aceite superficial hasta el día 7 de almacenamiento seguida de una disminución gradual. Junto con la reducción en la cantidad de aceite extraído se observó un aumento de la pegajosidad y aglomeración de las muestras. Velasco y col. (2009a) también observaron una reducción en la fracción superficial de aceite en encapsulados obtenidos por liofilización conjuntamente con un aumento de la pegajosidad como consecuencia de las condiciones oxidativas a las que se sometieron las muestras en el ensayo Rancimat. La reducción progresiva del aceite superficial extraíble se relacionó con la formación de un film sólido sobre la superficie de las cápsulas como consecuencia de la polimerización de ácidos grasos poliinsaturados por

mecanismos radicalarios en presencia de oxígeno (Das y col., 2013). El entrecruzamiento de glicéridos de ácidos grasos insaturados, no sólo disminuye la cantidad de aceite extraíble, sino que además induce la formación de puentes físicos entre las partículas que reducen sus propiedades de flujo libre y la calidad global del producto.

El estudio de permeación de aceite durante el almacenamiento (Figura IV.64) arrojó resultados complementarios a las observaciones realizadas en el estudio de la retención de aceite por extracción acelerada con solvente (Figura IV.43). Ambos contribuyen a una mejor comprensión del rol que cumple la goma exudada en la protección del aceite encapsulado. La mayor permeabilidad observada en las cápsulas sin goma, permitió explicar el mayor daño oxidativo (Figura IV.60 y Figura IV.61), donde la velocidad de oxidación parece estar principalmente determinada por la estabilidad del aceite en la superficie de la cápsula. Drusch y col. (2006a), también encontraron que la estabilidad oxidativa del aceite de pescado encapsulado por secado por atomización en diferentes matrices de almidón o azúcares, estuvo determinada exclusivamente por la estabilidad del aceite superficial extraíble.

La incorporación de GAL mejoró las propiedades del material de pared de los sistemas de encapsulación proporcionando una mayor retención del activo durante las etapas de secado y almacenamiento de los sistemas deshidratados. Una menor permeación del aceite hacia la superficie resultó en una menor exposición del activo a condiciones oxidantes y por tanto un menor daño oxidativo. La retención del activo en la estructura interna actuaría como un mecanismo físico importante para la protección de lípidos.

La goma exudada de *Prosopis alba* contribuyó a estabilizar aceite de pescado encapsulado en matrices compuestas de alginato-Ca<sup>2+</sup>-goma, disminuyendo la magnitud de los indicadores oxidativos y conservando el perfil lipídico e índices nutricionales relacionados. La goma en estudio, demostró ser un adecuado excipiente para la protección del aceite de pescado y estos resultados ponen en evidencia su potencial aplicación en el desarrollo de sistemas innovadores de encapsulación con los beneficios adicionales que resultan del uso de una fuente renovable autóctona.

### IV.3 Aplicación de los encapsulados para el desarrollo de un alimento funcional

Un alimento funcional contiene uno o más componentes específicos que ejercen una influencia positiva en la salud y bienestar de los consumidores. Estos pueden ser añadidos, removidos o modificados naturalmente en los alimentos para proveer beneficios en la salud (Tur y col., 2016b). El enriquecimiento de alimentos con compuestos funcionales ha crecido en gran medida en los últimos años debido a la tendencia general en la población hacia una alimentación más saludable (Shah, 2007, Olmedilla-Alonso y col., 2013). De acuerdo con el Art. 1369 del Código Alimentario Argentino, un producto se clasifica como “enriquecido”, cuando es formulado por adición de nutrientes esenciales con el objeto de resolver deficiencias de la alimentación que se traducen en fenómenos de carencia colectiva.

En la industria cárnica, el enriquecimiento con aceites ricos en ácidos grasos poliinsaturados tiene por objeto reducir la proporción de AGS y aumentar la relación de AGPI n3/n6 (Rubio-Rodríguez y col., 2010, Arab-Tehrany y col., 2012). La introducción de AGPI n3 en reemplazo parcial de grasas saturadas, es una de las modificaciones más frecuentes (Jiménez-Colmenero, 2007, Valencia y col., 2008). La incorporación de aceite de pescado encapsulado constituye una alternativa innovadora, que pretende no sólo obtener alimentos con un adecuado valor nutricional, sino además postergar los fenómenos oxidativos, confiriéndole a los productos funcionales una mayor vida útil (Ansorena y col., 2004, Pelsler y col., 2007, Salcedo-Sandoval y col., 2015).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se decidió evaluar la posibilidad de usar las cápsulas de polielectrolitos deshidratadas conteniendo el aceite de pescado encapsulado como ingrediente para desarrollar un producto cárnico funcional, tipo hamburguesa, enriquecido con AGPI n3. Resultó de particular interés estudiar la funcionalidad de GAL, como componente del material de pared, en relación a la capacidad de protección de la fracción de ácidos grasos saludables durante la cocción y durante el almacenamiento en condiciones de congelación. Además, se comparó el impacto del enriquecimiento con aceite (libre y encapsulado) respecto de una muestra preparada en forma convencional, sobre distintos aspectos de calidad y estabilidad.

Con esta finalidad, se prepararon hamburguesas en base a carne vacuna y tocino de cerdo (H) y hamburguesas en las que parte del contenido graso se sustituyó por adición de aceite



de pescado libre (H+AP) o aceite de pescado encapsulado en matrices de alginato-quitosano (H+AQ) y alginato-quitosano-goma (H+AQ-GAL). La proporción de aceite libre o encapsulado adicionado a la formulación se ajustó de modo que el aporte de EPA y DHA sea uniforme entre los tratamientos, representando el aceite de pescado incorporado aproximadamente el 1,5% de la formulación. El contenido graso total de los productos se ajustó al 10% del peso del producto crudo por adición de tocino de cerdo.



**Figura IV.65** Imagen del laboratorio de Industrias Alimentarias II (UNCAUS), donde se llevó a cabo la elaboración, cocción y análisis de las hamburguesas de carne enriquecidas con aceite de pescado o aceite de pescado encapsulado en AQ y AQ-GAL.

### IV.3.1 Efectos de la cocción sobre parámetros físico-químicos y nutricionales de hamburguesas enriquecidas

Inicialmente se determinó la composición de las hamburguesas crudas, en términos de humedad, grasas totales y contenido de EPA y DHA. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 15. Las distintas formulaciones presentaron valores similares de humedad y contenido de grasas totales. El contenido de grasa de los productos crudos fue cercano al estimado al diseñar la formulación.

**Tabla 15.** Composición de los sistemas cárnicos crudos no enriquecidos (H), adicionados en aceite de pescado libre (H+AP), aceite en cápsulas de alginato-quitosano (H+AQ) y aceite en cápsulas de alginato-goma-quitosano (H+AQ-GAL).

	H	H+AP	H+AQ	H+ AQ-GAL
Humedad, % b.h.	67 ± 1,42 <sup>a</sup>	68 ± 0,01 <sup>a</sup>	67 ± 0,31 <sup>a</sup>	68 ± 0,41 <sup>a</sup>
Grasas totales, % b.h.	11 ± 1,32 <sup>a</sup>	11 ± 0,36 <sup>a</sup>	10 ± 0,87 <sup>a</sup>	11 ± 0,54 <sup>a</sup>
Grasas totales, % b.s.	34 ± 0,61 <sup>a</sup>	37 ± 0,58 <sup>b</sup>	34 ± 0,53 <sup>a</sup>	33 ± 0,56 <sup>a</sup>
EPA, mg/100 g producto b.h.	5,69 ± 0,66 <sup>a</sup>	54,47 ± 1,72 <sup>b</sup>	52,26 ± 4,37 <sup>b</sup>	49,41 ± 2,52 <sup>b</sup>
DHA, mg/100 g producto b.h.	4,54 ± 0,53 <sup>a</sup>	94,19 ± 2,98 <sup>b</sup>	91,97 ± 7,69 <sup>b</sup>	91,53 ± 4,73 <sup>b</sup>
EPA + DHA, mg/100 g producto b.h.	10,23 ± 1,19 <sup>a</sup>	148,67 ± 4,70 <sup>b</sup>	144,24 ± 8,89 <sup>b</sup>	141,95 ± 7,27 <sup>b</sup>
AGS*, %	34 <sup>c</sup>	33 <sup>b</sup>	32 <sup>a</sup>	32 <sup>a</sup>
AGMI*, %	36 <sup>a</sup>	38 <sup>c</sup>	37 <sup>b</sup>	36 <sup>a</sup>
AGPI*, %	30 <sup>c</sup>	29 <sup>a</sup>	30 <sup>c</sup>	31 <sup>c</sup>
AGPI/AGS	0,81	0,89	0,93	0,95
n3/n6	0,13	0,19	0,18	0,20

Valores promedios ± desviación estándar con diferentes letras en la misma fila son significativamente diferentes de acuerdo al análisis de la varianza ( $p < 0,05$ ).

\*Medidas realizadas con un desvío estándar medio de 0,06.

Los productos crudos obtenidos, cumplieron con el requisito establecido por el CAA para este tipo de alimento, el cual fija un máximo de 20 g de grasa/100 g de producto b.h.. Además, en todas las formulaciones enriquecidas, la suma de EPA y DHA fue superior a 80 mg/100 g de producto b.h., valor mínimo establecido por el CAA para que se pueda dar la denominación “Alto contenido de ácidos grasos n3”. De todos modos, sabiendo que la cocción afecta en gran medida tanto la proporción de materia grasa como el perfil de ácidos grasos (Bilek y col., 2009), resultó indispensable evaluar la composición de las hamburguesas formuladas en las condiciones normales de consumo. Las distintas formulaciones de hamburguesa se cocinaron siguiendo un tratamiento establecido en 15 minutos a 200°C, estas condiciones aseguraron una temperatura en el centro geométrico mayor que la temperatura de coagulación de las proteínas miofibrilares (aprox. 77°C). Las condiciones de cocción se establecieron en un ensayo previo y se mantuvieron constantes en todos los tratamientos.

El estudio de los cambios post cocción resulta además interesante para comprender mejor las interacciones de los ingredientes en la matriz alimentaria. En la Tabla 16 se muestran los resultados de los sistemas cocidos.

**Tabla 16.** Composición de los sistemas cárnicos cocidos no enriquecidos (H), adicionados en aceite de pescado libre (H+AP), aceite en cápsulas de alginato-quitosano (H+AQ) y aceite en cápsulas de alginato-quitosano-goma (H+AQ-GAL).

	H	H+AP	H+AQ	H+ AQ-GAL
Humedad, % b.h.	61 ± 0,03 <sup>c</sup>	60 ± 0,14 <sup>a</sup>	60 ± 0,03 <sup>b</sup>	60 ± 0,07 <sup>b</sup>
Grasas totales, % b.h.	12 ± 1,87 <sup>a</sup>	12 ± 0,09 <sup>a</sup>	13 ± 0,23 <sup>a</sup>	12 ± 0,32 <sup>a</sup>
Grasas totales, % b.s.	30 ± 0,54 <sup>a</sup>	31 ± 0,49 <sup>a</sup>	31 ± 0,48 <sup>a</sup>	31 ± 0,34 <sup>a</sup>
EPA, mg/100 g producto b.h.	3,62 ± 0,22 <sup>a</sup>	13,12 ± 0,04 <sup>b</sup>	27,22 ± 0,21 <sup>c</sup>	42,55 ± 0,44 <sup>d</sup>
DHA, mg/100 g producto b.h.	7,26 ± 0,44 <sup>a</sup>	46,54 ± 0,13 <sup>b</sup>	105,34 ± 0,80 <sup>c</sup>	104,56 ± 1,09 <sup>c</sup>
EPA + DHA, mg/100 g producto b.h.	10,88 ± 0,66 <sup>a</sup>	59,66 ± 0,17 <sup>b</sup>	132,24 ± 1,00 <sup>c</sup>	147,12 ± 1,53 <sup>d</sup>
AGS*, %	32 <sup>a</sup>	34 <sup>b</sup>	34 <sup>b</sup>	32 <sup>a</sup>
AGMI*, %	38 <sup>c</sup>	37 <sup>b</sup>	37 <sup>b</sup>	35 <sup>a</sup>
AGPI*, %	31 <sup>c</sup>	29 <sup>b</sup>	28 <sup>a</sup>	31 <sup>c</sup>
AGPI/AGS	0,87	0,84	0,81	0,93
n3/n6	0,11	0,16	0,15	0,17

Valores promedios ± desviación estándar con diferentes letras en la misma fila son significativamente diferentes de acuerdo al análisis de la varianza ( $p < 0,05$ ).

\*Medidas realizadas con un desvío estándar medio de 0,06.

De acuerdo a lo esperado, la cocción redujo el contenido de agua. A pesar de esto, tanto los productos crudos como los cocidos presentaron valores de  $a_w$  comprendidos entre 0,94 y 0,95 a 25°C, no observándose diferencias significativas debidas al proceso de cocción o a la formulación. Los productos cárnicos estudiados presentan, por lo tanto, una  $a_w$  alta (Feiner, 2006), lo cual conducirá a la hidratación de los encapsulados (agregados en estado deshidratado) conforme se alcance el equilibrio entre los ingredientes. Este aspecto resulta clave en la evaluación de la estabilidad del aceite encapsulado en relación al estado físico de las cápsulas y por tanto, a su capacidad de protección (Garti y col., 2012).

En todas las formulaciones se observó un aumento en el contenido total de grasas respecto del producto crudo, debido a la deshidratación que se produce durante el proceso de cocción.

De todos modos, el producto cocido listo para consumo, presentó un contenido de grasas totales menor que lo especificado por el CAA para este tipo de alimento (20 g de grasa/100 g de producto). Para evitar errores asociados a la pérdida de peso por deshidratación, el efecto de la formulación en la retención de grasas se evaluó en términos del contenido de grasas totales en base seca. En este sentido, la cocción redujo las grasas totales, atribuyéndose esto a pérdidas por fusión y escurrimiento durante el tratamiento térmico (Bilek y col., 2009). El estado físico del aceite (libre o encapsulado) y la composición del material encapsulante afectaron el porcentaje de retención de grasas durante la cocción. Los sistemas control (H) y adicionados con aceite libre (H+AP) presentaron la menor retención de grasas siendo 88% y 84% respectivamente, mientras que las muestras adicionadas en aceite encapsulado, presentaron porcentajes de retención ligeramente superiores, siendo en H+AQ de 90% y en H+AQ-GAL de 93%. En H+AP las pérdidas post cocción podrían deberse al escurrimiento del aceite, favorecido en el tratamiento térmico por los bajos puntos de fusión de los aceites ricos en ácidos grasos insaturados (Scheeder y col., 2001). Así también, la incorporación de aceite podría conducir a una desestabilización de la emulsión cárnica, conduciendo a la separación y pérdida de la fracción grasa más fluida (Miklos y col., 2011). La encapsulación mejoró la retención de la grasas, siendo este efecto más evidente en presencia de GAL, lo cual es positivo, cuando la composición lipídica resulta de alto valor nutricional.

En forma complementaria, se examinó la composición de ácidos grasos en la fracción de aceite extraído de muestras crudas y cocidas, por cromatografía de gases de acuerdo con el método oficial AOAC (sección III.8.7.4).

Las formulaciones enriquecidas con aceite encapsulado presentaron luego de la cocción un mayor contenido de EPA y DHA, siendo la suma de ambos mayor en las muestras formuladas con AQ-GAL. En este sentido, la presencia de GAL contribuyó a la protección de EPA y DHA, utilizados como indicadores de calidad debido a su alto valor nutricional (Akhtar y col., 2010, Polavarapu y col., 2011).

Además del contenido de EPA y DHA, la proporción de AGS, AGM y AGPI y la relación AGPI/AGS y n3/n6, son también indicadores del valor nutricional muy utilizados en alimentos (Pelser y col., 2007, Bilek y col., 2009). En la muestra sin aceite agregado (H), la cocción condujo a una ligera reducción en el contenido de AGS. Cabe señalar que esta disminución en el contenido de AGS lleva al aumento relativo observado en el contenido de

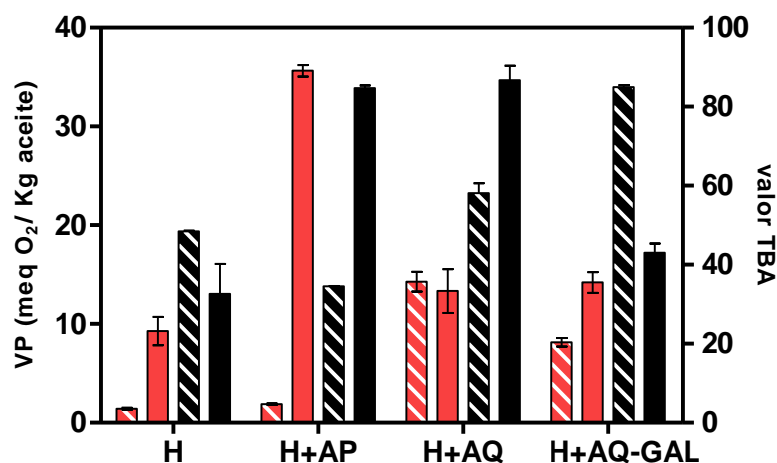
AGMI y AGPI. Resultados similares encontraron Scheeder y col. (2001) quienes atribuyeron la reducción de AGS, durante la cocción de hamburguesas, al escurrimiento principalmente de triglicéridos del tejido adiposo con alta proporción de ácidos grasos saturados. Observaron paralelamente que la proporción ácidos grasos insaturados aumentó, atribuyendo esto a la retención de los mismos en membranas celulares.

En las muestras enriquecidas con aceite de pescado (libre o encapsulado), se observó un aumento relativo en la fracción de AGS y una leve disminución en los contenidos de AGMI y AGPI por efecto de la cocción. En estos casos, la reducción de los ácidos grasos insaturados, podría deberse a la degradación oxidativa del aceite de pescado añadido, la cual se favorece por el efecto catalítico de la temperatura en el comienzo de la peroxidación lipídica (Bilek y col., 2009). La oxidación de los ácidos grasos insaturados más sensibles conduciría a una reducción de los mismos y a un aumento relativo de la fracción de AGS más estables a la oxidación (Berdeaux y col., 2012). Es evidente que los fenómenos de oxidación, junto con las pérdidas por escurrimiento que ocurren durante la cocción, dificultan el análisis de la variación del perfil lipídico.

Por otro lado, la relación AGPI/AGS fue mayor para la formulación H+AQ-GAL (0,93) que para H+AQ (0,81) y H+AP (0,84), indicando la que presencia de GAL contribuyó al mantenimiento de la calidad nutricional de los productos. De igual modo, la relación n3/n6 calculada para H+AQ-GAL (0,16) fue ligeramente superior que para H+AQ (0,15) y para H+AP (0,14). A partir de estos resultados se puede inferir que, además de la encapsulación del aceite, la presencia de GAL permitiría mejorar la retención de lípidos saludables y por lo tanto el valor nutricional de los productos cárnicos enriquecidos sometidos a cocción.

### **IV.3.2 Estabilidad oxidativa por efecto de la cocción**

En las distintas formulaciones desarrolladas se evaluó el cambio en los indicadores primarios (VP) y secundarios (valor de TBA) de la oxidación debidos al proceso de cocción (Figura IV.66). El estudio conjunto de ambos indicadores, antes y después del tratamiento térmico, permite obtener una visión integrada respecto de la estabilidad oxidativa y concluir sobre el efecto protector de las distintas matrices de encapsulación.



**Figura IV.66** Valor de peróxidos, VP (barra rayada) y valor de TBA (barra lisa) determinados en las hamburguesas crudas (rojo) y cocidas (negro). Hamburguesas no enriquecidas (H), enriquecidas con aceite libre (H+AP), enriquecidas con cápsulas de alginato-quitosano (H+AQ) y enriquecidas con cápsulas de alginato-quitosano-goma (H+AQ-GAL).

Se observa que las muestras crudas adicionadas con aceite encapsulado, presentaron mayores VP y menores valores de TBA que las muestras a las que se incorporó el aceite libre. Mayores valores de TBA indican una mayor proporción de productos secundarios de la oxidación resultantes de la descomposición de los hidroperóxidos reactivos (menores VP). Los resultados obtenidos (Figura IV.66) muestran que si bien en todas las hamburguesas crudas los valores obtenidos de VP y TBA indican cierto grado de oxidación, en la hamburguesa adicionada con el aceite libre los valores mayores de TBA (y menores VP) indican un mayor grado de oxidación del aceite. No se observaron diferencias significativas en el grado de oxidación entre las hamburguesas crudas adicionadas con AQ y AQ-GAL, siendo los valores VP y TBA más parecidos a los determinados en la hamburguesa no enriquecida.

La cocción produjo un aumento del VP en todos los sistemas, principalmente en H+AQ-GAL, donde el aceite estaba menos oxidado antes del tratamiento térmico respecto a las otras formulaciones. En los productos cocidos conteniendo el aceite encapsulado (H+AQ y H+AQ-GAL), se observó un aumento marcado de ambos indicadores de oxidación respecto de los productos crudos, como consecuencia de la alta temperatura requerida en el proceso (aproximadamente 80°C) (Valencia y col., 2008). El efecto de la cocción fue menos evidente en H+AP ya que el aceite se oxidó rápidamente durante la preparación de la hamburguesa,

antes de realizar la cocción. Se observa además, que el valor de TBA en las hamburguesas que fueron adicionadas con el aceite encapsulado en presencia de GAL, el valor de TBA fue menor que en H+AQ, lo cual indica una menor concentración de productos avanzados de oxidación en presencia de la goma, y por lo tanto, un mayor estabilidad del aceite. El valor de TBA en H+AQ-GAL fue ligeramente superior al determinado en la muestra control, no enriquecida con AGPI.

En las condiciones de alta humedad del producto estudiado, los encapsulados probablemente pierden su estructura y capacidad para retener el aceite, por lo cual los compuestos antioxidantes presentes en la goma podrían contribuir a la mayor estabilidad observada. Ansorena y col. (2013), señalan que es necesario agregar antioxidantes cuando se formulan productos cárnicos enriquecidos con AGPI n3, especialmente cuando son sometidos a cocción. En este sentido una alternativa para disminuir la oxidación en los productos estudiados sería aumentar la proporción de GAL o de otros compuestos antioxidantes en la fracción lipídica antes de realizar la encapsulación.

Si bien, la incorporación de aceites ricos en AGPI en matrices de polielectrolitos con GAL, permitió mejorar el valor nutricional y la estabilidad por cocción, la adición de nutrientes encapsulados podría afectar drásticamente a las propiedades sensoriales de los alimentos en los que se introducen como suplemento (Jiménez-Colmenero, 2007). Por este motivo, y como estudio preliminar, se evaluó el efecto de la incorporación de encapsulados sobre el color y la textura de las hamburguesas cocidas, mediante métodos instrumentales.

La determinación del color se realizó por medio de un fotocolorímetro de reflectancia difusa descrito en la sección III.6.10. En la Tabla 17 se presentan las coordenadas cromáticas L\*, a\* y b\* determinadas para la formulaciones cárnicas cocidas y la diferencia total de color ( $\Delta E$ ) calculada en relación a la muestra control (sin aceite agregado).

Los valores de las coordenadas cromáticas L\*, a\* y b\*, no mostraron diferencias significativas entre las formulaciones enriquecidas con aceite (libre o encapsulado) y la muestra control. El valor de  $\Delta E$  resultó inferior en todos los casos a 2,3, límite que se ha establecido para indicar diferencias perceptibles (Taylor, 2004). De acuerdo con la evaluación instrumental del color, el enriquecimiento con aceite libre o encapsulado no sería percibido. Sin embargo, se observó que este método presentó limitaciones, en tanto las

muestras adicionadas con aceite encapsulado presentaron un aspecto heterogéneo fácilmente perceptible en forma visual.

**Tabla 17.** Parámetros  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  hamburguesa cocidas con aceite de pescado libre (H+AP), hamburguesa con cápsulas de alginato-quitosano (H-AQ) y hamburguesas con cápsulas de alginato-quitosano-goma (AQ-GAL).

	H	H+FO	H+AQ	H+AQ-G
$L^*$	54,70±0,64 <sup>a</sup>	55,28±0,26 <sup>a</sup>	55,98±1,49 <sup>a</sup>	56,40±1,35 <sup>a</sup>
$a^*$	4,75±0,06 <sup>a</sup>	4,88±0,15 <sup>a</sup>	4,88±0,21 <sup>a</sup>	4,68± 0,13 <sup>a</sup>
$b^*$	9,45±0,06 <sup>a,b</sup>	9,40±0,22 <sup>a,b</sup>	9,20±0,14 <sup>a</sup>	9,63±0,15 <sup>b</sup>
$\Delta E$	-	0,65±0,18 <sup>a</sup>	1,54±1,09 <sup>a,b</sup>	1,86±0,99 <sup>b</sup>

Valores promedios  $\pm$  desviación estándar con diferentes letras en la misma fila son significativamente diferentes de acuerdo al análisis de la varianza ( $p < 0,05$ ).

Las cápsulas AQ y AQ-GAL conteniendo el aceite se introdujeron en estado deshidratado en la mezcla de ingredientes, y conservaron en la formulación cruda la coloración y translucidez descrita en secciones anteriores para estos sistemas. En los productos cocidos (Figura IV.67), la apariencia de los encapsulados se modificó debido probablemente a que se rehidrataron en contacto con los jugos de la matriz alimentaria, y adquirieron un aspecto opaco y blanquecino similar al de los hidrogeles antes de la deshidratación al vacío (Figura IV.42).



**Figura IV.67.** Apariencia de hamburguesas cocidas sin enriquecer (A) y con el agregado de cápsulas de polielectrolitos conteniendo aceite de pescado (B).



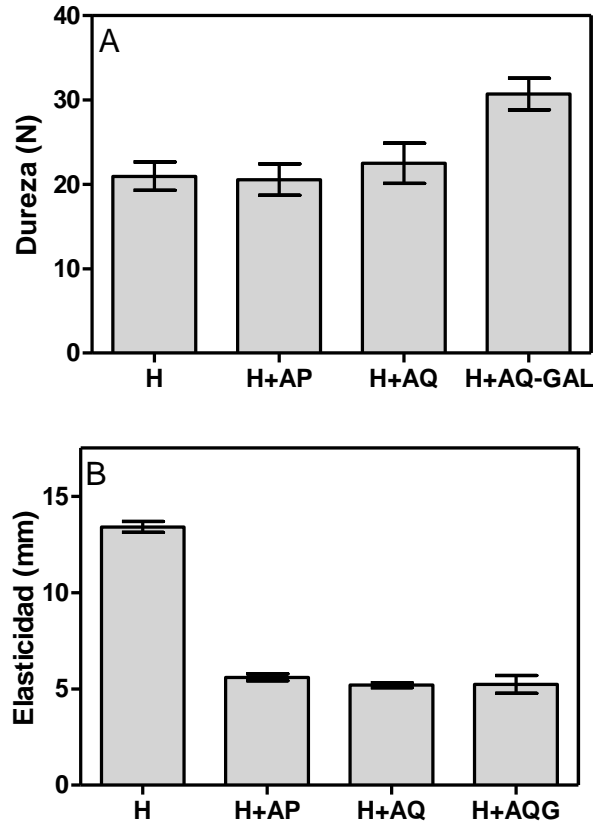
La propiedad de rehidratación de los encapsulados de alginato- $\text{Ca}^{2+}$  ha sido ampliamente reportada (Chan y col., 2009a, Rayment y col., 2009), asociándose esta característica a numerosos aspectos positivos. Sin embargo, las propiedades de absorción e hinchamiento, con eventuales cambios en los atributos del aspecto del alimento al que se incorporan los encapsulados, podrían conducir a una rápida percepción por parte del consumidor, afectando la aceptabilidad del producto (Garti y col., 2012). En este sentido, la incorporación de cápsulas de alginato con fines de fortificación, plantea el desafío de reducir el impacto visual, ya sea por coloración de los encapsulados, o bien por reducción del tamaño.

Debido a que las hamburguesas contienen una proporción de grasa mayor que la carne, las propiedades texturales pueden ser muy sensibles a las variaciones en la composición de la fracción grasa y en especial cuando se modifica intencionalmente el perfil de lípidos (Scheeder y col., 2001). La textura es un aspecto importante de la calidad de los productos cárnicos e incluso, algunas veces, más importante que el color, aspecto o sabor. En este sentido, se estudiaron las propiedades texturales de las hamburguesas cocidas a través de un ensayo instrumental del perfil de textura (APT), a partir del cual se determinó que los parámetros dureza (Figura IV.68 A), y elasticidad (Figura IV.68 B) fueron sensibles a los cambios de composición de las hamburguesas. La masticabilidad, cohesividad y firmeza (datos no mostrados) no presentaron diferencias significativas con la composición.

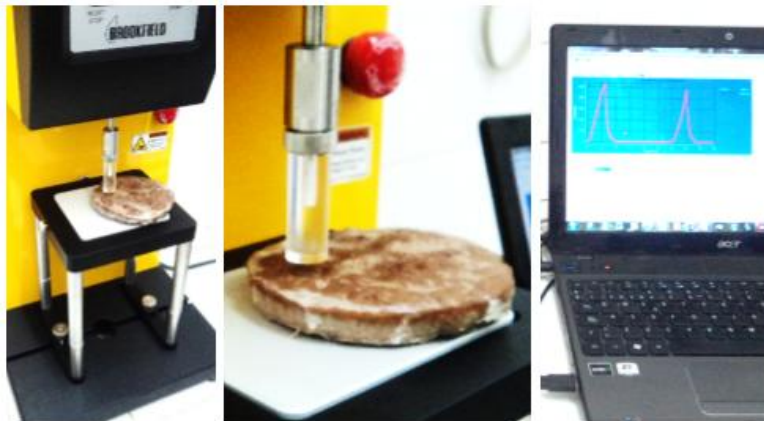
La incorporación de cápsulas de polielectrolitos con GAL condujo a un aumento en la dureza de la hamburguesa respecto de la muestra control (sin aceite) y de la enriquecida con aceite libre. La formulación H+AQ presentó un valor de dureza intermedio. La dureza se ha relacionado en productos cárnicos con las pérdidas post cocción y en especial con el aumento en el contenido de sólidos (Scheeder y col., 2001, Yi y col., 2012). Sin embargo, en los estudios realizados previamente no se observaron diferencias en la humedad de las formulaciones, por lo tanto, la mayor dureza observada en los sistemas que contenían la goma podría atribuirse al estado hidratado de las cápsulas y su efecto en la resistencia a la deformación.

La muestra control presentó una mayor elasticidad respecto de las enriquecidas con aceite libre o encapsulado. Scheeder y col. (2001) encontraron una evidente relación entre los valores de elasticidad y el grado de contracción de las muestras durante el proceso de cocción, considerándose este efecto proporcional al contenido de colágeno. La formación de una red

de proteínas podría resultar interrumpida por la adición de aceite y/o de encapsulados resultando por tanto en estructuras menos compactas y menos elásticas.



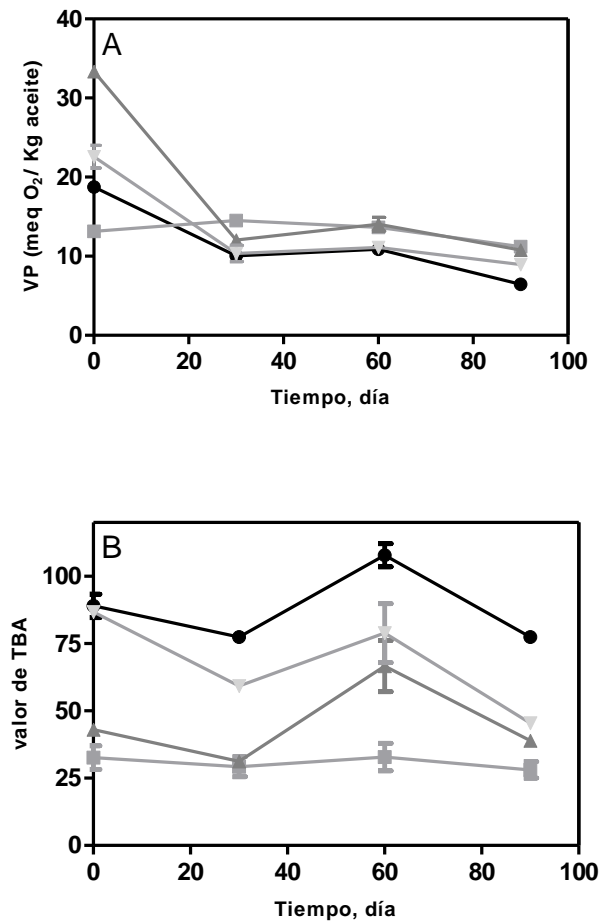
**Figura IV.68** Dureza (A) y elasticidad (B) determinadas por análisis de perfil de textura en hamburguesas cocidas no enriquecidas (H), enriquecidas con aceite libre (H+AP), enriquecidas con cápsulas de alginato-quitosano (H+AQ) y enriquecidas con cápsulas de alginato-quitosano-goma (H+AQ-GAL).



**Figura IV.69.** Imágenes del análisis instrumental de textura en los productos cárnicos.

### IV.3.3 Efecto del almacenamiento congelado y cocción

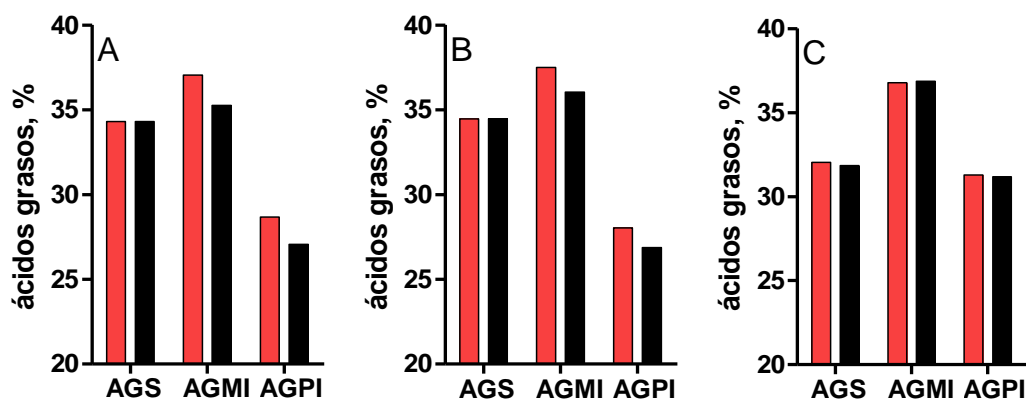
La estabilidad oxidativa de los productos cárnicos desarrollados se estudió en condiciones normales de almacenamiento congelado ( $-18^{\circ}\text{C}$  en freezer doméstico), determinando los productos de oxidación primaria y secundaria (VP y valor de TBA). Las hamburguesas se sacaron del freezer, se sometieron a cocción ( $220^{\circ}\text{C}$ , 15 min) y se determinaron los índices de oxidación. En la Figura IV.70 se muestra la variación del valor de peróxidos y del valor de TBA en función del tiempo de almacenamiento a  $-18^{\circ}\text{C}$ .



**Figura IV.70** Variación del valor de peróxidos (A) y valor de TBA (B), en función del tiempo de almacenamiento ( $-18^{\circ}\text{C}$ ) de hamburguesas crudas y posteriormente cocidas ( $200^{\circ}\text{C}$ , 15 min) adicionadas con aceite libre (●), aceite encapsulado en AQ (▼) y aceite encapsulado en AQ-GAL (▲). Hamburguesa no enriquecida cocida (■).

En las hamburguesas no enriquecidas, no se detectaron cambios apreciables en los índices de oxidación. La incorporación del aceite (rico en AGPI), libre o encapsulado, aumentó la susceptibilidad a la oxidación de las hamburguesas (Valencia y col., 2008). En las muestras enriquecidas con aceite, el VP disminuyó rápidamente en los primeros 30 días de almacenamiento (Figura IV.70 A). La disminución del VP se correspondió, en todos los casos, con un aumento simultáneo del valor de TBA (Figura IV.70 B), alcanzándose mayores valores en el sistema enriquecido con el aceite libre, más sensible a la oxidación. Los sistemas H+AQ-GAL presentaron los menores valores de TBA, lo cual indicaría un menor deterioro del aceite en este sistema. Salcedo-Sandoval y col. (2015), observaron también una reducción en el VP y un aumento proporcional en la concentración de productos secundarios de la oxidación durante el almacenamiento refrigerado de hamburguesas enriquecidas con aceite de pescado libre o emulsionado en presencia de caseinato de sodio y pectina

Paralelamente a los estudios de estabilidad oxidativa, se estudió la variación del perfil de ácidos grasos de las muestras enriquecidas durante el almacenamiento a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . En la Figura IV.71 se muestra el contenido de ácidos grasos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) y poliinsaturados (AGPI) luego del almacenamiento en freezer (90 días) y cocción.



**Figura IV.71** Variación del contenido de ácidos grasos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) y poliinsaturados (AGPI) por efecto del almacenamiento en H+AP (A) H+AQ (B) y H+AQ-GAL (C). Productos cocidos al tiempo 0 (rojo). Productos cocidos al día 90 (negro).

Los resultados se compararon con el contenido de ácidos grasos determinado en la muestra congelada y cocida al día 0. Para evaluar sólo el efecto del almacenamiento congelado, la fracción de ácidos grasos se calculó manteniendo constante la fracción de ácidos grasos

saturados determinada para la muestra cocida sin congelar, de acuerdo a lo propuesto por Berdeaux y col. (2012).

Se observó que el contenido de AGMI y AGPI disminuyó durante el congelado, principalmente en las muestras adicionadas con aceite libre y con cápsulas AQ. Las muestras enriquecidas con AQ-GAL conservaron la proporción de AGMI y AGPI respecto a la muestra al tiempo 0.

Por lo tanto, el uso de GAL como material de pared en sistemas de encapsulación por gelación iónica permitió disminuir el deterioro oxidativo del aceite, observado tanto por cocción como por el almacenamiento en condiciones de congelación. Para lograr un mayor grado de protección frente a los fenómenos oxidativos, principalmente en sistemas conteniendo ácidos grasos sensibles, se podría pensar en aumentar la proporción de GAL en el sistema y/o incorporar otros antioxidantes para lograr una mejor estabilidad del aceite encapsulado.

## **V. CONCLUSIONES**

---

## V. CONCLUSIONES

A partir del presente trabajo de tesis se alcanzaron las siguientes conclusiones:

La goma exudada de *Prosopis alba* (GAL) es un recurso natural actualmente desaprovechado. Su recolección y acondicionamiento encuentra especiales ventajas en una región con gran abundancia de la especie productora. La purificación por filtración y liofilización, permite la obtención de un producto en polvo que comparte características fisicoquímicas comunes con la goma arábiga, GA (*Acacia senegal*, *A. seyal*), ampliamente utilizada en la industria alimentaria y farmacéutica.

Se determinó que GAL está compuesta principalmente por carbohidratos de alto y bajo peso molecular, principalmente arabinosa, galactosa y ácidos urónicos que le confieren características de polielectrolito. En comparación con otras gomas exudadas, presenta una mayor proporción de proteínas, lo cual advierte interesantes propiedades funcionales, especialmente en sistemas heterofásicos, debido al carácter anfifílico de las fracciones proteicas. Contiene además, compuestos polifenólicos (flavonoides, taninos y proantocianidinas) que amplían la funcionalidad de este biomaterial, especialmente para aquellas aplicaciones en las que la actividad antioxidante resulte de interés. Los estudios realizados por RMN y FTIR evidenciaron que la estructura molecular de GAL es compleja, con varios puntos de similitud con GA.

Los estudios de evaluación de toxicidad aguda *in vivo*, no evidenciaron efectos adversos de la goma, contribuyendo estos resultados a considerar su potencial aplicación como componente de sistemas alimentarios, sentando un antecedente importante para su incorporación como aditivo en la legislación alimentaria Argentina.

El estudio de las propiedades funcionales de GAL, complementó el estudio de sus características fisicoquímicas y estructurales y permitió ampliar el conocimiento de la goma para evaluar sus posibles aplicaciones tomando como referencia a la goma arábiga. A partir de los estudios realizados, se concluye que GAL es un hidrocoloide que se hidrata rápidamente alcanzando altos niveles de solubilidad lo cual permite su utilización en sistemas acuosos. Hasta concentraciones de 40% p/v, las soluciones de GAL muestran un comportamiento de flujo pseudoplástico con viscosidades aparentes ligeramente mayores

que GA, pero muy inferiores en comparación con gomas obtenidas de semillas, lo cual plantea su uso para aquellas aplicaciones en las que se requiera una alta concentración de sólidos y bajas viscosidades, como es el caso de la microencapsulación por atomización.

En emulsiones aceite/agua, GAL reduce la tensión interfacial con mayor rapidez que GA, incluso a pesar de su mayor volumen hidrodinámico. Forma en la interfase un film viscoelástico estable, con una distribución de cargas suficiente para evitar el agregado de gotas. GAL evidencia buenas propiedades emulsificantes y mayor capacidad para estabilizar emulsiones que GA, considerada un agente emulsionante de referencia.

Los compuestos fenólicos naturalmente presentes en GAL aportaron buena capacidad antioxidante a la goma en los ensayos *in vitro*, evaluada en términos de distintos mecanismos (capacidad antirradicalaria por el ensayo de ABTS<sup>+</sup>, inhibición del radical OH<sup>•</sup>, poder reductor y capacidad quelante de metales prooxidantes). La capacidad antioxidante de la goma representa una ventaja adicional interesante respecto a otros hidrocoloides, principalmente en sistemas conteniendo ácidos grasos poliinsaturados.

Se observó que GAL presenta propiedades de sorción de agua y plastificación similares a otros hidrocoloides hidrofílicos. En comparación con GA, la goma exudada de *P. alba* liofilizada, presenta mayores valores de  $T_g$ , lo cual evidencia la mayor estabilidad física de los sistemas formulados con la goma. Los diagramas de estado  $T_g$ - $a_w$ -contenido de agua resultaron útiles para definir las mejores condiciones de humedad y temperatura para conservar los sistemas en estado amorfo.

A partir de los diagramas de fases GAL-alginato y GAL-alginato- $Ca^{2+}$  se observó que a bajas concentraciones GAL forma con el alginato dispersiones completamente miscibles sin interferir en el proceso de gelación en presencia de  $Ca^{2+}$ . GAL y alginato actúan en forma sinérgica en la preparación y estabilización de las emulsiones garantizando la correcta homogenización del activo durante la etapa de goteo.

Las cápsulas de alginato-goma recubiertas con quitosano y deshidratadas por secado al vacío retuvieron mejor el aceite encapsulado y ofrecieron mayor protección frente a la oxidación térmica que las liofilizadas, probablemente debido a la estructura más compacta observada por SEM de las capsulas secadas al vacío. Los espectros FTIR, pusieron de manifiesto las interacciones moleculares de GAL con los demás polielectrolitos (alginato,



quitosano) sugiriendo que GAL actuaría como agente de relleno, contribuyendo a la formación de una matriz densa que retiene físicamente al aceite.

La incorporación de GAL mejoró las propiedades de las cápsulas de alginato-quitosano al reducir la fracción de aceite superficial y aumentar el rendimiento y la eficiencia del proceso de encapsulación. La presencia de la goma afectó la apariencia de los encapsulados, aumentando ligeramente el tamaño y modificando sus propiedades ópticas.

La naturaleza hidrofílica de GAL modificó las propiedades de interacción de los encapsulados con el agua y la capacidad de protección de la matriz de polielectrolitos. En presencia de la goma las cápsulas fueron menos susceptibles a la plastificación, ampliando el rango de  $a_w$  en que se puede almacenar en estado amorfo ( $a_w < 0,52$ ). En estas condiciones, la presencia de GAL favorece la retención del aceite en la estructura interna y reduce el grado de deterioro oxidativo. A altas  $a_w$ , las reacciones de oxidación se aceleran e inducen cambios en el aspecto (color y transparencia) de los encapsulados.

A bajas  $a_w$ , la presencia de GAL mejoró la estabilidad oxidativa del aceite encapsulado, reduciéndose la formación de hidroperóxidos y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. De esta manera, la incorporación de la goma contribuyó también a conservar el perfil de ácidos grasos del aceite y por lo tanto, su valor nutricional. La capacidad de protección de GAL se atribuyó a una mejor conservación de la estructura de la cápsula, así como también al aporte de las sustancias antioxidantes naturalmente presentes.

Se evaluó la posibilidad de utilizar los encapsulados deshidratados conteniendo aceite de pescado y GAL, como ingredientes para enriquecer con AGPI n3 un producto cárnico tipo hamburguesa. Las hamburguesas enriquecidas fueron más estables a la oxidación por cocción y durante el almacenamiento en condiciones de congelación. El valor nutricional del producto cocido, enriquecido con el aceite encapsulado en presencia de GAL, mejoró cualitativamente respecto de los sistemas control (enriquecidos con aceite libre o encapsulado sin GAL). La incorporación de los encapsulados afectó las características de color y textura de las hamburguesas cocidas.

En términos generales, se demostró que la introducción de GAL como material de pared permite mejorar los sistemas de encapsulación por gelificación iónica, siendo una alternativa innovadora para la protección de lípidos en el diseño de ingredientes funcionales. El estudio integral de las propiedades físico-químicas y funcionales advierten que la goma exudada de

*Prosopis alba* presenta un gran potencial tecnológico, tanto para su empleo como agente emulsificante y/o estabilizante, como así también para el desarrollo de nuevos sistemas de encapsulación, con los beneficios adicionales que derivan del uso de una fuente autóctona actualmente no utilizada y renovable.

---

## Publicaciones surgidas de la presente tesis

### 1. Publicaciones

- ✓ *Prosopis alba* exudate gum as excipient for improving fish oil stability in alginate-chitosan beads. Vasile FE, Romero AM, Judis MA, Mazzobre MF. Food Chemistry. 2015. 190:1093-1101.
- ✓ *Physicochemical, interfacial and emulsifying properties of a non-conventional exudate gum (Prosopis alba) in comparison with gum arabic*. Vasile FR, Martínez, Pizones Ruiz-Henestrosa VM, Judis, MA Mazzobre MF. Food Hydrocolloids. 2016. 56: 245-253.

### 2. Trabajos publicados en actas de reuniones científicas nacionales e internacionales

- ✓ Efecto de la goma exudada de *Prosopis alba* sobre las propiedades de sorción y de transición vítrea de cápsulas de polielectrolitos conteniendo aceite de pescado, Vasile FE, Romero AM, Judis MA, Mazzobre MF. World congress on oils and fats and 31st ISF lectureship series.
- ✓ Estudio comparativo de las propiedades fisicoquímicas y emulsionantes de la goma exudada de *Prosopis alba* con goma arábica, F. E. Vasile, M. J. Martínez; V. M. Pizones Ruiz-Henestrosa; M. A. Judis; M. F. Mazzobre. XV Congreso argentino de ciencia y tecnología de los alimentos.
  - ✓ Purificación y caracterización fisicoquímica de la goma exudada del algarrobo blanco (*Prosopis alba*) del NEA. Vasile, FE; Judis, MA; Mazzobre MF. II Jornadas de investigación en ingeniería del NEA y países limítrofes.

## **IV. BIBLIOGRAFÍA**

---

**VI. BIBLIOGRAFÍA**

- A. Bos, M. y T. van Vliet (2001). "Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: a review." Advances in Colloid and Interface Science **91**(3): 437-471.
- Abang, S., E.-S. Chan y D. Poncelet (2012). "Effects of process variables on the encapsulation of oil in ca-alginate capsules using an inverse gelation technique." Journal of Microencapsulation **29**(5): 417-428.
- Abed El Kader, D., E. Molina, G. Colina, L. Montero y G. León de Pinto (2003). "Cationic composition and the tannin content of five gums from Venezuelan Mimosaceae species." Food Hydrocolloids **17**(3): 251-253.
- Acedo-Carrillo, J. I., A. Rosas-Durazo, R. Herrera-Urbina, M. Rinaudo, F. M. Goycoolea y M. A. Valdez (2006). "Zeta potential and drop growth of oil in water emulsions stabilized with mesquite gum." Carbohydrate Polymers **65**(3): 327-336.
- Adamiec, J. y D. Kalemba (2006). Microencapsulation of peppermint oil during spray drying. Proceedings of the XIVth International Workshop on Bioencapsulation.
- Aghbashlo, M., H. Mobli, A. Madadlou y S. Rafiee (2012). "The correlation of wall material composition with flow characteristics and encapsulation behavior of fish oil emulsion." Food Research International **49**(1): 379-388.
- Aguilera, J., J. del Valle y M. Karel (1995). "Caking phenomena in amorphous food powders." Trends in Food Science & Technology **6**(5): 149-155.
- Akhtar, M. J., M. Jacquot, E. Arab-Tehrany, C. Gañani, M. Linder y S. Desobry (2010). "Control of salmon oil photo-oxidation during storage in HPMC packaging film: Influence of film colour." Food Chemistry **120**(2): 395-401.
- Al Assaf, S., G. O. Phillips y P. A. Williams (2005). "Studies on acacia exudate gums. Part I: the molecular weight of Acacia senegal gum exudate." Food Hydrocolloids **19**(4): 647-660.
- Alam, M. N., N. J. Bristi y M. Rafiquzzaman (2013). "Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity." Saudi Pharmaceutical Journal **21**(2): 143-152.
- Alfrén, J., J. M. Peñarrieta, B. Bergenståhl y L. Nilsson (2012). "Comparison of molecular and emulsifying properties of gum arabic and mesquite gum using asymmetrical flow field-flow fractionation." Food Hydrocolloids **26**(1): 54-62.
- Alhamdan, A. M. y B. H. Hassan (1999). "Water sorption isotherms of date pastes as influenced by date cultivar and storage temperature." Journal of Food Engineering **39**(3): 301-306.
- Anderson, D. M. W. y J. G. K. Farquhar (1982). "GUM EXUDATES FROM THE GENUS PROSOPIS." International Tree Crops Journal **2**(1): 15-24.
- Anderson, D. M. W. y N. A. Morrison (1989a). "The characterization of four proteinaceous Acacia gums which are not permitted food additives." Food Hydrocolloids **3**(1): 57-63.
- Anderson, D. M. W. y W. Weiping (1989b). "The characterization of proteinaceous Prosopis (mesquite) gums which are not permitted food additives." Food Hydrocolloids **3**(3): 235-242.
- Andres-Brull, M., I. G. Abdalla, J. Cirre, J. Edwards, M. E. Osman, G. O. Phillips y S. Al-Assaf (2015). "Studies on acacia gums: Part VII effect of exudates form and tree age on the characteristics of Acacia seyal var. seyal and Acacia seyal var. fistula." Food Hydrocolloids **45**(0): 279-285.

- Ansorena, D. y I. Astiasaran (2004). "The use of linseed oil improves nutritional quality of the lipid fraction of dry-fermented sausages." Food Chemistry **87**(1): 69-74.
- Ansorena, D. y I. Astiasarán (2013). 10 - Enrichment of meat products with omega-3 fatty acids by methods other than modification of animal diet. Food Enrichment with Omega-3 Fatty Acids. C. Jacobsen, N. S. Nielsen, A. F. Horn y A.-D. M. Sørensen, Woodhead Publishing: 299-318.
- Arab-Tehrany, E., M. Jacquot, C. Gaiani, M. Imran, S. Desobry y M. Linder (2012). "Beneficial effects and oxidative stability of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids." Trends in Food Science & Technology **25**(1): 24-33.
- Arancibia, M. Y., M. E. López-Caballero, M. C. Gómez-Guillén, M. Fernández-García, F. Fernández-Martín y P. Montero (2015). "Antimicrobial and rheological properties of chitosan as affected by extracting conditions and humidity exposure." LWT - Food Science and Technology **60**(2, Part 1): 802-810.
- Arihara, K. (2006). "Strategies for designing novel functional meat products." Meat Science **74**(1): 219-229.
- Augustin, M., L. Sanguansri, E. Decker, R. Elias y D. McClements (2010). "Use of encapsulation to inhibit oxidation of lipid ingredients in foods." Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications. Volume 2: Management in different industry sectors: 479-495.
- Babak, V. G., J. Desbrières y V. E. Tikhonov (2005). "Dynamic surface tension and dilational viscoelasticity of adsorption layers of a hydrophobically modified chitosan." Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **255**(1-3): 119-130.
- Balboa, E. M., E. Conde, A. Moure, E. Falqué y H. Domínguez (2013). "In vitro antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae." Food chemistry **138**(2): 1764-1785.
- Barbosa-Cánovas, G. y P. Juliano (2005). "Physical and chemical properties of food powders." FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER- **146**: 39.
- Bazardeh, M. E. y M. Esmaili (2014). "Sorption isotherm and state diagram in evaluating storage stability for sultana raisins." Journal of Stored Products Research **59**: 140-145.
- Bell, L. N. y M. J. Hageman (1994). "Differentiating between the effects of water activity and glass transition dependent mobility on a solid state chemical reaction: aspartame degradation." Journal of Agricultural and Food Chemistry **42**(11): 2398-2401.
- Bell, L. N. y T. P. Labuza (2000). Moisture sorption: practical aspects of isotherm measurement and use, American Association of Cereal Chemists.
- Bellesi, F. A., V. M. Pizones Ruiz-Henestrosa y A. M. R. Pilosof (2014). "Behavior of protein interfacial films upon bile salts addition." Food Hydrocolloids **36**(0): 115-122.
- BeMiller, J. N. y K. C. Huber (2007). Chapter 3: Carbohydrates. Fenema's Food Chemistry Fourth Edition 83 - 154
- Berdeaux, O., S. Marmesat, J. Velasco y M. C. Dobarganes (2012). "Apparent and quantitative loss of fatty acids and triacylglycerols at frying temperatures." grasas y aceites **63**(3): 284-289.
- Beristain, C. I., E. Azuara, H. S. Garcia y E. J. Vernon-Carter (1996). "Kinetic model for water/oil absorption of mesquite gum (*Prosopis juliflora*) and gum arabic (*Acacia senegal*)." International journal of food science & technology **31**(5): 379-386.

- Beristain, C. I., E. Azuara y E. J. Vernon-Carter (2002). "Effect of Water Activity on the Stability to Oxidation of Spray-Dried Encapsulated Orange Peel Oil Using Mesquite Gum (*Prosopis Juliflora*) as Wall Material." Journal of Food Science **67**(1): 206-211.
- Beverung, C. J., C. J. Radke y H. W. Blanch (1999). "Protein adsorption at the oil/water interface: characterization of adsorption kinetics by dynamic interfacial tension measurements." Biophysical Chemistry **81**(1): 59-80.
- Bhandari, B. y T. Howes (1999). "Implication of glass transition for the drying and stability of dried foods." Journal of Food Engineering **40**(1): 71-79.
- Bhattarai, R. S., N. V. Dhandapani y A. Shrestha (2011). "Drug delivery using alginate and chitosan beads: An Overview." Chronicles of Young Scientists **2**(4): 192.
- Bilek, A. E. y S. Turhan (2009). "Enhancement of the nutritional status of beef patties by adding flaxseed flour." Meat science **82**(4): 472-477.
- Biswas, B., S. Biswas y G. Phillips (2000). "The relationship of specific optical rotation to structural composition for Acacia and related gums." Food Hydrocolloids **14**(6): 601-608.
- Bligh, E. G. y W. J. Dyer (1959). "A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION." Canadian Journal of Biochemistry and Physiology **37**(8): 911-917.
- Bonilla, E., E. Azuara, C. Beristain y E. Vernon-Carter (2010). "Predicting suitable storage conditions for spray-dried microcapsules formed with different biopolymer matrices." Food Hydrocolloids **24**(6): 633-640.
- Botrel, D. A., R. V. de Barros Fernandes, S. V. Borges y M. I. Yoshida (2014). "Influence of wall matrix systems on the properties of spray-dried microparticles containing fish oil." Food Research International **62**(0): 344-352.
- Brunauer, S., P. H. Emmett y E. Teller (1938). "Adsorption of Gases in Multimolecular Layers." Journal of the American Chemical Society **60**(2): 309-319.
- Buera, M., A. Farroni y L. Agudelo-Laverde (2015). Water and Food Appearance. Water Stress in Biological, Chemical, Pharmaceutical and Food Systems, Springer: 27-39.
- Cai, Y. y H. Corke (2000). "Production and properties of spray-dried *Amaranthus betacyanin* pigments." JOURNAL OF FOOD SCIENCE-CHICAGO- **65**(7): 1248-1252.
- Calvo, P., Á. L. Castaño, M. Lozano y D. González-Gómez (2012). "Influence of the microencapsulation on the quality parameters and shelf-life of extra-virgin olive oil encapsulated in the presence of BHT and different capsule wall components." Food Research International **45**(1): 256-261.
- Camino, N. A. y A. M. R. Pilosof (2011). "Hydroxypropylmethylcellulose at the oil-water interface. Part II. Submicron-emulsions as affected by pH." Food Hydrocolloids **25**(5): 1051-1062.
- Cano-Chauca, M., P. Stringheta, A. Ramos y J. Cal-Vidal (2005). "Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization." Innovative Food Science & Emerging Technologies **6**(4): 420-428.
- Cardozo, M. L., R. M. Ordoñez, I. C. Zampini, A. S. Cuello, G. Dibenedetto y M. I. Isla (2010). "Evaluation of antioxidant capacity, genotoxicity and polyphenol content of non conventional foods: *Prosopis* flour." Food Research International **43**(5): 1505-1510.
- Carocho, M. y I. C. F. R. Ferreira (2013). "A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives." Food and Chemical Toxicology **51**(0): 15-25.

- Carp, D., J. Wagner, G. Bartholomai y A. Pilosof (1997). "Rheological method for kinetics of drainage and disproportionation of soy proteins foams." Journal of food science **62**(6): 1105-1109.
- Cassini, A., L. Marczak y C. Noreña (2006). "Water adsorption isotherms of texturized soy protein." Journal of Food Engineering **77**(1): 194-199.
- Cedres, J. F. (2013). "Effect of Fish Oil on the Concentration of Fatty Acids from Fat Layer of Buffaloes (*Bubalus bubalis*)." REVISTA CIENTIFICA **23**(3).
- Çetinus, Ş. A., E. Şahin y D. Saraydin (2009). "Preparation of Cu (II) adsorbed chitosan beads for catalase immobilization." Food Chemistry **114**(3): 962-969.
- Clamens, C., G. León de Pinto, F. Rincón y A. Vera (1998). "Exudados gomosos de plantas localizadas en Maracaibo, Venezuela." Revista de la Facultad de Agronomía **103**.
- Committee, F. W. E. (1994). "Fats and oils in human nutrition." Food and Nutrition Paper(57): 49-55.
- Córdoba, A. L., L. Deladino y M. Martino (2013). "Effect of starch filler on calcium-alginate hydrogels loaded with yerba mate antioxidants." Carbohydrate polymers **95**(1): 315-323.
- Correa, R. M. (2003). Preparo e caracterização de microcapsulas obtidas por polimerização ionica para alimentação de larvas de peixe, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Faculdade de Engenharia de Alimentos.
- Chan, A. W. y R. J. Neufeld (2009a). "Modeling the controllable pH-responsive swelling and pore size of networked alginate based biomaterials." Biomaterials **30**(30): 6119-6129.
- Chan, E.-S. (2011). "Preparation of Ca-alginate beads containing high oil content: Influence of process variables on encapsulation efficiency and bead properties." Carbohydrate Polymers **84**(4): 1267-1275.
- Chan, E.-S., B.-B. Lee, P. Ravindra y D. Poncet (2009b). "Prediction models for shape and size of ca-alginate macrobeads produced through extrusion–dripping method." Journal of colloid and interface science **338**(1): 63-72.
- Chan, L., L. Lim y P. Heng (2000). "Microencapsulation of oils using sodium alginate." Journal of microencapsulation **17**(6): 757-766.
- Chang, C. P. y T. Dobashi (2003). "Preparation of alginate complex capsules containing eucalyptus essential oil and its controlled release." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **32**(3): 257-262.
- Cheatham, C. L., J. Colombo y S. E. Carlson (2006). "n- 3 Fatty acids and cognitive and visual acuity development: methodologic and conceptual considerations." The American journal of clinical nutrition **83**(6): S1458-1466S.
- d'Arcy, R. y I. Watt (1970). "Analysis of sorption isotherms of non-homogeneous sorbents." Transactions of the Faraday Society **66**: 1236-1245.
- Damodaran, S. y K. B. Song (1988). "Kinetics of adsorption of proteins at interfaces: role of protein conformation in diffusional adsorption." Biochim Biophys Acta **954**(3): 253-264.
- Das, R., S. Biswas, R. Bandyopadhyay y P. Pramanik (2013). "Polymerized linseed oil coated quartz crystal microbalance for the detection of volatile organic vapours." Sensors and Actuators B: Chemical **185**(0): 293-300.
- Deladino, L., P. S. Anbinder, A. S. Navarro y M. N. Martino (2008). "Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*." Carbohydrate Polymers **71**(1): 126-134.



- Delgobo, C. L., P. A. Gorin, C. A. Tischer y M. Iacomini (1999). "The free reducing oligosaccharides of angico branco (*Anadenantheracolubrina*) gum exudate: an aid for structural assignments in the heteropolysaccharide." Carbohydrate research **320**(3): 167-175.
- Desai, K. G. H. y H. Jin Park (2005). "Recent developments in microencapsulation of food ingredients." Drying technology **23**(7): 1361-1394.
- Desobry, S., F. Netto y T. Labuza (1999). "INFLUENCE of MALTODEXTRIN SYSTEMS ATAN EQUIVALENT 25DE ON ENCAPSULATED  $\beta$ -CAROTENE LOSS DURING STORAGE." Journal of food processing and preservation **23**(1): 39-55.
- Dickinson, E. (2001). "Milk protein interfacial layers and the relationship to emulsion stability and rheology." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **20**(3): 197-210.
- Dickinson, E. (2003). "Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems." Food Hydrocolloids **17**(1): 25-39.
- Dickinson, E. (2009). "Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers." Food Hydrocolloids **23**(6): 1473-1482.
- Dickinson, E. (2011). "Mixed biopolymers at interfaces: Competitive adsorption and multilayer structures." Food Hydrocolloids **25**(8): 1966-1983.
- Dimitri, M. J. (2004). "Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. Tomo I."
- Dinis, T. C., V. M. Madeira y L. M. Almeida (1994). "Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers." Archives of biochemistry and biophysics **315**(1): 161-169.
- Diosady, L., S. Rizvi, W. Cai y D. Jagdeo (1996). "Moisture sorption isotherms of canola meals, and applications to packaging." Journal of Food Science **61**(1): 204-208.
- Dobarganes, M. C., G. Márquez Ruiz y J. Velasco (2003). "Variables affecting lipid oxidation in dried microencapsulated oils." Grasas y aceites **54**: 304-314.
- Doco, T., P. Williams y V. Cheynier (2007). "Effect of flash release and pectinolytic enzyme treatments on wine polysaccharide composition." Journal of agricultural and food chemistry **55**(16): 6643-6649.
- Drusch, S. y S. Mannino (2009). "Patent-based review on industrial approaches for the microencapsulation of oils rich in polyunsaturated fatty acids." Trends in Food Science & Technology **20**(6-7): 237-244.
- Drusch, S., Y. Serfert y K. Schwarz (2006a). "Microencapsulation of fish oil with n-octenylsuccinate-derivatised starch: Flow properties and oxidative stability." European Journal of Lipid Science and Technology **108**(6): 501-512.
- Drusch, S., Y. Serfert, A. Van Den Heuvel y K. Schwarz (2006b). "Physicochemical characterization and oxidative stability of fish oil encapsulated in an amorphous matrix containing trehalose." Food Research International **39**(7): 807-815.
- Du, C.-J. y D.-W. Sun (2004). "Recent developments in the applications of image processing techniques for food quality evaluation." Trends in Food Science & Technology **15**(5): 230-249.
- Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers y F. Smith (1956). "Colorimetric method for determination of sugars and related substances." Analytical Chemistry **28**(3): 350-356.

- Elizalde, B., M. Herrera y M. Buera (2002). "Retention of  $\beta$ -Carotene Encapsulated in a Trehalose-based Matrix as Affected by Water Content and Sugar Crystallization." Journal of food science **67**(8): 3039-3045.
- Escalona-García, L., R. Pedroza-Islas, R. Natividad, M. Rodríguez-Huezo, H. Carrillo-Navas y C. Pérez-Alonso (2016). "Oxidation kinetics and thermodynamic analysis of chia oil microencapsulated in a whey protein concentrate-polysaccharide matrix." Journal of Food Engineering **175**: 93-103.
- Fabra, M. J., E. Márquez, D. Castro y A. Chiralt (2011). "Effect of maltodextrins in the water-content–water activity–glass transition relationships of noni (*Morinda citrifolia* L.) pulp powder." Journal of Food Engineering **103**(1): 47-51.
- Feiner, G. (2006). Meat products handbook: Practical science and technology, Elsevier.
- Fennema, S. D. K. L. P. O. R. (2010). Química de Alimentos de Fennema, Artmed Editora.
- Fernández-Ginés, J. M., J. Fernández-López, E. Sayas-Barberá y J. Pérez-Alvarez (2005). "Meat products as functional foods: A review." Journal of food science **70**(2): R37-R43.
- Fernández, I. J. (2003). "Polímeros en Solución y Aplicación de los Polímeros en la Industria Petrolera." Rev. Iber. Pol de la Universidad del País Vasco.
- Fernández, P. V., I. Quintana, A. S. Cerezo, J. J. Caramelo, L. Pol-Fachin, H. Verli, J. M. Estevez y M. Ciancia (2013). "Anticoagulant activity of a unique sulfated pyranosic (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -L-arabinan through direct interaction with thrombin." Journal of Biological Chemistry **288**(1): 223-233.
- Figuroa-Espinoza, M. C., A. Zafimahova, P. G. M. Alvarado, E. Dubreucq y C. Poncet-Legrand (2015). "Grape seed and apple tannins: Emulsifying and antioxidant properties." Food chemistry **178**: 38-44.
- Fioramonti, S. A., M. J. Martínez, A. M. Pilosof, A. C. Rubiolo y L. G. Santiago (2015). "Multilayer emulsions as a strategy for linseed oil microencapsulation: effect of pH and alginate concentration." Food Hydrocolloids **43**: 8-17.
- Frollini, E., W. Reed, M. Milas y M. Rinaudo (1995). "Polyelectrolytes from polysaccharides: selective oxidation of guar gum—A revisited reaction." Carbohydrate Polymers **27**(2): 129-135.
- Furmaniak, S., P. Gauden, A. Terzyk, R. Wesolowski y G. Rychlicki (2005a). "Improving fundamental ideas of Dubinin, Serpinsky and Barton—Further insights into theoretical description of water adsorption on carbons." Annales UMCS (Sectio AA, Chemia) **60**: 151-182.
- Furmaniak, S., A. P. Terzyk y P. A. Gauden (2007a). "The general mechanism of water sorption on foodstuffs—Importance of the multitemperature fitting of data and the hierarchy of models." Journal of Food Engineering **82**(4): 528-535.
- Furmaniak, S., A. P. Terzyk y P. A. Gauden (2011). "Some remarks on the classification of water vapor sorption isotherms and Blahovec and Yanniotis isotherm equation." Drying Technology **29**(8): 984-991.
- Furmaniak, S., A. P. Terzyk, P. A. Gauden y G. Rychlicki (2005b). "Parameterization of the corrected Dubinin–Serpinsky adsorption isotherm equation." Journal of colloid and interface science **291**(2): 600-605.
- Furmaniak, S., A. P. Terzyk, P. A. Gauden y G. Rychlicki (2007b). "Applicability of the generalised D'Arcy and Watt model to description of water sorption on pineapple and other foodstuffs." Journal of Food Engineering **79**(2): 718-723.

- Furmaniak, S., A. P. Terzyk, R. Gołembiewski, P. A. Gauden y L. Czepirski (2009). "Searching the most optimal model of water sorption on foodstuffs in the whole range of relative humidity." Food Research International **42**(8): 1203-1214.
- Gal, A. y A. Nussinovitch (2007). "Hydrocolloid carriers with filler inclusion for diltiazem hydrochloride release." Journal of pharmaceutical sciences **96**(1): 168-178.
- Galazka, V. B., E. Dickinson y D. A. Ledward (1996). "Effect of high pressure on the emulsifying behaviour of  $\beta$ -lactoglobulin." Food Hydrocolloids **10**(2): 213-219.
- Gallardo, G., L. Guida, V. Martinez, M. C. López, D. Bernhardt, R. Blasco, R. Pedroza-Islas y L. G. Hermida (2013). "Microencapsulation of linseed oil by spray drying for functional food application." Food Research International **52**(2): 473-482.
- Gaonkar, A. G., N. Vasisht, A. R. Khare y R. Sobel (2014). Microencapsulation in the food industry: a practical implementation guide, Elsevier.
- Garti, N. y D. J. McClements (2012). Encapsulation technologies and delivery systems for food ingredients and nutraceuticals, Elsevier.
- Gómez-Díaz, D., J. M. Navaza y L. C. Quintáns-Riveiro (2008). "Intrinsic Viscosity and Flow Behaviour of Arabic Gum Aqueous Solutions." International Journal of Food Properties **11**(4): 773-780.
- Gordon, M. y J. S. Taylor (1952). "Ideal copolymers and the second-order transitions of synthetic rubbers. i. non-crystalline copolymers." Journal of Applied Chemistry **2**(9): 493-500.
- Goycoolea, F., E. Morris, R. Richardson y A. Bell (1995a). "Solution rheology of mesquite gum in comparison with gum arabic." Carbohydrate Polymers **27**(1): 37-45.
- Goycoolea, F. M., A. M. Calderón de la Barca, J. R. Balderrama y J. R. Valenzuela (1997). "Immunological and functional properties of the exudate gum from northwestern Mexican mesquite (*Prosopis* spp.) in comparison with gum arabic." International Journal of Biological Macromolecules **21**(1-2): 29-36.
- Goycoolea, F. M., E. R. Morris, R. K. Richardson y A. E. Bell (1995b). "Solution rheology of mesquite gum in comparison with gum arabic." Carbohydrate Polymers **27**(1): 37-45.
- Graham, D. E. y M. C. Phillips (1979). "Proteins at liquid interfaces: I. Kinetics of adsorption and surface denaturation." Journal of Colloid and Interface Science **70**(3): 403-414.
- Grant, G. T., E. R. Morris, D. A. Rees, P. J. Smith y D. Thom (1973). "Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model." FEBS letters **32**(1): 195-198.
- Greenspan, L. (1977). "Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions." Journal of Research of the National Bureau of Standards **81**(1): 89-96.
- Grein, A., B. C. da Silva, C. F. Wendel, C. A. Tischer, M. R. Sierakowski, A. B. D. Moura, M. Iacomini, P. A. Gorin, F. F. Simas-Tosin y I. C. Riegel-Vidotti (2013). "Structural characterization and emulsifying properties of polysaccharides of *Acacia mearnsii* de Wild gum." Carbohydrate polymers **92**(1): 312-320.
- Gu, Y. S., A. E. Decker y D. J. McClements (2005). "Production and Characterization of Oil-in-Water Emulsions Containing Droplets Stabilized by Multilayer Membranes Consisting of  $\beta$ -Lactoglobulin,  $\iota$ -Carrageenan and Gelatin." Langmuir **21**(13): 5752-5760.
- Gutiérrez-López, G. F., L. Alamilla-Beltrán, M. del Pilar Buera, J. Welti-Chanes, E. Parada-Arias y G. V. Barbosa-Cánovas (2015). "Water Stress in Biological, Chemical, Pharmaceutical and Food Systems." Food Engineering.

- Guzey, D. y D. J. McClements (2007). "Impact of Electrostatic Interactions on Formation and Stability of Emulsions Containing Oil Droplets Coated by  $\beta$ -Lactoglobulin–Pectin Complexes." Journal of Agricultural and Food Chemistry **55**(2): 475-485.
- Hagerman, A. E., K. M. Riedl, G. A. Jones, K. N. Sovik, N. T. Ritchard, P. W. Hartzfeld y T. L. Riechel (1998). "High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants." Journal of Agricultural and Food Chemistry **46**(5): 1887-1892.
- Haslam, E. (1996). "Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action." Journal of natural products **59**(2): 205-215.
- Hosseini, H., M. Mahmoudzadeh, M. Rezaei, L. Mahmoudzadeh, R. Khaksar, N. K. Khosroshahi y A. Babakhani (2014). "Effect of different cooking methods on minerals, vitamins and nutritional quality indices of kutum roach (*Rutilus frisii kutum*)." Food Chemistry **148**(0): 86-91.
- Hutchings, J. B. (2011). Food colour and appearance, Springer Science & Business Media.
- Illanes, C. O., E. Quiroga, G. E. Camí y N. A. Ochoa (2013). "Evidence of structural changes of an enzymatic extract entrapped into alginate beads." Biochemical Engineering Journal **70**(0): 23-28.
- Islam, A. M., G. O. Phillips, A. Slijivo, M. J. Snowden y P. A. Williams (1997). "A review of recent developments on the regulatory, structural and functional aspects of gum arabic." Food Hydrocolloids **11**(4): 493-505.
- Ivanov, I., H. Kuhn y D. Heydeck (2015). "Structural and functional biology of arachidonic acid 15-lipoxygenase-1 (ALOX15)." Gene **573**(1): 1-32.
- Jacobsen, C., M. B. Let, N. S. Nielsen y A. S. Meyer (2008). "Antioxidant strategies for preventing oxidative flavour deterioration of foods enriched with n-3 polyunsaturated lipids: a comparative evaluation." Trends in Food Science & Technology **19**(2): 76-93.
- Jiménez-Aguilar, D. M., A. E. Ortega-Regules, J. D. Lozada-Ramírez, M. C. I. Pérez-Pérez, E. J. Vernon-Carter y J. Welti-Chanes (2011). "Color and chemical stability of spray-dried blueberry extract using mesquite gum as wall material." Journal of Food Composition and Analysis **24**(6): 889-894.
- Jiménez-Colmenero, F. (2007). "Healthier lipid formulation approaches in meat-based functional foods. Technological options for replacement of meat fats by non-meat fats." Trends in Food Science & Technology **18**(11): 567-578.
- Jones, O. G. y D. J. McClements (2011). "Recent progress in biopolymer nanoparticle and microparticle formation by heat-treating electrostatic protein–polysaccharide complexes." Advances in colloid and interface science **167**(1): 49-62.
- Josquin, N. M., J. P. H. Linssen y J. H. Houben (2012). "Quality characteristics of Dutch-style fermented sausages manufactured with partial replacement of pork back-fat with pure, pre-emulsified or encapsulated fish oil." Meat Science **90**(1): 81-86.
- Judd, D. B. y G. Wyszecski (1975). "Color in business, science, and industry."
- Kacurakova, M., P. Capek, V. Sasinkova, N. Wellner y A. Ebringerova (2000). "FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses." Carbohydrate Polymers **43**(2): 195-203.
- Kamboj, S. y V. Rana (2014). "Physicochemical, rheological and antioxidant potential of corn fiber gum." Food Hydrocolloids **39**(0): 1-9.
- Khan, N. M., T. H. Mu, F. Ali, L. A. Arogundade, Z. U. Khan, M. Zhang, S. Ahmad y H. N. Sun (2015). "Effects of high hydrostatic pressure on emulsifying properties of sweet potato protein in model protein-hydrocolloids system." Food Chem **169**: 448-454.

- Kolanowski, W., D. Jaworska y J. Weißbrodt (2007). "Importance of instrumental and sensory analysis in the assessment of oxidative deterioration of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid-rich foods." Journal of the Science of Food and Agriculture **87**(2): 181-191.
- Kolanowski, W., M. Ziolkowski, J. Weißbrodt, B. Kunz y G. Laufenberg (2006). "Microencapsulation of fish oil by spray drying--impact on oxidative stability. Part 1." European Food Research and Technology **222**(3-4): 336-342.
- Kralovec, J. A., S. Zhang, W. Zhang y C. J. Barrow (2012). "A review of the progress in enzymatic concentration and microencapsulation of omega-3 rich oil from fish and microbial sources." Food Chemistry **131**(2): 639-644.
- Kris-Etherton, P. M., J. A. Grieger y T. D. Etherton (2009). "Dietary reference intakes for DHA and EPA." Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids **81**(2): 99-104.
- Kris-Etherton, P. M., D. S. Taylor, S. Yu-Poth, P. Huth, K. Moriarty, V. Fishell, R. L. Hargrove, G. Zhao y T. D. Etherton (2000). "Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States." The American journal of clinical nutrition **71**(1): 179S-188S.
- Kunchandy, E. y M. Rao (1990). "Oxygen radical scavenging activity of curcumin." International Journal of Pharmaceutics **58**(3): 237-240.
- Labuza, T., N. Heidelbaugh, M. Silver y M. Karel (1971). "Oxidation at intermediate moisture contents." Journal of the American Oil Chemists Society **48**(2): 86-90.
- Labuza, T., S. Tannenbaum y M. Karel (1970). "Water content and stability of low-moisture & intermediate-moisture foods." Food Technology.
- Lang, K., T. McCune y M. Steinberg (1981). "A proximity equilibration cell for rapid determination of sorption isotherms." Journal of Food Science **46**(3): 936-938.
- Larrieu, S., L. Letenneur, C. Helmer, J. Dartigues y P. Barberger-Gateau (2004). "Nutritional factors and risk of incident dementia in the PAQUID longitudinal cohort." Journal of Nutrition, Health & Aging.
- LeLon, J. K., M. O. Muga, D. W. Odee, C. Wekesa y B. Ndakwe (2010). "Effect of chemical properties of soils on gum elementary compositions from Acacia senegal variety kerensis in Samburu and Marsabit districts."
- Leroux, J., V. Langendorff, G. Schick, V. Vaishnav y J. Mazoyer (2003). "Emulsion stabilizing properties of pectin." Food Hydrocolloids **17**(4): 455-462.
- Li, J.-M. y S.-P. Nie (2016). "The functional and nutritional aspects of hydrocolloids in foods." Food Hydrocolloids **53**: 46-61.
- Li, X.-Y., L.-J. Jin, T. A. McAllister, K. Stanford, J.-Y. Xu, Y.-N. Lu, Y.-H. Zhen, Y.-X. Sun y Y.-P. Xu (2007). "Chitosan-alginate microcapsules for oral delivery of egg yolk immunoglobulin (IgY)." Journal of agricultural and food chemistry **55**(8): 2911-2917.
- Li, X., Y. Fang, S. Al-Assaf, G. O. Phillips, K. Nishinari y H. Zhang (2009). "Rheological study of gum arabic solutions: Interpretation based on molecular self-association." Food Hydrocolloids **23**(8): 2394-2402.
- Li, Y. y D. J. McClements (2011). "Controlling lipid digestion by encapsulation of protein-stabilized lipid droplets within alginate-chitosan complex coacervates." Food Hydrocolloids **25**(5): 1025-1033.
- Liao, L., Y. Luo, M. Zhao y Q. Wang (2012). "Preparation and characterization of succinic acid deamidated wheat gluten microspheres for encapsulation of fish oil." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **92**(0): 305-314.

- Lindberg, B. (1972). "[12] Methylation analysis of polysaccharides." Methods in enzymology **28**: 178-195.
- Liu, Q. (2005). Chemical and functional properties of food saccharides, Elsevier.
- López-Franco, Y., I. Higuera-Ciapara, F. M. Goycoolea y W. Wang (2009). 18 - Other exudates: tragacanth, karaya, mesquite gum and larchwood arabinogalactans. Handbook of Hydrocolloids (Second edition). G. O. Phillips y P. A. Williams, Woodhead Publishing: 495-534.
- López-Franco, Y. L., R. E. Córdova-Moreno, F. M. Goycoolea, M. A. Valdez, J. Juárez-Onofre y J. Lizardi-Mendoza (2012). "Classification and physicochemical characterization of mesquite gum (*Prosopis* spp.)." Food Hydrocolloids **26**(1): 159-166.
- Lopez-Torrez, L., M. Nigen, P. Williams, T. Doco y C. Sanchez (2015). "Acacia senegal vs. Acacia seyal gums – Part 1: Composition and structure of hyperbranched plant exudates." Food Hydrocolloids **51**: 41-53.
- Ma, Q., Y. Zhang y Q. Zhong (2016). "Physical and antimicrobial properties of chitosan films incorporated with lauric arginate, cinnamon oil, and ethylenediaminetetraacetate." LWT - Food Science and Technology **65**: 173-179.
- MacRitchie, F. (1989). "Protein adsorption/desorption at fluid interfaces." Colloids and Surfaces **41**(0): 25-34.
- Mahfoudhi, N., M. Sessa, M. Chouaibi, G. Ferrari, F. Donsi y S. Hamdi (2014). "Assessment of emulsifying ability of almond gum in comparison with gum arabic using response surface methodology." Food Hydrocolloids **37**(0): 49-59.
- Malsawmtluangi, C., K. Thanzami, H. Lahlhenmawia, V. Selvan, S. Palanisamy, R. Kandasamy y L. Pachuau (2014). "Physicochemical characteristics and antioxidant activity of *Prunus cerasoides* D. Don gum exudates." International Journal of Biological Macromolecules **69**(0): 192-199.
- Martinez, K., R. Baeza, F. Millan y A. Pilosof (2005). "Effect of limited hydrolysis of sunflower protein on the interactions with polysaccharides in foams." Food Hydrocolloids **19**(3): 361-369.
- Martinez, M. J., C. C. Sánchez, J. M. R. Patino y A. M. R. Pilosof (2009). "Bulk and interfacial behaviour of caseinoglycomacropeptide (GMP)." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **71**(2): 230-237.
- Maskan, M. y F. Göğüş (2000). "Effect of sugar on the rheological properties of sunflower oil–water emulsions." Journal of Food Engineering **43**(3): 173-177.
- Matalanis, A., O. G. Jones y D. J. McClements (2011). "Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds." Food Hydrocolloids **25**(8): 1865-1880.
- Matanjun, P., S. Mohamed, N. M. Mustapha, K. Muhammad y C. H. Ming (2008). "Antioxidant activities and phenolics content of eight species of seaweeds from north Borneo." Journal of Applied Phycology **20**(4): 367-373.
- Mazzobre, M., M. Longinotti, H. Corti y M. Buera (2001). "Effect of salts on the properties of aqueous sugar systems, in relation to biomaterial stabilization. 1. Water sorption behavior and ice crystallization/melting." Cryobiology **43**(3): 199-210.
- McIntyre, D. D., H. Ceri y H. J. Vogel (1996). "Nuclear magnetic resonance studies of the heteropolysaccharides alginate, gum arabic and gum xanthan." Starch-Stärke **48**(7-8): 285-291.

- McMinn, W. y T. Magee (2003). "Thermodynamic properties of moisture sorption of potato." Journal of Food Engineering **60**(2): 157-165.
- Mecozzi, M. (2005). "Estimation of total carbohydrate amount in environmental samples by the phenol-sulphuric acid method assisted by multivariate calibration." Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems **79**(1-2): 84-90.
- Mestdagh, M. y M. Axelos (1999). "Physico-chemical properties of polycarboxylate gel phase and their incidence on the retention/release of solutes." Les Colloques de l'INRA: 303-314.
- Mhinzi, G. (2004). "Chemotaxonomic distinction of selected closely related Acacia species using chemical properties of their gum exudates." Tanzania Journal of Science **29**(1): 91-98.
- Mhinzi, G. S. (2002). "Properties of gum exudates from selected Albizia species from Tanzania." Food Chemistry **77**(3): 301-304.
- Miklos, R., X. Xu y R. Lametsch (2011). "Application of pork fat diacylglycerols in meat emulsions." Meat science **87**(3): 202-205.
- Mirhosseini, H. y B. T. Amid (2012). "A review study on chemical composition and molecular structure of newly plant gum exudates and seed gums." Food Research International **46**(1): 387-398.
- Mitic, V., V. S. Jovanovic, M. Dimitrijevic, J. Cvetkovic y G. Stojanovic (2013). "Effect of Food Preparation Technique on Antioxidant Activity and Plant Pigment Content in Some Vegetables Species." Journal of Food and Nutrition Research **1**(6): 121-127.
- Möbius, D. y R. Miller (1998). Proteins at Liquid Interfaces, Elsevier Science.
- Mofidi, N., M. Aghai-Moghadam y M. Sarbolouki (2000). "Mass preparation and characterization of alginate microspheres." Process Biochemistry **35**(9): 885-888.
- Montenegro, M. A., C. D. Borsarelli, L. Valle y M. L. Boiero (2012). Gum Arabic: more than an edible emulsifier, INTECH Open Access Publisher.
- Moraga, G., P. Talens, M. Moraga y N. Martínez-Navarrete (2011). "Implication of water activity and glass transition on the mechanical and optical properties of freeze-dried apple and banana slices." Journal of Food Engineering **106**(3): 212-219.
- Mosquera, L. H., G. Moraga y N. Martínez-Navarrete (2012). "Critical water activity and critical water content of freeze-dried strawberry powder as affected by maltodextrin and arabic gum." Food Research International **47**(2): 201-206.
- Nayak, A. K., B. Das y R. Maji (2012). "Calcium alginate/gum Arabic beads containing glibenclamide: Development and in vitro characterization." International Journal of Biological Macromolecules **51**(5): 1070-1078.
- Nedovic, V., A. Kalusevic, V. Manojlovic, S. Levic y B. Bugarski (2011). "An overview of encapsulation technologies for food applications." Procedia Food Science **1**(0): 1806-1815.
- Nussinovitch, A. (2009). Plant Gum Exudates of the World: Sources, Distribution, Properties, and Applications, Taylor & Francis.
- Okwu, D. y F. U. Nnamdi (2008). "Evaluation of the chemical composition of Dacryodes edulis and Raphia hookeri Mann and Wendl exudates used in herbal medicine in south eastern Nigeria." African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines **5**(2): 194-200.

- Olmedilla-Alonso, B., F. Jiménez-Colmenero y F. J. Sánchez-Muniz (2013). "Development and assessment of healthy properties of meat and meat products designed as functional foods." Meat Science **95**(4): 919-930.
- Oroian, M. y I. Escriche (2015). "Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis." Food Research International **74**(0): 10-36.
- Orozco-Villafuerte, J., F. Cruz-Sosa, E. Ponce-Alquicira y E. J. Vernon-Carter (2003). "Mesquite gum: fractionation and characterization of the gum exuded from *Prosopis laevigata* obtained from plant tissue culture and from wild trees." Carbohydrate Polymers **54**(3): 327-333.
- Ortega-Rivas, E., P. Juliano y H. Yan (2006). Food Powders: Physical Properties, Processing, and Functionality, Springer US.
- Oxley, J. (2012). "Coextrusion for food ingredients and nutraceutical encapsulation: principles and technology." Encapsulation Technologies and Delivery Systems for Food Ingredients and Nutraceuticals: 131.
- Palipane, K. y R. Driscoll (1993). "Moisture sorption characteristics of in-shell macadamia nuts." Journal of Food Engineering **18**(1): 63-76.
- Papadakis, S. E., S. Abdul-Malek, R. E. Kamdem y K. L. Yam (2000). "A versatile and inexpensive technique for measuring color of foods." Food Technology **54**(12): 48-51.
- Pardaul, J. J., L. K. Souza, F. A. Molfetta, J. R. Zamian, G. N. Rocha Filho y C. Da Costa (2011). "Determination of the oxidative stability by DSC of vegetable oils from the Amazonian area." Bioresource technology **102**(10): 5873-5877.
- Patiño, E., M. Judis, M. S. Negrette, D. Pochon, J. Cedres, G. Rebak, A. Romero, M. Doval y G. Crudeli (2012). "Influence of fish oil in the concentration of conjugated linoleic acid and omega 6 and 3 in buffalo milk." Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia **64**(2): 427-433.
- Pelser, W. M., J. P. Linssen, A. Legger y J. H. Houben (2007). "Lipid oxidation in n-3 fatty acid enriched Dutch style fermented sausages." Meat Science **75**(1): 1-11.
- Peniche, C., I. Howland, O. Carrillo, C. Zaldívar y W. Argüelles-Monal (2004). "Formation and stability of shark liver oil loaded chitosan/calcium alginate capsules." Food Hydrocolloids **18**(5): 865-871.
- Perduca, M. J., M. J. Spotti, L. G. Santiago, M. A. Judis, A. C. Rubiolo y C. R. Carrara (2013). "Rheological characterization of the hydrocolloid from *Gleditsia amorphoides* seeds." LWT - Food Science and Technology **51**(1): 143-147.
- Pérez-Alonso, C., C. Beristain, C. Lobato-Calleros, M. Rodríguez-Huezo y E. Vernon-Carter (2006a). "Thermodynamic analysis of the sorption isotherms of pure and blended carbohydrate polymers." Journal of Food Engineering **77**(4): 753-760.
- Pérez-Alonso, C., C. I. Beristain, C. Lobato-Calleros, M. E. Rodríguez-Huezo y E. J. Vernon-Carter (2006b). "Thermodynamic analysis of the sorption isotherms of pure and blended carbohydrate polymers." Journal of Food Engineering **77**(4): 753-760.
- Pérez-Alonso, C., J. Cruz-Olivares, J. Barrera-Pichardo, M. Rodríguez-Huezo, J. Báez-González y E. Vernon-Carter (2008). "DSC thermo-oxidative stability of red chili oleoresin microencapsulated in blended biopolymers matrices." Journal of food engineering **85**(4): 613-624.
- Pilosof, A. M. y G. B. Bartholomai (2000). "Caracterización funcional y estructural de proteínas." Ed. Eudeba, Buenos Aires.



- Pilosof, A. M. R., R. Boquet y G. B. Bartholomai (1985). "Kinetics of Water Uptake by Food Powders." Journal of Food Science **50**(1): 278-279.
- Pizones Ruiz-Henestrosa, V. M., M. J. Martínez, C. Carrera Sánchez, J. M. Rodríguez Patino y A. M. R. Pilosof (2014). "Mixed soy globulins and  $\beta$ -lactoglobulin systems behaviour in aqueous solutions and at the air–water interface." Food Hydrocolloids **35**(0): 106-114.
- Pokorny, J., N. Yanishlieva y M. Gordon (2005). "Antioxidantes de los alimentos." Zaragoza, Ed. Acribia SA, 364p.
- Polavarapu, S., C. M. Oliver, S. Ajlouni y M. A. Augustin (2011). "Physicochemical characterisation and oxidative stability of fish oil and fish oil–extra virgin olive oil microencapsulated by sugar beet pectin." Food Chemistry **127**(4): 1694-1705.
- Pongjanyakul, T. y S. Puttipipatkachorn (2007). "Xanthan–alginate composite gel beads: Molecular interaction and in vitro characterization." International Journal of Pharmaceutics **331**(1): 61-71.
- Porter, L. J., L. N. Hrstich y B. G. Chan (1985). "The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin." Phytochemistry **25**(1): 223-230.
- Porto, B. C., P. E. D. Augusto, A. Terekhov, B. R. Hamaker y M. Cristianini (2015). "Effect of dynamic high pressure on technological properties of cashew tree gum (*Anacardium occidentale* L.)." Carbohydrate Polymers **129**: 187-193.
- Puguan, J. M. C., X. Yu y H. Kim (2014). "Characterization of structure, physico-chemical properties and diffusion behavior of Ca-Alginate gel beads prepared by different gelation methods." Journal of colloid and interface science **432**: 109-116.
- Qian, H. F., S. W. Cui, Q. Wang, C. Wang y H. M. Zhou (2011). "Fractionation and physicochemical characterization of peach gum polysaccharides." Food Hydrocolloids **25**(5): 1285-1290.
- Quintanilha, R. C., E. S. Orth, A. Grein-Iankovski, I. C. Riegel-Vidotti y M. Vidotti (2014). "The use of gum Arabic as "Green" stabilizer of poly(aniline) nanocomposites: A comprehensive study of spectroscopic, morphological and electrochemical properties." Journal of Colloid and Interface Science **434**(0): 18-27.
- Rahman, M. S. (2010). "Food stability determination by macro–micro region concept in the state diagram and by defining a critical temperature." Journal of food engineering **99**(4): 402-416.
- Rahman, M. S. (2012). "Applications of macro–micro region concept in the state diagram and critical temperature concepts in determining the food stability." Food Chemistry **132**(4): 1679-1685.
- Ramoneda, X. A., P. A. Ponce-Cevallos, M. del Pilar Buera y B. E. Elizalde (2011). "Degradation of beta-carotene in amorphous polymer matrices. Effect of water sorption properties and physical state." J Sci Food Agric **91**(14): 2587-2593.
- Rana, V., P. Rai, A. K. Tiwary, R. S. Singh, J. F. Kennedy y C. J. Knill (2011). "Modified gums: Approaches and applications in drug delivery." Carbohydrate Polymers **83**(3): 1031-1047.
- Randall, R. C., G. O. Phillips y P. A. Williams (1988). "The role of the proteinaceous component on the emulsifying properties of gum arabic." Food Hydrocolloids **2**(2): 131-140.
- Randall, R. C., G. O. Phillips y P. A. Williams (1989). "Fractionation and characterization of gum from *Acacia senegal*." Food Hydrocolloids **3**(1): 65-75.

- Rao, A. (2010). Rheology of Fluid and Semisolid Foods: Principles and Applications: Principles and Applications, Springer.
- Rayment, P., P. Wright, C. Hoad, E. Ciampi, D. Haydock, P. Gowland y M. F. Butler (2009). "Investigation of alginate beads for gastro-intestinal functionality, Part 1: In vitro characterisation." Food Hydrocolloids **23**(3): 816-822.
- Rehm, B. H. A. (2009). Alginates: Biology and Applications: Biology and Applications, Springer.
- Relkin, P. y S. Sourdets (2005). "Factors affecting fat droplet aggregation in whipped frozen protein-stabilized emulsions." Food Hydrocolloids **19**(3): 503-511.
- Román-Guerrero, A., J. Orozco-Villafuerte, J. P. Pérez-Orozco, F. Cruz-Sosa, R. Jiménez-Alvarado y E. J. Vernon-Carter (2009). "Application and evaluation of mesquite gum and its fractions as interfacial film formers and emulsifiers of orange peel-oil." Food Hydrocolloids **23**(3): 708-713.
- Roos, Y. H. y Y. H. Roos (1995). Phase transitions in foods, Academic Press.
- Roque, A. C. A., A. Bicho, I. L. Batalha, A. S. Cardoso y A. Hussain (2009). "Biocompatible and bioactive gum Arabic coated iron oxide magnetic nanoparticles." Journal of Biotechnology **144**(4): 313-320.
- Rosa, G. S., M. A. Moraes y L. A. Pinto (2010). "Moisture sorption properties of chitosan." LWT-Food Science and Technology **43**(3): 415-420.
- Rubio-Rodríguez, N., S. Beltrán, I. Jaime, S. M. de Diego, M. T. Sanz y J. R. Carballido (2010). "Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review." Innovative Food Science & Emerging Technologies **11**(1): 1-12.
- Ruíz-Henestrosa, V. P., C. C. Sánchez y J. M. Rodríguez Patino (2008). "Adsorption and Foaming Characteristics of Soy Globulins and Tween 20 Mixed Systems." Industrial & Engineering Chemistry Research **47**(9): 2876-2885.
- Salcedo-Sandoval, L., S. Cofrades, C. Ruiz-Capillas, A. Matalanis, D. J. McClements, E. A. Decker y F. Jiménez-Colmenero (2015). "Oxidative stability of n-3 fatty acids encapsulated in filled hydrogel particles and of pork meat systems containing them." Food chemistry **184**: 207-213.
- Salminen, H., K. Herrmann y J. Weiss (2013). "Oil-in-water emulsions as a delivery system for n-3 fatty acids in meat products." Meat Science **93**(3): 659-667.
- Santagapita, P. R. (2010). Estabilidad de enzimas en medios de distinta movilidad molecular. Impacto de interacciones con azúcares y biopolímeros y de la encapsulación, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Santagapita, P. R., M. F. Mazzobre y M. d. P. Buera (2012). "Invertase stability in alginate beads: Effect of trehalose and chitosan inclusion and of drying methods." Food Research International **47**(2): 321-330.
- Santos Biloni, J. y C. A. Guastavino (1990). "Árboles autóctonos argentinos."
- Scheeder, M. R. L., M. M. Casutt, M. Roulin, F. Escher, P. A. Dufey y M. Kreuzer (2001). "Fatty acid composition, cooking loss and texture of beef patties from meat of bulls fed different fats." Meat Science **58**(3): 321-328.
- Schmitt, D., N. Tran, S. Riefler, J. Jacoby, D. Merkel, P. Marone y N. Naouli (2008). "Toxicologic evaluation of modified gum acacia: mutagenicity, acute and subchronic toxicity." Food and chemical toxicology **46**(3): 1048-1054.

- Seeram, N. P. (2008). "Berry fruits: compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease." Journal of agricultural and food chemistry **56**(3): 627-629.
- Seta, L., N. Baldino, D. Gabriele, F. R. Lupi y B. d. Cindio (2014). "Rheology and adsorption behaviour of  $\beta$ -casein and  $\beta$ -lactoglobulin mixed layers at the sunflower oil/water interface." Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **441**(0): 669-677.
- Shah, N. P. (2007). "Functional cultures and health benefits." International Dairy Journal **17**(11): 1262-1277.
- Shahidi, F. y Y. Zhong (2005). "Lipid oxidation: measurement methods." Bailey's industrial oil and fat products.
- Shen, Y., L. Jin, P. Xiao, Y. Lu y J. Bao (2009). "Total phenolics, flavonoids, antioxidant capacity in rice grain and their relations to grain color, size and weight." Journal of Cereal Science **49**(1): 106-111.
- Shimada, Y., Y. Roos y M. Karel (1991). "Oxidation of methyl linoleate encapsulated in amorphous lactose-based food model." Journal of Agricultural and Food Chemistry **39**(4): 637-641.
- Sibaja-Hernández, R., A. Román-Guerrero, G. Sepúlveda-Jiménez y M. Rodríguez-Monroy (2015). "Physicochemical, shear flow behaviour and emulsifying properties of Acacia cochliacantha and Acacia farnesiana gums." Industrial Crops and Products **67**(0): 161-168.
- Simatos, D. y M. Karel (1988). "Characterization of the condition of water in foods: physico-chemical aspects."
- Sims, I. M. y R. H. Furneaux (2003). "Structure of the exudate gum from *Meryta sinclairii*." Carbohydrate polymers **52**(4): 423-431.
- Singh, V. y S. K. Singh (2011). "Synthesis and characterization of gum acacia inspired silica hybrid xerogels for mercury(II) adsorption." International Journal of Biological Macromolecules **48**(3): 445-451.
- Slade, L., H. Levine y D. S. Reid (1991). "Beyond water activity: recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety." Critical Reviews in Food Science & Nutrition **30**(2-3): 115-360.
- Smrdel, P., M. Bogataj y A. Mrhar (2008). "The influence of selected parameters on the size and shape of alginate beads prepared by ionotropic gelation." Scientia Pharmaceutica **76**(1): 77.
- Soazo, M., A. Rubiolo y R. Verdini (2011). "Effect of drying temperature and beeswax content on moisture isotherms of whey protein emulsion film." Procedia Food Science **1**: 210-215.
- Syamaladevi, R. M., S. S. Sablani, J. Tang, J. Powers y B. G. Swanson (2010). "Water sorption and glass transition temperatures in red raspberry (*Rubus idaeus*)." Thermochemica Acta **503**: 90-96.
- Tan, J. B. L. y Y. Y. Lim (2015). "Critical analysis of current methods for assessing the in vitro antioxidant and antibacterial activity of plant extracts." Food chemistry **172**: 814-822.
- Taylor, J. (2004). "Digital Color Imaging Handbook." Color Research & Application **29**(5): 395-397.

- Thompson, D. S., L. J. Markoski, J. S. Moore, I. Sendijarevic, A. Lee y A. J. McHugh (2000). "Synthesis and characterization of hyperbranched aromatic poly (ether imide) s with varying degrees of branching." Macromolecules **33**(17): 6412-6415.
- Tiwari, A. y V. Singh (2008). "Microwave-induced synthesis of electrical conducting gum acacia-graft-polyaniline." Carbohydrate Polymers **74**(3): 427-434.
- Tonon, R. V., A. F. Baroni, C. Brabet, O. Gibert, D. Pallet y M. D. Hubinger (2009). "Water sorption and glass transition temperature of spray dried açai (Euterpe oleracea Mart.) juice." Journal of Food Engineering **94**(3): 215-221.
- Torgersen, H. y R. Toledo (1977). "Physical properties of protein preparations related to their functional characteristics in comminuted meat systems." Journal of Food Science **42**(6): 1615-1620.
- Torres, M. D., R. Moreira, F. Chenlo y M. J. Vázquez (2012). "Water adsorption isotherms of carboxymethyl cellulose, guar, locust bean, tragacanth and xanthan gums." Carbohydrate polymers **89**(2): 592-598.
- Trejo-Espino, J. L., M. Rodríguez-Monroy, E. J. Vernon-Carter y F. Cruz-Sosa (2010). "Emulsifying properties of the gum produced by *Prosopis laevigata* (humb. & bonpl. ex willd) m.c. johnst (mesquite) cells suspension culture in bioreactor." Revista Mexicana de Ingeniería Química **9**(3): 251-260.
- Tur, J. A. y M. M. Bibiloni (2016a). Functional Foods. Encyclopedia of Food and Health. B. Caballero, P. M. Finglas y F. Toldrá. Oxford, Academic Press: 157-161.
- Tur, J. A. y M. M. Bibiloni (2016b). Functional Foods A2 - Caballero, Benjamin. Encyclopedia of Food and Health. P. M. Finglas y F. Toldrá. Oxford, Academic Press: 157-161.
- Valencia, I., M. O'Grady, D. Ansorena, I. Astiasaran y J. Kerry (2008). "Enhancement of the nutritional status and quality of fresh pork sausages following the addition of linseed oil, fish oil and natural antioxidants." Meat Science **80**(4): 1046-1054.
- van den Berg, C. y S. Bruin (1981). WATER ACTIVITY AND ITS ESTIMATION IN FOOD SYSTEMS: THEORETICAL ASPECTS. Water Activity: Influences on Food Quality. L. B. R. F. Stewart, Academic Press: 1-61.
- Vasile, F. E., A. M. Romero, M. A. Judis y M. F. Mazzobre (2015). "Prosopis alba exudate gum as excipient for improving fish oil stability in alginate-chitosan beads." Food Chemistry.
- Vásquez, C., P. Díaz-Calderón, J. Enrione y S. Matiacevich (2013). "State diagram, sorption isotherm and color of blueberries as a function of water content." Thermochimica Acta **570**: 8-15.
- Velasco, J., C. Dobarganes, F. Holgado y G. Márquez-Ruiz (2009a). "A follow-up oxidation study in dried microencapsulated oils under the accelerated conditions of the Rancimat test." Food Research International **42**(1): 56-62.
- Velasco, J., F. Holgado, C. Dobarganes y G. Márquez-Ruiz (2009b). "Influence of relative humidity on oxidation of the free and encapsulated oil fractions in freeze-dried microencapsulated oils." Food Research International **42**(10): 1492-1500.
- Velasco, J. n., M. L. Andersen y L. H. Skibsted (2004). "Evaluation of oxidative stability of vegetable oils by monitoring the tendency to radical formation. A comparison of electron spin resonance spectroscopy with the Rancimat method and differential scanning calorimetry." Food Chemistry **85**(4): 623-632.

- Velázquez-Gutiérrez, S. K., A. C. Figueira, M. E. Rodríguez-Huezo, A. Román-Guerrero, H. Carrillo-Navas y C. Pérez-Alonso (2015). "Sorption isotherms, thermodynamic properties and glass transition temperature of mucilage extracted from chia seeds (*Salvia hispanica* L.)." Carbohydrate polymers **121**: 411-419.
- Verbeken, D., S. Dierckx y K. Dewettinck (2003). "Exudate gums: occurrence, production, and applications." Appl Microbiol Biotechnol **63**(1): 10-21.
- Vernon-Carter, E. J., C. I. Beristain y R. Pedroza-Islas (2000). Mesquite gum (Prosopis gum). Developments in Food Science. G. Doxastakis y V. Kiosseoglou, Elsevier. **Volume 41**: 217-238.
- Vernon-Carter, E. J., S. A. GÓmez, C. I. BeristaÍN, G. Mosqueira, R. Pedroza-Islas y R. C. Moreno-Terrazas (1996). "COLOR DEGRADATION AND COALESCENCE KINETICS OF AZTEC MARIGOLD OLEORESIN-IN-WATER EMULSIONS STABILIZED BY MESQUITE OR ARABIC GUMS AND THEIR BLENDS." Journal of Texture Studies **27**(6): 625-641.
- Vernon-Carter, E. J., R. Pedroza-Islas y C. I. Beristain (1998). "STABILITY OF CAPSICUM ANNUUM OLEORESIN-IN-WATER EMULSIONS CONTAINING PROSOPIS AND ACACIA GUMS." Journal of Texture Studies **29**(5): 553-567.
- von Martius, S., K. A. Hammer y C. Locher (2012). "Chemical characteristics and antimicrobial effects of some Eucalyptus kinos." J Ethnopharmacol **144**(2): 293-299.
- von Müller, A. R., C. B. López, A. R. Eynard y C. A. Guzmán (2009). "Subchronic toxicological evaluation of brea gum (*Parkinsonia preacox*) as a food additive in BALB/c mice." Drug and chemical toxicology **32**(4): 307-311.
- von Staszewski, M., V. M. Pizones Ruiz-Henestrosa y A. M. R. Pilosof (2014). "Green tea polyphenols- $\beta$ -lactoglobulin nanocomplexes: Interfacial behavior, emulsification and oxidation stability of fish oil." Food Hydrocolloids **35**(0): 505-511.
- Vongsvivut, J., P. Heraud, W. Zhang, J. A. Kralovec, D. McNaughton y C. J. Barrow (2012). "Quantitative determination of fatty acid compositions in micro-encapsulated fish-oil supplements using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy." Food Chemistry **135**(2): 603-609.
- Wang, W., G. I. N. Waterhouse y D. Sun-Waterhouse (2013). "Co-extrusion encapsulation of canola oil with alginate: Effect of quercetin addition to oil core and pectin addition to alginate shell on oil stability." Food Research International **54**(1): 837-851.
- Wichchukit, S., M. Oztop, M. McCarthy y K. McCarthy (2013). "Whey protein/alginate beads as carriers of a bioactive component." Food Hydrocolloids **33**(1): 66-73.
- Wilde, P., A. Mackie, F. Husband, P. Gunning y V. Morris (2004). "Proteins and emulsifiers at liquid interfaces." Advances in Colloid and Interface Science **108–109**(0): 63-71.
- Williams, P. A. (2008). Handbook of Industrial Water Soluble Polymers, Wiley.
- Williams, P. A. y G. O. Phillips (2009). 11 - Gum arabic. Handbook of Hydrocolloids (Second edition). G. O. Phillips y P. A. Williams, Woodhead Publishing: 252-273.
- Wu, Y., W. Ding, L. Jia y Q. He (2015). "The rheological properties of tara gum (*Caesalpinia spinosa*)." Food Chemistry **168**(0): 366-371.
- Xiong, X., M. Li, J. Xie, Q. Jin, B. Xue y T. Sun (2013). "Antioxidant activity of xanthan oligosaccharides prepared by different degradation methods." Carbohydrate Polymers **92**(2): 1166-1171.

- Yang, J., S. Han, H. Zheng, H. Dong y J. Liu (2015). "Preparation and application of micro/nanoparticles based on natural polysaccharides." Carbohydrate Polymers **123**: 53-66.
- Yao, X. C., Y. Cao y S. J. Wu (2013). "Antioxidant activity and antibacterial activity of peach gum derived oligosaccharides." Int J Biol Macromol **62**: 1-3.
- Ye, A. y H. Singh (2006). "Heat stability of oil-in-water emulsions formed with intact or hydrolysed whey proteins: influence of polysaccharides." Food hydrocolloids **20**(2): 269-276.
- Yi, H. C., H. Cho, J. J. Hong, R. K. Ryu, K. T. Hwang y J. M. Regenstein (2012). "Physicochemical and organoleptic characteristics of seasoned beef patties with added glutinous rice flour." Meat science **92**(4): 464-468.
- Zhang, W., S. Xiao, H. Samaraweera, E. J. Lee y D. U. Ahn (2010). "Improving functional value of meat products." Meat Science **86**(1): 15-31.
- Zuidam, N. J. y V. Nedović (2010). Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing, Springer.